

Juliana Lima Von Ammon

**ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E
PAINEL MULTIGÊNICO NO CARCINOMA
DE TIREOIDE DERIVADO DE CÉLULAS
FOLICULARES**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**



JULIANA LIMA VON AMMON

**ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E PAINEL MULTIGÊNICO NO
CARCINOMA DE TIREOIDE DERIVADO DE CÉLULAS
FOLICULARES**

Salvador
2022

JULIANA LIMA VON AMMON

**ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E PAINEL MULTIGÊNICO NO
CARCINOMA DE TIREOIDE DERIVADO DE CÉLULAS
FOLICULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos
Coorientadora: Dra. Taise Lima de Oliveira
Cerqueira

Salvador
2022

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Von Ammon, Juliana Lima

Aspectos clínico-patológicos e painel multigênico no carcinoma de tireoide derivado de células foliculares./ [Manuscrito]. Juliana Lima Von Ammon. Salvador, 2022.

90f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos.

Coorientadora: Taise Lima de Oliveira Cerqueira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2022.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Carcinoma papilífero da tireoide. 3. Sequenciamento de Nova Geração. 4. Proteínas Proto-Oncogênicas B-raf. 5. Mutação. 6. Mutação Pontual. I. Ramos, Helton Estrela. II. Cerqueira, Taise Lima de Oliveira. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 614.5999 21. ed.

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO - ICS - UFBA



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

JULIANA LIMA VON AMMON

ASPECTOS CLÍNICOPATOLÓGICOS E PAINEL MULTIGÊNICO NO CARCINOMA
DE TIREOIDE DERIVADO DE CÉLULAS FOLICULARES

Salvador, Bahia, 21 de dezembro de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:

Helton Estrela Ramos

#C61554693C4489

PROF. DR. HELTON ESTRELA RAMOS (Examinador Interno)

DocuSigned by:

Tatiane de Oliveira Teixeira Muniz Carletto

#C61554693C4489

PROFA. DRA. TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA MUNIZ CARLETTO (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

Gustavo Cancela e Penna

#C61554693C4489

PROF. DR. GUSTAVO CANCELA E PENNA (Examinador Externo)

Para meus pais, Gotz e Juvenilda,
meu marido, Davide,
e meus irmãos Mariana e Lucas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Gotz e Juvenilda, por todo apoio, amor e educação.

Ao meu marido, Davide, que esteve sempre ao meu lado me apoiando e auxiliando nos momentos de dificuldades. Obrigado por todo amor e suporte nesse período.

Aos meus irmãos Mariana e Lucas, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus sogros, Fabrizio e Nilzete, por todo apoio, auxílio e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Helton Estrela Ramos, muito obrigada por todo conhecimento adquirido, por me confiar na execução deste projeto, por toda compreensão, paciência e pelo estímulo.

A Dra. Taise Lima, minha coorientadora, pelo apoio, pelos ensinamentos, pela disponibilidade e pelo incentivo.

Ao Laboratório Studart, Sr. Paulo, Dr. Eduardo e Sr. João, por todo suporte e incentivo à educação.

A Dra. Gabriela Félix, pelos conhecimentos, incentivo e apoio.

Aos meus colegas de mestrado, Gabriel e Rafael, por toda parceria e ajuda, tornando os momentos difíceis mais leves.

A Dra. Ana Telles e Dr. Marcos Pinheiro, pelo auxílio e pela disponibilidade.

Aos colaboradores do Hospital Aristides Maltez (HAM), pelo trabalho oferecido e pela disponibilidade.

Von Ammon JL. Aspectos clínico-patológicos e painel multigênico no carcinoma de tireoide derivado de células foliculares [dissertação]. Salvador: Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia; 2022. 90 p.

RESUMO

Introdução: O carcinoma de tireoide derivado de células foliculares (CTDCF) constitui a maioria das neoplasias da tireoide, correspondendo a quase 90% dos casos. A análise do perfil molecular tumoral, através da técnica de sequenciamento de nova geração (SNG), vem sendo essencial para o rastreamento de mutações acionáveis do câncer e, conseqüentemente, na identificação dos casos que podem evoluir para um comportamento mais agressivo da doença. O manejo clínico do CTDCF vem evoluindo devido a uma melhor compreensão dos impactos das alterações genéticas relatadas nos principais *drivers* gênicos envolvidos na hiperativação das vias *MAPK* e *PI3K-AKT*. No entanto, a correlação clínico-patológica dessas alterações genéticas ainda é pouco compreendida, sobretudo em pacientes da América Latina.

Objetivos: Correlacionar aspectos clínico-patológicos do CTDCF em pacientes adultos com mutações através de um painel multigênico customizado. **Material e Métodos:** Estudo retrospectivo, transversal, unicêntrico, envolvendo 100 pacientes adultos diagnosticados com CTDCF, entre 2010 e 2019, no Hospital Aristides Maltez em Salvador, Bahia. Foi realizada revisão anatomopatológica por patologista colaborador. DNA tumoral parafinado foi extraído com o ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, EUA). Genotipagem das regiões genômicas alvos (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR* e *PIK3CA*) foram realizadas através do painel Ampliseq personalizado, e o sequenciamento realizado na plataforma iSeq™ 100 (Illumina®, EUA). Análises de bioinformática foram realizadas na plataforma Varstation™ baseada em nuvem. **Resultados:** Realizada a técnica de SNG, 54/100 (54%) apresentaram resultado satisfatório, e 46/100 (46%) amostras apresentaram resultado inconclusivo. Através do nosso painel mutacional customizado, 31/54 (57%) das amostras apresentaram mutações nos genes analisados, 83% de subtipo papilífero clássico (CPTC), idade média de 39 anos, 87% do sexo feminino, e média do tamanho tumoral de 2,14 cm. 23/54 (42,6%) não apresentaram nenhuma mutação (selvagem). As mutações no gene *BRAF* foram as mais frequentes 18/54 (33%), detectadas em maioria no CPTC. 10/54 (18%) amostras apresentaram a mutação *BRAF*^{V600E}, e encontramos 7 mutações *BRAF*^{NO-V600E} ainda não descritas em CTDCF (G464E, G464R, G466E, S467L, G469E, G596D e a deleção T599Ifs*10) e a mutação *BRAF*^{A598V} já previamente reportada. A *BRAF*^{G464E} e *BRAF*^{G596D} foram detectadas em dois casos CT cribriforme morular, a *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G464R} e *BRAF*^{A598V} estiveram presentes em CPTC, a deleção *BRAF*^{T599Ifs*10} observada em uma variante sólida de CPT, e a *BRAF*^{S467L} esteve presente em um caso de variante folicular infiltrativa de CPT e em CPTC; todas as amostras com ausência de extensão extratireoidiana (EET). Mutações no gene *EGFR* foram encontradas em 16/54 (29%) das amostras tumorais, todas do subtipo CPTC, e nos genes *RAS* (*KRAS* e *NRAS*) foram encontradas 8/54 (14%) mutações. Não foram encontradas mutações no gene *PIK3CA*, amostras tiveram múltiplas mutações: 3 (*BRAF*^{V600E}/*EGFR*), 3 (*BRAF*^{NO-V600E}/*EGFR*), 2 (*BRAF*^{V600E}/*BRAF*^{NO-V600E}), 3 (*BRAF*/*RAS*), sendo que 1 amostra de CPTC, tumor de 4cm e EET presente apresentou 3 mutações simultaneamente nos genes *KRAS*^{D119N}, *NRAS*^{Q61*} e *EGFR*^{H850Rfs*26}. **Conclusão:** Neste estudo, não foi encontrada associação significativa entre CTDCF e as mutações *BRAF*^{V600E}, *KRAS*, *NRAS* e *EGFR*. Entretanto, as variantes *BRAF*^{NO-V600E} foram significativamente evidentes e associadas a um menor risco de EET. Os achados deste estudo trazem a relevância da realização de um painel multigênico por SNG nos casos de CTDCF, com a finalidade em

expandir o conhecimento sobre a frequência e os impactos das alterações genéticas associadas a essa patologia.

Palavras-chave: Neoplasias da glândula tireoide. Carcinoma papilífero da tireoide. Sequenciamento de Nova Geração. Proteínas proto-oncogênicas B-raf. Mutação. Mutação Puntual.

Von Ammon JL. Clinicopathological aspects and multigene panel in follicular cell-derived thyroid carcinoma [dissertation]. Salvador: Postgraduate Program in Interactive Processes of Organs and Systems, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia; 2022. 90 p.

ABSTRACT

Introduction: Follicular cell-derived thyroid carcinoma (FCDTC) constitutes the majority of thyroid neoplasms, accounting for almost 90% of cases. The tumor molecular profile analysis, through the technique of next generation sequencing (NGS), has been essential for the tracking of actionable mutations in cancer and, consequently, in the identification of cases that may evolve to a more aggressive behavior of the disease. The clinical management of FCDTC has evolved due to a better understanding of the impacts of genetic alterations reported on the main gene drivers involved in the hyperactivation of the MAPK and PI3K-AKT pathways. However, the clinicopathological correlation of these genetic alterations is still poorly understood, especially in patients from Latin America. **Objectives:** To correlate clinicopathological aspects of FCDTC in adult patients with mutations through a customized multigenic panel. **Material and Methods:** Retrospective, cross-sectional, unicentric study, involving 100 adult patients diagnosed with FCDTC, between 2010 and 2019, at Hospital Aristides Maltez in Salvador, Bahia. The anatomopathological data were reviewed by a pathologist. Paraffinized tumor DNA was extracted with the ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, USA). Genotyping of target genomic regions (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR* and *PIK3CA*) was performed using the customized Ampliseq panel and sequencing performed on the iSeq™ 100 platform (Illumina®, USA). Bioinformatics analyzes were performed on the cloud-based Varstation™ platform. **Results:** After performing the NGS technique, 54/100 (54%) presented satisfactory results, and 46/100 (46%) samples presented inconclusive results. Through our customized mutational panel, 31/54 (57%) of the samples had mutations in the analyzed genes, 83% of classic papillary subtype (CPTC), mean age of 34 years, 83% female, and mean tumor size of 2.21 cm. 23/54 (42.6%) did not present any mutation (wild). Mutations in the *BRAF* gene were the most frequent ($\geq 58\%$ of the mutations found), most of them present in CPTC. 10/54 (18%) samples had the *BRAF*^{V600E} mutation, and surprisingly, we found 7 *BRAF*^{NO-V600E} mutations not yet described in FCDTC (G464E, G464R, G466E, S467L, G469E, G596D and the T599Ifs*10 deletion) and the *BRAF*^{A598V} mutation previously reported. *BRAF*^{G464E} and *BRAF*^{G596D} were detected in two cribriform morular CT cases, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G464R} and *BRAF*^{A598V} were present in CPTC, the *BRAF*^{T599Ifs*10} deletion observed in a solid variant of CPT, and *BRAF*^{S467L} was present in one case of an infiltrative follicular variant from CPT and CPTC; all samples with absence of extrathyroidal extension (ETE). Mutations in the *EGFR* gene were found in 16/54 (29%) of the tumor samples, all of the CPTC subtype, and in the *RAS* genes (*KRAS* and *NRAS*), 8/54 (14%) mutations were found. No mutations were found in the *PIK3CA* gene. Interestingly, 12 samples had multiple mutations: 3 (*BRAF*^{V600}/*EGFR*), 3 (*BRAF*^{NO-V600}/*EGFR*), 2 (*BRAF*^{V600}/*BRAF*^{NO-V600}), 3 (*BRAF*/*RAS*), with 1 CPTC sample with 4cm and ETE present presented three mutations simultaneously in the *KRAS*^{SD119N}, *NRAS*^{Q61*} and *EGFR*^{H850Rfs*26} genes. **Conclusion:** In this study, no significant association was found between FCDTC and *BRAF*^{V600E}, *KRAS*, *NRAS* and *EGFR* mutations. However, the *BRAF*^{NO-V600E} variants were significantly evident and associated with a lower risk of ETE. The findings of this study bring the relevance of carrying out a multigene panel by NGS in cases of

FCDTC, with the purpose of expanding knowledge about the frequency and impacts of genetic alterations associated with this pathology.

Keywords: Thyroid Neoplasms. Papillary thyroid carcinoma. Next-generation sequencing. Proto-oncogene Proteins B-raf. Mutation. Point Mutation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Taxas de incidência de CT padronizadas por idade, região e sexo em 2020. As taxas são mostradas em ordem decrescente. 23
- Figura 2-** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais comuns estimados para 2020 por sexo, exceto pele (não melanoma) 23
- Figura 3-** Vias MAPK e AKT no câncer de tireoide. Visão geral esquematizada das vias de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e AKT, no estado fisiológico (esquerda) e neoplásico (direita). Após a ativação dos receptores de tirosinas quinases (RTKs; incluindo RET e TRK1/3) através de ligantes extracelulares, os RTKs dimerizam e ativam a via MAPK, pela ativação de proteínas RAS e também estimulam a cascata PI3K-AKT, através de PIK3. Ambas as vias estimulam a proliferação, angiogênese e migração de células. No câncer de tireoide (à direita), vários genes de fusão ou mutações simulam a ativação fisiológica dos RTKs, levando à sinalização constitutivamente ativa de MAPK e PI3K-AKT, mesmo na ausência de ligantes extracelulares. As fusões RET e NTRK1/3 (estrelas amarelas), ativando as mutações PIK3CA, AKT, RAS e BRAF (estrela verde), bem como as mutações deletérias do PTEN (estrela vermelha), são destacadas 26
- Figura 4-** Mutações *RAS* no CTDCF. No tecido tireoidiano normal, as proteínas RAS mediam a ativação dos receptores de tirosina quinase (esquerda). As formas mutantes de RAS (mutRAS) são ativas na ausência de estímulos extracelulares e são capazes de ativar as vias MAPK e PI3K, esta última com maior força (direita). Como não há inibidores usados para direcionar diretamente o RAS, a figura mostra os pequenos inibidores de quinase que visam o efetor MEK a jusante em caixas tracejadas. As setas indicam a ativação (\rightarrow), e as linhas truncadas, inativação ($-$), a seta dupla indica um estado reversível (\rightleftharpoons). As setas vermelhas indicam fluxo aumentado 30
- Figura 5-** Mutação *BRAF*^{V600E} no CTDCF. As proteínas *RAF* são um dos principais efetores do *RAS* e estão sujeitas à regulação negativa no tecido normal. O *BRAF*^{V600E} oncogênico ativa a via MAPK independentemente de estímulos extracelulares e não requer dimerização. Portanto, não há regulação negativa da dimerização ERK para RAF, induzindo uma forte ativação da via (direita). Pequenos inibidores de quinase contra BRAF são mostrados em caixas tracejadas. As setas indicam ativação (\rightarrow) e inativação de linhas truncadas ($-$). As setas vermelhas indicam fluxo aumentado através da via 34
- Figura 6-** Fluxo de um teste de painel de genes baseado em sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando tecido fixado em formalina e incorporado em parafina (FFPE). A preparação e preservação do tecido FFPE é a primeira etapa do teste do painel, seguida pela extração de DNA, sequenciamento por NGS, análise dos dados e laudo com os resultados encontrados e recomendações terapêuticas 40
- Figura 7-** Lâmina em HE com marcação tumoral e lâmina com corte tumoral em 10 μ M 42
- Figura 8-** Amostra de DNA extraído 43
- Figura 9-** Fluxograma de amostragem para análise por NGS 48
- Figura 10-** Gráfico do resultado do painel multigênico por NGS 49

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Mutações dos genes <i>BRAF</i> , <i>RAS</i> , <i>PIK3CA</i> e <i>EGFR</i> no CTDCF e seu respectivo impacto funcional no comportamento biológico do tumor | 28 |
| Tabela 2- Mutações dos genes <i>RAS</i> descritas em CTDCF | 31 |
| Tabela 3- Mutações do gene <i>BRAF</i> descritas em CTDCF | 35 |
| Tabela 4- Mutações do gene <i>PIK3CA</i> descritas em CTDCF | 36 |
| Tabela 5- Mutações do gene <i>EGFR</i> descritas em CTDCF | 38 |
| Tabela 6- Características clínico-patológicas dos pacientes com CTDCF | 47 |
| Tabela 7- Dados anatomopatológicos e correlação com mutações encontradas através de painel gênico customizado | 50 |
| Tabela 8- Análise estatística comparativa de características anatomopatológicas de amostras portadoras de mutações <i>BRAF</i> ^{NO-V600} vs. <i>BRAF</i> ^{V600E} | 53 |
| Tabela 9- Mutações <i>BRAF</i> ^{NO-V600E} encontradas em CTDCF | 54 |
| Tabela 10- Análise de predição dos efeitos das mutações no gene <i>BRAF</i> sobre a estabilidade da proteína | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| AJCC | <i>American Joint Committee on Cancer</i> |
| AKT | <i>Protein Kinase B</i> |
| ARAF | <i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i> |
| BRAF | <i>v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B</i> |
| CDFAG | Carcinoma derivado de folículos de alto grau |
| CDTAG | Carcinoma diferenciado de tireoide de alto grau |
| CEP | Comitê de ética e pesquisa em seres humanos |
| CFAI | Carcinoma folicular amplamente invasivo |
| CFT | Carcinoma folicular de tireoide |
| CID | Classificação Internacional de doenças |
| CMT | Carcinoma medular de tireoide |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| COT | Carcinoma oncocítico da tireoide |
| CPT | Carcinoma papilífero de tireoide |
| CPTC | Carcinoma papilífero de tireoide clássico |
| CPTVFI | Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular infiltrativo |
| CPVFEI | Carcinoma papilífero variante folicular encapsulado invasivo |
| CPTVS | Carcinoma papilífero variante sólida |
| CPTVO | Carcinoma papilífero variante oncocítica |
| CRAF | <i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> |
| CT | Câncer de tireoide |
| CTDCF | Carcinoma de tireoide derivado de células foliculares |
| CTDCFA | Carcinoma de tireoide derivado de células foliculares anaplásicas |
| CTPD | Carcinoma de tireoide pouco diferenciado |

| | |
|--------------------|--|
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| EET: | Extensão extratireoidiana |
| EGFR | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> |
| ERK | Extracellular <i>signal- Regulated Kinase</i> |
| FFPE | <i>Formalin Fixed Paraffin Embedded</i> |
| FFEP | Fixado em formalina e embocado em parafina |
| HAM | Hospital Aristides Maltez |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| HRAS | <i>H-Rat Sarcoma Virus</i> |
| ICS | Instituto Ciências da Saúde |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva |
| KRAS | <i>K-Rat Sarcoma Virus</i> |
| LET L | Laboratório estudos da tireoide |
| LSS | Laboratório Studart & Studart |
| MAPK | <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> |
| MET | <i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i> |
| MEK | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i> |
| mTOR | <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> |
| NIS | <i>Sodium-iodide symporter</i> |
| NGS | <i>Next-generation sequencing</i> |
| NRAS | <i>N-Rat Sarcoma Virus</i> |
| NTRK1 | <i>Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1</i> |
| PAAF | Punção aspirativa por agulha fina |
| PAX8/PPAR γ | <i>PAX8/Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |

| | |
|--------|---|
| PI3K | <i>Phosphatidyl Inositol 3 Kinase</i> |
| PI3KCA | <i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i> |
| PTEN | <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> |
| RAF | <i>Proto-Oncogene Serine/Threonine Protein Kinase</i> |
| RAI | <i>Radioactive iodine-131</i> |
| RAS | <i>Rat Sarcoma Virus</i> |
| RET | <i>Rearranged During Transfection</i> |
| RNA | <i>RiboNucleic Acid</i> |
| RTK | <i>Receptor tirosine kinase</i> |
| SAPC | Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia |
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TCGA | <i>The Cancer Genome Atlas</i> |
| TERT | <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i> |
| UFBA | Universidade Federal da Bahia |
| VEGF | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 GERAL | 21 |
| 3.2 ESPECÍFICOS | 21 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 22 |
| 3.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE TIREOIDE | 22 |
| 3.2 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DO CTDCF | 24 |
| 3.3 ASPECTOS MOLECULARES DA ONCOGÊNESE DO CTDCF | 25 |
| 3.3.1 Mutação no gene RAS em CTDCF | 29 |
| 3.3.2 Mutação no gene BRAF em CTDCF | 32 |
| 3.3.3 Mutação no gene PIK3CA em CTDCF | 36 |
| 3.3.4 Mutação no gene EGFR EM CTDCF | 37 |
| 3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM CTDCF | 38 |
| 3.4.1 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) | 39 |
| 4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 DESENHO DO ESTUDO | 41 |
| 4.2 GRUPO AMOSTRAL | 41 |
| 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO | 41 |
| 4.4 OBTENÇÃO DE DADOS | 42 |
| 4.4.1 Marcação da área tumoral | 42 |
| 4.4.2 Extração do DNA tumoral parafinado (FFEP) | 43 |
| 4.4.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) | 44 |
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 45 |
| 4.6 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> | 45 |
| 4.7 VIABILIDADE TÉCNICA, CIENTÍFICA E FINANCEIRA | 45 |
| 4.8 ASPECTOS ÉTICOS | 46 |
| 5 RESULTADOS | 47 |
| 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES | 47 |
| 5.2 FLUXOGRAMA DA ANÁLISE POR NGS | 48 |
| 5.3 RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO PAINEL MULTIGÊNICO POR NGS | 49 |

| | |
|--|----|
| 5.4 ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS E MUTAÇÕES ENCONTRADAS POR NGS | 50 |
| 5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS COM MUTAÇÃO <i>BRAF</i> ^{NO-V600} E <i>BRAF</i> ^{V600E} | 53 |
| 5.6 NOVAS VARIANTES <i>BRAF</i> ^{NO-V600E} ENCONTRADAS EM CTDCF | 54 |
| 5.7 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS MUTAÇÕES PONTUAIS NO GENE <i>BRAF</i> | 55 |
| 6 DISCUSSÃO | 56 |
| 7 CONCLUSÕES | 61 |
| 8 TRABALHOS GERADOS DURANTE O MESTRADO | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |
| ANEXOS | 73 |
| ANEXO A – Artigo publicado na Revista de Ciências Médicas e Biológicas | 73 |
| ANEXO B – Pôster apresentado no XVIII Latin American Thyroid Congress | 74 |
| ANEXO C – Resumo publicado em Anais do XVIII Latin American Thyroid Congress | 75 |
| ANEXO D - Resumo de capítulo de livro publicado em <i>Anais do II Simpósio de Órgãos E Sistemas de 2022</i> | 76 |
| ANEXO E – Parecer Consubstanciado do CEP | 77 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia endócrina mais frequente, correspondendo por aproximadamente 3% de todos os diagnósticos de câncer em todo o mundo. A taxa de incidência global é 3 vezes maior em mulheres do que em homens^{1,2}. No Brasil, a estimativa para novos casos de câncer de tireoide no ano de 2023 é de 16.660 casos, sendo desses, 14.160 casos em mulheres³.

O carcinoma de tireoide derivado de células foliculares (CTDCF) corresponde a, aproximadamente, 90% dos casos de neoplasias da tireoide, sendo desses, 80-85% dos casos de carcinoma papilífero da tireoide (CPT)⁴⁻¹³. Geralmente, o CPT é clinicamente indolente, compatível com seu genoma simples, que apresenta poucas alterações no número de cópias⁸. Embora tenha uma alta incidência, possui taxas de sobrevida global excedendo 90%^{4,9,11,14}. Apesar da maioria dos CPTs serem bem diferenciados e com baixa taxa de invasão local, recidiva ou metástases (regionais ou distantes), existe um subgrupo de tumores que apresentam uma heterogeneidade genética com variantes mais agressivas, podendo tornar o câncer de tireoide mais invasivo e letal⁸⁻⁹.

A maioria das mutações que impulsionam a tumorigênese da tireoide envolvem os efetores das vias *MAPK* ou *PI3K-AKT*, que resultam em uma desregulação do crescimento celular e diferenciação. As alterações genéticas que afetam essas vias codificam receptor de tirosina quinase da membrana celular *RET*, *NTRK1* e os transdutores de sinal intracelular *BRAF* e *RAS*. Essas mutações ocorrem em, aproximadamente, 70% dos casos de CPT¹⁵⁻²⁶.

A mutação somática de maior evidência no câncer de tireoide encontra-se no gene *BRAF*, que resulta em uma transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 (T1799A), levando a uma substituição de valina por ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína (V600E)²⁷⁻²⁹. Essa variante é bastante evidente em CPT, com uma frequência em torno de 45% dos casos^{4,15,30-32}. Há outras mutações no gene *BRAF* que estão envolvidas no CTDCF, as mutações *BRAF*^{NO-V600E}, porém são necessários mais estudos para melhor classificá-las e correlacioná-las aos aspectos clínico-patológicos. A mutação *BRAF*^{V600E} foi associada em alguns estudos^{8,20,25,28,33-40} com estágios mais avançados do tumor, comportamento biológico de maior invasividade, com maior risco de metástase e recorrência de doença, além de mostrar reduzida resposta ao tratamento com radioiodo, no entanto outros estudos⁴¹⁻⁴³

relataram resultados controversos a essa associação da mutação *BRAF*^{V600E} com gravidade da doença.

Outras mutações bastante frequentes em tumores da tireoide são nos genes *KRAS*, *HRAS* e *NRAS*. Com prevalência de 10-20% em CPT, 40-50% em CFT e 20-40% em carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos. São mais comuns as mutações do códon 12,13 e 61 do gene *NRAS* e do códon 61 do *HRAS*^{17,18,29}. Além disso, sabe-se que as mutações *RAS* podem predispor cânceres bem diferenciados à desdiferenciação e transformação anaplásica¹⁵, também oferecendo comportamento biológico mais agressivo, com maior probabilidade de metástases à distância e desfecho clínico desfavorável^{16,44-48}.

O receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) pertence à família *ErbB* de receptores tirosina quinases (*RTK*), e a hiperatividade ou supressão do gene *EGFR*, causada por mutações ativadoras, tem sido reportada em diferentes tipos de câncer, inclusive no CT^{30,49}. No CTDCF, o gene *EGFR* é determinante no crescimento e na disseminação das células tumorais, e se expressa mais nos casos mais agressivos⁵⁰. Assim como as mutações no gene *EGFR*, as mutações no gene *PIK3CA* em CTDCF também estão relacionadas aos casos mais graves da doença, podendo coexistir com as mutações *RAS* ou *BRAF* nesses cânceres e sendo consideradas raras as mutações deste gene em CPT e CFT⁵¹⁻⁵².

A compreensão dos mecanismos moleculares na carcinogênese é de extrema importância para diagnósticos precisos e terapias personalizadas. O sequenciamento de nova geração (NGS) é a tecnologia padrão ouro para as análises simultâneas de genes de interesse, possibilitando, assim, melhor avaliação do câncer e uma abordagem terapêutica especializada^{19,53-55}.

Este estudo visa investigar um painel multigênico customizado para detectar mutações em drivers oncogênicos e correlacionar seu resultado com aspectos clínico-patológicos e das amostras tumorais de CTDCF de pacientes adultos atendidos no maior hospital de referência oncológico do estado da Bahia. Usando técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), considerada padrão ouro, pretendemos fazer análise multigênica, englobando: *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *EGFR* e *PI3KCA*, genes considerados importantes na oncogênese da tireoide e de outros tumores sólidos, conhecidamente envolvidos na hiperativação das vias *MAPK* e *PI3K-AKT*^{24,51}. Este estudo pretende, de forma inédita no estado da Bahia, avançar no conceito de medicina personalizada no manejo de pacientes com CTDCF atendidos no Sistema Único de

Saúde (SUS), com potencial para explorar a existência de novas alterações genéticas peculiares da população do estado e correlacioná-las com aspectos clínico-patológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o *status* mutacional, através de painel multigênico customizado, de 100 amostras tumorais de carcinoma de tireoide derivado de células foliculares em pacientes adultos atendidos no Hospital Aristides Maltez (HAM).

2.2 ESPECÍFICOS

- Correlacionar aspectos clínico-patológicos com mutações eventualmente encontradas;
- Identificar novas mutações relacionadas com CTDCF;
- Estabelecer a associação de novas mutações encontradas e as menos estudadas, com os aspectos clínico-patológicos, como idade, sexo, tamanho tumoral, ocorrência de metástases em linfonodos cervicais e subtipo histológico nos casos de CTDCF.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

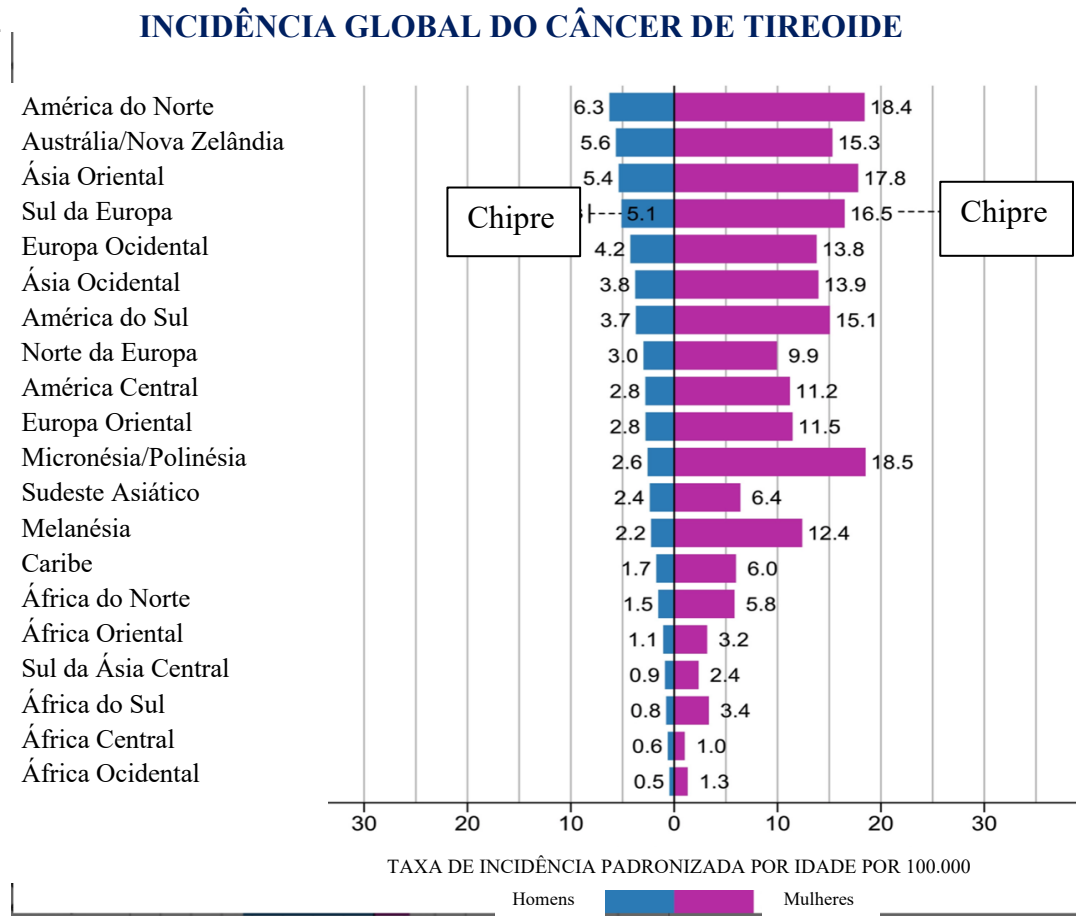
3.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE TIREOIDE

O câncer de tireoide (CT) é responsável por 586.000 casos em todo o mundo, ocupando o 9º lugar em incidência no ano de 2020. A taxa de incidência global é 3 vezes maior em mulheres do que em homens^{1,2,5,10,12,56} (Figura 1). De acordo com o INCA (2022)³, o número de casos novos de câncer de tireoide estimados para o Brasil, para cada ano do triênio 2023-2025, será de 2.500 casos novos em homens e de 14.160 em mulheres, ocupando o 5º lugar de câncer mais frequente em mulheres no Brasil (Figura 2).

Desde a década de 1970, a incidência do CT tem aumentado em todo o mundo, alguns estudos apontam que esse aumento está relacionado ao sobrediagnóstico^{1,2,10,57-58} devido à ampla utilização de exames de imagem (ultrassonografia) na rotina, e outros estudos acreditam ser por motivos multifatoriais, como estilo de vida e fatores ambientais^{10,59}.

Os principais fatores de risco para desenvolvimento CT são: história de exposição à radiação, radioterapia em baixas doses (principalmente na infância), história familiar de câncer de tireoide e dieta pobre em iodo, ter histórico de bócio e obesidade^{1,10,20,56,60}.

Figura 1- Taxas de incidência de CT padronizadas por idade, região e sexo em 2020. As taxas são mostradas em ordem decrescente.



Fonte: adaptada de Sung et al.¹ (2021)

Figura 2- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma

| Localização primária | Casos | % | | Localização primária | Casos | % |
|-----------------------------|--------|-------|---|-----------------------------|--------|-------|
| Próstata | 71.730 | 30,0% | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">Homens</div> <div style="text-align: center;">Mulheres</div> </div> | Mama feminina | 73.610 | 30,1% |
| Cólon e Reto | 21.970 | 9,2% | | Cólon e Reto | 23.660 | 9,7% |
| Traqueia, Brônquio e Pulmão | 18.020 | 7,5% | | Colo do útero | 17.010 | 7,0% |
| Estômago | 13.340 | 5,6% | | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 14.540 | 6,0% |
| Cavidade Oral | 10.900 | 4,6% | | Glândula Tireoide | 14.160 | 5,8% |
| Esôfago | 8.200 | 3,4% | | Estômago | 8.140 | 3,3% |
| Bexiga | 7.870 | 3,3% | | Corpo do útero | 7.840 | 3,2% |
| Laringe | 6.570 | 2,7% | | Ovário | 7.310 | 3,0% |
| Linfoma não Hodgkin | 6.420 | 2,7% | | Pâncreas | 5.690 | 2,3% |
| Fígado | 6.390 | 2,7% | | Linfoma não Hodgkin | 5.620 | 2,3% |

*Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: INCA³ (2022)

3.2 ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DO CTDCF

As neoplasias malignas da tireoide desenvolvem-se a partir de dois tipos de células diferentes na glândula tireoide: células foliculares e células parafoliculares (C). As células foliculares são células epiteliais responsáveis pela síntese de hormônios tireoidianos e pela captação de iodo, e 90% dos carcinomas da tireoide são derivados das células foliculares. As células parafoliculares (C) produzem e secretam calcitonina e geram 3-5% dos carcinomas medulares da tireoide (CMT)^{8,14,26,61-62}.

Os CTDCFs são classificados de acordo com os critérios implementados na 5ª edição da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS)⁶³ 2022, como: carcinoma papilífero da tireoide (CPT), composto por muitos subtipos morfológicos, carcinoma papilífero variante folicular encapsulado invasivo (CPVFEI), carcinoma folicular da tireoide (CFT), carcinoma oncocítico da tireoide (COT), carcinomas derivados de folículos de alto grau (CDFAG) que incluem o carcinoma diferenciado de tireoide de alto grau (CDTAG) e carcinoma de tireoide pouco diferenciado (CTPD) e, por fim, o carcinoma de tireoide derivado de células foliculares anaplásicas (CTDCFA).

O tipo histológico mais frequente das neoplasias malignas derivadas de células foliculares é o CPT, tanto na população adulta quanto na pediátrica, representando em torno de 80% dos casos, seguido do CFT, que representa aproximadamente 15%^{5,7,8,9,11,18,20,37,41}. Os CPTs são diagnosticados principalmente com base na morfologia nuclear, núcleos grandes que apresentam cromatina hipodensa e citoplasma finamente granular, e são ainda subclassificados morfológicamente e arquitetonicamente com certos subtipos correlacionados com uma biologia agressiva; em combinação com mutações genéticas específicas^{9,24,35,52,56}. A invasão em tecidos extratireoidianos e invasão vascular extensa são atribuídas ao comportamento agressivo do CPT¹¹.

O CFT é considerado mais agressivo e com pior prognóstico quando comparado ao CPT, apresenta lesões bem encapsuladas que exibem fibrose, hemorragia e áreas císticas. Enquanto o CPT metastatiza com frequência os linfonodos regionais e pode mostrar maior incidência de extensão extratireoidiana para órgãos adjacentes, é mais provável que o CFT se dissemine por via hematogênica para órgãos mais distantes, como pulmão, osso e cérebro^{11,44,56}.

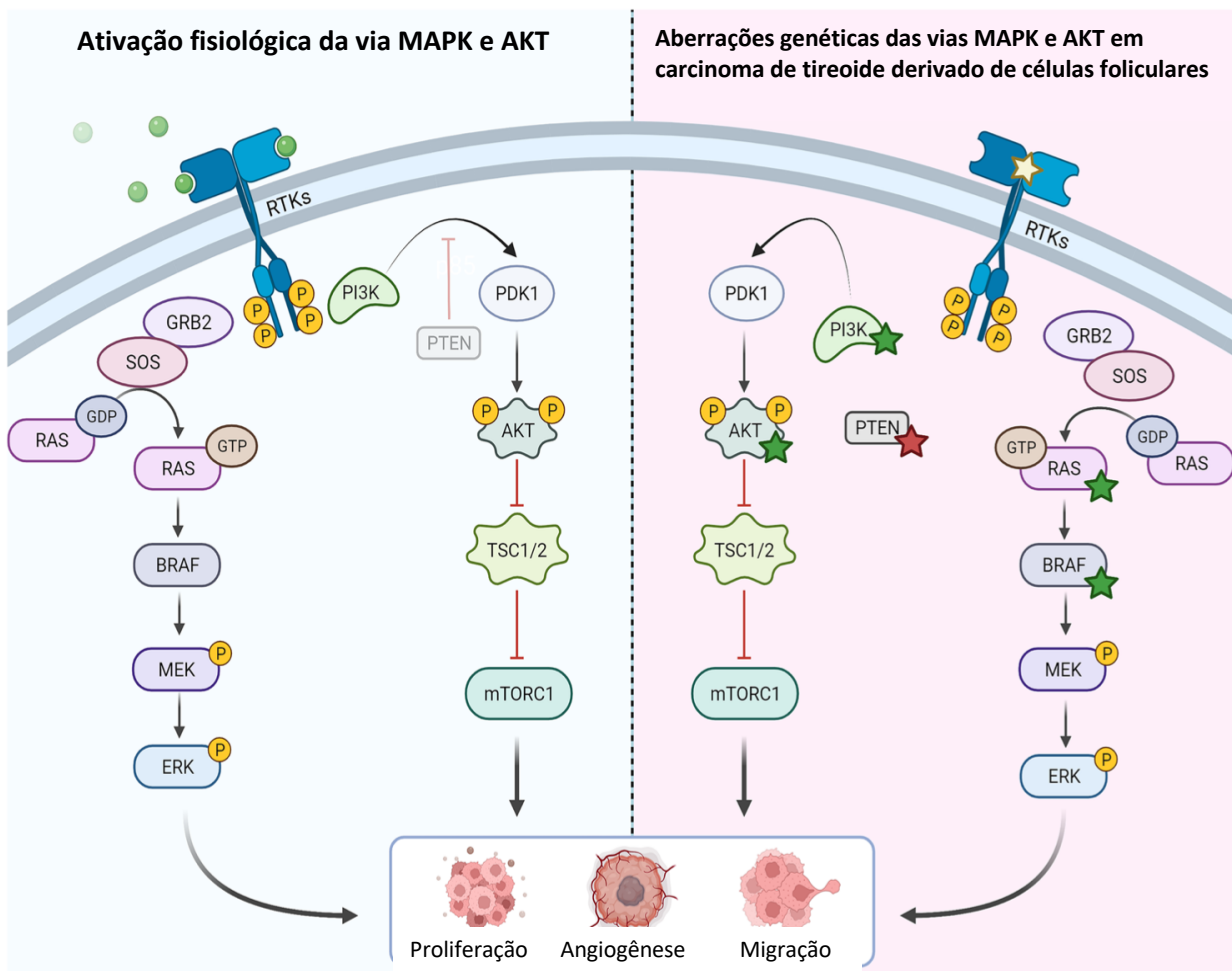
Geralmente, o CPT possui um excelente prognóstico, com taxas de sobrevida em 10 anos superiores a 90% e 95%^{4,5,9,22,35,41}. Apesar disso, uma parcela de 20% e 10% dos pacientes desenvolvem recorrências locorregionais e metástases à distância, e geralmente são refratárias à terapia com radioiodo (RAI) e cirurgicamente irresssecáveis, com sobrevida global de 3 anos inferior a 50%^{22,24}.

3.3 ASPECTOS MOLECULARES DA ONCOGÊNESE DO CTDCF

A ativação da via MAPK é desencadeada através de estímulos externos, como fatores de crescimento e mitógenos, que se ligam aos receptores da membrana plasmática e induzem a dimerização do receptor e sua autofosforilação de resíduos que são reconhecidos pelas proteínas adaptadoras. O controle da ativação da via é realizado em vários níveis pela regulação de feedback positivo e negativo, que regula a duração e amplitude dos sinais, e por diversas proteínas adaptadoras que definem a localização subcelular do núcleo das quinases⁶².

Especificamente, a via MAPK utiliza uma série de proteínas quinases para transmitir sinais da membrana celular para o núcleo, sendo responsável por controlar uma variedade de processos celulares essenciais, como proliferação, diferenciação, motilidade e apoptose. A sua hiperativação está associada a várias patologias, incluindo câncer. Aproximadamente, 70% dos CTDCF são causados por mutações que ativam essa via^{16,41,62}. A tumorigênese da tireoide envolve a ativação das vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) e fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) /transformação de Akstrain (AKT)^{24,41}, que resultam em uma desregulação do crescimento celular e diferenciação¹⁵. A ativação de MAPK é importante para a iniciação do tumor, e a via de sinalização PI3K/AKT é necessária para a progressão e desdiferenciação do câncer de tireoide¹⁸ (figura 3).

Figura 3- Vias MAPK e AKT no câncer de tireoide. Visão geral esquematizada das vias de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e AKT, no estado fisiológico (esquerda) e neoplásico (direita). Após a ativação dos receptores de tirosinas quinases (RTKs; incluindo RET e TRK1/3) através de ligantes extracelulares, os RTKs dimerizam e ativam a via MAPK, pela ativação de proteínas RAS e também estimulam a cascata PI3K-AKT, através de PI3K. Ambas as vias estimulam a proliferação, angiogênese e migração de células. No câncer de tireoide (à direita), vários genes de fusão ou mutações simulam a ativação fisiológica dos RTKs, levando à sinalização constitutivamente ativa de MAPK e PI3K-AKT, mesmo na ausência de ligantes extracelulares. As fusões RET e NTRK1/3 (estrelas amarelas), ativando as mutações PIK3CA, AKT, RAS e BRAF (estrela verde), bem como as mutações deletérias do PTEN (estrela vermelha), são destacadas.



Fonte: adaptada de Baloch et al.⁶³(2022)

Assim como a via MAPK, a via PI3K também é composta por um grande grupo de proteínas conservadas que controlam uma série de processos celulares, sendo uma das principais vias de sinalização em diversos tipos de câncer. No ambiente tumoral, a via PI3K-AKT desempenha papéis essenciais no funcionamento da angiogênese e no recrutamento de fatores inflamatórios⁶⁴. No CTDCF, mutações nessa via estão associadas à progressão para carcinomas mais avançados e indiferenciados^{17,34,62}.

Múltiplos genes estão envolvidos no desenvolvimento do CTDCF, no qual apresentam alterações através de dois principais mecanismos moleculares distintos: mutação pontual e rearranjo cromossômico. A mutação pontual é resultado de uma alteração em um único nucleotídeo dentro da cadeia de *DNA*, enquanto o rearranjo cromossômico apresenta uma alteração em grande escala, com quebra e fusão de partes do mesmo ou de diferentes cromossomos¹⁵. Os genes mutados que afetam essas vias codificam as tirosinas quinases receptoras de membrana celular *RET* e *NTRK1* e os transdutores de sinal intracelular *BRAF* e *RAS*^{5,14,20}. Aproximadamente, 90% destas mutações são mutuamente exclusivas e apresentam uma frequência alta de, aproximadamente, 70% em CPT⁶⁵. Em CFT, além de mutações no gene *RAS*, outro evento relativamente comum é rearranjo *PAX8/PPAR γ* ^{15,16,18,26,29}.

De acordo com as classificações do The Cancer Genome Atlas (TCGA)⁶⁵, as principais alterações genéticas nos CTDCFs vêm sendo subclassificadas em duas principais classes geralmente mutuamente exclusivas: (i) as mutações tipo *RAS* (também conhecidas como *RAS-like*), em tumores com padrão de crescimento expansivo e atipia nuclear discreta, se assemelhando mais aos CFTs; (ii) mutações tipo *BRAF* (*BRAF-like*) dando origem a tumores mais infiltrativos, com atipia nuclear evidente, assemelhando-se mais aos CPTs⁶³. Porém, a coexistência de múltiplas alterações genéticas dos componentes da via MAPK também podem ocorrer, por exemplo, pela presença simultânea da mutação *BRAF*^{V600E}, mutações *RAS* e *RET-PTC* em CPTs agressivos e carcinoma anaplásico^{66,67}. É possível que, diante de um cenário de progressão tumoral do CTDCF, exista o acúmulo progressivo de múltiplas alterações genéticas, que contribuem para amplificar sua oncogenicidade^{51,55,68}.

A mutação pontual com maior prevalência em CPT encontra-se no gene *BRAF*, que resulta em uma transversão de timina para adenina no nucleotídeo 1799 (T1799A), levando a uma substituição de valina por ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína (V600E)^{20,27}. Essa variante é bastante evidente em CPT, com uma frequência em torno de 45% dos casos^{8,9,15,18,21,25,51}. A mutação *BRAF*^{V600E} está bastante associada a uma maior ativação da via MAPK, do que outras alterações (mutações *RAS* ou rearranjos *RET*, por exemplo), devido à ausência de resposta aos sinais de feedback negativo mediados por *ERK*^{63,68}. Há as classes de mutações *BRAF*^{NO-V600}, que, embora sejam mais frequentes em outros cânceres, também já foram relatadas em CTDCF^{13,69,70}.

Outras mutações bastante recorrentes são no gene *RAS*, com prevalência de 10-20% em CPT e de 40-50% em CFT^{15,18,35}. Mutações envolvendo os efetores da via PI3K-AKT, como *PIK3CA*, *AKT1* e *PTEN*, são encontradas com menos frequência em CPT, com uma

prevalência de 3% de mutações *PIK3CA*^{15,24,51}. A ativação das mutações *PIK3CA* é um evento precoce mais evidente no câncer de mama e cólon⁶⁴. Porém, os CFTs normalmente apresentam mutações em genes relacionados à via de sinalização AKT, com alterações deletérias de *PTEN*, mutações de ativação de *PIK3CA* e ganho de número de cópias de *PIK3CA*. Como na via PI3K-AKT, o *PTEN* regula negativamente a ativação mediada por *PI3K*, essas mutações levam ao aumento da sinalização de AKT e tumorigênese⁶³.

Outros aspectos, sobretudo relacionados ao microambiente e angiogênese tumoral, também são cruciais para a patogenicidade tumoral⁵⁰. Por exemplo, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) pertence à família ErbB de receptores tirosina quinases (RTK), e este gene é determinante no crescimento e na disseminação do CT, estando fortemente expresso no CT agressivo⁵⁰. Suas mutações contribuem para a ativação de RET e estão associadas a uma maior probabilidade de metástases linfonodais no CPT^{50,71}. Na tabela abaixo (Tabela 1), é possível visualizar a frequência e o impacto funcional relacionado ao comportamento biológico do tumor, das mutações nos genes avaliados no nosso painel multigênico customizado.

Tabela 1- Mutações dos genes *BRAF*, *RAS*, *PIK3CA* e *EGFR* no CTDCF e seu respectivo impacto funcional no comportamento biológico do tumor

| Genes mutados | | Prevalência aproximada (%) | Vias de sinalização afetadas | Impacto funcional na proteína e no tumor |
|---------------|-----|----------------------------|------------------------------|---|
| <i>BRAF</i> | CPT | 61,7 | MAPK | Ativar; promover tumorigênese, invasão, metástase, recorrência e mortalidade. |
| | CFT | 1,7 | | |
| <i>RAS</i> | CPT | 10-20 | MAPK e PI3K/AKT | Ativar; promover tumorigênese, invasão e metástase. |
| | CFT | 30-45 | | |
| <i>PIK3CA</i> | CPT | 1-3 | PI3K/AKT | Ativando; promovendo tumorigênese e invasividade. |
| | CFT | 5-15 | | |
| <i>EGFR</i> | CPT | 30,4 | MAPK e PI3K/AKT | Ativação; o impacto nos tumores não está claro. |
| | CFT | - | | |

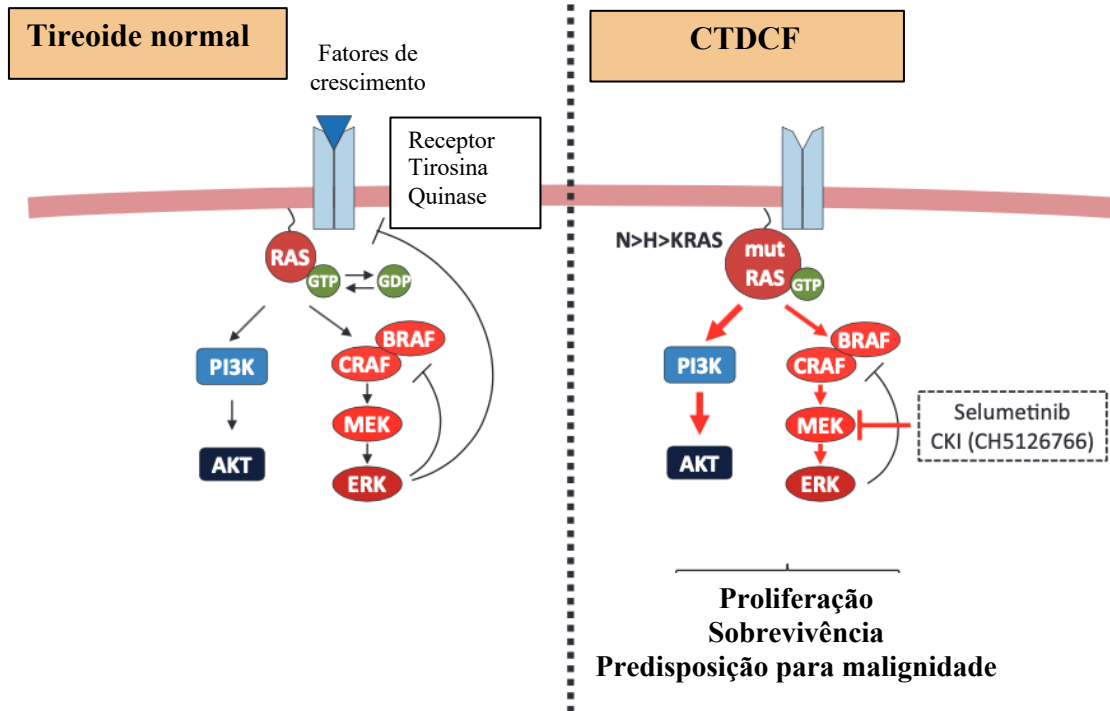
Fonte: Prete et al.¹⁴ (2020); Xing⁴⁰ (2015); Masago et al.⁷² (2009).

