

UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

GABRIEL JEFERSON RODRÍGUEZ MACHADO



**FUSÕES DO GENE *RET* EM PAINEL
MULTIGÊNICO PARA CÂNCER DE
TIROIDE NUMA POPULAÇÃO
INFANTOJUVENIL**

Salvador
2023

GABRIEL JEFERSON RODRÍGUEZ MACHADO

**FUSÕES DO GENE *RET* EM PAINEL MULTIGÊNICO PARA CÂNCER
DE TIROIDE NUMA POPULAÇÃO INFANTOJUVENIL**

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.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos

Coorientadora: Dra. Taíse Lima de Oliveira Cerqueira

Salvador

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Machado, Gabriel Jeferson Rodríguez.

Fusões do gene *RET* em painel multigênico para câncer de tireoide numa população infantojuvenil / Gabriel Jeferson Rodríguez Machado. - 2023.
85 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Taíse 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, 2023.

1. Neoplasias da glândula tireoide. 2. Câncer em crianças. 3. Câncer em adolescentes. 4. Fusão gênica. 5. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala. I. Ramos, Helton Estrela. II. Cerqueira, Taíse 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 616.99444 - 23. ed.

Elaborada por Maria Auxiliadora da Silva Lopes - CRB-5/1524



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



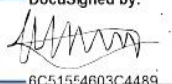
TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO

GABRIEL JEFERSON RODRÍGUEZ MACHADO

**FUSÕES DO GENE RET EM PAINEL MULTIGÊNICO PARA CÂNCER DE TIREOIDE
NUMA POPULAÇÃO INFANTOJUVENIL**

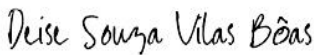
Salvador, Bahia, 31 de março de 2023

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:

6C51554603C4489


PROF. DR. HELTON ESTRELA RAMOS (Examinador Interno)

DocuSigned by:



PROFA. DRA. DEISE SOUZA VILAS BÔAS (Examinadora Interna)

DocuSigned by:



PROF. DR. CESAR SEIGI FUZIWARA (Examinador Externo)

Grande apoiadora do meu trajeto acadêmico, dedico este trabalho à minha avó – Damiana Braga Rodríguez – que, duplamente mãe, foi minha maior companheira e amiga. Sempre guerreira, venceu um avançado câncer de mama e é meu exemplo de força e superação.

AGRADECIMENTOS

A meus amados pais, Cíntia Rodríguez e Valfredo Machado, pelo incondicional e imensurável apoio emocional;

Ao meu orientador, Professor Doutor Helton Estrela Ramos, pela generosidade e humildade em compartilhar o seu conhecimento, confiar em mim para a execução deste projeto e por conceder-me incríveis oportunidades;

À minha coorientadora, Doutora Taíse Lima de Oliveira Cerqueira, pela parceria, pelo suporte e pelos ensinamentos das técnicas moleculares que fundamentaram este trabalho;

À farmacêutica Bayer pelo financiamento do projeto;

À Viviane de Matos Ferreira, docente da disciplina Microbiologia Clínica e preceptora dos Estágios Supervisionados I e II durante a minha graduação em Biomedicina, por me apresentar esse grupo de pesquisa e pelos aprendizados que levo para a minha vida, além do profissional;

Aos colaboradores do Hospital Aristides Maltez, do Instituto Integrado Endocrinologia e Cirurgia, do Hospital Dom Pedro de Alcântara, e do Hospital Universitário Lauro Wanderley, pela preocupação e pelo envolvimento com o trabalho de pesquisa;

A Ana Clara Talles, Juliana von Ammon, Lilian Landeiro, Rafael da Matta e Sara Moreira, pela leve e divertida convivência no Laboratório de Estudo da Tireoide. A interprofissionalidade nos permitiu a troca de conhecimento sob um olhar de diferentes áreas da saúde e sou realizado por isso;

Aos amigos Maria Rita Sampaio, Sandiloren Guedes e Victor Nascimento, pelos momentos de descontração e alegria que, certamente, fizeram toda a diferença ao longo do processo de elaboração deste trabalho;

À minha terapeuta, Tatiane Resende, por me fazer priorizar a minha saúde física e mental ao longo desta caminhada, a cada sessão me auxiliando a ser uma versão melhor de mim mesmo. O seu empático profissionalismo me ajudou a encarar os desafios da melhor forma, sendo a razão por eu poder amar, confiar e acreditar na pessoa que sou;

Muito obrigado!

“A diferença entre o seu sonho e a realidade é o preço que você paga todos os dias sendo consistente nas coisas que se propõe a fazer.”

(Leonardo Capel)

MACHADO, Gabriel Jeferson Rodriguez. **Fusões do gene *RET* em painel multigênico para câncer de tireoide numa população infantojuvenil.** 2023. Orientador: Helton Estrela Ramos. 85 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: O câncer de tireoide, embora seja uma rara malignidade na população pediátrica, nessa fase da vida está associado a estágios avançados da doença, quando comparado à fase adulta. O tipo papilífero representa 80 a 90% de todos os carcinomas tireoidianos derivados de células foliculares e apresenta alta taxa de mutações e fusões gênicas, capazes de influenciar o comportamento clínico e biológico do tumor. As fusões *RET* são apontadas como importantes marcadores de agressividade tumoral na população pediátrica, entretanto, devido a alguns fatores, a sua frequência é altamente variável. **Objetivo:** Determinar, retrospectivamente, a frequência de fusões do gene *RET* em amostras parafinadas de carcinoma diferenciado de tireoide em crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos), atendidos nos centros participantes do estudo. **Material e métodos:** Estudo retrospectivo, de corte transversal, com 79 casos de carcinoma diferenciado de tireoide, tratados em quatro centros de referência da região Nordeste do Brasil, entre janeiro de 2010 e março de 2021. O DNA foi extraído das amostras parafinadas e direcionado para análise mediante sequenciamento de nova geração, onde foi submetido ao painel *HotSpot*, para determinação de mutações pontuais, e ao painel *Fusion* para identificação de fusões gênicas. **Resultados:** Inicialmente, detectaram-se cinco amostras previamente positivas para a mutação *BRAF*^{V600E} e, por tratar-se de uma alteração genética excludente para rearranjos *RET/PTC*, não seguiram para a avaliação de positividade para fusões gênicas. O resultado *HotSpot* apontou 21/79 (26,6%) resultados inconclusivos, 21/79 (26,6%) mutados e 37/79 (46,8%) tipo selvagem. Entre os mutados, 10/21 (47,6%) casos foram positivos para mutação em *BRAF*, 8/21 (38,1%) para *EGFR*, 04/21 (19,0%) para *KRAS*, 03/21 (14,3%) para *NRAS* e 01/21 (4,8%) para *PIK3CA*, com ocorrência de mutações pontuais simultâneas. Quanto à análise molecular para detecção de fusões gênicas, 39/74 (52,7%) tiveram resultados inconclusivos, 10/74 (13,5%) apresentaram positividade para um rearranjo e 25/74 (33,8%) foram classificados como tipo selvagem. Dentre os casos positivos para fusões gênicas, 3 foram do gene *RET* (1 *CCDC6::RET* ou *RET/PTC1*, 1 *NCOA4::RET* ou *RET/PTC3*, e 1 *TRIM24::RET* ou *RET/PTC6*); 4 foram do gene *NTRK* (3 *ETV6::NTRK3* e 1 *TPR::NTRK1*); 2 fusões *PAX8::PPARG*; e 1 *STRN::ALK*. **Conclusão:** A frequência de fusões *RET* foi de 8,6% (03/35) e indivíduos mais jovens (<18 anos) apresentaram maior frequência de rearranjos gênicos, porém, o alto índice de resultados inconclusivos não permite estabelecer a associação das mutações com aspectos clínico-patológicos. Além disso, as mutações no gene *BRAF* foram as mais frequentes no painel *HotSpot*, seguidas por *EGFR*, *KRAS*, *NRAS* e *PIK3CA*.

Palavras-chave: câncer de tireoide; criança; juventude; translocação genética; sequenciamento de nova geração.

MACHADO, Gabriel Jeferson Rodriguez. **Fusões do gene *RET* em painel multigênico para câncer de tireoide numa população infantojuvenil.** 2023. Orientador: Helton Estrela Ramos. 85 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Introduction: Although it is a rare malignancy in the pediatric population, thyroid cancer, at this stage of life, is associated with advanced stages of the disease when compared to adulthood. The papillary type represents 80 to 90% of all thyroid carcinomas derived from follicular cells and presents a high rate of mutations and gene fusions, capable of influencing the clinical and biological behavior of the tumor. *RET* fusions are identified as important markers of tumor aggressiveness in the pediatric population, however, due to some factors, their frequency is highly variable. **Objective:** To retrospectively determine the frequency of *RET* gene fusions in paraffin-embedded samples of differentiated thyroid carcinoma from children, adolescents and young adults (<21 years) treated at the participating centers in the study. **Material and methods:** Retrospective, cross-sectional study with 79 cases of differentiated thyroid carcinoma, treated in four reference centers in the northeast region of Brazil, between January 2010 and March 2021. DNA was extracted from paraffin-embedded samples and directed to analysis through next-generation sequencing, where it was submitted to the HotSpot panel to determine point mutations, and to the Fusion panel to identify gene fusions. **Results:** Initially, five samples previously positive for the *BRAF*^{V600E} mutation were detected and, as it is a genetic alteration that excludes *RET/PTC* rearrangements, they were not followed up with the evaluation of positivity for gene fusions. The HotSpot result showed 21/79 (26.6%) inconclusive results, 21/79 (26.6%) mutated and 37/79 (46.8%) wild type. Among the mutated, 10/21 (47.6%) cases were positive for *BRAF* mutation, 08/21 (38.1%) for *EGFR*, 04/21 (19.0%) for *KRAS*, 03/21 (14.3%) for *NRAS* and 01/21 (4.8%) for *PIK3CA*, with occurrence of simultaneous point mutations. As for molecular analysis to detect gene fusions, 39/74 (52.7%) had inconclusive results, 10/74 (13.5%) were positive for a rearrangement and 25/74 (33.8%) were classified as wild type. Among the positive cases for gene fusions, 03 were of the *RET* gene (01 *CCDC6::RET* or *RET/PTC1*, 01 *NCOA4::RET* or *RET/PTC3*, and 01 *TRIM24::RET* or *RET/PTC6*); 04 were from the *NTRK* gene (03 *ETV6::NTRK3* and 01 *TPR::NTRK1*); 02 *PAX8::PPARG* merges; and 01 *STRN::ALK*. **Conclusion:** In our study, the frequency of *RET* fusions was 8.6% (03/35), and younger individuals (<18 years) had a higher frequency of gene rearrangements, but the high rate of inconclusive results does not allow establishing the association of individuals with clinical-pathological aspects. Furthermore, *BRAF* gene mutations were the most frequent in the HotSpot panel, followed by *EGFR*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA*.