3.3.1 Mutações no gene RAS em CTDCF

O gene homólogo de oncogenes virais de sarcoma de rato (*RAS*) é um proto-oncogene e possui três isoformas: *NRAS*, *HRAS* e *KRAS*, que são expressas em diferentes níveis, em diversos tipos de tecidos⁴⁸. As proteínas RAS atuam ativamente nas cascatas de sinalização das vias *MAPK* e *PI3K/AKT/mTOR*, e estão envolvidas oncogenicamente em diversos tipos de câncer humano, inclusive no CTDCF^{24,73}. Os tumores de tireoide com *status RAS*-mutado (mutações *RAS-like*) mostram, em especial, superativação da via *PI3K-AKT*³⁴. As proteínas *RAS* são GTPases da membrana plasmática ativadas por receptores de fator de crescimento, tirosina quinases não receptoras e, em menor proporção, por receptores acoplados à proteína G, levando à ativação de vias efetoras a jusante^{14,21,24,52}.

Como o *RAS* regula diversos processos fisiológicos importantes, como o crescimento celular, a diferenciação, a morte celular apoptótica, o estresse oxidativo, a resposta ao dano ao DNA, a adesão, os rearranjos do citoesqueleto e a motilidade celular, a sua ativação pode ser crucial para a proliferação e sobrevivência da célula tumoral⁷³. As mutações pontuais no domínio de ligação GTP (códon 12 e 13) ou no domínio GTPase (códon 61) causam a substituição de certos resíduos de proteínas que afetam a atividade da GTPase, bloqueando o *p21RAS* na forma ativada e iniciando o desenvolvimento do tumor^{24,48}(Figura 4). São exatamente as mutações nos códon 12, 13 e 61 as alterações mais encontradas no gene *RAS*^{14,21,29,62}. Por exemplo, as mutações no códon 61 do *NRAS* e *HRAS* são encontradas em 10-20% dos CPTs, 40-50% dos CFTs e 20-40% dos carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos^{15,18,20,35}. Classicamente, os tumores com padrão folicular, como o CFT e CPVFT, abrigam mais mutações nos genes RAS⁶³.

Figura 4- Mutações *RAS* no CTDCF. No tecido tireoidiano normal, as proteínas *RAS* mediam a ativação dos receptores de tirosina quinase (esquerda). As formas mutantes de *RAS* (*mutRAS*) são ativas na ausência de estímulos extracelulares e são capazes de ativar as vias *MAPK* e *PI3K*, essa última com maior força (direita). Como não há inibidores usados para direcionar diretamente o *RAS*, a figura mostra os pequenos inibidores de quinase que visam o efector *MEK* a jusante em caixas tracejadas. As setas indicam a ativação (\rightarrow) e as linhas truncadas, inativação ($-$), a seta dupla indica um estado reversível (\rightleftharpoons). As setas vermelhas indicam fluxo aumentado.



Fonte: adaptada de Zaballos, Santisteban⁶² (2017).

Interessantemente, mutações no gene *RAS* também são encontradas em até 33% de adenomas foliculares benignos da tireoide, sugerindo a hipótese de que os adenomas foliculares com *status RAS*-mutados podem servir como precursores de carcinomas^{41,73}. No entanto, alguns estudos realizados em modelos experimentais animais apontaram que mutações no gene *RAS* podem predispor câncer bem diferenciado de tireoide à desdiferenciação e transformação anaplásica^{15,24,45,50,73}.

Do ponto de vista clínico-patológico, a mutação no gene *RAS* nos casos de CTDCF pode estar associada a um comportamento tumoral mais agressivo, com maior chance de metástases à distância, perda de diferenciação tumoral, maior tamanho tumoral, invasão vascular e pior desfecho clínico^{20,44,46}. Além disso, estudos anteriores apontaram que o gene *RAS*-mutado determina a instabilidade cromossômica, e isso pode estar relacionado com desdiferenciação tumoral no CT⁷³, porém essa associação com gravidade da doença ainda é

controversa, pois outros estudos defendem que as mutações *RAS* isoladamente não são consideradas um fator de risco para pior prognóstico, enquanto sua coexistência com mutações adicionais está associada à pior evolução^{8,65,73}.

Mesmo não existindo um inibidor direcionável para o *RAS*, há os inibidores de quinases que possuem como alvo os efetores a jusante *MEK* e *BRAF*, que têm sido utilizados contra células tumorais com *status RAS*-mutado em outros estudos⁷⁴. Abaixo, segue a tabela 2 com as principais variantes do gene *RAS* encontradas em CTDCF.

Tabela 2- Mutações nos genes *RAS* descritas em CTDCF.

| GENES MUTADOS | CODIFICAÇÃO | PROTEÍNA HGVS | OMIM | CLINVAR ID | REFERÊNCIAS |
|---------------|-------------|----------------------|-------------|------------|---|
| <i>KRAS</i> | c.35G>A | G12D (p.Gly12Asp) | 190070.0025 | 12582 | Radkay et al. ⁷⁵ (2014) e Al-Salam et al. ⁷⁶ (2020) |
| | c.35G>T | G12V (p.Gly12Val) | 190070.0026 | 12583 | Radkay et al. ⁷⁵ (2014) e Al-Salam et al. ⁷⁶ (2020) |
| | c.34G>A | G12S (p.Gly12Ser) | 190070.0007 | 12584 | Radkay et al. ⁷⁵ (2014) e Al-Salam et al. ⁷⁶ (2020) |
| | c.38G>A | G13D (p.Gly13Asp) | 190070.0003 | 12580 | Radkay et al. ⁷⁵ (2014) e Al-Salam et al. ⁷⁶ (2020) |
| | c.37G>T | G13C (p.Gly13Cys) | 190070.0023 | 45123 | Radkay et al. ⁷⁵ (2014) e Al-Salam et al. ⁷⁶ (2020) |
| <i>HRAS</i> | c.34G>C | G12R (p.Gly12Arg) | - | 375961 | Schulten et al. ⁴⁸ (2013) |
| | c.182A>G | Q61R (p.Gln61Arg) | 190020.0019 | 160364 | Schulten et al. ⁴⁸ (2013) Póvoa et al. ²⁵ (2021) |
| | c.181C>A | Q61K (p.Gln61Lys) | 190020.0002 | 12601 | Schulten et al. ⁴⁸ (2013) |
| <i>NRAS</i> | c.35G>A | G12D (p.Gly12Asp) | 164790.0007 | 39648 | Nikiforov, Nikiforova ¹⁵ (2011) |
| | c.38G>A | G13D (p.Gly13Asp) | 164790.0003 | 13901 | Nikiforov, Nikiforova ¹⁵ (2011) |

| | | | | |
|----------|----------------------|-------------|-------|--|
| c.181C>A | Q61K (p.Gln61Lys) | 164790.0008 | 73058 | Schulten et al. ⁴⁸ (2013) |
| c.182A>G | Q61R (p.Gln61Arg) | 164790.0002 | 13900 | Volante et al. ⁴⁶ (2009) Schulten et al. ⁴⁸ (2013) Póvoa et al. ²⁵ (2021) Nikiforov, Nikiforova ¹⁵ (2011) |

3.3.2 Mutações no gene BRAF em CTDCF

RAF é uma serina-treonina quinase, localizada no cromossomo 7 e possui três isoformas: *ARAF*, *BRAF* e *CRAF* (*RAF1*)^{23,28,38}, que compartilham três regiões altamente conservadas conhecidas como CR1, CR2 e CR3³². Entre esses, o *BRAF* possui a atividade basal mais forte e desempenha um papel essencial na regulação da via de sinalização *RAS/RAF/MEK/ERK*^{23,28,41}. O *RAS* ativa diferencialmente essas isoformas, iniciando a ativação a jusante dos efetores da via MAPK²⁴. A ativação de *RAF* leva a uma cascata de ativação de quinase de *MEK1/2* a *ERK1/2*. A *ERK* fosforilada é uma quinase que pode estimular vários fatores de transcrição (por exemplo, FRA e RSK)^{21,28,37,38}. A própria *ERK* regula transcricionalmente genes envolvidos em uma variedade de processos celulares, incluindo proliferação e sobrevivência celular³².

A isoforma *BRAF* encontra-se predominante nas células foliculares da tireoide⁸. E, no carcinoma de tireoide, o *BRAF* pode ser ativado por mutações pontuais, pequenas deleções ou inserções ou rearranjo cromossômico. Sendo o mecanismo mais comum a ativação por mutação pontual nos *éxons* 11 e 15, em especial a mutação *BRAF V600E*, detectada em cerca de 27-83% dos CPTs, sendo rara em CFT e com menor frequência em CPT pediátrico^{15,20,24,27-29,31,33,76}.

As mutações pontuais no gene *BRAF*, envolvendo códons V600 e não-V600, foram funcionalmente caracterizadas, primeiro, por seu potencial oncogênico na transformação de células *NIH3T3* e, posteriormente, por sua atividade de quinase intrínseca como sendo alta, intermediária ou prejudicada³². No entanto, estudos recentes apresentaram um esquema de classificação de três grupos para mutações em *BRAF*, baseado em três importantes aspectos bioquímicos e de sinalização, como: (1) atividade de quinase, (2) dependência de RAS e (3) status de dimerização. A compreensão da sinalização dessas variantes tem implicações

importantes, principalmente para a previsão de respostas a terapias-alvo direcionáveis à via MAPK^{32,77}.

Portanto, as mutações de classe I são funcionalmente independentes da sinalização RAS e não precisam de dimerização para ativar a via *ERK* a jusante. Possui uma forte ativação da quinase de *BRAF* e ativação característica da via MAPK, são, no caso, as mutações V600E, ou outras substituições de aminoácidos no códon 600 (V600D/E/K/R). As de classe II são as mutações não-V600, representam uma grande variedade de alterações, todas independentes da sinalização RAS, mas necessitam de dimerização para ativar *MEK-ERK* a jusante. Também possui uma alta atividade de quinase, mas com menor envolvimento da via MAPK em relação às Mut-V600, são essas as (G464E/V/R, G469A/V/S, L597Q/R/S/V e muitas outras). Por fim, as de classe III possuem atividade quinase menor e dimerização com CRAF. Esse processo de dimerização é dependente de *RAS* e frequentemente coexistem com mutações genéticas adicionais ou ativação de mutações de *RAS*^{32,77}.

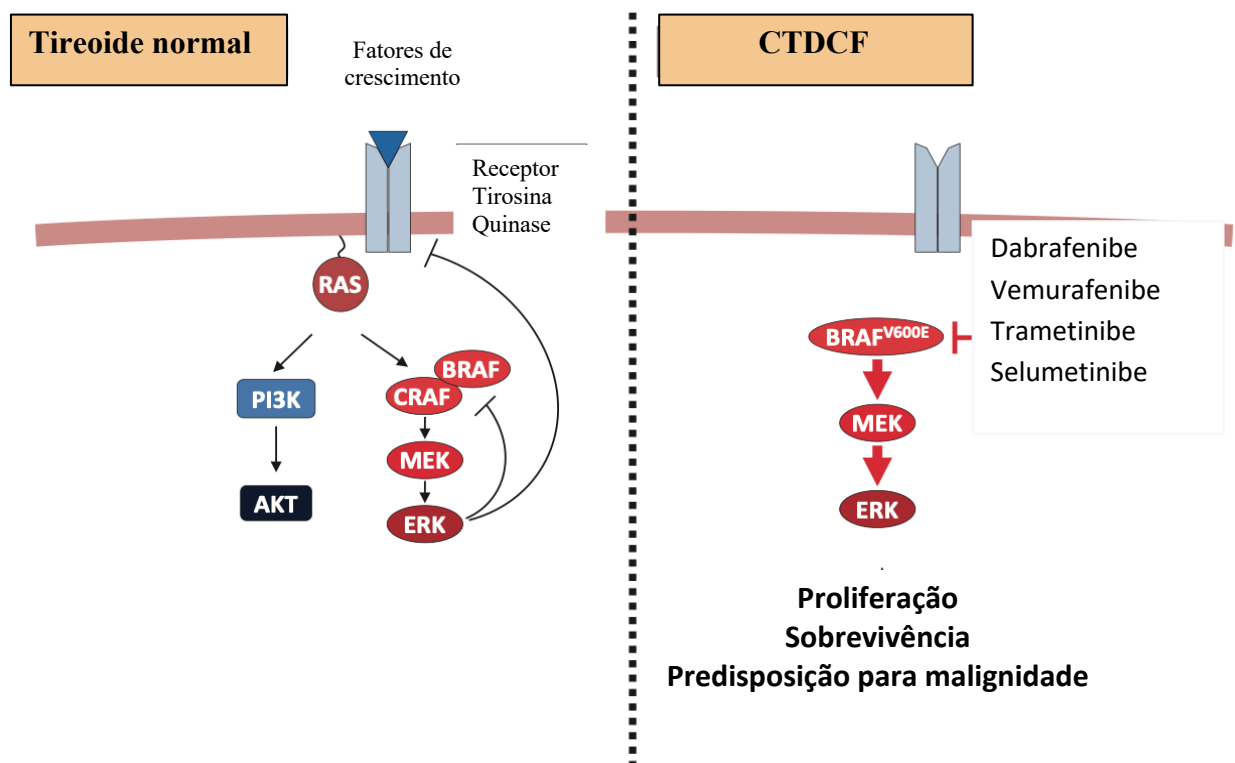
No CPT, as mutações no gene *BRAF* são majoritariamente da classe I e uma pequena parcela da classe II^{15,32}. Muitos estudos têm mostrado que os CPTs com mutações *BRAF*^{V600E} apresentam um pior prognóstico, maior frequência de invasão extratireoidiana, estadiamento patológico avançado (TNM), metástase linfonodal e à distância, persistência e recorrência tumoral, e refratários à RAI^{13,14,25,33,35-40}, além de exibirem diminuição acentuada da expressão de genes necessários para a biossíntese de hormônios tireoidianos, incluindo a peroxidase tireoidiana, tireoglobulina e simportador de iodeto de sódio (NIS)^{21,28,31,36,50-52}. O comportamento mais agressivo também foi evidenciado em microcarcinomas papilares (CPT com tamanho tumoral <1cm) com mutação *BRAF*^{V600}, no qual foram relatados, com frequência, maior prevalência de bordas tumorais infiltrativas, desmoplasia/fibrose e/ou esclerose estromal, metástases linfonodais e extensão extratireoidiana³¹. A presença da mutação em microcarcinomas também sugere o seu papel no fator de iniciação tumoral da tireoide^{34,39}.

Foi amplamente comprovado que a mutação *BRAF* também pode causar a expressão excessiva de muitas moléculas promotoras de tumores, como *VEGF* e *MET*. Todos esses dados fornecem uma base molecular para agressividade e resistência ao tratamento convencional em CPTs associados ao *status BRAF*-mutado⁴⁷.

A baixa resposta ou refratariedade à terapia com RAI, em pacientes com CTDCF portadores da mutação *BRAF*^{V600E}, deve-se, sobretudo, à modulação do metabolismo do iodo,

resultando na diminuição da capacidade das células neoplásicas em captar o iodo radioativo. Devido a isso, as terapias-alvo direcionáveis trazem uma nova perspectiva para o tratamento de pacientes com CTDCF localmente avançado ou metastático com *status BRAF*-mutado, através dos inibidores específicos de *BRAF* ou *MEK*, como *dabrafenibe*, *vemurafenibe*, *trametinibe* e *selumetinibe*. Já *sorafenibe* quanto o *lenvatinibe*, inibidores da via MAPK, possuem caráter de inibição de multiquinase, com atividade inibitória do crescimento tumoral, da progressão por maior invasividade e de maior angiogênese, além de suprimir os mecanismos antiapoptóticos das células tumorais (Figura 4). As terapias-alvo de inibidores específicos estão apresentando resultados bem promissores^{23,24,39,41}.

Figura 5- Mutação $BRAF^{V600E}$ no CTDCF. As proteínas *RAF* são um dos principais efetores do *RAS* e estão sujeitas   regula o negativa no tecido normal. O $BRAF^{V600E}$ oncog nico ativa a via MAPK independentemente de estímulos extracelulares e não requer dimeriza o. Portanto, não há regula o negativa da dimeriza o ERK para RAF, induzindo uma forte ativa o da via (direita). Pequenos inibidores de quinase contra BRAF são mostrados em caixas tracejadas. As setas indicam ativa o (\rightarrow) e inativa o de linhas truncadas (\dashv). As setas vermelhas indicam fluxo aumentado através da via.



Fonte: adaptada de Zaballos, Santisteban⁶² (2017).

Devido às grandes implica es clínicas negativas do *status BRAF*-mutado em CDT, estudos vêm relatando a importância da análise desse gene como fator prognóstico no

momento pré-operatório, através da análise molecular da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou pós-operatório, pela análise molecular do tecido tumoral. Porém, alguns estudos⁴²⁻⁴³ mais recentes demonstraram que a mutação *BRAF*^{V600E} não deve ser considerada como fator independente de pior prognóstico, mas deve ser avaliada em conjunto com outras variáveis prognósticas, sobretudo, correlacionada com outros parâmetros clínico-patológicos, podendo, assim, auxiliar na conduta terapêutica especializada e na vigilância tumoral ativa para recorrência ou metástases^{17,31,38}.

Em decorrência da maior prevalência das mutações BRAF classe I (V600E) no carcinoma tireoidiano, grande parte dos estudos só avaliaram os impactos dessa mutação, necessitando de mais estudos referentes aos impactos das mutações de classe II e III. Abaixo, a tabela 3 com as principais variantes encontradas em CTDCF.

Tabela 3- Mutações no gene *BRAF* descritas em CTDCF

| GENE MUTADO | CODIFICAÇÃO | PROTEÍNA HGVS | OMIM | CLINVAR ID | REFERÊNCIAS |
|-------------|---------------------------|------------------------|-------------|------------|---|
| <i>BRAF</i> | c.1799T>A | V600E (p.Val600Glu) | 164757.0001 | 13961 | Rossi et al. ⁶⁹ (2015) Özdamar et al. ⁷⁸ (2020) |
| | c.1801A>G | K601E (p.Lys601Glu) | 164757.0005 | 13966 | Haroon Al Rasheed et al. ²⁶ (2019) Afkhami et al. ⁷⁰ (2016) |
| | c.1795_1796del ACinsGA | T599E (p.Thr599Glu) | - | - | Rossi et al. ⁶⁹ (2015) |
| | c.1793C>T | A598V (p.Ala598Val) | - | - | Santarpia et al. ¹³ (2009) |
| | c.1794_1796del | (p.T599del) | - | - | Cho et al. ⁷⁹ (2014) |

Fonte: elaborado pela autora

3.3.3 Mutação no gene *PIK3CA* em CTDCF

A via *PI3K/AKT* regula diversos processos celulares fundamentais, incluindo metabolismo da glicose, sobrevivência celular, progressão do ciclo celular, adesão e motilidade⁵². As proteínas *PI3Ks* de classe I são divididas em quatro isoformas catalíticas, p110 α , p110 β , p110 γ e p110 δ , e são codificadas respectivamente por *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG* e *PIK3CD*⁶⁴. A sinalização da via é ativada pela ligação de *RAS* às subunidades catalíticas, das quais *PIK3CA* (tipo α) e *PIK3CB* (tipo β) são as subunidades mais expressas nos tecidos. Nessa via, as mutações ativadoras são geralmente no gene *PIK3CA*, e as mutações inativadoras são no gene *PTEN*, essas são características evidentes em tumores menos diferenciados^{14,24,55}. As mutações ativadoras em *PIK3CA* ocorrem em regiões específicas dentro dos éxon 9 e éxon 20, e foram relatadas em CTDCF^{17,34}.

No CTDCF, essas mutações possuem baixa prevalência no CPT e CFT, representando aproximadamente 3% e 11% de *PIK3CA* mutado, respectivamente, sendo mais prevalentes em CTPD e CTDCFA (aproximadamente 25%). Nos CTPD e CTDCFA, as mutações *PIK3CA* podem também coexistir com mutações *BRAF*^{V600E}, sugerindo que a desdiferenciação do CTDCF pode estar relacionada com o acúmulo progressivo de mutações, especialmente nos genes que codificam efetores da via PI3K-AKT, que possuem associação com a progressão tumoral do CTDCF^{15,24,34,51,52}.

Clinicamente, foram desenvolvidos alguns inibidores para certos efetores da via PI3K/AKT, como os *buparlisibe*, *pilaralisibe* e *alpelisibe*, que podem ser utilizados associados com agentes quimioterápicos convencionais para o tratamento de CT avançado^{24,64}. Abaixo, a tabela 4 com as principais variantes encontradas em CTDCF.

Tabela 4- Mutações no gene *PIK3CA* descritas em CTDCF

| GENE MUTADO | CODIFICAÇÃO | PROTEÍNA HGVS | OMIM | CLINVAR ID | REFERÊNCIAS |
|---------------|-------------|--------------------------|-----------------|------------|--|
| <i>PIK3CA</i> | c.3140A>T | H1047L (p.His1047Leu) | 171834.000 2 | 13653 | Theodora Pappa et al. ⁶⁸ (2021) |
| | c.3140A>G | H1047R (p.His1047Arg) | 171834.000 1 | 13652 | Theodora Pappa et al. ⁶⁸ (2021) |
| | c.1633G>A | E545K (p.Glu545Lys) | 171834.000 3 | 13655 | Theodora Pappa et al. ⁶⁸ (2021) |

3.3.4 Mutação no gene *EGFR* no CTDCF

O receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*) pertence à família ErbB de receptores tirosina quinases (RTK), que engloba três proteínas, ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4. O *EGFR* e a família de fator de crescimento peptídico (EGF) têm um papel fundamental na patogênese e progressão de diferentes tipos de carcinoma, principalmente o câncer de pulmão, cólon e mama⁴⁹.

As mutações, regulações incorretas ou amplificações de *EGFR*, estão presentes em aproximadamente 30% de todos os cânceres epiteliais e, no CT, o *EGFR* participa da progressão e invasão tumoral, além de ser superexpresso no CPT, CFT e CTDCFA⁷⁸. A expressão da proteína *EGFR* é ausente ou leve na tireoide livre de tumor e no CPT, porém, no CTPD e no CTDCFA, essa proteína é regulada positivamente, sugerindo que a regulação positiva da expressão de *EGFR* pode ser um marcador importante para a desdiferenciação dos carcinomas epiteliais de tireoide. A alta expressão de *EGFR* no CPT também foi associada à metástase linfonodal e pior prognóstico^{50,71}.

Um estudo recente⁸⁰ relatou uma associação entre carcinoma de pulmão (carcinoma pulmonar de não pequenas células) mutados no gene *EGFR* com CT e histórico familiar de CT. As mutações no gene *EGFR* foram mais prevalentes em pacientes do sexo feminino que tiveram CT ou com histórico familiar de CT, portanto, essa relação pode fornecer mais informações sobre a patogênese dessa alteração. Em outros estudos, foram relatados o tratamento de CT avançado com inibidor seletivo de tirosina quinase de *EGFR*, *erlotinibe*, com resposta positiva ao tratamento^{30,50}.

Mutações acionáveis no gene *EGFR* já estão bem classificadas em adenocarcinomas de pulmão, por exemplo, porém o significado clínico-patológico das mutações no CTDCF ainda não foi esclarecido totalmente⁷⁸. Mais estudos são necessários para avaliar o *status* mutacional do *EGFR* e a correlação com os parâmetros clínico-patológicos do CTDCF.

A maioria dos estudos não descreveu quais variantes são encontradas no CTDCF, apenas dois estudos reportaram as variantes encontradas e representadas na Tabela 5.

Tabela 5- Mutações no gene *EGFR* descritas em CTDCF

| GENE MUTADO | CODIFICAÇÃO | PROTEÍNA HGVS | OMIM | CLINVAR ID | REFERÊNCIAS |
|-------------|----------------|--------------------------------------|-------------|------------|--|
| <i>EGFR</i> | c.2573T>G | L858R (p.Leu858Arg) | 131550.0002 | 16609 | Lote H et al. ⁸¹ (2014) Masago et al. ⁷² (2009) |
| | c.2235_2249del | E746_A750del (p.Glu746_Ala750del) | - | 163343 | Masago et al. ⁷² (2009) |
| | c.2236_2250del | E746_A750del (p.Glu746_Ala750del) | - | 177620 | Masago et al. ⁷² (2009) |

Fonte: elaborado pela autora

3.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR NO CTDCF

Nos últimos dez anos, a compreensão dos mecanismos moleculares que ocorrem na patogênese do câncer de tireoide aumentou consideravelmente, destacando o papel essencial de determinadas sinalizações das vias MAPK e PI3K-AKT envolvidas na iniciação e progressão do CTDCF^{34,51}. Os testes moleculares têm uma grande importância, podendo ser usado para fins diagnósticos, preditivos e prognósticos; o conhecimento molecular tumoral vem auxiliando muito no desenvolvimento de terapias-alvo direcionáveis, promovendo a inibição dos principais agentes regulatórios dessas vias, e assim, possibilitando novas estratégias terapêuticas^{4,15,24,34,62}.

O uso de marcadores moleculares como diagnóstico em análise de amostras de tireoide PAAF vem sendo bastante discutido, principalmente nos casos de classificação indeterminada na citologia⁵⁵, visto que a concordância das amostras de PAAF da tireoide que apresentaram a mutação *BRAF*^{V600E} e foram classificadas posteriormente no anatomopatológico como CPT foi de (99,3%). Além disso, o diagnóstico prévio pode auxiliar no manejo cirúrgico, entre a decisão da tireoidectomia ou lobectomia^{15,17,82}. Enquanto no pós-operatório, a análise do perfil molecular proporciona a estratificação de risco e na identificação de mutações acionáveis em caso de progressão da doença com resistência à terapia⁶³.