Keywords: thyroid neoplasms; child; youth; translocation; next generation sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Vias MAPK e AKT no câncer de tireoide	24
Figura 2	Tomografia computadorizada mostra metástases em linfonodos regionais e m paciente de 11 anos, com fusão <i>RET/PTC6 (TRIM24::RET)</i>	25
Figura 3	Fusões <i>RET</i>	27
Figura 4	Representação esquemática da proteína RET	29
Figura 5	Representação esquemática das etapas da FISH	34
Figura 6	Representação esquemática das etapas da RT-PCR	35
Figura 7	Fluxo de trabalho do NGS	36
Figura 8	Fluxograma de amostragem	42
Figura 9	Material de arquivo dos SAPCs e coleta de serviço tumoral	43
Figura 10	Comparativo dos casos com e sem positividade para fusões gênicas, em relação à idade e tamanho tumoral	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais características do câncer de tireoide derivado de células foliculares	20
Quadro 2	Frequência de fusões do gene <i>RET</i> no câncer de tireoide infantojuvenil por estudo	30
Quadro 3	Painel NGS utilizado para detecção de mutações pontuais	45
Quadro 4	Resultado do painel <i>HotSpot</i> por amostra tumoral	55
Quadro 5	Características clínico-patológicas dos casos positivos para fusão no gene <i>RET</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil sociodemográfico e anatomopatológico dos participantes do estudo	49
Tabela 2	Análise molecular por NGS da casuística de estudo	52
Tabela 3	Resultado do painel de fusões gênicas de acordo com a idade	57
Tabela 4	Relação do risco de recorrência, segundo os critérios da ATA, e a presença de fusões e mutações pontuais	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AP	Anatomopatológico
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1</i>
CAO	Carcinoma Oncocítico
CAT	Carcinoma Anaplásico da Tireoide
CDT	Carcinoma Diferenciado de Tireoide
CDTAG	Carcinoma Diferenciado de Tireoide de Alto Grau
CEDAPI	Centro de Diagnóstico Pires
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos
CFT	Carcinoma folicular de tireoide
CID	Classificação Internacional de Doenças;
CIT	Carcinoma Indiferenciado da Tireoide
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPDT	Carcinoma Pouco Diferenciado da Tireoide
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CPTC	Carcinoma papilífero de tireoide clássico
CPTVF	Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EET	Extensão extratireoidiana
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
HAM	Hospital Aristides Maltez
HE	Hematoxilina-eosina
HULW	Hospital Univesitário Lauro Wanderley

ICS	Instituto de Ciências da Saúde
KRAS	<i>V-ki-ras2 kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
LBCC	Liga Baiana Contra o Câncer
LET	Laboratório de Estudo da Tireoide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
Mg	Micrograma (10^{-3} grama)
ml	Mililitro (10^{-3} litro)
mm	Milímetro (10^{-3} metro)
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
Ng	Nanograma (10^{-9} grama)
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGS	<i>Next generation sequence</i>
NIS	<i>Sodium-iodide symporter</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma ras viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NTRK	<i>Neurotrophic tropomyosin receptor tyrosine kinase</i>
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction;</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

SAPC	Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia
SCCP	Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
SCMFS	Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana
SP	Serviço de Patologia
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TFG	<i>Trk-fused gene</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>
TNM	<i>Tumor, node, metastasis</i>
TPR	<i>Translocated promoter region (to activated met oncogene)</i>
TRK	<i>Tropomyosin receptor kinase</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WT	<i>Wild Type</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	O CÂNCER DIFERENCIADO DE TIREOIDE	19
2.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DE RISCO	20
2.3	PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO CT	23
2.4	ASPECTOS CLÍNICOS E PROGNÓSTICO	25
2.5	O GENE RET	26
2.5.1	Histórico	26
2.5.2	Aspectos Moleculares	28
2.6	RASTREAMENTO DE FUSÕES RET/PTC	33
2.6.1	FISH	33
2.6.2	RT-PCR	34
2.6.3	NGS	35
3	OBJETIVOS	38
3.1	GERAL	38
3.2	ESPECÍFICOS	38
4	HIPÓTESES	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA	40
5.2	GRUPO AMOSTRAL	41
5.2.1	CrITÉrios de Inclusão e Exclusão	41
5.3	COLETA DE TECIDO PARAFINADO	43
5.4	EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL PARAFINADO	44
5.5	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)	44
5.5.1	Mutações Pontuais	44
5.5.2	Fusões Gênicas	45
5.6	ASPECTOS ESTATÍSTICOS	47
5.7	ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS	47
6	RESULTADOS	48
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	48

6.1.1	Aspectos Sociodemográficos	48
6.1.2	Aspectos Clínico-patológicos	48
6.2	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	51
6.2.1	Mutações Pontuais	51
6.2.2	Fusões gênicas	56
7	DISCUSSÃO	59
8	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO A – Protocolo de Revisão de Lâminas de Carcinoma de Tireoide	80
	ANEXO B - Parecer Consubstanciado do CEP	81

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia maligna mais frequente do sistema endócrino e, embora seja uma doença rara entre crianças e adolescentes, sua incidência na população infantojuvenil tem aumentado nas últimas décadas [1,2]. No Brasil, as taxas de CT estão em constante aumento em indivíduos jovens, sobretudo, no sexo feminino [3]. Os Carcinomas Tireoidianos Derivados de Células Foliculares (CTDCF) correspondem a, aproximadamente, 95% dos casos de CT, enquanto o percentual restante abrange casos de carcinoma: derivados de células C, mistos derivados de células medulares e foliculares, de histogênese incerta, embrionários, tímicos e do tipo glândula salivar [4–6].

Dividido em três tipos histológicos, o CTDCF era classificado em: Carcinoma Diferenciado da Tireoide (CDT), Carcinoma Pouco Diferenciado da Tireoide (CPDT) e Carcinoma Indiferenciado da Tireoide (CIT). Posteriormente, com a nova abordagem da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 2022, o CTDCF passou a ser dividido em: tumores benignos, neoplasias de baixo risco e neoplasias malignas. Dentre as classificações, o carcinoma papilífero da tireoide (CPT) e o carcinoma folicular da tireoide (CFT), ambos neoplasias malignas, representam 80 a 90% de todos os casos de CT [6,7].

A exposição prévia à radiação é considerada um fator de risco consolidado para o desenvolvimento da doença, seja por questões ambientais (como acidentes nucleares) ou tratamento de lesões benignas (como dermatofitoses) [8]. No entanto, as causas associadas à tumorigênese da tireoide ainda são controversas. Estudos sugerem que a causa para o CT seja multifatorial, sendo dependente de fatores ambientais e estilo de vida [9–11].

Nas últimas décadas, a compreensão de mecanismos moleculares do CT — como a elucidação das vias MAPK e PIK3CA/AKT — trouxe conhecimento acerca de como alterações genéticas têm capacidade de ativação dessas vias e, conseqüentemente, de conduzir o processo de carcinogênese tireoidiana [12]. Na população adulta, as modificações mais comuns são mutações pontuais *BRAF*^{V600E} e *RAS* em fenótipo mais indolente e mutações no promotor *hTERT* com viés mais agressivo [13–15]. Em contrapartida, a população pediátrica tem maior incidência de rearranjos ou fusões gênicas *RET/PTC*, *ETV6::NTRK*, *AGK::BRAF* e *AKAP9::BRAF*, principalmente, em crianças ≤ 10 anos [16–18]. Já a mutação *BRAF*^{V600E}, menos comum na população pediátrica, está associada à maior idade e agressividade tumoral [19].

O gene *RET* — localizado no braço longo do cromossomo 10, região 1, banda 1 e sub-banda 2 (10q11.2) — é responsável por codificar um receptor transmembrana do tipo tirosina-quinase, a proteína RET [20]. Sua porção extracelular (RET-EC) é composta por quatro domínios do tipo caderina (CLD) e um domínio rico em cisteína (CRD) que, juntos, acoplam-se a um ligante bipartido da família GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) e um co-receptor GFR- α , resultando em dimerização e ativação do gene *RET* [21]. A parte intracelular da proteína (RET-IC) contém o domínio tirosina quinase, dividido em dois subdomínios — o primeiro formado pelos éxons 13 e 14 e o segundo pelos éxons 15 e 16; por fim, uma cauda carboxi-terminal [22,23].

Mutações pontuais nesse gene, de base somática (adquirida) e germinativa (herdada), estão associadas ao carcinoma medular da tireoide (CMT) e à neoplasia endócrina múltipla tipo 2A, respectivamente. Já o carcinoma CPDT, carcinoma colorretal e adenocarcinoma de pulmão são alguns exemplos típicos de doenças associadas a fusões gênicas do *RET*, que ocorrem em nível somático [24,25] e são as alterações genéticas mais encontradas no CPT pediátrico, constituindo, aproximadamente, 41% dos casos esporádicos e 58% dos induzidos por radiação [10,26].

As fusões *RET* não são comuns nos principais tipos de CTDCF. No CFT, por exemplo, o resultado costuma ser negativo [27], sendo positivo para fusões no gene *PPARG*, principalmente, para *PAX8::PPARG* [28–33]. Uma das vias de ativação do proto-oncogene *RET* ocorre pela fusão 3' quinase (justaposição da porção amino-terminal do gene parceiro com a porção carboxi-terminal do *RET*) ou vice-versa, processo denominado 5' quinase [34]. Atualmente, mais de 30 fusões *RET* foram descritas na literatura científica [35]; as mais frequentes na população pediátrica são os *RET/PTC1* e *RET/PTC3*, onde o gene *RET* se funde com os genes *CCDC6* (10q21) e *NOCA4* (10q11.2), respectivamente [36].

Atualmente, as fusões *RET* são foco de estudo no desenvolvimento de alvos terapêuticos em oncologia, tendo sua atividade bloqueada por inibidores de tirosina quinase direcionados [37]. Diante desse cenário, o presente estudo se propôs a investigar a frequência de fusões *RET* em amostras de CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens, assistidos em quatro centros de atendimento oncológico da região Nordeste do Brasil.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Esta seção compreende a base teórica constitutiva do objeto deste estudo e se apresenta em cinco partes, detalhadas a seguir.

2.1 O CÂNCER DIFERENCIADO DE TIREOIDE

Câncer é a nomenclatura atribuída a um conjunto de mais de 100 doenças que têm, em comum, a desordem da divisão celular [38]. Proliferando-se rapidamente, as células formam tumores com capacidade de disseminação e invasão de tecidos locais e/ou a distância (processo denominado metástase), principal causa de morte entre pacientes acometidos por essa enfermidade [39]. Pelo seu caráter multifatorial, o seu desenvolvimento ainda é muito complexo, entretanto, sabe-se que alterações no DNA são responsáveis por desencadear o processo de carcinogênese [40].

As células foliculares da tireoide dão origem a diferentes formas de tumores tireoidianos e, entre eles, os tipos papilífero e folicular são os mais frequentes em população infantojuvenil [41,42]. O CPT é dividido em subtipos, segundo as características histológicas: clássica (CPTC), folicular (CPTVF), sólida (CPTVS) e esclerosante difusa (CPTVED). Dentre elas, a CPTVF e a CPTVS são encontradas com maior frequência em indivíduos mais jovens [43,6]. O CPDT e o carcinoma indiferenciado ou anaplásico da tireoide (CIT/CAT) estão associados à maior agressividade tumoral e à alta carga mutacional, além de surgirem de CTDCFs pré-existentes (**Quadro 1**) [44]. Oriundo de células parafoliculares, o carcinoma medular da tireoide (CMT) apresenta características clínicas e moleculares distintas [41].

Nas últimas décadas, o aumento da incidência de câncer de tireoide – sobretudo na população pediátrica – gerou um grande debate na comunidade científica [45]. As alterações genéticas e epigenéticas do câncer de tireoide, assim como em outros tipos de cânceres, são fatores que determinam o comportamento tumoral e, em determinados casos, o êxito na resposta terapêutica [46].

Quadro 1 – Principais características do câncer de tireoide derivado de células foliculares.

Histotipo	Diferenciação	Atividade mitótica	Prognóstico
CPT	Bem diferenciado	Baixa	Excelente
CFT			
CAO		Alta	Intermediário
CDTAG			
CPDT	Pouco diferenciado		
CAT	Indiferenciado		Ruim

Fonte: Adaptado de Baloch e colaboradores (2022) [6]

Legenda: CPT – Carcinoma Papilífero da Tireoide; CFT – Carcinoma Folicular da Tireoide; CAO – Carcinoma Oncocítico; CDTGA – Carcinoma Diferenciado de Tireoide de Alto Grau; CPDT – Carcinoma Pouco Diferenciado da Tireoide; CAT – Carcinoma Anaplásico da Tireoide.

No cenário atual, a compreensão de fundamentos moleculares do CT segue sendo uma linha de pesquisa com alta relevância, tendo em vista que diversas mutações estão associadas à tumorigênese na glândula tireoide. Dentre essas, foi demonstrado que os rearranjos do gene *RET* têm uma importância particular e essas fusões gênicas são o foco do presente capítulo.

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E FATORES DE RISCO

A neoplasia maligna da tireoide, apesar de rara, representa a principal doença do sistema endócrino de crianças, adolescentes e jovens adultos [47]. Uma parcela expressiva da taxa de incidência é composta pelo tipo papilífero com, aproximadamente, 90% dos cânceres de tireoide pediátricos, entretanto, o aumento de registros para a classe folicular também tem sido relatado, com média de 10% dos casos [48,49]. Por conta da raridade em indivíduos mais jovens, os carcinomas medular, pouco diferenciados e anaplásicos, não compreendem um percentual significativo [42,50,51].

A incidência do tipo papilífero em indivíduos com idade inferior a 20 anos — entre 2000 e 2019 — aumentou de 5×10^4 para $1,1 \times 10^5$ [47]. Proposta por vários autores, a justificativa para esse aumento é o aprimoramento das técnicas de diagnóstico por imagem, causando um sobrediagnóstico na população, sobretudo, em países de alta renda. A

consequência dessa prática é a transformação de indivíduos saudáveis em pacientes que serão expostos a tratamentos desnecessários ao longo da vida [52–56], principalmente, pessoas assintomáticas e/ou com microcarcinomas (≤ 1 cm) que – no CPT tanto adulto, como pediátrico – chega a equivaler a 40% e 10% dos casos, respectivamente [57,58].

Entretanto, um estudo de 2019, realizado nos Estados Unidos, avaliou 39 registros de CT no período de 1998 a 2013. A partir dessa avaliação, Bernier e colaboradores observaram um crescimento significativo ao longo do intervalo de tempo para todos os estágios de tumor e, além disso, tendências crescentes foram relatadas na faixa etária de 10 a 19 anos e em todas as etnias. Com isso, o estudo conclui sugerindo que há improbabilidade que o aumento da vigilância médica contribua, integralmente, para o aumento da incidência de CT, tendo em vista que os casos em estágio avançado estão aumentando ao longo do tempo [49].

De acordo com o sexo, as taxas de incidência para câncer de tireoide passam a apresentar diferença significativa acima dos 10 anos. Em 2018, na faixa etária 10–14 anos, foi observada uma taxa de 17,1 por milhão para meninas e 5,4 por milhão para meninos, com distinção crescente entre os 15–19 anos, onde a incidência aumenta para 61,0 por milhão para meninas e 12,6 por milhão para meninos [47], sendo esse o intervalo de idade onde o carcinoma tireoidiano mais incide na população infantojuvenil ⁽²⁸⁾. Além disso, tanto o ganho, quanto a perda de peso aparecem como um fator de risco, significativamente associado ao risco de desenvolvimento de câncer de tireoide [60].

Embora a incidência da doença continue a aumentar em todas as etnias, pessoas de ascendência branca são as mais acometidas pela doença [61]. De acordo com o *Cancer Incidence in Five Continents (CI5)*, o Brasil apresenta a maior taxa de incidência de câncer de tireoide entre os países da América do Sul e Central [62]. Recentemente, Balmant e colaboradores apontaram uma incidência de 5,36 por milhão em indivíduos menores de 20 anos – com destaque para a região Sul – onde o percentual da população de pele branca é maior que nas outras regiões do país e, além disso, o sexo feminino foi o mais acometido pela doença [63].

Dados que corroboram aspectos epidemiológicos da carcinogênese tireoidiana, sobretudo em jovens brasileiros, advém de estudos que associam a alta ingestão de iodo com maior prevalência de câncer de tireoide, principalmente o CPT [64,65]. Em 2014, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma revisão sistemática acerca do efeito da iodização do sal de cozinha, a fim de prevenir distúrbios causados pela deficiência desse

nutriente [66] e o Brasil, ao lado do Chile, Equador, Libéria e Uganda, apresentaram ingestão excessiva de iodo – com quantidades superiores a 300 µg/L.

O fato é que, ao longo das últimas seis décadas, a incidência de casos na população infantojuvenil foi para além do dobro. Nessa fase da vida, a exposição à radiação é muito preocupante, principalmente, em indivíduos submetidos à radioterapia para tratamento de malignidade prévia – tendo em vista que essa ação terapêutica eleva o risco de desenvolvimento de CT [67,68].

Historicamente, a radiação ionizante aparece associada à carcinogênese tireoidiana desde 1950 e dois grandes eventos são relatados na literatura científica como ocasionadores dos picos de casos da doença. Ainda na década de 50, o primeiro aumento significativo de câncer de tireoide na população pediátrica se deu pelo uso de radiação no tratamento de lesões benignas, como: acne, eczema, otite, *tinea capitis*, e aumento do timo e amídalas [8,69,70].

No início da década de 1960, a relação causa e efeito entre a exposição à radiação e o desenvolvimento de CPT foi estabelecida, levando a uma diminuição dessa prática terapêutica. Entretanto, atualmente, a radioterapia é utilizada como tratamento de diferentes tipos de carcinoma e, como consequência, o câncer de tireoide na população infantojuvenil é um dos tumores malignos secundários mais frequentes em sobreviventes de câncer infantil [42,67,68,71].

O segundo acontecimento histórico foi a explosão dos reatores da Usina Nuclear de Chernobyl, em abril de 1986. No momento do episódio, crianças menores de quatro anos representaram o grupo de alto risco para o CPT [72]. Dez anos depois, países do leste europeu, sobretudo Ucrânia e Bielorrússia — que apresentaram altos níveis de contaminação por ^{131}I e ^{137}Cs — tiveram uma elevação acentuada no número de casos de câncer de tireoide mas, desta vez, em crianças de 10 a 14 anos [73]. Nesse período, a taxa de incidência teve pico de 4×10^6 enquanto, antes do acidente, os registros nessa área marcavam 1×10^6 [74].

Em março de 2011 — após um tsunami provocado por maremoto de magnitude 8,7 — ocorreu o derretimento de três dos seis reatores da Central Nuclear de Fukushima I. Após o desastre, medidas foram tomadas pelo governo japonês a fim de reduzir a captação de ^{131}I , como: restrições alimentares, baixa ingestão de iodo e evacuação de áreas contaminadas [75].

Tais providências podem ter surtido efeito pois, entre outubro de 2011 e março 2014, a Pesquisa de Gestão de Saúde de Fukushima realizou uma triagem com ultrassonografia em, aproximadamente, 300 mil indivíduos com idade < 18 anos [76]. Após essa rodada, um total

de 108 crianças foram diagnosticadas com suspeitas ou confirmação de malignidade tireoidiana por meio da punção aspirativa por agulha fina (PAAF), representando um valor não significativo [77].

Além disso, a quantidade de iodo radioativo absorvida por residentes de Fukushima foi muito inferior à quantidade de Chernobyl. Embora tenha sido um acidente de grande impacto, ainda não há evidências que associem a catástrofe ocorrida no Japão ao aumento da incidência de câncer de tireoide em seus residentes [78,79]. Cientistas seguem estudando os efeitos desse episódio na carcinogênese tireoidiana em população infantojuvenil e, curiosamente, descobriram que o perfil mutacional desse grupo se assemelha ao relatado em adultos [80].