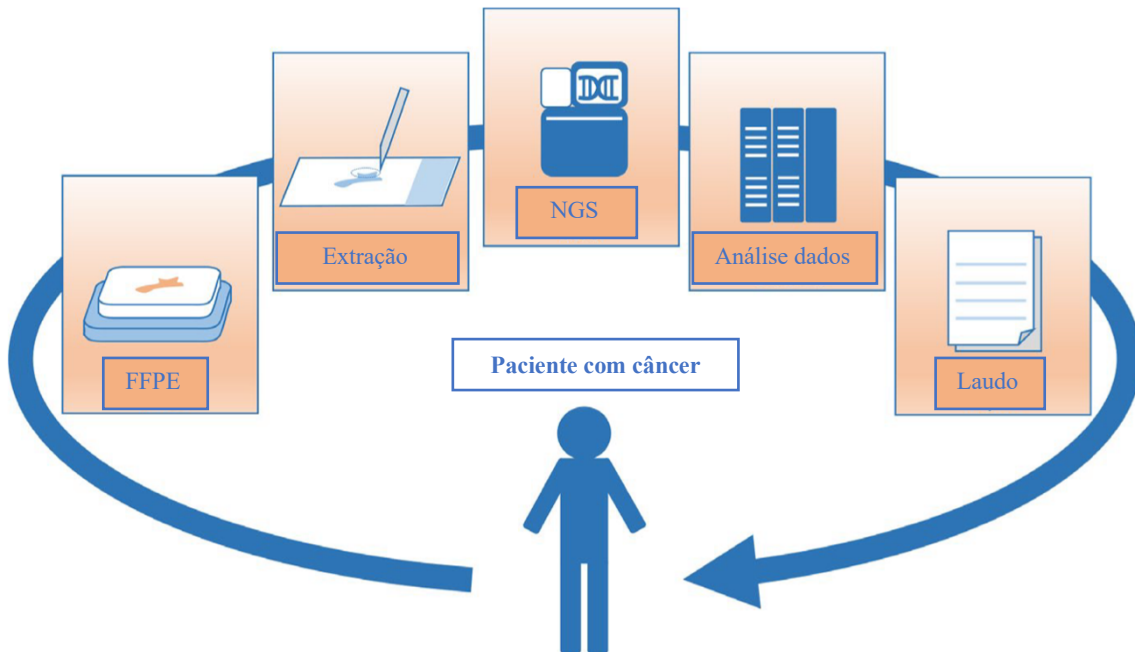
Mais estudos são necessários para desvendar os fatores etiológicos que levam a mutações pontuais em tumores de tireoide e a uma melhor compressão genética molecular do CTDCF. Os avanços nos testes moleculares, como a tecnologia de sequenciamento de nova geração, trazem maior especificidade e sensibilidade às análises, possibilitando resultados mais robustos e novas descobertas na genética molecular do CT^{15,17,26,34,52}.

3.4.1 Sequenciamento de Nova Geração (SNG)

O sequenciamento de nova geração ou *Next-Generation Sequencing* (NGS) oferece sequenciamento simultâneo de milhares a milhões de sequências curtas de nucleotídeos de maneira massivamente paralela, detectando múltiplas alterações genéticas presentes em uma determinada molécula de DNA ou RNA de forma rápida e eficaz¹⁹. A tecnologia realiza a análise de centenas de genes simultaneamente, através de painéis genéticos direcionados a regiões específicas ou até mesmo sequenciamento do genoma, exoma e transcriptoma completo, oferecendo bastante vantagem em relação às técnicas anteriores, nas quais analisam um gene por vez, ou apenas uma única região codificante de um gene^{17,19,53}.

A preparação técnica para realização do NGS consiste na construção de uma biblioteca de ácidos nucleicos (DNA ou DNA complementar, cDNA), ligadas as sequências adaptadoras (oligonucleotídeos sintéticos), seguido de uma ou duas etapas de amplificação através da reação em cadeia da polimerase PCR (*polymerase chain reaction*) e, por fim, o sequenciamento. Após a finalização do sequenciamento, os dados brutos gerados devem passar por uma série de análises de bioinformática para mapear os dados de interesse e remover leituras de baixa qualidade e artefatos^{83,84}. O fluxo de um teste de NGS pode ser visualizado abaixo (Figura 6).

Figura 6- Fluxo de um teste de painel de genes baseado em sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando tecido fixado em formalina e incorporado em parafina (FFPE). A preparação e preservação do tecido FFPE é a primeira etapa do teste do painel, seguida pela extração de DNA, sequenciamento por NGS, análise dos dados e laudo com os resultados encontrados e recomendações terapêuticas.



Fonte: adaptada de Nagahashi et al.⁵³ (2019).

Os testes moleculares por NGS, através de painéis multigênicos, permitem identificar alterações genéticas que são direcionáveis a tratamentos com terapia-alvo, oferecendo melhorias na precisão dos diagnósticos e trazendo o conceito da “medicina personalizada”, no qual cada paciente recebe a terapia com base em suas alterações genéticas do tumor⁵³. O uso do NGS na pesquisa e prática clínica está sendo essencial para a melhor compreensão da genética molecular do CTDCF, desde as análises em nódulos tireoidianos de citologia indeterminada, em que foram detectadas múltiplas alterações genéticas e sinalizaram pacientes com alto risco de câncer, como também nos casos de CTDCF e CMT, nos quais foram encontradas novas alterações genéticas que não tinham sido relatadas por métodos de sequenciamento anteriores, possibilitando, assim, um melhor desfecho clínico para os pacientes^{19,54}.

Devido ao seu alto desempenho, o NGS é considerado atualmente a técnica padrão ouro. Das suas poucas limitações, a principal seria o custo elevado, embora já tenha se tornado mais acessível nos últimos anos, é ainda considerado um exame de alto custo, impossibilitando sua ampla utilização na prática clínica⁵³.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo retrospectivo de corte transversal unicêntrico envolvendo amostras tumorais, não consecutivas, de casos de CTDCF em 100 pacientes adultos, diagnosticados e tratados entre janeiro de 2010 e dezembro de 2019, no Hospital Aristides Maltez (HAM), localizado na cidade de Salvador, Bahia.

4.2 GRUPO AMOSTRAL

Trata-se de amostra por conveniência e de casos não consecutivos. As amostras tumorais foram selecionadas após a pesquisa de pacientes que obtiveram diagnóstico de neoplasia maligna da glândula tireoide ao exame anatomopatológico (código C73, segundo a Classificação Internacional de Doenças – CID) e que estavam adequadamente registrados em base de dados disponível no sistema eletrônico interno do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez (SAPC/HAM), abrangendo casos operados no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2019, sendo que fosse possível localizar o material para realização da revisão anatomopatológica pelo médico patologista colaborador.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A seleção dos casos elegíveis para o estudo obedeceu ao seguinte critério de inclusão: a) pacientes com idade acima de 18 anos de idade, tratados cirurgicamente pelo HAM e diagnosticados com CTDCF pelo HAM no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2019.

Não foram incluídos no estudo: a) pacientes que não possuíam laudo anatomopatológico registrado em sistema eletrônico; b) casos cujos blocos de parafina contendo tecido tumoral não foram localizados no arquivo do serviço de anatomia patológica; c) casos com escassez de tecido tumoral tireoidiano para análise inicial do serviço de anatomia patológica; d) amostras tumorais que não foram submetidas ao protocolo de revisão anatomopatológica pelo médico patologista colaborador.

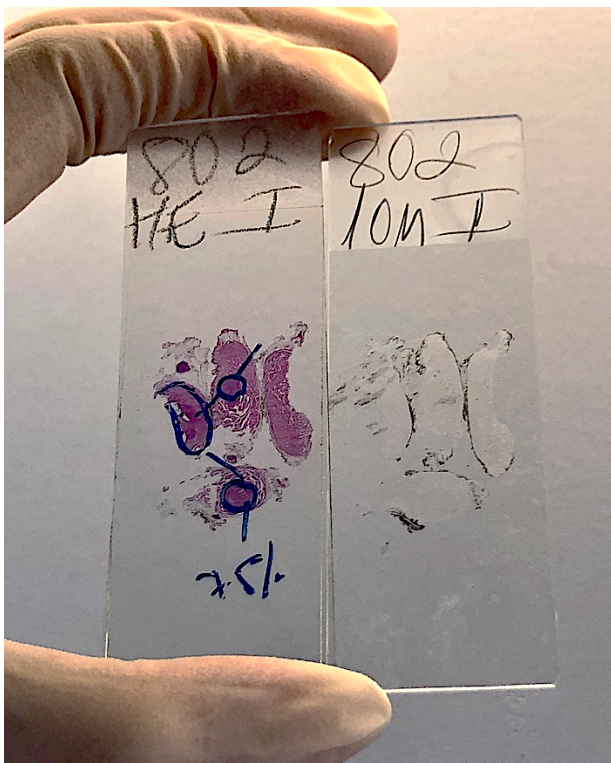
Serão excluídos do estudo: a) casos com amostra tumoral em quantidade escassa.

4.4 OBTENÇÃO DE DADOS

4.4.1 Marcação da área tumoral

O tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (FFEP) foi obtido através de cortes histológicos dos blocos de parafina armazenados no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez (SAPC/HAM). As lâminas dos tumores coradas com hematoxilina e eosina (HE) foram classificadas pelo médico patologista de acordo com os critérios da Classificação Tumores da Organização Mundial de Saúde⁶³ e estadiados conforme o Manual de Estadiamento do Câncer AJCC, 8ª edição⁸⁵. A partir da avaliação microscópica da lâmina HE de cada amostra realizada pelo médico patologista colaborador, a área tumoral será descrita por marcação direta na lâmina HE. O corte do bloco tumoral foi realizado do micrótomo pelos técnicos de laboratório do SAPC/HAM e transferidos para lâminas silanizadas. (Figura 7).

Figura 7- Lâmina de HE com marcação tumoral e lâmina com corte tumoral FFEP em 10 μ M.



Fonte: foto elaborada pela autora.

4.4.2 Extração do DNA tumoral parafinado (FFEP)

Após marcação da área tumoral na lâmina de HE, foram realizados três cortes histológicos de espessura de 10 μ m de cada bloco parafinado selecionado e transferidos para lâminas silanizadas, posteriormente, com o auxílio de uma navalha estéril, os cortes foram transferidos para microtubos tipo eppendorf (1,5ml), previamente estéreis (livre de *DNase* e *RNase*) e identificados, prontos para processamento da extração dos ácidos nucleicos.

Para extração de DNA genômico, foi utilizado o estojo comercial ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após o término do processo de extração, as amostras foram quantificadas no método fluorométrico Qubit™dsDNA BR Assay (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante, e em seguida, armazenadas em freezer -20°C, até a sua utilização (Figura 8). Amostras com concentrações abaixo de 1ng/ μ L foram descartadas.

Figura 8- Amostra de DNA extraído.



Fonte: foto elaborada pela autora.

4.4.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

A genotipagem das regiões genômicas alvos *EGFR* (éxons 18, 19, 20 e 21), *KRAS* (éxons 2, 3 e 4), *NRAS* (éxons 2, 3 e 4), *BRAF* (éxons 11 e 15) e *PIK3CA* (éxons 7, 9 e 20) foi realizada por sequenciamento de nova geração (next-generation sequencing) na plataforma iSeq 100 Sequencing System, Illumina Inc (USA). O método de enriquecimento de biblioteca foi amplicon-based, AmpliSeq for Illumina Custom Panel (USA) conforme validação e padronização interna do laboratório parceiro, Laboratório Studart. As análises de bioinformáticas foram conduzidas na plataforma cloud-based Varstation™ com pipeline padronizado exclusivamente para tecnologia e laboratório considerando as regras da Association for Molecular Pathology (AMP)⁸⁶⁻⁸⁸.

As sequências genômicas, usadas como padrão de referência dos genes analisados, foram obtidas do banco de dados de nucleotídeos do centro nacional de informação biotecnológica (NCBI): *PIK3CA*, RefSeq:NM_006218; *BRAF*, Ref Seq: NM_004333.4; *KRAS*, RefSeq:NM_004985.5; *NRAS*, RefSeq:NM_002524.4; *EGFR*, RefSeq: NM_005228.5.

Ensaio qualitativo e quantitativo. A frequência alélica variante (VAF) representa a porcentagem de leituras das sequências observadas é uma medida de parâmetro para leitura de dados do NGS⁸⁹. O ponto de corte (*Cut-off*) do laboratório é o VAF de 5%. Mutações com VAF menor de 5% não foram relatadas. A cobertura média em regiões de interesse foi de 350 vezes, percentual de leituras (*reads*) em regiões de interesse com cobertura $\geq 300x$ foi de 90,00%.

A pontuação Q (*score Q*), medida pelo índice de qualidade Phred, é considerada a métrica mais comum para avaliar a precisão da plataforma de sequenciamento. A pontuação Q deste sequenciamento foi Q30, que equivale à probabilidade de uma chamada incorreta de base de 1 em 1000 vezes, sendo considerada a pontuação de referência de qualidade no NGS⁹⁰. O percentual de *reads* com *score* Q30 foi de 95%. Sensibilidade: $\geq 95\%$ e especificidade: 95,9%.

Variantes que podem ser detectadas: SNP e indels. Variantes reportadas: patogênicas e provavelmente patogênicas. Limitações: detecção de indels; 20bp (inserções e deleções), fusões gênicas, inversões e translocações, grandes rearranjos exônicos (deleção ou duplicação de éxons), mutações em regiões promotoras e intrônicas, e allele drop-out. Limitações pré-

analíticas: características intrínsecas da amostra (qualidade, conservação, amostra exígua, área tumoral restrita <5%, baixa concentração e/ou DNA degradado).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram analisadas as seguintes variáveis: idade na época da cirurgia, sexo, tamanho tumoral, multifocalidade, extensão extratireoidiana, presença de metástases linfonodais e mutações dos genes *RAS*, *BRAF*, *EGFR* e *PIK3CA* do grupo amostral. O processamento e a análise dos dados foram realizados com o auxílio do pacote estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 22, por meio do uso de testes não paramétricos, de acordo com as variáveis categóricas da pesquisa. O teste de Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher (análises univariadas) foram utilizados para avaliar a associação entre o resultado da genotipagem e características clínicas e anatomopatológicas.

4.6 ANÁLISE *IN SILICO*

Foram utilizados dois programas para prever o efeito funcional das mutações pontuais no gene *BRAF* sobre a estabilidade da proteína, o programa MUpro (<https://mupro.proteomics.ics.uci.edu>) e o I-Mutant 2.0 (<https://folding.biofold.org/cgi-bin/i-mutant2.0.cgi>). A métrica avaliada foi o valor do delta delta G ($\Delta\Delta G$), o qual prevê como a mutação pontual poderá afetar a proteína. O valor positivo de $\Delta\Delta G$ indica que a proteína mutada possui maior estabilidade, e o valor de $\Delta\Delta G$ negativo indica que a proteína mutada possui diminuição da estabilidade da proteína.

4.7 VIABILIDADE TÉCNICA, CIENTÍFICA E FINANCEIRA

As atividades de pesquisa do projeto foram realizadas no laboratório de estudo da tireoide (LET) localizado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). As amostras parafinadas de tecido tumoral destinadas à avaliação do painel multigênico por NGS foram realizadas em parceria com o laboratório Studart & Studart (LSS). Estudo realizado por financiamento próprio do grupo de pesquisa.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi executado de acordo com a Resolução N° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Os projetos foram submetidos para análise ética no sistema eletrônico da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos, apreciado e aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS) e da Liga Baiana Contra o Câncer (CEP/LBCC/HAM) conforme Parecer Consubstanciado N° 1.874.922, e 1.939.949 e N°5.470.375 respectivamente (Anexo).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS PACIENTES

Tabela 6- Características clínico-patológicas dos pacientes com CTDCF.

| CARACTERÍSTICAS | (N=100) |
|---|-----------|
| <i>Idade (anos, média)</i> | 39,05 |
| <i>Amplitude (anos)</i> | 18-88 |
| N, >55 anos | 24 |
| <i>Sexo: n (%)</i> | |
| <i>Feminino</i> | 87 (87%) |
| <i>Subtipo histológico: n (%)</i> | |
| <i>CPTC</i> | 80 (80%) |
| <i>CFAI</i> | 2 (2%) |
| <i>CPTVFI</i> | 10 (10%) |
| <i>CPTVS</i> | 1 (1%) |
| <i>CPTVO</i> | 1 (1%) |
| <i>CPTVFE</i> | 3 (3%) |
| <i>CTCM</i> | 2 (2%) |
| <i>Tamanho do tumor - cm (média)</i> | 2,14 cm |
| <i>Amplitude (cm)</i> | 0,2-6,6cm |
| <i>Tumor multifocal n (%)</i> | 34 (34%) |
| <i>Extensão extratireoidiana (EET): n (%)</i> | |
| <i>Presente</i> | 32 (32%) |
| <i>Metástase linfonodos cervicais: n (%)</i> | |
| <i>Nx</i> | 4 (4%) |
| <i>N0</i> | 51 (51%) |
| <i>NI</i> | 45 (45%) |

Abreviações: CPTC, Carcinoma papilífero de tireoide clássico; CFAI, Carcinoma folicular amplamente invasivo; CPTVFI, Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular infiltrativo; CPTVS, Carcinoma papilífero de tireoide variante sólida; CPTVO, Carcinoma papilífero de tireoide variante oncócica; CPTVFE, Carcinoma Papilífero de tireoide variante folicular encapsulado não invasivo; CTCM, Carcinoma de tireoide cribforme morular.

Fonte: elaborado pela autora

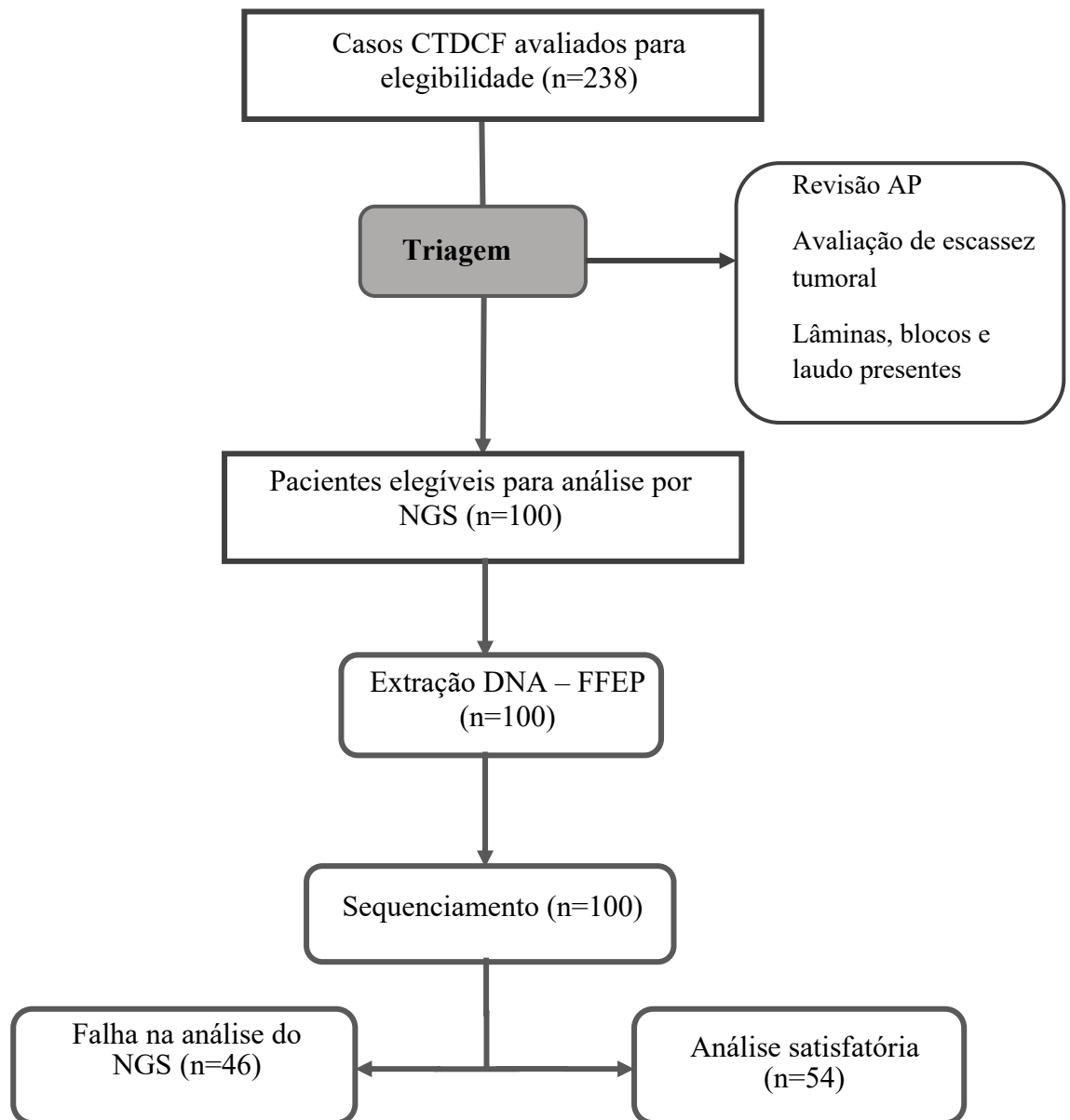
A média da idade observada na casuística deste estudo foi de 39,05 anos, com pacientes variando de 18 a 88 anos, 24% dos pacientes tinham idade superior a 55 anos. O sexo

feminino foi o mais prevalente, representando 87% da casuística. O subtipo histológico mais frequente neste estudo foi o CPTC, representando 80% dos casos.

A média do tamanho tumoral foi de 2,1cm, com tumores variando de 0,2 a 6,6cm de tamanho. Trinta e quatro tumores apresentaram multifocalidade. Extensão extratireoidiana foi presente em 32% dos casos, e 45% dos casos apresentaram metástase linfonodal.

5.2 FLUXOGRAMA DA ANÁLISE POR NGS

Figura 9- Fluxograma de amostragem para análise por NGS



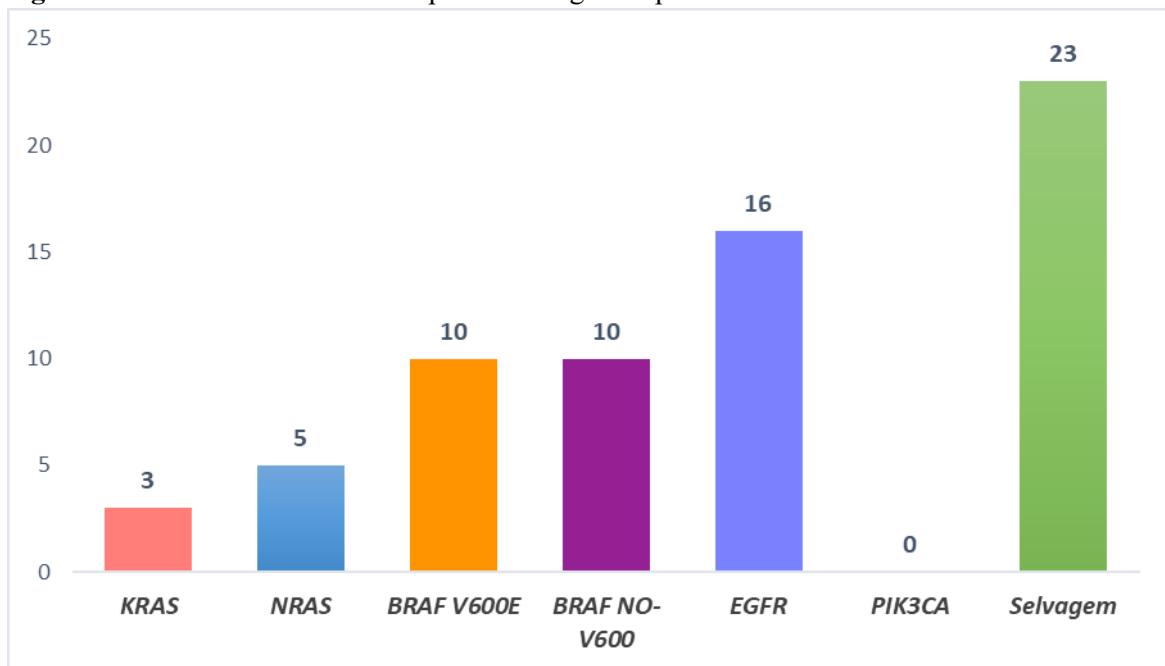
NGS, Sequenciamento de nova geração; AP, Anatomopatológico.

Fonte: elaborado pela autora.

Foram avaliados 238 casos inicialmente, porém, após a realização da triagem dos casos que passaram por revisão anatomopatológica feita pelo médico patologista, avaliação tumoral e verificação do material (lâminas, blocos e laudo) presente, restaram 100 amostras elegíveis para dar seguimento às análises por NGS. 46/100 amostras que realizaram a análise molecular por NGS apresentaram resultado inconclusivo, e 54/100 amostras apresentaram resultado molecular satisfatório, das 46 amostras que apresentaram resultado inconclusivo, 42/46 (91%) tinham acima de 9 anos de coletadas. Parte das 100 amostras (n=43) de tecido tumoral de pacientes diagnosticados com CTDCF e tratados no HAM já havia sido analisada por outra técnica de sequenciamento em uma publicação anterior⁹¹.

5.3 RESULTADO DA AVALIAÇÃO DO PAINEL MULTIGÊNICO POR NGS

Figura 10- Gráfico do resultado do painel multigênico por NGS.



Abreviações: *KRAS*, *K-Rat Sarcoma Virus*; *NRAS*, *N-Rat Sarcoma Virus*; *BRAF*, *v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B*; *EGFR*, *Epidermal Growth Factor Receptor*, *PIK3CA*, *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*.

Fonte: elaborado pela autora.