2.3 PRINCIPAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO DO CT

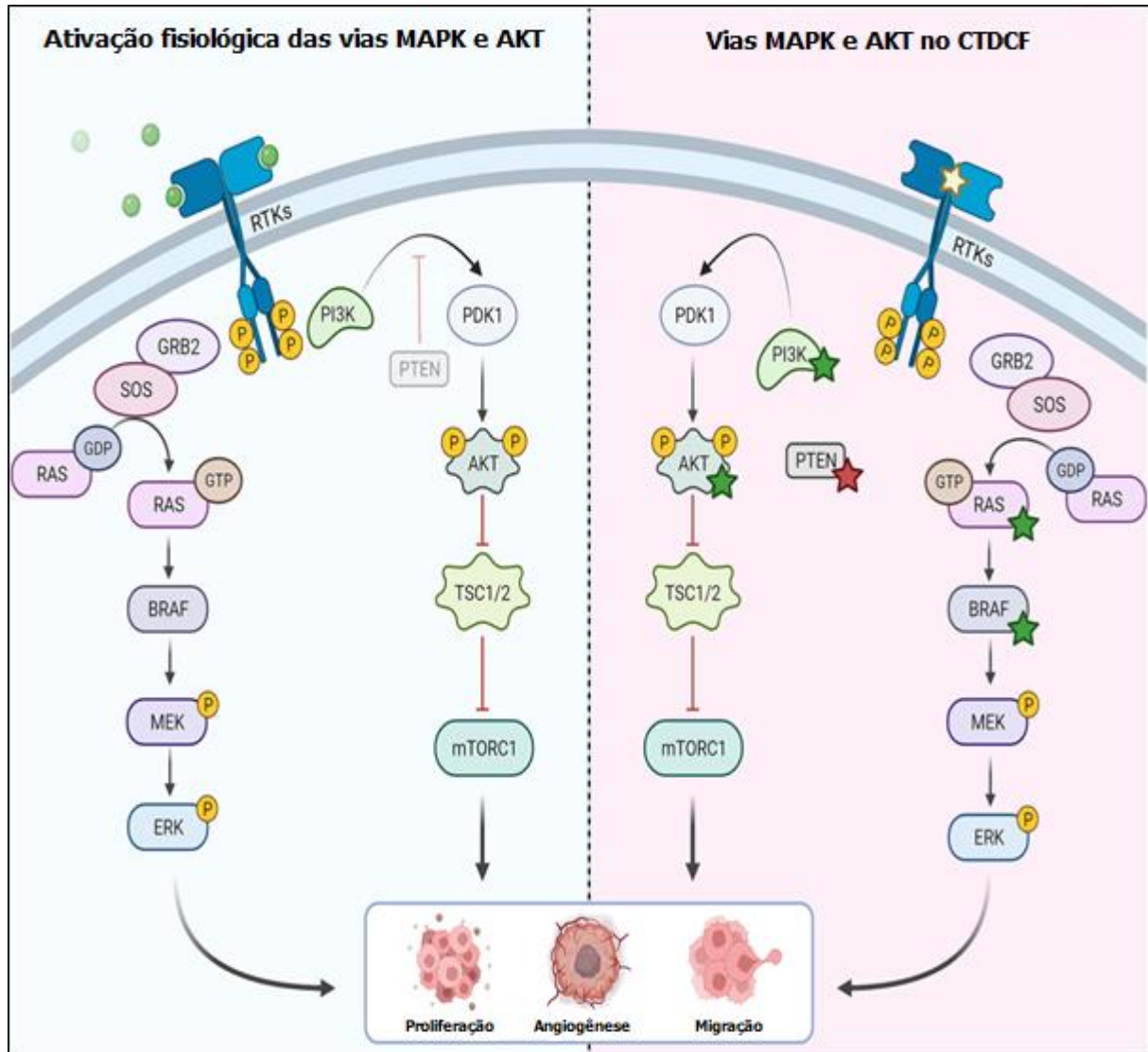
O processo de tumorigênese é mediado pelas vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR, ativadas pela ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina quinase, como a RET (**Figura 1**) [81]. A ativação constitutiva da via MAPK é considerada essencial para o desenvolvimento do câncer de tireoide, tendo em vista que, aproximadamente 70% dos casos da doença são causados por mutações que ativam essa via, ou seja, *drivers* oncogênicos. Esse processo pode ocorrer por mutações pontuais nos genes *BRAF* e *RAS* ou por fusões gênicas de receptores tirosina quinase, como *RET*, *NTRK* e *ALK* [13,82].

Esse mecanismo resulta na dimerização e ativação do receptor por meio da autofosforilação de resíduos de tirosina, da porção RET-IC. A partir daí, proteínas ativam a proteína RAS pela troca GDP (guanodina difosfato) por GTP (guanodina trifosfato) [83]. Uma vez ativada, a RAS realiza o recrutamento e ativação de proteínas RAF, induzindo ativação sequencial das proteínas MEK e ERK; por fim, a ERK age fosforilando, proteínas de sinalização no citoplasma e fatores de transcrição no núcleo, responsáveis por controlar importantes processos celulares [84,85].

A segunda principal via de sinalização envolvida no CT é a PI3K/AKT/mTOR, outro mecanismo celular responsável pelo controle da sobrevivência, proliferação e mobilidade celular. O processo tem início com a ativação do receptor tirosina quinase por meio de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), recrutando PI3K para perto de seus substratos lipídicos [86]. PI3K produz PIP3, que recruta a proteína quinase AKT para a membrana plasmática, onde é ativada pela PDK1 e mTORC2. A AKT fosforila TSC2 e esse processo induzem RHEB-GTP a ativar o complexo mTORC1 que, por sua vez, fosforila as proteínas de

ligação 4E e S6K, responsáveis por modular a biogênese do ribossomo e tradução de proteínas como a c-MYC que, da mesma forma que a via MAPK/ERK, desempenha processos celulares essenciais [87].

Figura 1 - Vias MAPK e AKT no câncer de tireoide.



Fonte: Adaptado de Baloch e colaboradores (2022) [6].

Legenda: Visão geral esquematizada das vias de MAPK e AKT em estado fisiológico (esquerda) e neoplásico (direita). 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.

2.4 ASPECTOS CLÍNICOS E PROGNÓSTICO

Os nódulos tireoidianos palpáveis, apesar de raros na população pediátrica, são a principal manifestação clínica do CPT e ocorrem em 1% a 1,5% das crianças [42,88]. Nesse grupo, a malignidade dos nódulos de tireoide é muito maior quando comparada à população adulta, sendo 26% *versus* 5% [89,90]. No entanto, o CPT também se apresenta como adenopatia cervical sem lesão palpável e, infelizmente, o diagnóstico é realizado após a descoberta de metástases distantes [91].

Comumente, o CPT pediátrico é multifocal e bilateral, com alto índice de metástases regionais para linfonodos cervicais (**Figura 2**) [92–94] e, aproximadamente, 25% dos casos são acometidos por metástases pulmonares por via hematogênica. Os casos de CFT, normalmente, são caracterizados por um tumor unifocal, com ausência de metástase em linfonodos regionais e maior propensão a metástases hematogênicas para os pulmões e os ossos [95–97].

Figura 2 – Tomografia computadorizada mostra metástases em linfonodos regionais em paciente de 11 anos, com fusão *RET/PTC6 (TRIM24::RET)*



Fonte: Arquivo de imagens do autor.

Apesar do aumento de incidência, a taxa de sobrevida nesse grupo é alta. Numa coorte de 740 pacientes – com idade média de 11,7 anos – a sobrevida observada em 5 e 10 anos, para todo o grupo, foi de 99,5% e 98,8%, respectivamente [98]. Usualmente, indivíduos adultos com rearranjos *RET* tendem a um prognóstico favorável e boa resposta ao tratamento com iodo radioativo. Em contrapartida, na população infantojuvenil, as fusões nesse gene aparecem associados à extensão extratireoidiana, metástases regionais e à distância, variantes mais agressivas e pior prognóstico [95,36,99,100].

2.5 O GENE *RET*

Esta seção aborda as características do gene *RET*, compreendendo duas partes, detalhadas a seguir.

2.5.1 Histórico

Em 1985, num experimento de transfecção — processo de inserção de ácidos nucleicos em células eucarióticas — Takahashi e colaboradores identificaram o gene *RET* (*REarranged during Transfection*). Sua nomenclatura foi atribuída ao fato de que, inicialmente, a sequência de DNA desse gene foi reorganizada dentro de uma linhagem celular de fibroblastos 3T3, após sua transfecção com DNA de alto peso molecular, originada de linfoma de células T humanas [101].

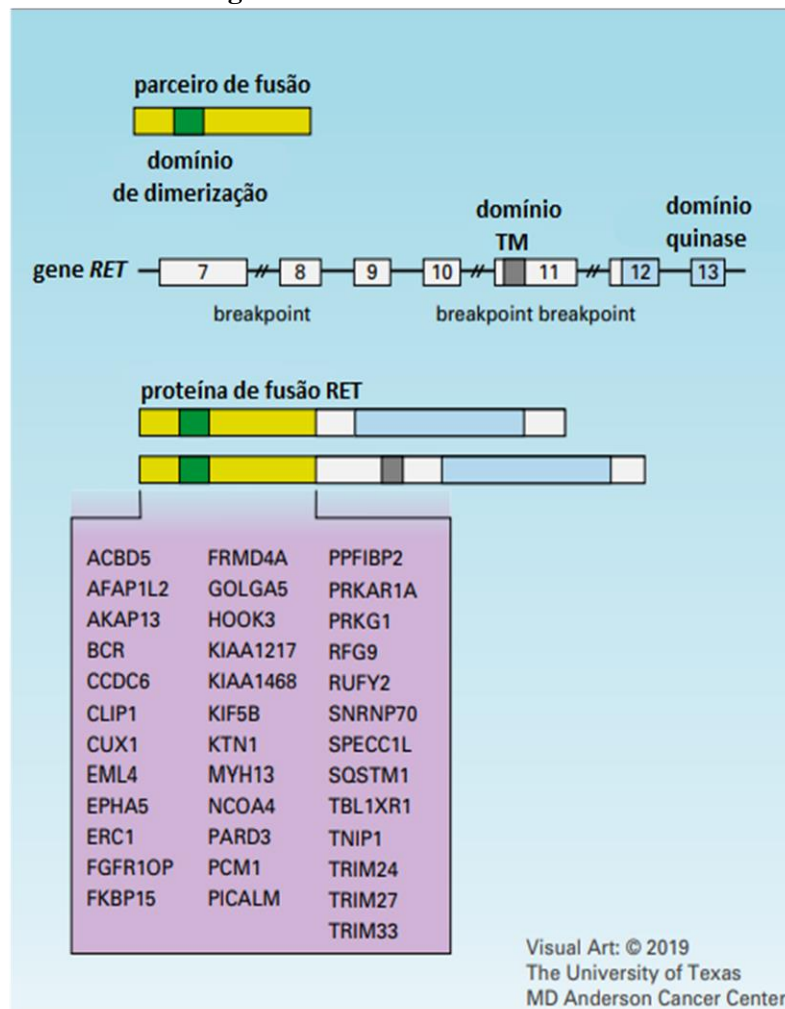
No final da década de 1980, o *RET* foi mapeado no cromossomo 10 (10q11.2), tendo 21 éxons e tamanho de, aproximadamente, 53 Kb [102,103]. A partir dessa descoberta, o gene *RET* foi apontado, em 1989, como um *driver* para a neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN2), mapeada na mesma região cromossômica [104]. No mesmo ano, descobriu-se que ele codifica uma proteína transmembranar pertencente à família do receptor tirosina quinase (RTK): a RET, responsável pela regulação da expressão gênica envolvida no crescimento, proliferação, apoptose, migração, sobrevivência e diferenciação celular [105,106].

O gene *RET* e seus homólogos já foram identificados em vários vertebrados, bem como na mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) [107]. É expresso na crista neural (embriogênese), gânglios entéricos, células C da tireoide, células germinativas renais e testiculares, além de gânglios sensoriais e autônomos do sistema nervoso periférico [108]. Devido a isso, mutações com perda de função da linha germinativa no gene *RET* estão

associadas a anomalias congênitas do rim e do trato urinário (CAKUT) e ao mega cólon congênito (doença de Hirschsprung) [109–111].

Em 1990, quando avanços na pesquisa permitiram que cientistas reportassem as fusões no gene *RET* como um *driver* oncogênico comum nos casos de CPT, Grieco e colaboradores relataram que 05/20 amostras tumorais desse tipo histológico apresentaram fusão do domínio tirosina quinase do *RET*, com a região terminal 5' do gene *H4*, ambos genes do cromossomo 10 [112]. Esse rearranjo – posteriormente denominado *RET::CCDC6* ou *RET/PTC1* – foi o primeiro a ser descoberto e, como é visto na **Figura 3**, atualmente, mais de 35 parceiros de fusão do gene *RET* já foram relatados na literatura científica [35].

Figura 3 – Fusões *RET*



Fonte: Adaptado de Subbiah e colaboradores (2020) [113]

Legenda: Os pontos de quebra cromossômicos, normalmente, ocorrem no íntron 11 e, eventualmente, nos íntrons 7 e 10. Os números indicam os éxons do gene. A proteína de fusão resultante possui o domínio de dimerização do parceiro (verde) e o domínio quinase do *RET* (azul), podendo também possuir o domínio transmembranar do gene (cinza). Os genes de parceiros de fusão estão listados na figura.

2.5.2 Aspectos moleculares

A proteína que ele codifica, a RET, é composta, estruturalmente, por três porções: extracelular (EC), transmembranar (TM) e intracelular (IC) [114], como mostra a **Figura 4**. O segmento RET-EC tem quatro domínios do tipo caderina e um domínio rico em cisteína, envolvidos na formação de ligações dissulfeto [21]. RET-IC contém o domínio tirosina quinase, dividido em dois subdomínios, sendo o primeiro pelos éxons 13 e 14 e o segundo pelos éxons 15 e 16 [22]. Por fim, a cauda carboxi-terminal que, como consequência de *splicing* alternativo, varia em comprimento e gera diferentes isoformas: RET9, RET43 e RET51 (a depender da quantidade de aminoácidos, a partir da glicina de posição 1063 [115,116]).

Para que a proteína RET seja ativada, é necessário que ocorra uma ligação entre seu domínio extracelular e o receptor alfa ($GFR\alpha$) pertencente à família GDNF. Os ligantes, conhecidos por se ligarem ao receptor $GFR\alpha$, incluem persefina, artemina e neurturina, três membros da família GDNF (pertencentes à superfamília do fator de crescimento beta/ $TGF\beta$) [117]. Dessa forma, um complexo tripartite é formado pela ligação do receptor alfa à porção extracelular da proteína RET e um membro da $TGF\beta$, estimulando a RET quinase [21].

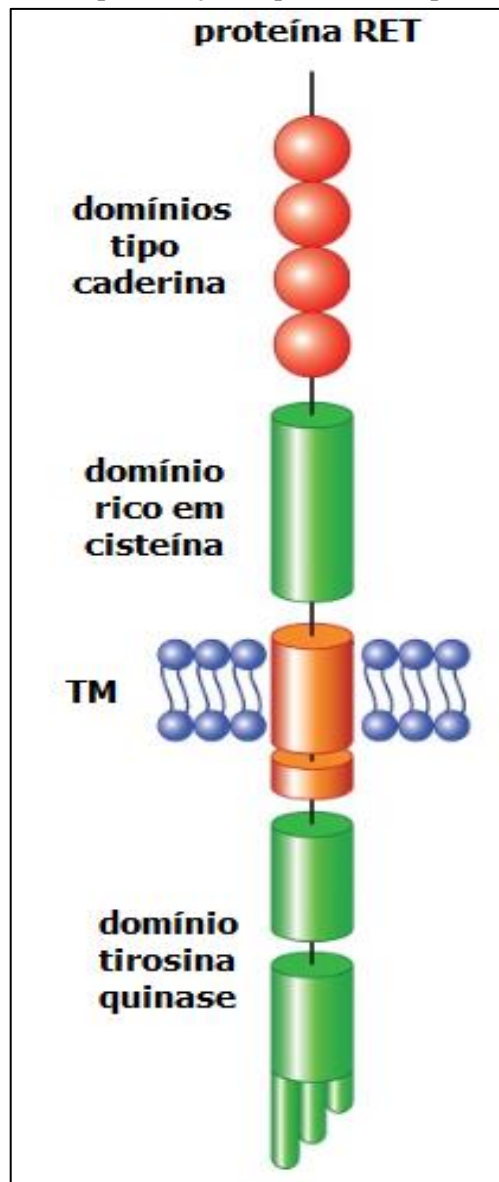
Em consequência, ocorre a autofosforilação de múltiplos resíduos de tirosina quinase na porção intracelular da proteína RET, alterando sua conformação e permitindo a ligação de proteínas citoplasmáticas adaptadoras, que irão conduzir a ativação de vias de sinalização no citosol [118], sendo que algumas estão associadas à implicação de importantes eventos celulares, como: quimiotaxia, diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência celular [119].

Em especial, a fosforilação da tirosina citoplasmática 1096 da RET é essencial para a ligação da proteína citoplasmática adaptadora shc, que recruta a proteína de ligação associada ao GRB2 (GAB) para ativar as vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK [119,120]. Por conta disso, mutações no gene *RET* têm sido amplamente associadas ao desenvolvimento de diversas doenças. Atualmente, é bem esclarecido na literatura científica que diversas mutações pontuais no *RET* exerçam papel indutor para MEN2A, MEN2B e CMT [121,122].

Além da sua atividade oncogênica sobre as células parafoliculares, sabe-se que mutações do *RET* também atuam como indutoras do CPT. Entretanto, diferente das demais malignidades, esse tipo de câncer não está diretamente associado à presença de mutações

pontuais ativadoras, mas à presença de alterações cromossômicas estruturais, principalmente, a inversão paracêntrica e as translocações, ambas responsáveis pela formação de fusões gênicas [112,124]. A inversão paracêntrica ocorre quando uma região do cromossomo se separa, mas é reconstituída de forma invertida e sem afetar o centrômero. Já a translocação é um processo que envolve a troca de segmentos de dois cromossomos não homólogos [125].

Figura 4 – Representação esquemática da proteína RET



Fonte: Adaptado de Santoro e Carlomagno (2013) [123].

Os rearranjos do *RET* podem acontecer de forma espontânea, em baixa frequência, mas podem ser induzidos por agentes clastogênicos (que produzem *breakpoints* cromossomais), como: radiação ionizante, infecções virais e agentes químicos [125,126]. Estudos mostram que quase metade dos tumores pediátricos apresentam um rearranjo genético, seja ele

espontâneo ou induzido por radiação [95]. Em relação aos drivers moleculares, a prevalência de fusões *RET* em casos de CTDCF vem sendo, expressamente, reportada na literatura científica, dada a sua predominância em crianças, adolescentes e adultos jovens, como é possível visualizar no **Quadro 2**.

Embora a expressão do gene *RET* seja nula ou apresente níveis muito baixos no epitélio tireoidiano normal, seus rearranjos representam as alterações moleculares mais frequentes no CT infantojuvenil [10,127]. Dentre as já descritas desse gene, *RET/PTC1* e *RET/PTC3* são as fusões mais frequentes, embora haja variação nas técnicas de detecção e heterogeneidade de expressão gênica dentro do tumor [128,129]. No CPT, as fusões *RET* são mutuamente excludentes com outros *drivers* oncogênicos, como mutações em *BRAF*, *RAS* e outras fusões *TR*. Essa exclusividade mutacional tem direcionado pesquisas a fim de desenvolver inibidores da quinase RET, como o Selpercatinibe e Pralsetinibe [130].

Quadro 2 – Frequência de fusões do gene *RET* no câncer de tireoide infantojuvenil por estudo.

Estudo	País	Idade	Casos (N)	Frequência de fusões <i>RET</i>	Método
Fugazzola L et al. 1995 [131]	Itália	6 - 14	06 CPT*	4/6 (67%)	RT-PCR
Klugbauer et al. 1995 [132]	Alemanha	< 11	12 CPT*	8/12 (67%)	RT-PCR
Bongarzone et al. 1996 [133]	Itália	4 - 19	9 CPT**	6/9 (67%)	RT-PCR
Williams et al. 1996 [134]	Reino Unido	7 - 14	21 CPT**	10/21 (48%)	RT-PCR
Nikiforov et al. 1997 [135]	Estados Unidos	5 - 18	38 CPT*	33/38 (87%)	RT-PCR
Nikiforov et al. 1997 [135]	Estados Unidos	5 - 18	17 CPT**	12/17 (71%)	RT-PCR
Motomura et al. 1998 [136]	Japão	9 - 14	10 CPT**	3/10 (30%)	RT-PCR
Thomas et al. 1999 [137]	Reino Unido	6 – 18	67 CPT*	37/67 (55%)	RT-PCR e IHQ

Thomas et al. 1999 [137]	Reino Unido	6 - 18	7 FTC*	0/7 (0%)	RT-PCR e IHQ
Fenton et al. 2000 [138]	Estados Unidos	6 - 21	1 CPT*	1/1 (100%)	RT-PCR
Fenton et al. 2000 [138]	Estados Unidos	6 - 21	33 CPT**	15/33 (45%)	RT-PCR
Fenton et al. 2000 [138]	Estados Unidos	6 - 21	8 CFT**	0/8 (0%)	RT-PCR
Santoro et al. 2000 [139]	Itália	<15	106 CPT*	36/106 (34%)	RT-PCR
Rabes et al. 2000 [140]	Alemanha	≤14	99 CPT*	50/99 (50%)	RT-PCR
Rabes et al. 2000 [140]	Alemanha	14 - 18	92 CPT*	44/92 (48%)	RT-PCR
Elisei et al. 2001 [141]	Itália	<18	25 CPT*	19/25 (76%)	RT-PCR
Elisei et al. 2001 [141]	Itália	<18	25 CPT**	10/25 (40%)	RT-PCR
Penko et al. 2005 [142]	Estados Unidos	10 - 21	1 CPT*	1/1 (100%)	Nested PCR
Penko et al. 2005 [142]	Estados Unidos	10 - 21	13 CPT**	6/11 (55%)	Nested PCR
Penko et al. 2005 [142]	Estados Unidos	10 - 21	4 CFT**	0/3 (0%)	Nested PCR
Mitusake et al. 2015 [80]	Japão	9 - 22	67 CPT*	7/67 (10%)	RT-PCR
Mitusake et al. 2015 [80]	Japão	9 - 22	1 CPDT*	0/1 (0%)	RT-PCR
Ballester et al. 2016 [143]	Estados Unidos	10 - 18	2 CPT*	1/2 (50%)	RT-PCR, Sanger e NGS
Ballester et al. 2016 [143]	Estados Unidos	10 - 18	23 CPT**	5/23 (22%)	RT-PCR, Sanger e NGS
Ballester et al. 2016 [143]	Estados Unidos	10 - 18	1 CFT**	0/1 (0%)	RT-PCR, Sanger e NGS