Aproximadamente, 23/54 (42,6%) das amostras analisadas não apresentaram mutação (nominadas como selvagem) nos genes analisados. 31/54 (57,4%) apresentam mutações nos genes analisados, totalizando 44 mutações encontradas, visto que, curiosamente, 12 amostras apresentaram mais de uma mutação simultânea, e uma amostra apresentou 3 mutações em genes distintos simultaneamente. As mutações no gene *BRAF* foram as mais frequentes

(20/44), correspondendo a, aproximadamente, 45% das mutações encontradas e estiveram presentes em 18/54 (33%) amostras. Interessantemente, mutações *BRAF*^{NO-V600} (*BRAF*^{A598V}, *BRAF*^{G464E}, *BRAF*^{G464R}, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{S467L}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G596D} e a deleção *BRAF*^{T599ifs*10}), que são mais raramente reportadas, foram tão frequentes (10/44) quanto as mutações *BRAF*^{V600E} (10/44), e duas amostras apresentaram os dois tipos de mutações (*BRAF*^{V600E}/*BRAF*^{NO-V600}) simultaneamente (Tabela 7).

No gene *EGFR* 16/54 (29,6%), apresentaram-se mutações, 6 casos com a deleção *EGFR*^{H850Rfs*26}, 1 *EGFR*^{E865K}, 1 *EGFR*^{H773Y}, 1 *EGFR*^{L792F}, 2 *EGFR*^{T725M}, 1 *EGFR*^{V729M}, 1 *EGFR*^{W817*}, 1 *EGFR*^{K754Qfs*7}, 1 *EGFR*^{G824Efs*51}, 1 *EGFR*^{L692Hfs*12}. Os genes *RAS* (*KRAS* e *NRAS*) apresentaram no total 8/44 (18,2%) das mutações encontradas, em 7/54 (13%) amostras, as mutações encontradas foram: 2 *KRAS*^{D119N}, 1 *KRAS*^{T58I}, 1 *NRAS*^{Q61R}, 1 *NRAS*^{A146V}, 1 *NRAS*^{G12S}, 1 *NRAS*^{Q61*}, 1 *NRAS*^{G12D}. Não foi encontrada nenhuma mutação no gene *PIK3CA* neste estudo.

5.4. ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS E MUTAÇÕES ENCONTRADAS POR NGS

Tabela 7- Dados anatomopatológicos e correlação com mutações encontradas através de painel gênico customizado.

| ID | Idade | Sexo | Subtipo histológico | Tamanho tumor (cm) | Extensão Extratireoidiana (EET) | Metástase linfonodal | Metástase à distância | Mutações encontradas |
|----|-------|------|---------------------|--------------------|---------------------------------|----------------------|-----------------------|--|
| 1 | 41 | F | CTCM | 1 | Ausente | N1 | Mx | <i>BRAF</i> ^{G596D} , <i>EGFR</i> ^{E865K} |
| 2 | 30 | F | CPTC | 3,6 | Ausente | N0 | Mx | <i>EGFR</i> ^{H850Rfs*26} |
| 3 | 33 | F | CFAI | 3,5 | Presente | N0 | Mx | <i>BRAF</i> ^{V600E} |
| 4 | 62 | F | CPTC | 0,8 | Ausente | N0 | Mx | <i>BRAF</i> ^{V600E} <i>EGFR</i> ^{H850Rfs*26} |
| 5 | 29 | F | CPTVFI | 0,9 | Ausente | N1 | Mx | <i>BRAF</i> ^{V600E} , <i>BRAF</i> ^{S467L} |
| 6 | 37 | F | CPTC | 3 | Presente | N1 | Mx | <i>EGFR</i> ^{H773Y} |
| 7 | 64 | F | CPTC | 2 | Presente | N1 | Mx | <i>BRAF</i> ^{V600E} |
| 8 | 25 | F | CPTC | 1,6 | Ausente | N1 | Mx | <i>BRAF</i> ^{V600Afs*9} , <i>EGFR</i> ^{L792F} |
| 9 | 33 | F | CPTC | 2,9 | Ausente | N0 | Mx | <i>NRAS</i> ^{Q61R} |

| | | | | | | | | |
|----|----|---|-------|-----|----------|----|----|---|
| 10 | 68 | F | CPTC | 1,8 | Ausente | N0 | Mx | BRAF ^{V600E} , EGFR ^{H850Rfs*26} |
| 11 | 19 | M | CTCM | 3,2 | Ausente | N0 | Mx | BRAF ^{G464E} |
| 12 | 36 | F | CPTC | 3,3 | Ausente | N1 | Mx | BRAF ^{V600E} , BRAF ^{G466E} |
| 13 | 48 | F | CPTVS | 2,5 | Ausente | N0 | Mx | BRAF ^{T599Ifs*10} |
| 14 | 29 | F | CPTC | 3,7 | Ausente | N1 | Mx | EGFR ^{T725M} |
| 15 | 52 | F | CPTC | 0,4 | Ausente | N0 | Mx | BRAF ^{A598V} , EGFR ^{H850Rfs*26} |
| 16 | 44 | F | CPTC | 2,3 | Ausente | N0 | Mx | EGFR ^{V729M} |
| 17 | 55 | F | CPTC | 0,6 | Ausente | N1 | Mx | EGFR ^{W817*} |
| 18 | 55 | M | CPTC | 2,5 | Presente | N1 | Mx | EGFR ^{K754Qfs*7} |
| 19 | 59 | F | CPTC | 2,2 | Presente | N0 | Mx | BRAF ^{V600E} , NRAS ^{A146V} |
| 20 | 39 | F | CPTC | 1,5 | Ausente | N0 | Mx | NRAS ^{G12S} |
| 21 | 21 | F | CPTC | 4 | Presente | N1 | M0 | KRAS ^{D119N} , NRAS ^{Q61*} e EGFR ^{H850Rfs*26} |
| 22 | 21 | M | CPTC | 3 | Ausente | N1 | M0 | BRAF ^{G464R} , KRAS ^{D119N} |
| 23 | 21 | F | CPTC | 2,5 | Ausente | N0 | M0 | KRAS ^{T58I} |
| 24 | 21 | F | CPTC | 2 | Ausente | N0 | M0 | EGFR ^{T725M} |
| 25 | 21 | F | CPTC | 0,7 | Ausente | N0 | M0 | BRAF ^{S467L} , EGFR ^{G824Efs*51} |
| 26 | 21 | M | CPTC | 4,3 | Presente | N1 | M1 | BRAF ^{V600E} |
| 27 | 21 | F | CPTC | 1,2 | Presente | N1 | M0 | EGFR ^{L692Hfs*12} |
| 28 | 20 | F | CPTC | 2,7 | Ausente | N0 | M0 | BRAF ^{S467L} |
| 29 | 19 | M | CPTC | 3 | Ausente | N1 | M1 | BRAF ^{G469E} , NRAS ^{G12D} |
| 30 | 18 | F | CPTC | 1,2 | Ausente | N1 | M0 | EGFR ^{H850Rfs*26} |
| 31 | 18 | F | CPTC | 0,8 | Ausente | N1 | M0 | BRAF ^{V600E} |

Abreviações: ID, identificação da amostra; CPTC, Carcinoma papilífero de tireoide clássico; CFAI, Carcinoma folicular amplamente invasivo; CPTVFI, Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular infiltrativo; CPTVS, Carcinoma papilífero de tireoide variante sólida; CTCM, Carcinoma de tireoide cribforme morular; N1, metástase para linfonodo cervical; N0, metástase ausente para linfonodo cervical; Mx, ausência de informação para metástase à distância, M1, presença de metástase à distância; M0, ausência de metástase à distância.

Fonte: elaborado pela autora

As amostras que apresentaram mutações no gene *BRAF* 18/54 (33%) possuem características anatomopatológicas distintas. 10/54 (18,5%) exibiram a mutação *BRAF* no códon 600 (*BRAF*^{V600E}), 8 dessas amostras do subtipo histológico CPTC, 1 amostra do subtipo CFAI e outra do subtipo CPTVFI; 4 amostras com presença de EET, 6 amostras com metástase linfonodal, 5 desses tumores com tamanho tumoral >2,0cm e uma amostra (26) com metástase à distância. As mutações *BRAF*^{NO-V600E} foram encontradas em 10/54 (18,5%) pacientes, 7 dessas mutações ainda não haviam sido descritas em CTDCF (*BRAF*^{G464E}, *BRAF*^{G464R}, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{S467L}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G596D} e a deleção *BRAF*^{T599Ifs*10}), exceto a variante *BRAF*^{A598V} já previamente reportada¹³. Em relação ao subtipo histológico associado às mutações *BRAF*^{NO-V600}: (i) mutações *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G464R} e *BRAF*^{A598V} estiveram presentes em casos de CPTC; (ii) *BRAF*^{G464E} e *BRAF*^{G596D} foram detectadas em dois casos CT cribiforme morular; (iii) deleção *BRAF*^{T599Ifs*10} observada em variante sólida de CPT; (iv) *BRAF*^{S467L} em uma amostra de variante folicular infiltrativa de CPT e uma amostra de CPTC. Das mutações *BRAF*^{NO-V600E}, 6 amostras com tamanho tumoral > 2cm, 5 amostras com metástase linfonodal e todas com ausência de EET.

Amostras com mutações no gene RAS: as mutações no gene *KRAS* foram encontradas em 3 pacientes, todos do subtipo CPTC e com tumores de tamanho acima de 2,5cm, 2 desses pacientes apresentaram outras mutações em conjunto, um paciente com as mutações *KRAS*^{D119N}, *NRAS*^{Q61*} e *EGFR*^{H850Rfs*26} e outro paciente com as mutações *KRAS*^{D119N} e *BRAF*^{G464R}. As mutações no gene *NRAS* foram encontradas em 5 pacientes, mutações nos códons 12,61 e 146 foram evidenciadas neste estudo, todos do subtipo histológico CPTC, com tumores maiores que 1,5cm. Duas amostras com as mutações *NRAS*^{Q61*} e *NRAS*^{A146V} apresentaram presença de EET, e duas amostras com as mutações *NRAS*^{G12D} e *NRAS*^{Q61*} apresentaram metástase linfonodal.

Amostras com mutações no gene EGFR: 16/54 (29,6%) amostras foram mutadas para o gene *EGFR*, todas foram do subtipo histológico CPTC, e 7 amostras (1, 4, 8, 10, 15, 21 e 25) apresentaram outra mutação em conjunto, com os genes *BRAF*, *KRAS* e *NRAS*. 9 dessas amostras apresentaram metástase para linfonodos cervicais, 7 amostras com tumores de tamanho >2,0cm e apenas 4 amostras com presença de EET.

Amostras com múltiplas mutações: (i) 21: com três mutações (*KRAS*^{D119N}, *NRAS*^{Q61*} e *EGFR*^{H850Rfs*26}) de subtipo histológico CPTC, tamanho tumoral de 4cm, EET presente e com metástase para linfonodo cervical; (ii) 5 e 12: com duas mutações no gene *BRAF* (*BRAF*^{V600E} e *BRAF*^{NO-V600E}), pacientes com idade 29 e 36 anos (respectivamente), do sexo feminino, sem

EET e com metástase para linfonodos cervicais; (iii)1,4,8,10,15 e 25: com mutações nos genes *BRAF* e *EGFR* (vide Tabela 7); (iv)19, 22 e 29: com mutações nos genes *BRAF* e *RAS*, sendo *BRAF^{V600E}* e *NRAS^{A146V}* (amostra 19) e *BRAF^{NO-V600E}* (amostra 22 e 29) associado às mutações *KRAS^{D119N}* e *NRAS^{G12D}*, respectivamente; todas do subtipo CPTC, e a amostra 19 apresentou presença de EET e a amostra 29 com metástase para linfonodos cervicais e metástase à distância.

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS COM MUTAÇÃO *BRAF^{NO-V600E}* E *BRAF^{V600E}*

Foi realizada a análise estatística entre as mutações *BRAF^{NO-V600E}* e *BRAF^{V600E}* e as características anatomopatológicas, como multifocalidade, tamanho do tumor, EET e metástase linfonodal, e apenas uma variável obteve significância estatisticamente, os indivíduos portadores da mutação *BRAF^{NO-V600E}* foram associados à ausência de EET (P= 0,046), visto na tabela 8. As mutações *BRAF^{V600E}* não apresentaram associação significativa estatisticamente com multifocalidade, tamanho do tumor, EET e metástase linfonodal.

Tabela 8- Análise estatística comparativa de características anatomopatológicas de amostras portadoras de mutações *BRAF^{NO-V600E}* vs. *BRAF^{V600E}*.

| | BRAF^{NO-V600E} | | BRAF^{V600E} | |
|--|--------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| | Selvagem | Mutado | Selvagem | Mutado |
| Multifocal, n (%) | | | | |
| Não | 26 (86,7%) | 4 (13,3%) | 24 (80%) | 6 (20%) |
| Bilateral | 18 (75,0%) | 6 (25,0%) | 20 (83,3%) | 4 (16,7%) |
| | *P= 0,311 | | P= 1.0 | |
| Tamanho do tumor, n (%) | | | | |
| <2cm | 18 (81,8%) | 4 (18,2%) | 17 (77,3%) | 5 (22,7%) |
| ≥2cm | 26 (81,2%) | 6 (18,8%) | 27 (84,4%) | 5 (15,6%) |
| | P= 1.0 | | P= 0,723 | |
| Extensão Extratireoidiana (EET), n (%) | | | | |
| Ausente | 29 (74,4%) | 10 (25,6%) | 33 (84,6%) | 6 (15,4%) |
| Presente | 15 (100%) | 0 (0%) | 11 (73,3%) | 4 (26,7%) |
| | P= 0,046 | | P= 0,438 | |
| Metástase linfonodal, n (%) | | | | |
| Ausente | 23 (82,1%) | 5 (17,9%) | 24 (85,7%) | 4 (14,3%) |
| Presente | 21 (80,8%) | 5 (19,2%) | 20 (76,9%) | 6 (23,1%) |
| | P= 1.0 | | P= 0,494 | |

*Valor de P se refere ao valor do teste exato de Fisher bicaudal.

Fonte: elaborada pela autora

5.6 NOVAS VARIANTES $BRAF^{NO-V600}$ ENCONTRADAS EM CTDCF

Foram encontrados sete tipos distintos de variantes $BRAF^{NO-V600}$ nas análises realizadas que ainda não haviam sido descritas em CTDCF, vistas na tabela 9. Como referência, utilizamos os bancos de dados: *Varsome*, *Clinvar*, *Cosmic* e *My Cancer Genome*. Cinco mutações foram encontradas no éxon 11, e duas, no éxon 15 do gene BRAF. A maioria das mutações foi do tipo *missense*, e apenas uma *frameshift*. A maior parte das variantes foi previamente relatada em câncer de pele, pulmão e colorretal.

Tabela 9- Mutações $BRAF^{NO-V600}$ encontradas em CTDCF.

| Transcrito | Impacto da codificação | Codificação | Proteína HGVS | Éxon | Tipo de variante | Tipos de tecido descrito | Referência |
|-------------|------------------------|----------------|--------------------------------------|------|------------------|---|--|
| NM_004333.6 | <i>missense</i> | c.1397G> A | G466E (p.Gly466Glu) | 11 | SNV | Pele, pulmão, intestino, hematopoiético e linfóide, Sistema nervoso central | Varsome ⁹² Clinvar ⁹³ Cosmic ⁹⁴ |
| NM_004333.6 | <i>missense</i> | c.1391G> A | G464E (p.Gly464Glu) | 11 | SNV | Colorretal, pulmão, ovário, endométrio, trato biliar | Varsome ⁹⁵ Clinvar ⁹⁶ Cosmic ⁹⁷ |
| NM_004333.6 | <i>missense</i> | c.1390G>A | G464R (p.Gly464Arg) | 11 | SNV | Pele, pulmão, Sistema Nervoso Central | Varsome ⁹⁸ ClinVar ⁹⁹ |
| NM_004333.6 | <i>missense</i> | c.1400C> T | S467L (p.Ser467Leu) | 11 | SNV | Pele, pulmão, colorretal, Sistema reprodutor feminino | Varsome ¹⁰⁰ Cosmic ¹⁰¹ My Cancer Genome ¹⁰² |
| NM_004333.6 | <i>missense</i> | c.1787G> A | G596D (p.Gly596Asp) | 15 | SNV | Sistema Nervoso Central, cérvix, pele, intestino grosso | Varsome ¹⁰³ Clinvar ¹⁰⁴ Cosmic ¹⁰⁵ |
| NM_004333.6 | <i>frameshift</i> | c.1796_1803del | T599Ifs * 10 (p.Thr599IlefsTer10) | 15 | Deleção | - | Varsome ¹⁰⁶ |
| NM_004333.6 | <i>missense</i> | c.1406G>A | G469E (p.Gly469Glu) | 11 | SNV | Pele, intestino grosso, trato urinário, trato biliar, próstata | Varsome ¹⁰⁷ Cosmic ¹⁰⁸ |

Abreviações: SNV (single nucleotide variant).

Fonte: elaborada pela autora

5.7 ANÁLISE *IN SILICO* DAS MUTAÇÕES PONTUAIS NO GENE *BRAF*

Foi realizada a análise *in silico* para prever o impacto das mutações pontuais no gene *BRAF* sobre a estabilidade da proteína (Tabela 10), através dos programas Mupro e I-Mutant 2.0. A métrica avaliada foi o valor do delta delta G ($\Delta\Delta G$), no qual, no programa Mupro, todas as variantes foram associadas à diminuição da estabilidade da proteína. Porém, no programa I-Mutant 2.0, a diminuição da estabilidade da proteína foi prevista em 5 variantes (G464R, S467L, A598V, G596D e V600E), e a estabilidade aumentada foi prevista em 3 variantes do éxon 11 (G466E, G464E e G469E).

Tabela 10- Análise de predição dos efeitos das mutações no gene *BRAF* sobre a estabilidade da proteína.

| Variante <i>BRAF</i> | Éxon | Mupro ($\Delta\Delta G$ Value) | I-Mutant 2.0 ($\Delta\Delta G$ Value) |
|----------------------|------|---------------------------------|--|
| G466E | 11 | Diminuição (-0.48682042) | Aumento (0.43) |
| G464E | 11 | Diminuição (-0.77840704) | Aumento (0.67) |
| G464R | 11 | Diminuição (-0.89009946) | Diminuição (-1.20) |
| S467L | 11 | Diminuição (-0.24015707) | Diminuição (-0.58) |
| G469E | 11 | Diminuição (-0.30162826) | Aumento (0.68) |
| A598V | 15 | Diminuição (-0.24015707) | Diminuição (-1.23) |
| G596D | 15 | Diminuição (-0.72863899) | Diminuição (-1.51) |
| V600E | 15 | Diminuição (-1.2849203) | Diminuição (-1.93) |

Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Devido à alta incidência do CT nos últimos 10 anos, surgiu a necessidade de uma compreensão melhor da patogênese molecular dessa patologia^{2,56}. O desenvolvimento do CTDCF está associado a causas multifatoriais¹⁰, inclusive com a ativação das vias de sinalização MAPK e PI3K-AKT, que são consideradas cruciais para iniciação e progressão do CTDCF. O *status* mutacional dos genes envolvidos nas vias MAPK e PI3K-AKT é de grande importância para melhor compreensão do comportamento tumoral no CTDCF, visto que pacientes portadores de câncer do mesmo tipo histológico apresentam grandes diferenças na progressão da doença, gravidade e no prognóstico, a depender da sua classificação molecular^{15,17,18,34,56,62}.

Mutações *BRAF*^{V600E} na população estudada: na literatura, a frequência da variante *BRAF*^{V600E} em adultos portadores de CPT é de 27-83%^{15,20,24,27-29,31,33,76}. No presente estudo, a frequência de mutações no gene *BRAF* foi de 33% (18/54), no entanto, a frequência da variante *BRAF*^{V600E} foi de 18,5% (10/54); essa frequência menor pode estar relacionada ao número reduzido da casuística, que obteve resultado satisfatório. Neste estudo, as mutações *BRAF*^{V600E} foram presentes majoritariamente no subtipo histológico CPTC (8 casos), porém também foi evidente em 1 caso de CFAI e 1 caso de CPTVFI.

Variantes *BRAF*^{NO-V600E} na população estudada: neste estudo, as variantes *BRAF*^{NO-V600E} foram protagonistas, pois são tão evidentes quanto as mutações *BRAF*^{V600E}, apresentando oito tipos distintos de variantes. Dessas variantes, somente a variante *BRAF*^{A598V} já havia sido descrita em um caso de CPTVF em estudo anterior¹³. Outros estudos^{79,109} também reportaram a deleção no T599, porém não na mesma posição encontrada no nosso estudo, ou seja, com este estudo, pela primeira vez, estamos reportando as variantes *BRAF*^{G464E}, *BRAF*^{G464R}, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{S467L}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G596D} e a deleção *BRAF*^{T599Ifs*10} em amostras tumorais de CTDCF. Estas variantes já haviam sido descritas em outros tipos de câncer: câncer de pele/melanoma (*BRAF*^{G464R}, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{S467L}, *BRAF*^{G469E} e *BRAF*^{G596D}), pulmão (*BRAF*^{G464E}, *BRAF*^{G464R}, *BRAF*^{G466E} e *BRAF*^{S467L}), intestino (*BRAF*^{G464E}, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{S467L}, *BRAF*^{G469E} e *BRAF*^{G596D}) e outros⁹²⁻¹⁰⁸. Esses achados inéditos podem ser explicados por conta da escassez de estudos de CT que analisam o éxon 11 e outros códons do éxon 15 do gene *BRAF*.

No melanoma¹¹⁰ e câncer pulmonar (não pequenas células)¹¹¹, as mutações *BRAF*^{NO-V600E} foram associadas a uma maior agressividade da doença, quando comparadas às *BRAF*^{V600E}, porém, no câncer colorretal¹¹², os pacientes portadores das mutações *BRAF*^{NO-V600E} apresentaram sobrevida significativamente maior em comparação aos pacientes com mutações *BRAF*^{V600E}. Em relação ao subtipo histológico, as variantes *BRAF*^{NO-V600E} foram presentes neste estudo em 6 casos de subtipo CPTC, 2 casos de CTCM, 1 caso de CPTVS e 1 caso CPTVFI.

Idade e mutações no gene *BRAF*: de acordo com o estudo de Al-Salam et al.⁷⁶ (2020), as mutações *BRAF*^{V600E} são frequentes em pacientes com idade inferior a 55 anos, sendo compatível com os achados do nosso estudo, no qual 60% dos pacientes portadores das mutações *BRAF*^{V600E} tinham idade inferior a 55 anos. Quanto à variante *BRAF*^{NO-V600E}: 100% dos pacientes portadores das mutações *BRAF*^{NO-V600E} tinham idade inferior a 55 anos. No câncer colorretal, as mutações *BRAF*^{NO-V600E} também foram associadas a idades mais jovens e tumores de baixo grau de agressividade¹¹². A associação entre a mortalidade e o aumento da idade em pacientes *BRAF*^{V600E} positivos foi evidenciada recentemente em um grande estudo¹¹³, sugerindo que a idade é um importante fator de risco para pacientes com a mutação no gene *BRAF*^{V600E}.

Tamanho tumoral/acometimento linfonodal e mutações no gene *BRAF*: alguns estudos associam a mutação *BRAF*^{V600E} a tamanhos tumorais maiores >2cm^{20,76,114,115}. No presente estudo, a média do tamanho tumoral foi de 2,26 cm, com a amplitude de 0,8-4,3 cm para tumores com a mutação *BRAF*^{V600E} vs. tamanho tumoral de 2,09cm, com amplitude de 0,4-3,2cm, para tumores com variantes *BRAF*^{NO-V600E}. Portanto, não houve associação estatisticamente significativa (p= 0,723/p=1.0) entre os diferentes tipos de mutações no gene *BRAF* e tamanho tumoral. De acordo com a meta-análise realizada por Liu, Chen, Liu³⁷ (2016), a prevalência de metástase linfonodal aumentou em pacientes com mutação *BRAF*^{V600E}. Neste estudo, a associação descritiva entre mutações *BRAF*^{V600E}/*BRAF*^{NO-V600E} e metástase linfonodal foi de 60% e 50% dos casos mutados, no entanto, não houve associação estatística (p= 0,494/p=1.0). Outros estudos¹¹⁵⁻¹¹⁶ também não encontraram associação significativa entre mutação *BRAF*^{V600E} e metástase linfonodal.

Extensão extratireoidiana e mutações no gene *BRAF*: outro fator prognóstico importante é a presença da extensão extratireoidiana, de acordo com Liu, Chen, Liu³⁷ (2016), o risco de extensão extratireoidiana aumentou 2,04 vezes em casos com status de mutação *BRAF*^{V600E} positivo em comparação com casos de tipo selvagem. Neste estudo, a EET foi

presente em 40% das amostras positivas para a mutação $BRAF^{V600E}$, enquanto foi totalmente ausente nas amostras positivas para as variantes $BRAF^{NO-V600E}$, representando associação significativamente estatística ($p=0,046$). Portanto, nossos dados sugerem que as variantes $BRAF^{NO-V600E}$ não mostram o mesmo risco de associação com EET que as mutações $BRAF^{V600E}$ classicamente possuem.