Picarsic et al. 2016 [144]	Estados Unidos	<18	17 CPT**	3/17 (18%)	NGS
Picarsic et al. 2016 [144]	Estados Unidos	<18	1 CFT**	0/1 (0%)	NGS
Prasad et al. 2016 [145]	Estados Unidos	6 - 18	27 CPT**	6/27 (22%)	NGS
Nikita et al. 2016 [146]	Estados Unidos	7 - 18	2 CPT*	0/2 (0%)	RT-PCR
Nikita et al. 2016 [146]	Estados Unidos	7 - 18	32 CPT**	6/32 (19%)	RT-PCR
Nikita et al. 2016 [146]	Estados Unidos	7 - 18	5 CFT**	0/5 (0%)	RT-PCR
Gertz et al. 2016 [147]	Estados Unidos	8 - 18	14 CPT**	2/14 (14%)	FISH
Vanden Borre et al. 2017 [148]	Estados Unidos	≤ 21	14 CPT***	5/14 (36%)	NGS
Mostoufi-Moab et al. 2018 [149]	Estados Unidos	≤ 18	3 CPT*	0/3 (0%)	RT-PCR
Mostoufi-Moab et al. 2018 [149]	Estados Unidos	≤ 18	59 CPT**	12/59 (20%)	RT-PCR
Mostoufi-Moab et al. 2018 [149]	Estados Unidos	≤ 18	6 CFT**	0/6 (0%)	RT-PCR
Wasserman et al. 2018 [150]	Canadá	<18	2 CPT*	0/2 (0%)	RT-PCR
Wasserman et al. 2018 [150]	Canadá	<18	28 CPT**	7/28 (25%)	RT-PCR
Pekova et al. 2019 [95]	República Tcheca	6 - 20	2 CPT*	0/2 (0%)	PCR Real Time
Pekova et al. 2019 [95]	República Tcheca	6 - 20	81 CPT**	18/81 (22%)	PCR Real Time

Pekova et al. 2020 [151]	República Tcheca	6 - 20	93 CPT*	26/93 (28%)	NGS e PCR Real Time
Bae et al. 2021 [152]	Coreia do Sul	9 - 18	12 CFT***	01/12 (8%)	NGS
TOTAL GERAL			1.167 casos	394/1.167 (33,8%)	

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: *Presença de casos com exposição à radiação; **Casos esporádicos; ***Casos com exposição à radiação desconhecida.

2.6 RASTREAMENTO DE FUSÕES *RET/PTC*

As diferenças clínicas, moleculares e patológicas do CT entre adultos e crianças levaram a American Thyroid Association à criação de diretrizes exclusivas para a população pediátrica (7). Nesse grupo, o diagnóstico de câncer de tireoide tem início com a anamnese, exames de função tireoidiana e ultrassonografia que, dependendo do achado, pode ser complementado com uma tomografia computadorizada [153].

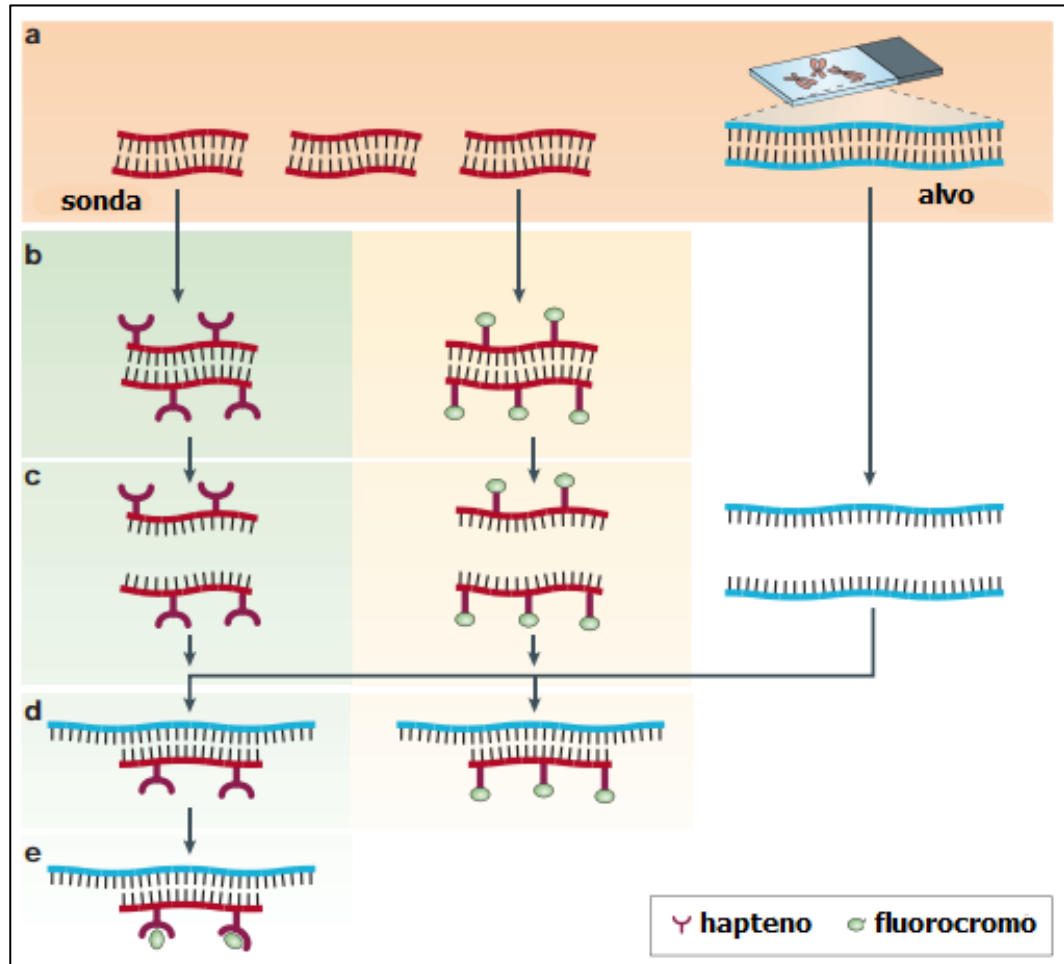
Dada a importância do papel prognóstico das fusões *RET/PTC* na população infantojuvenil, técnicas da biologia molecular para detectá-las têm sido cada vez mais solicitadas, em especial: hibridização fluorescente *in situ* (FISH), reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) e sequenciamento de nova geração (NGS) [154]. A imuno-histoquímica (IHQ) pode ser utilizada para medir a expressão da proteína RET, servindo como marcador substituto para fusões no gene. Entretanto, estudos mostram que a IHQ apresentou baixa correspondência com a presença de fusões *RET* identificadas em FISH e RT-PCR [155,156].

2.6.1 FISH

A *Fluorescence In Situ Hybridization* é uma técnica caracterizada pela identificação e localização de ácidos nucleicos alvo (sequências de DNA ou RNA), por meio da ligação complementar de sondas (sequências de DNA conhecidas) marcadas com moléculas fluorescentes, denominadas fluorocromos (**Figura 5**). Atualmente, empresas de consumíveis laboratoriais dispõem de diferentes sondas para aquisição e com diversas finalidades,

principalmente na oncologia, promovendo um rápido diagnóstico de ampliações gênicas, rearranjos, microdeleções e microduplicações cromossômicas [157,158].

Figura 5 – Representação esquemática das etapas da FISH



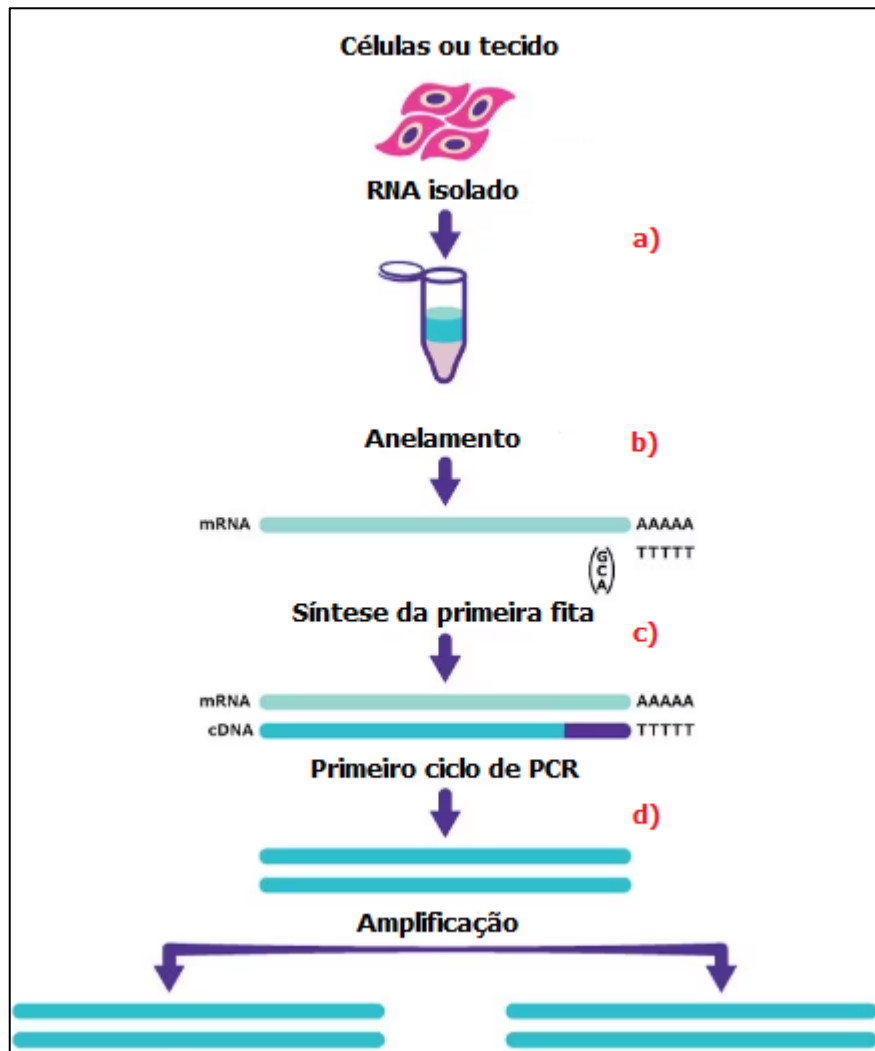
Fonte: Adaptado de Speicher e Carter (2005) [159] Legenda: A obtenção da sonda e da zona alvo são processos feitos de forma independente (a) e, em seguida, a sonda é rotulada (b) com haptenos (indiretamente) ou fluorocromos (diretamente). Para obtenção da fita simples, a sonda e o DNA cromossômico são desnaturados (c) e, quando postos em contato, a sonda hibridiza *in situ* com o DNA-alvo (d). Se a sonda for rotulada indiretamente, uma etapa extra é necessária para visualização do hapteno (e).

2.6.2 RT-PCR

A *Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction* é um método que permite o estudo do RNA através da PCR. Nessa técnica, demonstrada na **Figura 6**, por meio da enzima transcriptase reversa, uma amostra de RNA é convertida em cDNA para que seja amplificado pela PCR convencional, oferecendo oportunidades para detecção de genes expressos e variantes de transcrição, além da geração de cDNA para o método de sequenciamento [160].

No entanto, a RT-PCR é direcionada para a detecção única de fusão específica e, normalmente, requer um RNA de alta qualidade, associado ao sistema multiplex [161].

Figura 6 – Representação esquemática das etapas da RT-PCR



Fonte: Adaptado de Sigma-Aldrich [162]

Legenda: Juntamente com nucleotídeos, transcriptase reversa, primers, íon divalente e uma solução tampão, o RNA é inserido num microtubo para ser submetido a variações de temperatura (a), o primer se liga a sua região complementar na fase de anelamento (b) e a transcriptase reversa sintetiza o DNA complementar a partir do primer (c). Em seguida, o cDNA é submetido à PCR convencional e amplificado em milhões de cópias (d).

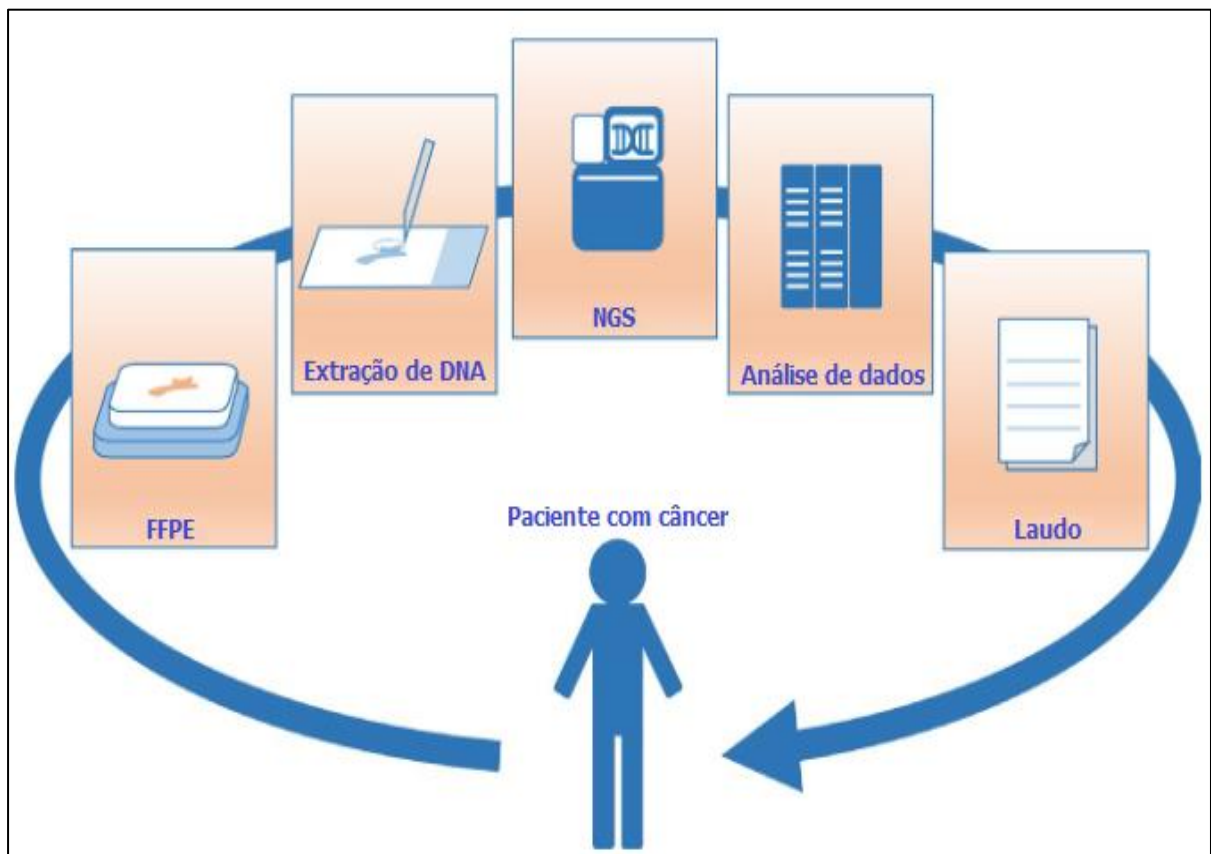
2.6.3 NGS

O *Next Generation Sequencing* é um método de abordagem econômica capaz de sequenciar, simultaneamente, milhões de curtas cadeias de nucleotídeos presentes no DNA ou RNA (**Figura 7**). Diferentemente do sequenciamento Sanger, essa técnica permite uma

análise de todo genoma, exoma ou transcriptoma, com alta sensibilidade para detecção de alterações moleculares [163,164].

O NGS direcionado ao DNA, além de não requerer uma etapa de purificação de RNA, é capaz de detectar pontos de fusões gênicas juntamente com alterações cromossômicas estruturais. Entretanto, ao envolver regiões intrônicas em genes com grandes sequências repetitivas (como *NTRK2* e *NTRK3*), a sua eficiência pode ser prejudicada [165].

Figura 7 – Fluxo de trabalho do NGS



Fonte: Adaptada de Nagahashi e colaboradores (2019) [166].

Legenda: O início se dá com o processamento da amostra parafinada que, em seguida, é submetida à extração de DNA e RNA. As regiões alvo de interesse são amplificadas e processadas para NGS, e as sequências geradas são analisadas em bioinformática para validação e geração de laudo com resultados encontrados e, se necessário, recomendações terapêuticas.

Embora o direcionamento com RNA não seja afetado por regiões intrônicas, a sua manipulação é mais sensível, principalmente em amostras parafinadas, pois o não cumprimento de critérios de qualidade pode ocasionar uma elevada degradação [167]. Por conta do alto desempenho, painéis direcionados (número limitado de genes a serem analisados) são os mais adequados para o rastreamento de fusões, pois requerem uma menor

quantidade de ácido nucleico, a análise é direcionada aos alvos clínicos mais importantes, tornando o processo mais rápido e de fácil interpretação. Além disso, os painéis permitem direcionar uma terapia alvo para as fusões detectadas, fornecendo melhoria na prática clínica [168].

3 OBJETIVOS

Esta seção apresenta os objetivos estabelecidos para este estudo, indicando os resultados esperados.

3.1 GERAL

Determinar, retrospectivamente, a prevalência de fusões do gene *RET* em amostras parafinadas de CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens atendidos nos centros participantes do estudo.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estudar, por meio de painel mutacional *HotSpot* e painel de fusões gênicas, a presença de outros *drivers* oncogênicos nas amostras tumorais;
- Avaliar a associação de aspectos clínico-patológicos (idade, sexo, tamanho do tumor, subtipo histológico, ocorrência de metástases loco-regionais e à distância, e risco de recorrência) com a positividade para fusões no gene *RET*.

4 HIPÓTESES

H0: existe baixa prevalência de fusões do gene *RET* em amostras parafinadas de CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens, atendidos nos centros participantes do estudo;

H1: existe alta prevalência de fusões do gene *RET* em amostras parafinadas de CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens, atendidos nos centros participantes do estudo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção compreende os procedimentos metodológicos que visam dar cumprimento aos objetivos estabelecidos.

5.1 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA

Estudo observacional analítico transversal, de caráter retrospectivo, com 79 casos de carcinoma diferenciado de tireoide (CDT), em pacientes com idade igual ou inferior a 21 anos de idade, diagnosticados e tratados em quatro diferentes centros de saúde da região Nordeste do Brasil, entre janeiro de 2010 e março de 2021: (i) Hospital Aristides Maltez (HAM), (ii) Instituto Integrado Endocrinologia e Cirurgia (IT), ambos localizados na cidade de Salvador, Bahia; (iii) Hospital Dom Pedro de Alcântara (HDPA), localizado na cidade de Feira de Santana, Bahia; (iv) Hospital Univesitário Lauro Wanderley (HULW), localizado na cidade de João Pessoa, Paraíba. Selecionaram-se amostras tumorais de pacientes não consecutivos (amostragem não probabilística, por conveniência), fixadas em formol e conservadas em parafina (FFPE), resultantes de ressecções cirúrgicas da tireoide realizadas pelos serviços de cirurgia de cabeça e pescoço dos respectivos locais.

Atualmente, o HAM conta com 255 leitos e um corpo clínico de, aproximadamente, 200 profissionais médicos que atendem, por dia, cerca de 3500 pessoas de todas as idades. A sua unidade oncopediátrica está em funcionamento há mais de uma década, sendo considerada uma das melhores do país. A instituição, mantida pela Liga Bahiana Contra o Câncer (LBCC), atende – exclusivamente – pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS), oriundos de quase todos os municípios da Bahia, mas também de estados adjacentes, como Sergipe e Alagoas [169].

O IT é um Instituto multidisciplinar, de rede privada, especializado em doenças da tireoide, com Cadastro Nacional de Pessoa Jurídica (CNPJ) 33.159.861/0001-76, e conta com serviços de Endocrinologia, Radiologia, Ultrassonografia, Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Medicina Nuclear, Patologia e Nutrição, a fim de tratar cada paciente de forma integral e individualizada [170].

O HDPA, mantido pela Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana (SCMFS), hoje conta com 145 leitos, 12 deles destinados à Unidade de Terapia Intensiva (UTI). O hospital é referência em Oncologia e atende, majoritariamente, pelo SUS e por demais convênios, a

pacientes de Feira de Santa e mais 71 municípios da Macrorregião Centro – Leste do Estado da Bahia [171].

O HULW, integrado à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), conta com cerca de 44.000 m² de área construída e, hoje, é configurado como hospital-escola. Como campo de estágio dos estudantes de graduação, pós-graduação e ensino técnico, a instituição busca entregar uma formação de profissionais que atuem como agentes humanizadores, por meio da educação em serviço no SUS. Atualmente, encontra-se em curso o processo de discussão interna para que o hospital seja habilitado como unidade especializada em Oncologia [172].