Utilidade da investigação das mutações do gene *RAS* em painéis multigênicos de análise do CTDCF: mutações no gene *RAS* estão mais associadas aos CFT e CPVFT⁶³, sendo menos frequente no CPT (10-20%)^{15,18,20,35}. No nosso estudo, a prevalência das mutações no gene *RAS* foi de ~13% (7/54) no CPT, sendo compatível com os dados da literatura. As variantes encontradas na isoforma *NRAS* foram mais evidentes, representando 9,2% (5/54), e as mutações encontradas na isoforma *KRAS* foram de 5,5% (3/54), estando também em concordância com a literatura, na qual as variantes do *NRAS* são mais frequentes no CTDCF do que a isoforma *KRAS*^{15,18,20,35}. No nosso estudo, houve tendência de maior tamanho tumoral (tamanho >2cm) nos tumores com mutação *RAS*: a média do tamanho tumoral foi de 2,72cm, com a amplitude de 1,5-4,0 cm, no entanto, não houve associação estatística ($p=0,262/p=0,638$) entre os tumores *RAS* mutados e o maior tamanho tumoral, que pode estar relacionado ao número reduzido de casos (7/54) com as mutações *RAS* neste estudo. No estudo de Semsar-Kazerooni et al.¹¹⁷ (2022), foi evidenciada a associação entre as mutações no gene *RAS* e maior tamanho tumoral quando comparados aos tumores com mutação $BRAF^{V600E}$, amostras com mutações *RAS* positivas apresentaram tamanho médio de tumor de 2,04cm.

Em discordância com a literatura^{48,63}, os nossos casos de CPVFT (5/54) e CFT (1/54) não apresentaram mutações no gene *RAS*, podendo estar relacionado ao número restrito desses tipos histológicos neste estudo. Ainda em discordância com estudos anteriores^{63,65}, descobrimos que as mutações *RAS* coexistiram com as mutações *BRAF* em três dos nossos casos de CPTCs, 1 $BRAF^{V600E}/NRAS^{A146V}$ e as outras 2 $BRAF^{NO-V600E}/KRAS^{D119N}$ e $NRAS^{G12D}$, esses achados também foram esporadicamente encontrados em um estudo prévio⁶⁶, no qual quatro tumores de CPT apresentaram as mutações $BRAF^{V600E}$ e $KRAS^{G12D}$ simultaneamente e estiveram associados à progressão da doença. Uma explicação para esse achado é que poucos estudos rastreiam todos os genes *RAS* em CTDCF mutados no gene $BRAF^{V600E}$ ⁶⁶. Embora seja um evento raro, a combinação de mutações $BRAF^{V600E}$ e *RAS* já foram descritas em outros tipos de câncer, como: carcinoma colorretal ($BRAF^{V600E}$ e $KRAS^{G12D}$)¹¹⁸⁻¹¹⁹, melanoma ($BRAF^{V600E}$ e $NRAS^{Q61K}$)¹²⁰ e estômago ($BRAF^{V600M}$ e $KRAS^{G13D}$)¹²¹.

Um dos pacientes apresentou concomitantes mutações nos genes *KRAS*^{D119N}, *NRAS*^{Q61*} e *EGFR*^{H850Rfs*26}, acompanhado de agressividade e pior prognóstico, já que apresentou tamanho tumoral de 4cm, presença de EET e metástase linfonodal, que são aspectos relacionados a uma maior agressividade de doença. Em alguns estudos^{44,46,122}, as mutações no gene *RAS* foram correlacionadas a um pior prognóstico, sugerindo que a detecção das mutações no gene *RAS* podem ser clinicamente relevantes para o diagnóstico e a estratificação de risco. Este assunto é ainda controverso, pois, segundo Marotta et al.⁷³ (2021), as mutações no gene *RAS*, isoladamente, oferecem pouca utilidade para o diagnóstico de malignidade, visto que também são evidenciadas em adenomas foliculares benignos e não necessariamente estão envolvidos na desdiferenciação dos tumores de tireoide, sendo necessária a correlação com um conjunto de outras alterações genéticas associadas. Apesar da limitação de número de casos positivos para mutações do gene *RAS* do nosso estudo, acreditamos que seja válido mantê-lo em painéis de análise multigênica, pois há possibilidade de utilidade prognóstica, sobretudo diante da associação com outras mutações.

As mutações no gene *EGFR* são pouco estudadas em CTDCF, de acordo com o estudo de Masago et al.⁷² (2009), as mutações do *EGFR* foram evidentes em 30,4% dos pacientes com CPT. No presente estudo, a prevalência foi de 29,6% (16/54), resultado muito próximo do estudo citado, embora as variantes encontradas sejam distintas. Ainda sobre o estudo de Masago et al.⁷² (2009), foi relatado que 42,8% dos pacientes apresentaram mutação no gene *EGFR* associado à variante *BRAF*^{V600E}, porém não houve associação significativa com gravidade da doença nestes pacientes. No presente estudo, também foi evidenciada a coexistência das mutações *BRAF* e *EGFR* em 11% (6/54) dos casos, três associadas à variante *BRAF*^{V600E} e as outras três associadas às variantes *BRAF*^{NO-V600E}, sendo assim, 33% (6/18) dos mutados no gene *BRAF* coexistiam com alguma mutação no gene *EGFR*, porém, em concordância com o estudo Masago et al.⁷² (2009), não foi encontrada associação significativa com relação à gravidade da doença entre os casos que portavam as duas mutações.

Das dezesseis amostras mutadas em *EGFR* ~56%, (9/16) apresentaram metástase linfonodal, e 25% (4/16) apresentaram EET. De acordo com Tang et al.⁷¹ (2014), o *EGFR* pode estar associado à metástase linfonodal em CPT, porém não foi estatisticamente significativo neste estudo (p= 0,554). A detecção de mutações no gene *EGFR* tem sido sugerida como um indicador prognóstico do comportamento tumoral agressivo em CT¹¹⁷. De acordo com Kim e colaboradores¹²³, as mutações em *EGFR* foram associadas ao câncer de

tireoide ou histórico familiar de CT em pacientes do sexo feminino com câncer de pulmão de células não pequenas, trazendo uma alerta à patogênese dessa variante genética.

No presente estudo, não foi encontrada nenhuma variante no gene *PIK3CA* em CTDCF, visto que, de acordo com a literatura^{24,34}, essas mutações possuem baixa prevalência em CPT e CFT. A compreensão molecular do CTDCF traz a possibilidade de terapias-alvo direcionáveis com inibidores seletivos de quinases, para aqueles pacientes que possuem mutações acionáveis e não respondem ao tratamento convencional, cursando com a forma mais agressiva e progressão tumoral do CTDCF³⁴. Os inibidores seletivos de quinases têm o objetivo de inibir crescimento tumoral, progressão, metástase e angiogênese, e possibilitar a esses pacientes, através da medicina personalizada, um tratamento eficaz e com chances curativas^{24,35,41}.

Houve taxa elevada (46%) de falhas na análise por NGS neste estudo, reduzindo o número de amostras com resultado satisfatório. É possível que tenha ocorrido preservação insuficiente do DNA tumoral parafinado, sobretudo nas amostras tumorais obtidas a partir de cirurgias mais antigas. Alguns estudos¹²⁴⁻¹²⁶ apontam para degradação do DNA em amostras FFEP, por conta de fragmentação e modificação química do DNA resultante da fixação em formalina e inclusão em parafina, resultando em índice de falhas no NGS, sobretudo em amostras tumorais de FFEP mais antigas (4 a 6 anos), as quais, no nosso estudo, 91% das falhas ocorreram em amostras com mais de 9 anos de coletadas, estando de acordo com os estudos citados.

7 CONCLUSÕES

- Foram encontradas novas mutações no gene *BRAF* (*BRAF*^{G464E}, *BRAF*^{G464R}, *BRAF*^{G466E}, *BRAF*^{S467L}, *BRAF*^{G469E}, *BRAF*^{G596D} e a deleção *BRAF*^{T599Ifs*10}) que não haviam sido descritas anteriormente em CTDCF.
- As variantes *BRAF*^{NO-V600E} foram significativamente evidentes neste estudo, porém não apresentaram associação significativa com parâmetros clínico-patológicos como agressividade da doença, e foram associadas a um menor risco de extensão extratireoidiana. No entanto, trazem uma alerta sobre a frequência dessas alterações em CTDCF e quais os impactos a longo prazo.
- As mutações *BRAF*^{V600E} e *RAS* não apresentaram associação estatística significativa com os aspectos clínico-patológicos relacionados à agressividade.
- As variantes no gene *EGFR* foram evidentes em 29,6% dos casos CTDCF neste estudo, porém necessitam de mais estudos para avaliar seus impactos.
- Não foram encontradas mutações no gene *PIK3CA*.
- A realização de um painel multigênico customizado por NGS para o CTDCF oferece resultados mais robustos e possibilita um diagnóstico mais preciso.
- Novos estudos de coorte com um maior número de pacientes são necessários para ajudar a esclarecer os impactos clínico-patológicos das mutações nos genes (*BRAF*, *RAS*, *EGFR* e *PIK3CA*) no CTDCF.

8 TRABALHOS GERADOS DURANTE O MESTRADO

- Publicação de artigo científico na Revista de Ciências Médicas e Biológicas, v.20 n.3 (2021): “*Mutação no gene BRAF em carcinoma diferenciado de tireoide avançado: um relato de caso*”.
- Apresentação de trabalho no XVIII Latin American Thyroid Congress na modalidade pôster: “*Beyond BRAFV600 mutations: Assessment of a multigene panel in a Brazilian cohort of papillary thyroid cancer patients*”.
- Resumo de artigo publicado em Anais do XVIII Latin American Thyroid Congress: “*Beyond BRAFV600 mutations: Assessment of a multigene panel in a Brazilian cohort of papillary thyroid cancer patients*”.
- Resumo de capítulo de livro publicado em Anais do II Simpósio de Órgãos E Sistemas de 2022, Volume 2 da coleção saúde e reabilitação: O Ponto De Equilíbrio. “*Painel Multigênico em Carcinoma Diferenciado de Tireoide*”.
- Capítulo de livro em processo de publicação na Revista de Ciências Médicas e Biológicas: “*Painel Multigênico em Carcinoma Diferenciado de Tireoide*”.

REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: Cancer J Clin.* 2021;71(3), 209-49. doi: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
2. Seib CD, Sosa JA. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2019 Mar;48:23-35. doi: 10.1016/j.ecl.2018.10.002.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2022 [citado 2022 out 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>
4. Haddad R, Nasr C, Bischoff L, Busaidy NL, Byrd D, Callender G, et al. NCCN Guidelines® Insights: thyroid carcinoma, version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw.* 2018;16(12):1429-40 doi: 10.6004/jnccn.2018.0089
5. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014;159(3):676-90. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>
6. DS Cooper, GM Doherty, BR Haugen, Kloss RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised american thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009 Nov;1167-214. doi: <http://doi.org/10.1089/thy.2009.0110>
7. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg.* 2002;26:879-85.
8. Fagin JA, Wells SA Junior. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(11):1054-67. doi:10.1056/NEJMra1501993
9. A Coca-Pelaz, Shah JP, Hernandez-Prera JC, Ghossein RA, Rodrigo JP, Hartl DM, et al. Papillary thyroid cancer—aggressive variants and impact on management: a narrative review. *Adv Ther.* 2020;37:3112-28. doi: <https://doi.org/10.1007/s12325-020-01391-1>
10. Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nature Rev Endocrinol.* 2016;12(11):646-53. doi: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.110>
11. Aboelnaga EM, Ahmed RA. Difference between papillary and follicular thyroid carcinoma outcomes: an experience from Egyptian institution. *Cancer Biol Med.* 2015;12(1):53-9. doi: <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0005>
12. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for adult patients with thyroid

- nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association Guidelines Task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2016;26:1-133. doi: <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>
13. 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(6):827-33. doi: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2008.11.003>.
 14. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on fundamental mechanisms of thyroid cancer. *Front Endocrinol*. 2020;11:102. doi:10.3389/fendo.2020.00102
 15. Nikiforov Y, Nikiforova M. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:569-80. doi: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142>
 16. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69(11):4885-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0727
 17. Hsiao SJ, Nikiforov Y. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(5):T301-13 doi: <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0166>
 18. Brehar AC, Brehar FM, Bulgar AC, Dumitrache C. Genetic and epigenetic alterations in differentiated thyroid carcinoma. *J Medicine and Life*. 2013 Oct-Dec;6(4):403-8.
 19. Nikiforova MN, Wald AI, Roy S, Durso MB, Nikiforov YE. Targeted next-generation sequencing panel (thyroseq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11): E1852-60. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2292>
 20. Rangel-Pozzo A, Sisdelli L, Cordioli MI, Vaisman F, Caria P, Mai S, et al. Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma and nuclear architecture: An overview comparing pediatric and adult populations. *Cancers*. 2020;12(11):1-26). doi: <https://doi.org/10.3390/cancers12113146>
 21. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008 May;21 (Suppl 2):S37-43. doi: 10.1038/modpathol.2008.10
 22. Li G, Lei J, Song L, Jiang K, Wei T, Li Z, et al. Radioiodine refractoriness score: a multivariable prediction model for radioiodine-refractory postoperative differentiated thyroid carcinomas. *Cancer Med*. 2018;7(11):5448-56. doi: <https://doi.org/10.1002/cam4.1794>.
 23. Roskoski R. Targeting oncogenic Raf protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacol Res*. 2018;135:239-58. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.08.013>
 24. Singh A, Ham J, Po JW, Niles N, Roberts T, Lee CS. The genomic landscape of thyroid cancer tumorigenesis and implications for immunotherapy. *Cells*. 2021;10(5):1082. doi: <https://doi.org/10.3390/cells10051082>

25. Póvoa AA, Teixeira E, Bella-Cueto MR, Batista R, Pestana A, Melo M, et al. Genetic determinants for prediction of outcome of patients with papillary thyroid carcinoma. *Cancers*. 2021;13(9):2048. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13092048>
26. Haroon Al Rasheed MR, Xu B. Molecular alterations in thyroid carcinoma. *Surg Pathol Clin*. 2019;12(4):92-30. doi: <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.08.002>
27. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Related Cancer*. 2005; 12(2): 245-62. doi:10.1677/erc.1.0978
28. Nikiforov Y, Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2005;16(3).
29. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini 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(44):7436-440. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207980>
30. Jia Y, Zhang C, Hu C, Yu Y, Zheng X, Li Y, et al. EGFR inhibition enhances the antitumor efficacy of a selective BRAF V600E inhibitor in thyroid cancer cell lines. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6763-69. doi: <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8093>
31. Pakneshan S, Salajeghe A, Smith RA, Lam AKY. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology*. 2013;45(4):346-56. doi: <https://doi.org/10.1097/PAT.0b013e328360b61d>
32. Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene*. 2018;37(24):3183-99. doi: <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0171-x>
33. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg*. 2007;246(3):466-70. doi: <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318148563d>
34. Valvo V, Nucera C. Coding molecular determinants of thyroid cancer development and progression. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(1):37-59. doi: 10.1016/j.ecl.2018.10.003
35. Jin M, Song DE, Ahn J, Song E, Lee YM, Sung TY, et al. Genetic profiles of aggressive variants of Papillary thyroid carcinomas. *Cancers*. 2021;13(4):1-11. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers13040892>
36. Anekpuranang T, Uataya M, Claimon A, Laokulrath N, Pongsapich W, Pithuksurachai P. The association between radioiodine refractory in papillary thyroid carcinoma, sodium / iodide symporter expression, and BRAFV600E mutation. *Onco Targets Ther*. 2021;14:3959-6389. doi: 10.2147/OTT.S308910
37. Liu C, Chen T, Liu Z. Associations between BRAF^{V600E} and prognostic factors and poor outcomes in papillary thyroid carcinoma: a meta-analysis. *World J Surg Onc*. 2016;14:241. doi: <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0979-1>

38. Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment: a systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2012 Sep;91(5):274-286. doi: 10.1097/MD.0b013e31826a9c71.
39. Chakravarty D, Santos E, Ryder M, Knauf JA, Liao X-L, West BL, et al. Small-molecule MAPK inhibitors restore radioiodine incorporation in mouse thyroid cancers with conditional BRAF activation. *J Clin Invest*. 2011;121:4700-11. doi: 10.1172/JCI46382
40. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between *BRAF* V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(1):42-50. doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.8253>.
41. Crispo F, Notarangelo T, Pietrafesa M, Lettini G, Storto G, Sgambato A, et al. BRAF inhibitors in thyroid cancer: clinical impact, mechanisms of resistance and future perspectives. *Cancers*. 2019;11(9):1388. doi: <https://doi.org/10.3390/cancers11091388>
42. Damiani L, Lupo S, Rossi R, Bruni S, Bartolomei M, Panareo S, et al. Evaluation of the Role of *BRAF*V600E somatic mutation on papillary thyroid cancer disease persistence: a prospective study. *Eur Thyroid J*. 2018;7(5):251-7. doi:10.1159/000490699
43. Tabriz N, Grone J, Uslar V, Tannapfel A, Weyhe D. BRAF V600E mutation correlates with aggressive clinico-pathological features but does not influence tumor recurrence in papillary thyroid carcinoma-10-year single-center results. *Gland Surg*. 2020;9(6):1902-13. doi:10.21037/gs-20-244
44. Jang EK, Song DE, Sim SY, Kwon H, Choi YM, Jeon MJ, et al. *NRAS* Codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2014;24(8):1275-81. doi: <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0053>
45. Vitagliano D, Portella G, Troncone G, Francione A, Rossi C, Bruno A, et al. Thyroid targeting of the N-ras(Gln61Lys) oncogene in transgenic mice results in follicular tumors that progress to poorly differentiated carcinomas. *Oncogene*. 2006; 25(39): 5467-74. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209527>
46. Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, et al. RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4735-41. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1233>
47. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet*. 2013;381(9871):1058-69. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60109-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60109-9)
48. Schulten HJ, Salama S, Al-Ahmadi A, Al-Mansouri Z, Mirza Z, Al-Ghamdi K, et al. Comprehensive survey of HRAS, KRAS, and NRAS mutations in proliferative thyroid lesions from an ethnically diverse population. *Anticancer Res*. 2013 Nov;33(11):4779-84.

49. Normanno N, de Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006;366:2-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.10.018>
50. Ferrari SM, Fallahi P, Politti U, Materazzi G, Baldini E, Ulisse S, et al. Molecular targeted therapies of aggressive thyroid cancer. *Front Endocrinol.* 2015;6. doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00176>
51. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13(3):184-99. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3431>
52. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008;22(6):955-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2008.09.017>
53. Nagahashi M, Shimada Y, Ichikawa H, Kameyama H, Takabe K, Okuda S, et al. Next generation sequencing-based gene panel tests for the management of solid tumors. *Cancer Sci.* 2019;110:6-15. doi: <https://doi.org/10.1111/cas.13837>
54. Cha YJ, Koo JS. Next-generation sequencing in thyroid cancer. *J Transl Med.* 2016;14(1):322. doi: <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1074-7>
55. Shrestha RT, Karunamurthy A, Amin K, Nikiforov YE, Caramori ML. Multiple mutations detected preoperatively may predict aggressive behavior of papillary thyroid cancer and guide management: a case report. *Thyroid.* 2015;25(12):1375-8. doi:10.1089/thy.2015.0278
56. Stewart BW, Wild CP, editores. *World cancer report 2014.* Lyon: IARC Press; 2014. 1010 p.
57. Ahn HS, Kim HJ, Welch HG. Korea's thyroid-cancer "epidemic"--screening and overdiagnosis. *N Engl J Med.* 2014 Nov 6;371(19):1765-7. doi: 10.1056/NEJMp1409841.
58. Morris LGT, Tuttle RM, Davies L. Changing Trends in the Incidence of Thyroid Cancer in the United States. *JAMA Otolaryngol–Head Neck Surg.* 2016;142(7):709. doi: <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2016.0230>
59. Brito JP, Gionfriddo M, Morris JC, Montori VM. Overdiagnosis of thyroid cancer and graves' disease. *Thyroid.* 2014;24(2):402-3. doi: <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0425>
60. American Cancer Society. *Cancer facts & figures 2019.* Atlanta: American Cancer Society; 2019.
61. Vladimirova U, Rumiantsev P, Zolotovskaia M, Albert E, Abrosimov A, Slashchuk K, et al. DNA repair pathway activation features in follicular and papillary thyroid tumors, interrogated using 95 experimental RNA sequencing profiles. *Heliyon.* 7(3). doi: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06408>
62. Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *J Endocrinol.* 2017;235(2):R43-61. doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0266>

63. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms. *Endocr Pathol.* 2022;33(1):27-63. doi:10.1007/s12022-022-09707-3
64. He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, et al. Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther.* 2021;6:425. doi: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5>
65. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014;159(3):676-90. doi:10.1016/j.cell.2014.09.050
66. Costa AM, Herrero A, Fresno MF, Heymann J, Alvarez JA, Cameselle-Teijeiro J, et al. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol.* 2008 Apr;68(4):618-34. doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.03077.x.
67. Henderson YC, Shellenberger TD, Williams MD, El-Naggar, Fredrick MJ, Ciepely KM, et al. High rate of BRAF and RET/PTC dual mutations associated with recurrent papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):485-91. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0933
68. Pappa T, Ahmadi S, Marqusee E, Johnson HL, Nehs MA, Cho NL, et al. Oncogenic mutations in PI3K/AKT/mTOR pathway effectors associate with worse prognosis in *BRAF^{V600E}*-driven papillary thyroid cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2021 Aug;27(15):4256-64. doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-0874>
69. Rossi ED, Martini M, Bizzarro T, Capodimonti S, Cenci T, Lombardi CP, et al. Uncommon *BRAF* mutations in the follicular variant of thyroid papillary carcinoma: new insights. *Cancer Cytopathology.* 2015;123:593-602. doi: <https://doi.org/10.1002/cncy.21586>
70. Afkhami M, Karunamurthy A, Chiosea S, Nikiforova MN, Seethala R, et al. Histopathologic and Clinical Characterization of Thyroid Tumors Carrying the BRAF(K601E) Mutation. *Thyroid.* 2016;26(2):242-7. doi:10.1089/thy.2015.0227
71. Tang C, Yang L, Wang N, Li L, Xu M, Chen GG, Liu ZM. High expression of GPER1, EGFR and CXCR1 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 May 15;7(6):3213-23.
72. Masago K, Asato R, Fujita S, Hirano S, Tamura Y, Kanda T, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations in papillary thyroid carcinoma. *Int J Cancer,* 124:2744-9. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.24250>
73. Marotta V, Bifulco M, Vitale M. Significance of RAS Mutations in Thyroid Benign Nodules and Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers.* 2021;13(15):3785. doi:10.3390/cancers13153785
74. Cox AD, Fesik SW, Kimmelman AC, Luo J, Der CJ. Drugging the undruggable RAS: Mission possible?. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(11):828-851. doi:10.1038/nrd4389
75. Radkay LA, Chiosea SI, Seethala RR, Hodak, SP, LeBeau SO, Yip L, et al. Thyroid nodules with *KRAS* mutations are different from nodules with *NRAS* and *HRAS* mutations with regard

- to cytopathologic and histopathologic outcome characteristics. *Cancer Cytopathol.* 2014;122:873-82. doi: <https://doi.org/10.1002/cncy.21474>
76. Al-Salam S, Sharma C, Afandi B, Al Dahmani K, Al-Zahrani AS, Al Shamsi A, et al. BRAF and KRAS mutations in papillary thyroid carcinoma in the United Arab Emirates. *PLoS ONE.* 2020;15(4):e0231341. doi:10.1371/journal.pone.0231341
 77. Frisone D, Friedlaender A, Malapelle U, Banna G, Addeo A. A BRAF new world. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;152. doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103008>
 78. Özdamar Oİ, Acar GÖ, Özen F, Zenginkinet T. Assessment of BRAF-V600E, KRAS, NRAS and EGFR mutations in papillary thyroid carcinoma and Hashimoto's thyroiditis. *ENT Updates.* 2020;10(2):300-5. doi: 10.32448/entupdates.711666
 79. Cho U, Oh WJ, Bae JS, Lee S, Sub Lee Y, Sin Park G, et al. Clinicopathological features of rare BRAF mutations in Korean thyroid cancer patients. *J Korean Med Sci.* 2014;29(8):1054-60. doi:10.3346/jkms.2014.29.8.1054
 80. Kim SY, Kim HR, Kim CH, Koo JS, Baek HJ, Choi C-M, et al. Association between thyroid cancer and epidermal growth factor receptor mutation in female with nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Med.* 2017;12(1):36-41. doi:10.4103/1817-1737.197774
 81. Lote H, Bhosle J, Thway K, Newbold K, O'Brien M. Epidermal growth factor mutation as a diagnostic and therapeutic target in metastatic poorly differentiated thyroid carcinoma: a case report and review of the literature. *Case Rep Oncol.* 2014;7(2):393-400. doi:10.1159/000364856
 82. Nishino M, Bellevicine C, Baloch Z. Molecular Tests for Risk-Stratifying Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: An Overview of Commercially Available Testing Platforms in the United States. *J Mol Pathol.* 2021;2(2):135-46. doi: <https://doi.org/10.3390/jmp2020014>
 83. Grada A, Weinbrecht K. Next-generation sequencing: methodology and application. *J Invest Dermatol.* 2013 Aug;133(8):e11. doi: 10.1038/jid.2013.248
 84. Rajesh R. Singh, next-generation sequencing in high-sensitive detection of mutations in tumors: challenges, advances, and applications. *J Mol Diagn.* 2020;22(8):994-1007. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.04.213>
 85. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin.* 2017 Mar;67(2):93-99. doi: 10.3322/caac.21388
 86. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology, american society of clinical oncology, and college of american pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 Jan;19(1):4-23. doi: 10.1016/j.jmoldx.2016.10.002

87. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing-based oncology panels: a joint consensus recommendation of the association for molecular pathology and college of american pathologists. *J Mol Diagn.* 2017 May;19(3):341-65. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.01.011
88. Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, et al. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the association for molecular pathology and the college of american pathologists. *J Mol Diagn.* 2018 Jan;20(1):4-27. doi: 10.1016/j.jmoldx.2017.11.003.
89. Strom SP. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med.* 2016;13(1):3-11. doi: 10.28092/j.issn.2095-3941.2016.0004
90. Technical Note: sequencing for illumina. Quality scores for next-generation sequencing [Internet]. 2011 Oct [citado 2022 Sep 22]. Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
91. Pessôa-Pereira D, Medeiros MFDS, Lima VMS, Silva JCD Junior, Cerqueira TLO, Silva ICD, et al. Association between BRAF (V600E) mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma: a Brazilian single-centre case series. *Arch Endocrinol Metab.* 2019 Mar-Apr;63(2):97-106. doi: 10.20945/2359-3997000000120.
92. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome [Internet]. 2022. [citado 2022 out]. Disponível em: <http://varso.me/bEOF>
93. Classificação da mutação gene BRAF. National Center for Biotechnology Information. ClinVar [Internet]. [VCV000376073.2]. [citado 202 out]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000376073.2>
94. Classificação da mutação gene BRAF. Cosmic [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=176433318>
95. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome[Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <http://varso.me/1aP8>
96. Classificação da mutação gene BRAF. National Center for Biotechnology Information. ClinVar [Internet]. [VCV000013964.9]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000013964.9>
97. Classificação da mutação gene BRAF [Internet]. Cosmic. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=176433781>
98. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <http://varso.me/9mLx>
99. Classificação da mutação gene BRAF. National Center for Biotechnology Information ClinVar [Internet]. [VCV000372572.7]. [citado 2022 Nov 2]. Disponível em: [19https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000372572.7](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000372572.7)
100. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <http://varso.me/1Xxn>

101. Classificação da mutação gene BRAF. Cosmic [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=176433081>
102. Classificação da mutação gene BRAF. My Cancer Genome [Internet] [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://www.mycancergenome.org/content/alteration/braf-s4671/>.
103. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <http://varso.me/1aPt>
104. Classificação da mutação gene BRAF. National Center for Biotechnology Information. ClinVar [Internet]. [VCV000376375.1]. [citado 2022 July 19]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000376375.1>
105. Classificação da mutação gene BRAF. Cosmic [Internet] [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=176435031>
106. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <http://varso.me/0n46>
107. Classificação da mutação gene BRAF. Varsome [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <http://varso.me/298y>
108. Classificação da mutação gene BRAF. Cosmic [Internet]. [citado 2022 jul 19]. Disponível em: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=176432595>
109. Schulten HJ, Salama S, Al-Mansouri Z, Alotibi R, Al-Ghamdi K, Al-Hamour OA, et al. BRAF mutations in thyroid tumors from an ethnically diverse group. *Hered Cancer Clin Pract.* 2012;10(1):10. doi:10.1186/1897-4287-10-10
110. Kim DW, Haydu LE, Joon AY, Bassett RL Junior, Siroy AE, Tet-zlaff MT, et al. Clinicopathological features and clinical out-comes associated with TP53 and BRAFNon-V600 mutations in cutaneous melanoma patients. *Cancer.* 2016;123:1372-81.
111. Litvak AM, Paik PK, Woo KM, Sima CS, Hellmann MD, Arcila ME, et al. Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers. *J Thorac Oncol.* 2014;9:1669-74.
112. Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, Schrock AB, Rankin A, Zhang BY. et al. Non-V600 BRAF mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2017;35:2624-30.
113. Shen X, Zhu G, Liu R, Viola D, Elisei R, Puxeddu E, et al. Patient age-associated mortality risk is differentiated by BRAF V600E status in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2018 Feb 10;36(5):438-5. doi: 10.1200/JCO.2017.74.5497
114. Choi EK, Chong A, Ha J-M, Jung CK, O JH, Kim, SH. Clinicopathological characteristics including *BRAF*V600E mutation status and PET/CT findings in papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol.* 2017;87:73-9. doi: <https://doi.org/10.1111/cen.13335>

115. Barreno L, Mello J, Barros-Filho M, Francisco AI, Chulam TC, Pinto CAL, et al. Characterization of BRAF mutation in patients older than 45 years with well-differentiated thyroid carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2022;88(4):523-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2020.07.007>
116. Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(12):4559-70. doi:10.1210/jc.2012-2104
117. Semsar-Kazerooni K, Morand GB, Payne AE, da Silva SD, Forest V-I, Hier MP, et al. Mutational status may supersede tumor size in predicting the presence of aggressive pathologic features in well differentiated thyroid cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022;51:9. doi: <https://doi.org/10.1186/s40463-022-00559-9>
118. Zelli V, Parisi A, Patruno L, Cannita K, Ficorella C, Luzi C, et al. Concurrent RAS and RAS/BRAF V600E variants in colorectal cancer: more frequent than expected? a case report. *Front Oncol.* 2022;12. doi:10.3389/fonc.2022.863639.
119. Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, et al. *KRAS* and *BRAF* oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene* 2007;26:158-63. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209758>
120. Kumar R, Angelini S, Hemminki K. Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. *Oncogene.* 2003 Dec 18;22(58):9217-24. doi: 10.1038/sj.onc.1206909.
121. Lee SH, Lee JW, Soung YH, Kim HS, Park WS, Kim SY, et al. BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene.* 2003 Oct 9;22(44):6942-5. doi: 10.1038/sj.onc.1206749
122. Gina M. Howell, Steven P. Hodak, Linwah Yip. Mutações RAS no câncer de tireóide. *Oncologist.* 2013;18:926-32. doi: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0072>
123. Kim S, Kim Hye-Ryoun, Kim C, Koh JS, Baek HJ, Choi C-M, et al. Association between thyroid cancer and epidermal growth factor receptor mutation in female with nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Med.* 2017;12 doi: 10.4103/1817-1737.197774
124. Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, Tran Van Nhieu J, Allory Y, et al. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch.* 2017 Oct;471(4):491-500. doi: 10.1007/s00428-017-2213-0
125. Cazzato G, Caporusso C, Arezzo F, Cimmino A, Colagrande A, Loizzi V, et al. Formalin-fixed and paraffin-embedded samples for next generation sequencing: problems and solutions. *Genes.* 2021;12(10):1472. doi: <https://doi.org/10.3390/genes12101472>
126. Kuwata T, Wakabayashi M, Hatanaka Y, et al. Impact of DNA integrity on the success rate of tissue-based next-generation sequencing: Lessons from nationwide cancer genome screening project SCRUM-Japan GI-SCREEN. *Pathol Int.* 2020;70(12):932-42. doi:10.1111/pin.13029

ANEXOS

Anexo A – Artigo publicado na Revista de Ciências Médicas e Biológicas

RELATO DE CASO

ISSN 1677-5190

© 2021 Revista de Ciências Médicas e Biológicas

DOI: 10.9771/rmb.v40i3.47697

Mutação no gene *BRAF* em carcinoma diferenciado de tireoide avançado: um relato de caso

Mutation in the BRAF gene in advanced differentiated thyroid carcinoma: a case report

Juliana Lima Von Ammon^{1*}, Helton Estrela Ramos²

¹*Bióloga. Mestranda do Programa de Pós graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia – UFBA.* ²*Médico. Professor Associado. Chefe do Laboratório de Estudo da Tireoide. Instituto de Ciências da Saúde – UFBA*

Resumo

Introdução: o carcinoma diferenciado da tireoide corresponde aproximadamente a 90% dos casos de neoplasias da tireoide, sendo que, desses, 80-85% dos casos são de carcinoma papilífero da tireoide. Apesar de a maioria desses carcinomas serem bem diferenciados e com baixa taxa de invasão local, recidiva ou metástases (regionais ou distantes), existe um subgrupo que apresenta uma heterogeneidade genética com variantes mais agressivas, podendo tornar o câncer de tireoide mais invasivo e letal. **Objetivos:** 1) Relatar o caso de um paciente adulto portador de carcinoma diferenciado da tireoide avançado, com metástase pulmonar, em terapia supressiva com levotiroxina, após tratamento combinado com cirurgia e radioiodoterapia; 2) Discutir sobre as características patológicas e moleculares como fatores relevantes no direcionamento de condutas terapêuticas. **Caso clínico:** trata-se de um paciente do sexo masculino, com 39 anos de idade, cuja a punção aspirativa com agulha fina (PAAF) foi compatível com carcinoma papilífero da tireoide que, na sequência, foi submetido a tireoidectomia total, com esvaziamento cervical. O exame anatomopatológico revelou carcinoma papilífero da tireoide clássica, com metástase em cinco linfonodos. A análise molecular realizada por sequenciamento de nova geração evidenciou a mutação no gene *BRAF* (V600E), o qual tem associação significativa com estágios mais avançados do tumor, metástases e radioiodoterapêutica. **Conclusão:** este relato possibilita discutir a necessidade de avaliação molecular como direcionamento na conduta terapêutica de cada paciente oncológico. **Palavras-chave:** Câncer Papilífero da Tireoide. Proteínas Proto-Oncogênicas B-raf. Sequenciamento de Nova Geração.

Abstract

Introduction: differentiated thyroid cancer accounts for approximately 90% cases of thyroid neoplasms, and among them 80-85% of cases are papillary thyroid carcinoma. Although most of this type of carcinoma is well differentiated and has a low rate of local invasion, recurrence, or metastases (regional or distant), there is a subgroup of tumors that present genetic heterogeneity with more aggressive variants, which may make thyroid cancer more invasive and lethal. **Objectives:** 1) To report the case of an adult patient with advanced differentiated thyroid carcinoma, and pulmonary metastasis, undergoing suppressive therapy with levothyroxine, after combined treatment with surgery and radioiodine therapy; 2) Discuss pathological and molecular characteristics as relevant factors in directing therapeutic approaches. **Case report:** a 39-year-old male patient, whose fine needle aspiration biopsy (FNAB) was compatible with papillary thyroid carcinoma, who subsequently underwent total thyroidectomy with neck dissection. Pathological examination revealed classic papillary thyroid carcinoma, with metastasis in five lymph nodes. Molecular analysis performed by second generation sequencing showed a mutation in *BRAF* gene (V600E), which has a significant association with more advanced stages of the tumor, metastases and radioiodine refractoriness. **Conclusion:** This report makes possible to discuss the need for molecular assessment as a guideline on therapeutic conduct of each cancer patient.

Keywords: Papillary thyroid cancer. Proto-oncogene proteins B-raf. Next-generation sequencing.

INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide (CT) representa a malignidade endócrina mais comum, sendo responsável por 3,6% de todos os cânceres diagnosticados anualmente¹.

O carcinoma diferenciado da tireoide (CDT) corresponde, aproximadamente, a 90% dos casos de neoplasias da tireoide e refere-se às derivadas de células foliculares, incluindo câncer papilar de tireoide (CPT), câncer folicular

da tireoide (CFT) e câncer de células de Hurthle. O CPT corresponde a 80-85% dos casos^{2,3}. Geralmente, ele é clinicamente indolente, compatível com seu genoma simples, apresentando poucas alterações no número de cópias². Embora tenha uma alta incidência, apresenta taxas de sobrevivência global excedendo a 90%⁴⁻¹¹. Apesar de a maioria dos CPT ser bem diferenciada e com baixa taxa de invasão local, recidiva ou metástases (regionais ou distantes), existe um subgrupo de tumores que apresenta heterogeneidade genética associada com variantes histológicas de maior agressividade, podendo tornar o CDT mais invasivo e letal⁵.

As características clínicas e histológicas não predizem precisamente o comportamento biológico dos tumores de tireoide, sendo relevante identificar, por meio de exames

Correspondente/Corresponding: *Juliana Lima Von Ammon – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia – End.: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Conde 40, 110-100 – Salvador – BA – Tel: (71) 99207-1942 – E-mail: juliana.ammor@ufba.br

Anexo B – Pôster apresentado no XVIII Latin American Thyroid Congress

Beyond BRAF^{V600} mutations: Assessment of a multigene panel in a Brazilian cohort of papillary thyroid cancer patients

Ammon, JLV¹, Matta, RRC, Autho¹, Machado, GJR, dos Santos, BAF, Garrido, LP, Telles, ACT¹, Pinheiro, MVO¹, Félix, GES¹, Kimura, EP¹, Fuzikawa, CS¹, Ramos, HE¹
¹Federal University of Bahia, Salvador – Brazil; ²Aristides de Menezes Hospital, Salvador, Bahia, Brazil; ³Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil
 E-mail: juliane.ammon@ufba.br



XVIII LATIN AMERICAN
 THYROID CONGRESS
 18-20th NOVEMBER 2021
 VIRTUAL EVENT

INTRODUCTION

Thyroid cancer (TC) represents the most common endocrine malignancy, accounting for 3.6% of all cancers diagnosed annually¹. Differentiated thyroid carcinoma (DTC) accounts for approximately 90% of cases of thyroid neoplasms and refers to those derived from follicular cells, including papillary thyroid cancer (PTC), follicular thyroid cancer (FTC) and cancer of the Hurthle cells. PTC corresponds to 80-85% of cases²⁻³. It is generally clinically indolent, compatible with its simple genome, with few copy number alterations⁴. Although it has a high incidence, it has overall survival rates exceeding 90%^{5,4,13}. Although most PTC are well differentiated and have a low rate of local invasion, recurrence or metastases (regional or distant), there is a subgroup of tumors that present genetic heterogeneity associated with more aggressive histological variants, which can make DTC more invasive and lethal⁶.

Clinical and histological characteristics do not accurately predict the biological behavior of thyroid tumors, and it is relevant to identify, through molecular exams, the patients with a higher risk of disease aggressiveness, in order to prevent unfavorable results and implement more personalized therapies⁶. Most mutations involved in thyroid tumorigenesis involve the effectors of the MAPK or PI3K-AKT pathways, which result in dysregulation of cell growth and differentiation⁷. Activation of MAPK is considered crucial for CPT initiation, through point mutations of BRAF and RAS genes or RET / PTC and NTRK gene fusions^{8,14}. These mutations occur in approximately 70% of TLC cases^{1,12}. The most evident somatic mutation in DTC is found in the BRAF gene, which results in a transversion from thymine to adenine at nucleotide 1799 (T1799A), leading to a substitution of valine for glutamic acid at residue 600 of the protein (V600E)^{7, 9}. BRAF gene mutation has a significant association with more advanced stages of the tumor, promoting its invasiveness, metastasis and recurrence, in addition to showing a low response to radioiodine treatment, thus being an important prognostic factor in PTC^{10,12,13}.

PTC clinical management has evolved due to improved understanding of its molecular drivers mutations reported in BRAF, RAS, TERT, ETV6, EIF1AX, GNAS, PIK3CA, EGFR, TP53 genes, as well fusions in NTRK, RET and ALK genes. Nevertheless, the clinical implication of this distinct mutations in PTC behavior is still understudied.

OBJECTIVE

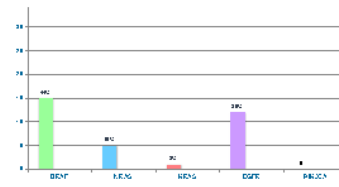
Verify the mutational and clinical profile of a Brazilian cohort of 34 PTC patients.

METHODS

A total of 34 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens from thyroidectomy were collected at the Department of Pathology of Aristides Maltz Hospital (Bahia, Brazil) in 2013. Tumor DNA was extracted with ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega, USA). Actionable hot spots regions of BRAF, EGFR, KRAS, NRAS, and PIK3CA genes were sequenced with a custom based Amplicon panel on iSeq™ 100 platform (Illumina®, USA). Bioinformatic analysis were conducted on the cloud-based VarStation™ platform. Clinical and epidemiological data were also collected.

RESULTS

The BRAF was the most mutated gene (15/34, 44%). Five novel variants of clinical significance were found at sites other than V600 (BRAF^{P601V600}), the missense mutations G464Q, G466Q, S467L, G596D, and the frameshift mutation T5991fs*10. The BRAF^{G596D} was present in a case of infiltrative follicular variant of PTC while the BRAF^{P601V600} variant was detected in a nodular cribriform PTC, the BRAF^{T5991fs*10} deletion observed in a solid variant of PTC measuring 2.5 cm and BRAF^{G596D} was evidenced in classic PTC measuring 3.3 cm. Two patients had co-occurring BRAF^{V600} and BRAF^{non-V600} mutations, and eight patients had the BRAF^{V600} mutation. For NRAS, mutations were detected in five (5/34, 15%) tumors G13D, Q61R, G12S, and A146V, while one sample had a KRAS mutation A146Qfs*10. Indeed, 12 of 34 patients had EGFR mutations, and none had PIK3CA mutations. 29% (n=10) of the PTC had ≥2 mutations. Co-occurring mutations were also observed: BRAF^{V600}/EGFR in 3 samples, and BRAF^{non-V600}/EGFR in two tumors. One tumor had co-occurring BRAF^{non-V600}/EGFR/NRAS mutations.



Graph 1. Mutations found in the study.

CONCLUSIONS

Through this study, it was possible to identify new variants in the BRAF gene. We hypothesized that BRAF^{non-V600} variants may be passenger mutations or might present clinical and molecular implications similar with BRAF^{V600} mutations, but further functional investigation is necessary.

Main references:

1. SIEB, C.D.; SOGA, J.A. Evolving understanding of the epidemiology of thyroid cancer. *Endocrine (MetaB Clin North Am)*. v. 48, n. 1, p. 25-35, Mar. 2019. doi: 10.1016/j.ecl.2018.10.002.
2. FAGIN, J.A.; WELLS, S.A. JR. Biologic and clinical perspectives on thyroid cancer. *N Engl J Med*. v. 375, n. 11, p. 1054-1067, 2016. Doi: 10.1056/NEJMa1508993.
3. THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. v. 159, n. 3, p. 676-690, 2014. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.050.
4. HAY, I.D. et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World Journal of Surgery*. n. 25, p. 879-885, 2002. PubMed: 12319458.
5. SOGA, P.E.I.A.Z. et al. Papillary thyroid cancer—Aggressive variants and impact on management: A narrative review. *Adv Ther*. n. 37, p. 311-2-5138, 2020. https://doi.org/10.1007/s12252-020-01391-1.
6. SHRESTHA, R.T. et al. Multiple mutations detected preoperatively may predict aggressive behavior of papillary thyroid cancer and guide management: A case report. *Thyroid*. v. 25, n. 12, p. 1575-1578, 2015. doi:10.1089/thy.2015.0278.
7. NIROFQV, V.; NIROFQVA, M. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. n. 7, p. 569-580, 2011. https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142.
8. NIROFQV, V.E. Cáncer de tireoide: vías moleculares e los terapéuticos. *Mod Patol*. n. 21 Suplemento 2 (Supl. 2), 537-45, May 2008. doi: 10.1007/modpathol.2008.10.
9. HADDAD, R. et al. NCCN Guidelines® Insights: thyroid carcinoma, version 2.2018. *J Natl Compr Canc Netw*. v. 16, n. 12, p. 1429-1431, 2018. doi: 10.6004/jcn.2018.0089.
10. MALO, U.; NUOJVA, C. Coding molecular determinants of thyroid cancer development and progression. *Endocrine (MetaB Clin North Am)*. v. 48, n. 1, p. 37-59, 2019. doi: 10.1016/j.ecl.2018.10.003.
11. ANEKPURITANANG, T. et al. The association between radioiodine refractory in papillary thyroid carcinoma, sodium/iodide symporter expression, and BRAFV600E mutation. *Oncol Targets Ther*. n. 14, p. 3659-3669, 2021.
12. JING, M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer*. v. 12, n. 2, p. 285-292, 2002. doi:10.1677/erc.1.0978.
13. REHAR, A.C. et al. Genetic and epigenetic alterations in differentiated thyroid carcinoma. *Journal of Medicine and Life*. Oct.-v. 6, n. 4, p. 403-408, Dec. 2013.
14. HSAO, S.J.; NIROFQV, V.E. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21, n. 5, p. T501-T515, 2014. doi:10.1530/ERC-14-0086.
15. JIN, M. et al. Genetic profiles of aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Cancers*. n. 13, p. 892, 2021. https://doi.org/10.3390/cancers1304892.

Anexo C – Resumo publicado em Anais do XVIII Latin American Thyroid Congress.



SUMÁRIO

THYROID AND PREGNANCY

- 104428 PRECONCEPTION THYROTROPIN LEVELS, THEIR RELATIONSHIP WITH INCREASED DOSE IN PREGNANCY AND ADVERSE OUTCOMES. STUDY IN COLOMBIAN POPULATION
Carlos Alfonso Bulles Barrera, Myriam Vanessa Rueda Galvis, Jorge Hernando Donado Gómez529

THYROID AND PREGNANCY

- 104512 NORMAL LEVELS OF TSH IN COLOMBIAN PREGNANT WOMEN
Carlos Alfonso Bulles-Barrera, Melissa Sofia Naranjo Vanegas529

THYROID CANCER CLINICAL

- 103753 THE CHALLENGES OF GENOMIC INTERROGATION IN PATIENTS WITH ADVANCED THYROID CANCER IN THE REAL-LIFE SCENARIO
Fernando Jerkovich, Erika Abelleira, Fernanda Bueno, Fabián Piloia530

THYROID CANCER CLINICAL

- 104213 LEPTOMENINGEAL CARCINOMATOSIS IN DIFFERENTIATED THYROID CANCER – AN INFREQUENT DIAGNOSIS WITH ADVERSE PROGNOSIS
Matias Calabretta, Maria Laura Iglesias, Eduardo Faure, Juan Manuel Carrera, Ines Califano530

THYROID CANCER CLINICAL

- 104214 LONG-TERM OUTCOME OF PATIENTS WITH DIFFERENTIATED THYROID CANCER AND INDETERMINATE RESPONSE TO INITIAL TREATMENT
Matias Calabretta, Maria Laura Iglesias, Ines Califano531

THYROID CANCER CLINICAL

- 104427 DABRAFENIB PLUS TRAMETINIB TREATMENT IN ANAPLASTIC THYROID CARCINOMA
Fernanda Bueno, Anabela Smulever, Inés Califano, Jorgelina Guerra, Andrés Del Grecco, Juan Manuel Carrera, Manglio Miguel Rizzo, Aleja Lingua, Ana Voogd, María del Carmen Negueruela, Erika Abelleira, Fabián Piloia531

THYROID CANCER CLINICAL

- 104243 BASAL OR STIMULATED THYROGLOBULIN ON EVALUATION OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA? A RETROSPECTIVE COHORT STUDY
Leticia Barreto, Carlos Segundo Paiva Soares, Cristiano Claudino Oliveira, Simone Antunes Terra, José Vicente Tagliarini, Katia Hiromoto Koga, Sonia Maria Moriguchi, José Eduardo Corrente, Gláucia Maria Ferreira da Silva532

THYROID CANCER CLINICAL

- 104264 THYROID CANCER STAGING FROM MACRO TO MICROCARCINOMA A THOROUGH REVISION FROM THE FIRST EDITION (1968) TO THE LATEST EIGHTH EDITION IN 2018
Carlos S. Duque, Carlos E. Bulles, Alejandro Vélez, Catalina Tobón, Juan Guillermo Sanchez, Andrés F. Londoño, Julia Valencia, Miguel Agudelo, Juan Pablo Dueñas, María Fernanda Palacio532

THYROID CANCER CLINICAL

- 104265 BEYOND BRAFV600 MUTATIONS: ASSESSMENT OF A MULTIGENE PANEL IN A BRAZILIAN COHORT OF PAPILLARY THYROID CANCER PATIENTS
Juliano Lima Von Ammon, Gabriel Jefferson Rodríguez Machado, Rafael Reis Campos da Matta, Ana Clara Oliveira Tosta Telles, Fabiane Tavares Carrijo, Bruno Alexander França dos Santos, Juliana Brandão Cabral, Marcos Vinícius Cardoso Pinheiro, Gabriela Felix, Edna Teruko Kimura, Cesar Seigi Fujiwara, Helton Estrela Ramos533

Anexo D- Resumo de capítulo de livro publicado em Anais do II Simpósio de Órgãos E Sistemas de 2022.

PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS



ANAIS DO II SIMPÓSIO DE ÓRGÃOS E SISTEMAS 2022

**RESUMO DOS CAPÍTULOS DE LIVROS PRODUZIDOS
PELOS MESTRANDOS, DOUTORANDOS E PROFESSORES
ORIENTADORES NO COMPONENTE CURRICULAR
ICSE62 – PESQUISA ORIENTADA PRESENCIAL**

**PREVISÃO DE PUBLICAÇÃO:
VOLUME 2 DA COLEÇÃO SAÚDE E REABILITAÇÃO: O PONTO DE EQUILÍBRIO**

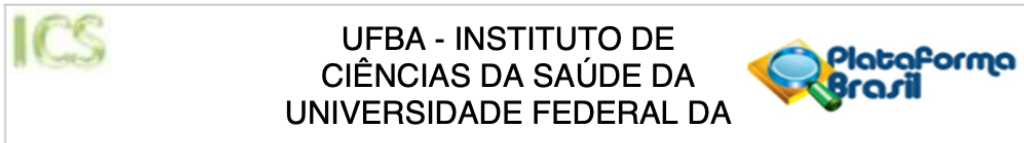
**Revista Ciências Médicas e Biológicas
[Journal of Medical and Biological Sciences]**

ISSN (impresso) 1677 – 5090
ISSN (on line) 2236-5222

Aprovada a publicação dos artigos originais no Número Especial da Revista de

| | |
|--|------------|
| CUIDADO AO PACIENTE ONCOLÓGICO DURANTE A PANDEMIA DE COVID-19 | 371 |
| Andressa Souza Jesus, Gabriela Botelho Martins | |
| REARRANJOS RET E O CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE NA JUVENTUDE | 372 |
| Gabriel Jeferson Rodríguez Machado, Helton Estrela Ramos, Taise Lima de Oliveira Cerqueira | |
| MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA POSTURA DO PÉ EM DIFERENTES TAREFAS | 373 |
| Grimaldo Ferreira da Silva Júnior, Cristiano Sena da Conceição | |
| MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO FUNCIONAL DE INDIVÍDUOS CARDIOPATAS INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA | 374 |
| José da Natividade Menezes Júnior, Helena França Correia | |
| O CUSTO DE SE TER UMA DOENÇA RARA | 375 |
| Juliana Cana Brazil Costa ¹ , Edna Lúcia Souza ² | |
| PAINEL MULTIGÊNICO EM CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE | 376 |
| Juliana Lima Von Ammon, Helton Estrela Ramos | |
| FUNCIONALIDADE DE CRIANÇAS HOSPITALIZADAS COM DIAGNÓSTICO DE CARDIOPATIA CONGÊNITA | 377 |

Anexo E – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de Mutações na Região Promotora do gene TERT em Carcinoma de Tireoide

Pesquisador: Helton Estrela Ramos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 56855016.6.0000.5662

Instituição Proponente: Universidade Federal da Bahia - UFBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.874.922

Apresentação do Projeto:

A mutação no promotor do gene TERT (C228T/C250T) bem como a coexistência desta com a mutação somática BRAFV600E tem sido relatadas como preditores de agressividade tumoral em carcinoma de tireoide. O perfil molecular da doença nodular tireoideana é alvo de intensa investigação na busca de marcadores moleculares que constituam ferramentas auxiliares no diagnóstico pre-operatório e que sejam de valor prognóstico para melhor manejo clínico e seguimento dos pacientes. O presente projeto de pesquisa visa, através de um grupo amostral de pacientes diagnosticados com carcinoma de tireoide em Salvador/BA, avaliar a associação deste background genético com aspectos clinicopatológicos de agressividade tumoral e contribuir para corroborar os resultados replicados em outros grupos étnicos na validação deste emergente biomarcador como coadjuvante na prática clínica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estabelecer a frequência da mutação do promotor do gene TERT e as associações entre a positividade para mutação do promotor do gene TERT e positividade para a mutação BRAFV600E com aspectos clinicopatológicos tais como tamanho do tumor, ocorrência de metastases

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

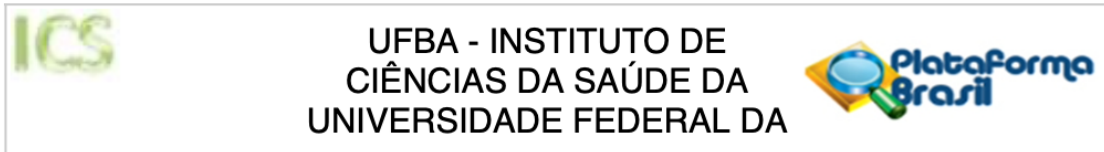
UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

CEP: 40.110-902

E-mail: cep.ics@outlook.com



Continuação do Parecer: 1.874.922

locorregionais e a distancia, estadiamento tumoral, subtipo histologico, presenca de tireoidite, estratificacao de risco de recorrencia, bem como os dados demograficos, idade e sexo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A presente pesquisa apresenta risco minimo associado a revisao de prontuarios clinicos, nao havendo nenhuma intervencao extra para alem do exames diagnosticos e procedimentos comuns ao tratamento da doenca ja prescritos pelo medico. O paciente sera devidamente esclarecido quanto ao carater de pesquisa de base deste projeto, a fim de nao gerar nele expectativas equivocadas quanto ao impacto imediato deste estudo na cura e/ou evolucao da doenca.

Benefícios:

O presente projeto de pesquisa pretende estimular a articulacao com outras instituicoes de pesquisa do pais e do estado, incentivando a troca de experiencias e transferencia de tecnologia. O compromisso das atividades conjuntas das instituicoes envolvidas e a disponibilidade de instalacoes e equipamentos como contrapartida das mesmas, garantem a relacao de reciprocidade ja existente em um grau mais elevado de atividades interinstitucionais. O projeto pretende padronizar e introduzir tecnica que poderia otimizar a utilizacao de recursos diagnosticos e terapeuticos em hospitais publicos e privados, alem de promover uma melhoria no manejo clinico do cancer de tireoide e, assim, diretamente, influenciar custos com o tratamento e seguimento clinico da doenca, alem de promover importante avanco na estratificacao de risco do cancer e melhor direcionamento dos recursos disponiveis.

A utilizacao do marcador prognostico molecular de identificacao da mutacao TERT podera, possivelmente, promovera, por exemplo:

a) inibicao da indicacao de radioiodoterapia em altas doses para tumores de baixa agressividade; b) a realizacao excessiva de exames e testes diagnosticos em tumores nao agressivos, levando a reducao dos custos em termos de saude publica; c) identificacao de lesoes de comportamento biologico mais invasivo com melhor direcionamento dos recursos para estes casos mais agressivos; d) intensificacao no follow-up de lesoes de alto risco de recorrencia, possibilitando deteccao mais precoce de recidivas com reducao de custos no tratamento de pacientes incuraveis e reducao de morbi-mortalidade; e) reducao das taxas de recorrencia tumoral; f) reducao de mortalidade, uma vez que lesoes mais agressivas poderao ser identificadas no pos-operatorio imediato e assim a radioiodoterapia, terapia de supresao do TSH com levotiroxina e seguimento clinico serao ajustados ao prognostico tumoral. Alem disso, a mutacao TERT e marcador molecular

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

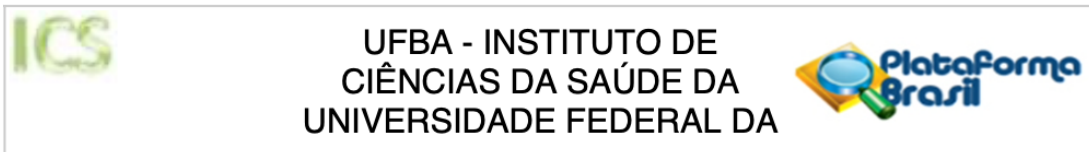
CEP: 40.110-902

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cep.ics@outlook.com



Continuação do Parecer: 1.874.922

prognóstico de outros tipos; g) melhoria no tratamento do cancer de tireoide que e o segundo cancer mais comum em pacientes do sexo feminino com menos de 40 anos, e portanto, melhorando as condicoes de saude de parcela da populacao economicamente ativa. Um outro ponto importante e que este projeto serve de ponto de partida para a deteccao de mutacao TERT em material de puncao aspirativa de agulha fina, no estabelecimento de diagnostico de carcinoma diferenciado de tireoide. Como marcador molecular de carcinoma, este procedimento podera diminuir o indice de exames citologicos nao-conclusivos em material de biopsias de agulha fina de tumores tireoidianos e realizar avaliacao prognostica na fase pre-operatoria, podendo influenciar na extensao da conduta cirurgica adotada, e consequentemente otimizar o tratamento clinico oferecido aos pacientes na rede hospitalar, com reducao expressiva de custos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de resposta ao parecer CEP ICS nº 1.775.227. O pesquisador atendeu a todas as pendencias listadas. O projeto de pesquisa se encontra adequado do ponto de vista ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos e, desta forma, somos favoráveis à aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde (CEP ICS), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº. 466 de 2012 e na Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP ICS de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em 19/06/2017, e ao término do estudo. O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar -se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12 em substituição à Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d). O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

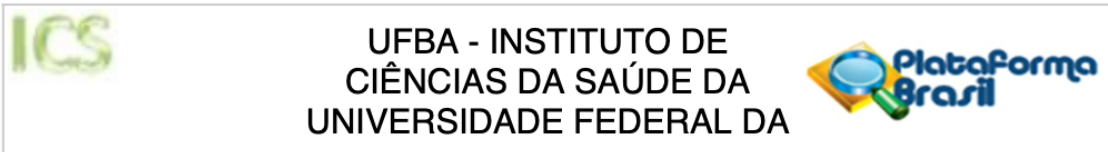
UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cep.ics@outlook.com



Continuação do Parecer: 1.874.922

descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata. O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ANVISA junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|-------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720795.pdf | 24/11/2016 15:46:17 | | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTA_RESPOSTA.pdf | 24/11/2016 15:42:40 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Recurso Anexado pelo Pesquisador | Carta_Justificativa_instituicao_coparticipante.pdf | 24/11/2016 15:40:51 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Dispensa_TCLE.pdf | 24/11/2016 15:39:59 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Reg_Biorrep.pdf | 24/11/2016 15:38:08 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Carta_anuencia_HAM.pdf | 24/11/2016 15:37:21 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Pesquisa.pdf | 24/11/2016 15:36:53 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhaRostoAss.pdf | 19/05/2016 14:00:19 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Termo_Responsabilidade_compromisso.pdf | 18/05/2016 00:20:54 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Termo_Compromisso_Dados_Prontuarios.pdf | 18/05/2016 00:20:26 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | Equipe_detalhada.pdf | 18/05/2016 00:18:38 | Helton Estrela Ramos | Aceito |

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

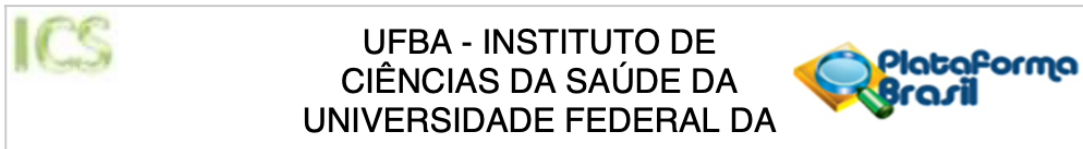
CEP: 40.110-902

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cep.ics@outlook.com



Continuação do Parecer: 1.874.922

| | | | | |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------|--------|
| Declaração de Pesquisadores | Declaracao_confidencialidade.pdf | 18/05/2016 00:17:13 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | Carta_Encaminhamento.pdf | 18/05/2016 00:15:41 | Helton Estrela Ramos | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 19 de Dezembro de 2016

Assinado por:
ANA PAULA CORONA
(Coordenador)

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

CEP: 40.110-902

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cep.ics@outlook.com

LIGA BAHIANA CONTRA O
CÂNCER/ HOSPITAL
ARISTIDES MALTEZ LBCC/BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de Mutações na Região Promotora do gene TERT em Carcinoma de Tireoide

Pesquisador: Helton Estrela Ramos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 56855016.6.3001.0050

Instituição Proponente: Universidade Federal da Bahia - UFBA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.939.949

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de corte transversal em material de arquivo parafinado e em prontuário de pacientes com diagnóstico de carcinoma de tireóide entre 2010 e 2016. As justificativas para realização do projeto, considerações éticas e metodologia encontram-se detalhadas.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecer a frequência da mutação do promotor do gene TERT e as associações entre a positividade para mutação do promotor do gene TERT e positividade para a mutação BRAFV600E com aspectos clinicopatológicos tais como tamanho do tumor, ocorrência de metástases locorregionais e à distância, estadiamento tumoral, subtipo histológico, presença de tireoidite, estratificação de risco de recorrência, bem como os dados demográficos, idade e sexo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá contato com paciente, apenas com tecido parafinado e dados de prontuário. Está prevista a constituição de biorepositório que ficará sob a responsabilidade dos pesquisadores do HAM Dra. Juliana Cabral e Dr. André Leonardo, com termo de responsabilidade assinado por ambos.

Endereço: Av.D.João VI 332 - Unid. Oncologia Pediátrica

Bairro: 4º andar - Brotas

CEP: 40.285-001

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3357-6997

Fax: (71)3357-6997

E-mail: cep@aristidesmaltez.org.br

**LIGA BAHIANA CONTRA O
CÂNCER/ HOSPITAL
ARISTIDES MALTEZ LBCC/BA**



Continuação do Parecer: 1.939.949

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de interesse para conhecimento do comportamento biológico de carcinomas de tireoide. O estudo é retrospectivo e será conduzido em amostras arquivadas de tecido parafinizado e em prontuário.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes e de acordo com as normas CEP - CONEP

Recomendações:

Atualizar a equipe com inclusão dos pesquisadores do Hospital Aristides Maltez que ficarão responsáveis pelo biorepositório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

As recomendações já foram esclarecidas com o Pesquisador Responsável e Assistente. De acordo com o Parecer do relator. O protocolo observa os princípios éticos da: autonomia, beneficência, não maleficência e justiça assim como assegura o sigilo das identidades, das informações e dados. Está em conformidade com as resoluções do Conselho Nacional de Saúde, e os pesquisadores comprometem-se em zelar pelo sigilo e proteção aos participantes sob todos os aspectos, garantindo assim os direitos fundamentais do participante da pesquisa quanto à informação e privacidade.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|-------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720795.pdf | 24/11/2016 15:46:17 | | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | CARTA_RESPOSTA.pdf | 24/11/2016 15:42:40 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Recurso Anexado pelo Pesquisador | Carta_Justificativa_instituicao_coparticipante.pdf | 24/11/2016 15:40:51 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | Dispensa_TCLE.pdf | 24/11/2016 15:39:59 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material | Reg_Biorrep.pdf | 24/11/2016 15:38:08 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |

Endereço: Av.D.João VI 332 - Unid. Oncologia Pediátrica
Bairro: 4º andar - Brotas **CEP:** 40.285-001
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3357-6997 **Fax:** (71)3357-6997 **E-mail:** cep@aristidesmaltez.org.br

**LIGA BAHIANA CONTRA O
CÂNCER/ HOSPITAL
ARISTIDES MALTEZ LBCC/BA**



Continuação do Parecer: 1.939.949

| | | | | |
|---|--|------------------------|-------------------------|--------|
| Biológico / Biorepositório / Biobanco | Reg_Biorrep.pdf | 24/11/2016 15:38:08 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Carta_anuencia_HAM.pdf | 24/11/2016 15:37:21 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_Pesquisa.pdf | 24/11/2016 15:36:53 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720795.pdf | 03/06/2016 08:57:32 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projetos_Anexos.pdf | 03/06/2016 08:55:49 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720795.pdf | 19/05/2016 14:01:10 | | Aceito |
| Folha de Rosto | FolhaRostoAss.pdf | 19/05/2016 14:00:19 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Regulamento_Biorrepositorio.pdf | 19/05/2016 13:58:25 | Fabiane Tavares Carrijo | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Termo_Responsabilidade_compromisso.pdf | 18/05/2016 00:20:54 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Termo_Compromisso_Dados_Prontuarios.pdf | 18/05/2016 00:20:26 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | Equipe_detalhada.pdf | 18/05/2016 00:18:38 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Declaracao_confidencialidade.pdf | 18/05/2016 00:17:13 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | Carta_Encaminhamento.pdf | 18/05/2016 00:15:41 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Carta_Anuencia_HDPA.pdf | 18/05/2016 00:15:10 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Carta_Anuencia_HP.pdf | 18/05/2016 00:14:46 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 17/05/2016 23:43:31 | Helton Estrela Ramos | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Av.D.João VI 332 - Unid. Oncologia Pediátrica
Bairro: 4º andar - Brotas **CEP:** 40.285-001
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3357-6997 **Fax:** (71)3357-6997 **E-mail:** cep@aristidesmaltez.org.br

LIGA BAHIANA CONTRA O
CÂNCER/ HOSPITAL
ARISTIDES MALTEZ LBCC/BA



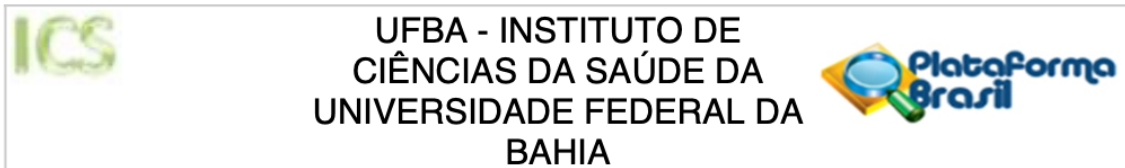
Continuação do Parecer: 1.939.949

Não

SALVADOR, 23 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Maria do Carmo da Silva Mendes
(Coordenador)

Endereço: Av.D.João VI 332 - Unid. Oncologia Pediátrica
Bairro: 4º andar - Brotas **CEP:** 40.285-001
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3357-6997 **Fax:** (71)3357-6997 **E-mail:** cep@aristidesmaltez.org.br



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: RASTREAMENTO DE REARRANJOS DOS GENES NTRK EM CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE DE CRIANÇAS, ADOLESCENTES E ADULTOS

Pesquisador: Helton Estrela Ramos

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 34192920.6.0000.5662

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.470.375

Apresentação do Projeto:

Este estudo tem o intuito de rastrear e determinar a frequência das fusões gênicas NTRK na população de crianças e adolescentes atendidos com CPT no Hospital Aristides Maltez (HAM), e simultaneamente, estabelecer correlação com o grau de agressividade tumoral. Atualmente, existe uma substância disponível já aprovada pela ANVISA, para o tratamento de cânceres NTRK positivos. Esta substância é o larotrectinibe, um inibidor seletivo da TRK que foi amplamente testado em adultos e crianças (48–52). Uma das principais novidades dessa terapia é - além do alvo - sua abordagem agnóstica do tumor. O larotrectinibe pode ser aplicado em todos os cânceres com fusão NTRK comprovada, independentemente da entidade tumoral e da idade dos pacientes. Nos ensaios de fase 1/2, um total de 55 pacientes foram incluídos com diferentes fusões NTRK. Todos os três genes NTRK foram representados e a faixa etária foi de 4 meses a 76 anos. A taxa de resposta geral foi de 75%. Após um ano, a resposta manteve-se em 71% dos pacientes que responderam e 55% dos pacientes apresentavam sobrevida livre de progressão.

Estudo retrospectivo de corte transversal multicêntrico envolvendo amostras tumorais de casos de CPT em pacientes pediátricos, adolescentes ou adultos jovens com menos de 21 anos de idade, diagnosticados e tratados entre janeiro de 2010 e março de 2020, na Santa Casa de Misericórdia

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

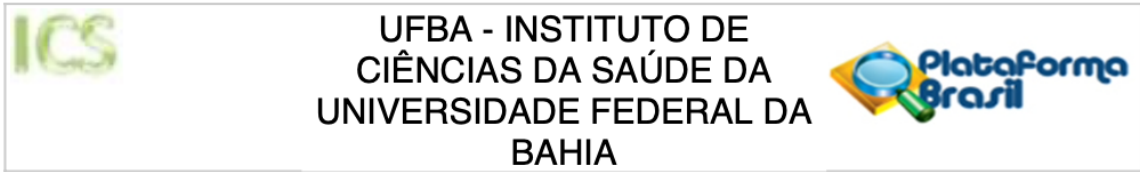
UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 5.470.375

de Feira de Santana (SCMFS), localizado na cidade de Feira de Santana, Bahia. Foram selecionados casos consecutivos e suas respectivas amostras tumorais resultantes de ressecções cirúrgicas da tireoide realizadas pelo Serviço

de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (SCCP) da SCMFS, fixadas em formalina e conservadas em blocos de parafina. O Hospital SCMFS, CNES número 2601680, é gerenciado pela Santa Casa de Misericórdia em Feira de Santana, Bahia e também é referência regional no tratamento cirúrgico oncológico. Serão incluídos o Hospital Aristides Maltez (HAM), o Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW-UFPA) e o Instituto Integrado como instituições coparticipantes.

Objetivo da Pesquisa:

Gerais

Rastrear a presença de fusões NTRK, utilizando imunohistoquímica, em carcinoma papilífero de tireoide de crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos) atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana (SCMFS).

Específicos

Determinar a prevalência de fusões NTRK nos tumores do subtipo CPT detectados em crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos) atendidos na Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

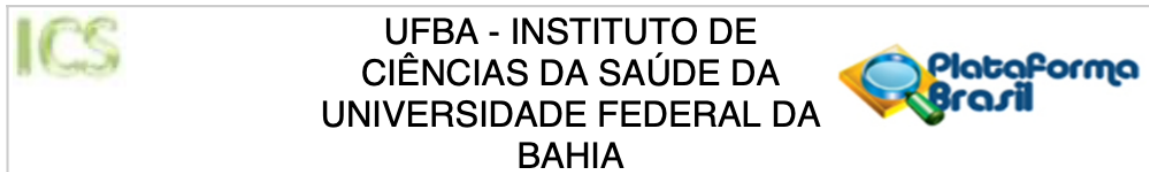
Riscos:

Quanto aos riscos: a) respeito à privacidade dos participantes, no sentido de que os autores se comprometem a guardar sigilo sobre as informações coletadas tanto nas análises histopatológicas, quanto na revisão dos prontuários; b) o pesquisador responsável estabeleceu salvaguardas seguras para confidencialidades dos dados de pesquisa; c) os dados obtidos na pesquisa somente serão utilizados para o projeto vinculado; os quais serão mantidos em sigilo, em conformidade com o que prevê os termos da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Benefícios:

Quanto aos benefícios: a) a avaliação de alterações genéticas das amostras tumorais podem trazer informações relevantes com aplicabilidade clínica direta no manejo do câncer de tireoide do

| | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Endereço: Miguel Calmon | |
| Bairro: Vale do Canela | CEP: 40.110-902 |
| UF: BA | Município: SALVADOR |
| Telefone: (71)3283-8951 | E-mail: cepics@ufba.br |



Continuação do Parecer: 5.470.375

paciente, sobretudo se há doença metastática ou radioiodoresistente; b) na revisão dos aspectos anatomopatológicos, pode-se gerar detalhamento mais minucioso do laudo anatomopatológico (como subtipo histológico, presença de ruptura de cápsula de linfonodo cervical e quantificação de invasão vascular) – dados que não são geralmente valorizados nos laudos anatomopatológicos obtidos na rotina hospitalar. Estes dados podem ter relevância na condução do caso, podendo possibilitar melhor estimativa do risco de recorrência tumoral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de solicitação de emenda para remoção do Instituto Nacional do Câncer (INCA) como instituição coparticipante;

2. Inserção do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW-UFPB) e Instituto Integrado como instituições coparticipantes, no tópico “Desenho do estudo e população estudada”;

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

vide conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de solicitação de emenda para remoção do Instituto Nacional do Câncer (INCA) como instituição coparticipante; e

2. Inserção do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW-UFPB) e Instituto Integrado como instituições coparticipantes, no tópico “Desenho do estudo e população estudada”;

Após análise o CEP do Instituto de Ciências da Saúde é de parecer favorável a aprovação da emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tenho a satisfação de informar que a emenda do seu protocolo de pesquisa foi aprovado pelo CEP/ICS, em acordo com as exigências estabelecidas na Resolução nº 466/2012 e Norma Operacional nº 001/2013 do Conselho Nacional de Saúde. Deste modo, sua coleta de dados poderá ser iniciada, seguindo o cronograma estabelecidos.

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

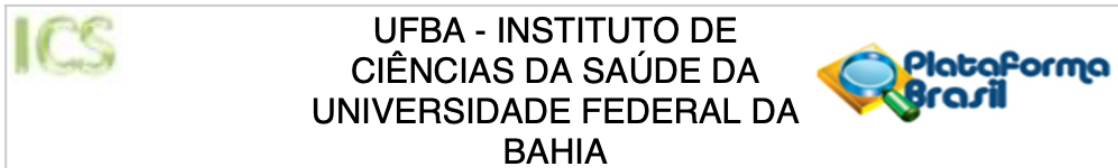
UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 5.470.375

Ressalta-se que, conforme institui a referida resolução, é necessário enviar a este CEP os relatórios semestrais pertinentes ao projeto, bem como o relatório final tão logo a pesquisa seja concluída.

Em nome dos membros CEP/ICS, desejo-lhe pleno êxito no desenvolvimento de seu projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|--|------------------------|----------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_194041_1_E2.pdf | 02/05/2022 03:45:19 | | Aceito |
| Outros | Emenda_NTRK.pdf | 02/05/2022 03:44:56 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | ProjetoNTRK.pdf | 02/05/2022 03:42:29 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Anuencia_IT.pdf | 02/05/2022 03:32:10 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Anuencia_HULW.pdf | 02/05/2022 03:31:55 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | anuencia_HAM.pdf | 10/05/2021 19:12:48 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | Solicitacao_dispensa_TCLE_NTRK.odt | 14/09/2020 21:24:52 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_Rosto.pdf | 14/09/2020 21:21:58 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | TermodeanuencialInstituicao.pdf | 28/06/2020 01:37:28 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | NTRKEquipedetalhadaatualizada.pdf | 28/06/2020 01:33:41 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | AnuenciaCEDAPI.pdf | 28/06/2020 01:31:40 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Declaração de concordância | AnuenciaSCMFSA.pdf | 28/06/2020 01:17:37 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | NTRKbiorrepositorio.pdf | 17/06/2020 20:20:49 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | NTRKEncaminhamento.pdf | 17/06/2020 20:18:26 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
| Outros | ConfidencialidadeNTRK.pdf | 17/06/2020 20:17:19 | Helton Estrela Ramos | Aceito |

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

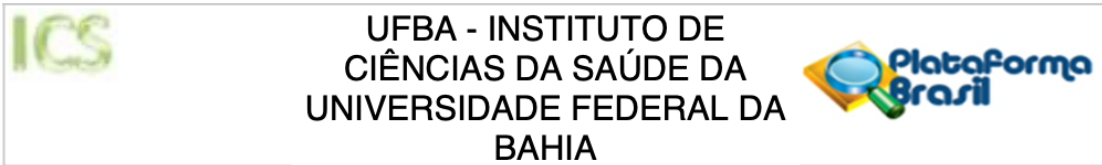
CEP: 40.110-902

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3283-8951

E-mail: cepics@ufba.br



Continuação do Parecer: 5.470.375

| | | | | |
|---|------------------|------------------------|----------------------|--------|
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | DispensaTCLE.pdf | 17/06/2020 20:10:34 | Helton Estrela Ramos | Aceito |
|---|------------------|------------------------|----------------------|--------|

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 15 de Junho de 2022

Assinado por:
Roberto Paulo Correia de Araújo
(Coordenador(a))

Endereço: Miguel Calmon
Bairro: Vale do Canela
UF: BA **Município:** SALVADOR **CEP:** 40.110-902
Telefone: (71)3283-8951 **E-mail:** cepics@ufba.br



Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100 Salvador, Bahia,
Brasil
<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>