5.2 GRUPO AMOSTRAL

Os casos foram selecionados após pesquisa de pacientes que tiveram o diagnóstico de neoplasia maligna da glândula tireoide (código C73, segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID), por meio de exame anatomopatológico (AP). Além disso, deviam estar registrados em base de dados disponível em sistema eletrônico interno dos serviços de anatomia patológica: a) HAM e IT, em Salvador; b) HDPA ou no Centro de Diagnóstico Pires (CEDAPI), em Feira de Santana; c) HULW ou no Centro de Diagnóstico Anatomopatológico (CEDAPP), em João Pessoa. A princípio, os pacientes elegíveis para o estudo foram aqueles cujos laudos de AP indicavam diagnóstico de CDT.

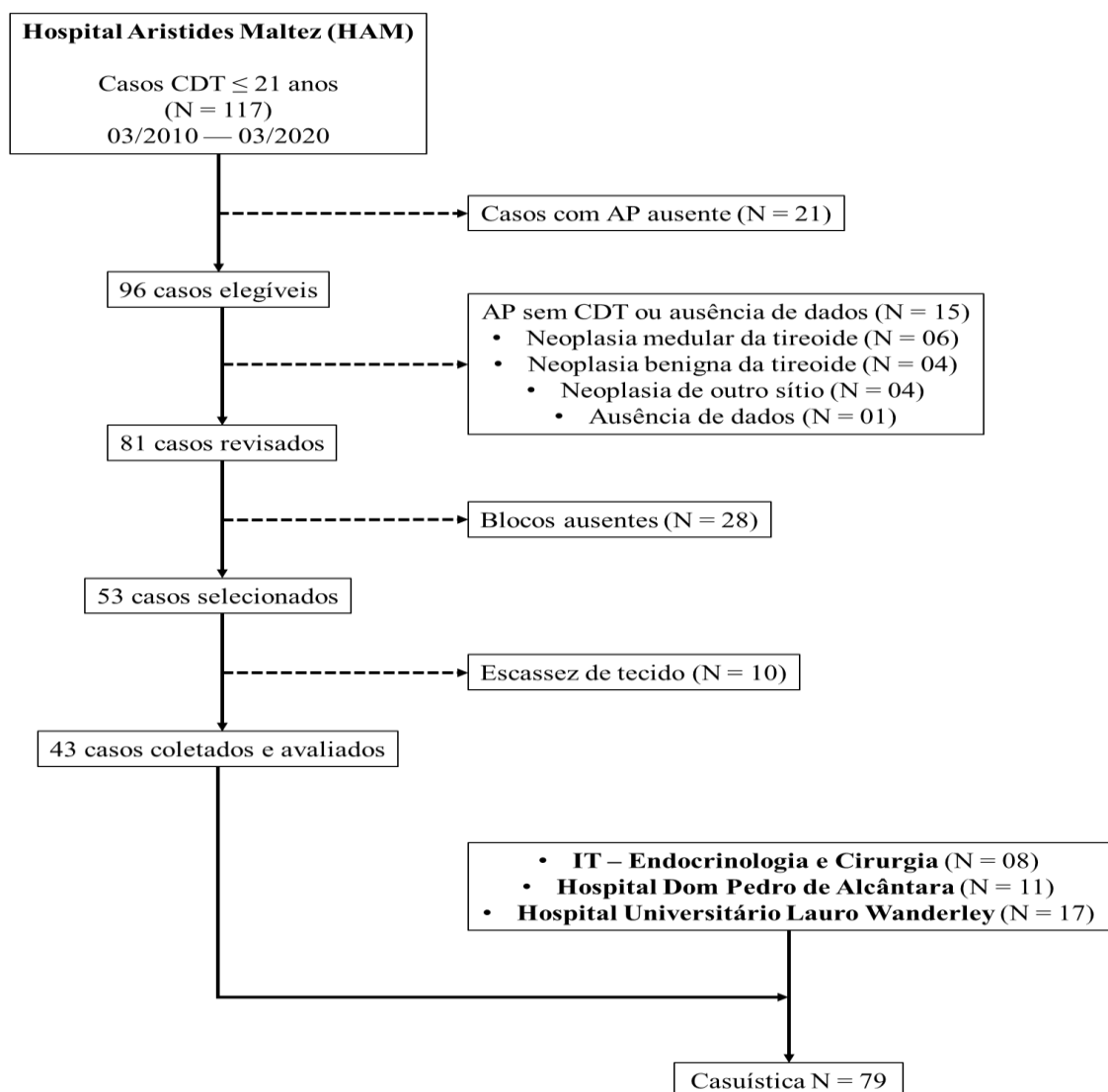
Após essa etapa, realizou-se a busca das respectivas lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) – previamente confeccionadas para realização do AP – bem como dos respectivos blocos de parafina contendo tecido tumoral. Ambos, blocos e lâminas, estavam mantidos em seus respectivos serviços. Nas ocasiões em que as lâminas estavam ausentes ou inadequadas para avaliação e identificação da área tumoral, novas lâminas foram confeccionadas e coradas com HE.

5.2.1 Critérios de Inclusão e Exclusão

A seleção de casos elegíveis para esta pesquisa, ilustrada na **Figura 8**, obedeceu ao seguinte critério de inclusão: a) pacientes com idade igual ou inferior a 21 anos, diagnosticados com CDT e tratados cirurgicamente pelo HAM, IT, HDPA e HULW, entre janeiro de 2010 e março de 2021.

Excluíram-se do estudo: a) casos que não dispunham de laudo anatomopatológico registrado em sistema eletrônico; b) casos que não tinham estadiamento tumoral completo pela classificação TNM [173]; c) casos cujos blocos de parafina contendo tecido tumoral não foram localizados nos respectivos arquivos dos serviços de anatomia patológica e citológica (SAPC); d) casos com escassez de tecido tumoral tireoidiano para análise inicial do SAPC; e) amostras tumorais que não tivessem sido submetidas ao protocolo de revisão anatomopatológica pelo médico patologista colaborador (*vide* ANEXO A).

Figura 8 – Fluxograma de amostragem



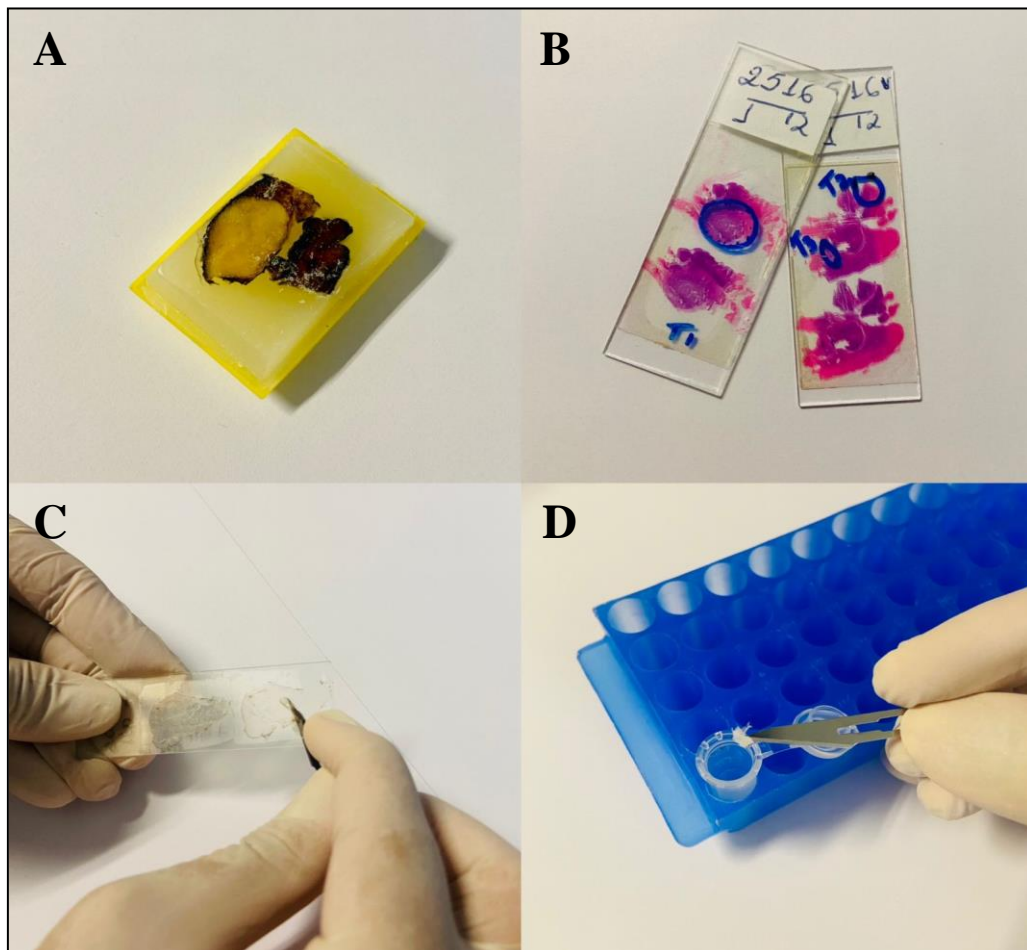
Fonte: Elaboração do autor.

Legenda: Abreviações: CDT — carcinoma diferenciado da tireoide; AP — anatomopatológico

5.3 COLETA DE TECIDO PARAFINADO

Para realização do exame molecular, quatro lâminas foram confeccionadas com cortes histológicos sequenciais de 10 μm de espessura, as quais foram sobrepostas às suas correspondentes lâminas HE, com as áreas tumorais previamente marcadas. As áreas de tecido tumoral das novas lâminas foram dissecadas manualmente com navalhas descartáveis e estéreis (*Leica Biosystems*, Alemanha) e transferidas para microtubos de 1,5 mL (*Eppendorf*, Alemanha), previamente autoclavados e identificados e estocados à temperatura ambiente até o processamento (**Figura 9**). Em casos de multifocalidade, foram selecionados todos os focos tumorais, mas somente o foco de maior extensão foi utilizado no estudo.

Figura 9 – Material de arquivo dos SAPCs e coleta de tecido tumoral



Fonte: Arquivo fotográfico do autor.

Legenda: A: bloco de parafina com tecido tireoidiano; B: demarcação da área tumoral a partir de corte de tecido tireoidiano corado com HE; C e D: coleta de tecido tumoral em lâminas com cortes histológicos.

A fim de iniciar a avaliação molecular, as amostras acondicionadas nos microtubos foram transferidas para o Laboratório de Estudo da Tireoide (LET), do Instituto de Ciências da Saúde (ICS/UFBA). Para o rastreamento de mutações pontuais e de fusões gênicas, por meio de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), as amostras foram inicialmente processadas no Laboratório Studart-Studart (LSS), localizado na cidade de Salvador; enquanto as amostras remanescente foram analisadas pelo Grupo Hermes Pardini, no município de Vespasiano, Distrito Industrial de Minas Gérias.

5.4 EXTRAÇÃO DE DNA TUMORAL PARAFINADO

Para extração de DNA genômico utilizou-se o kit comercial *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life Technologies, Estados Unidos), conforme instruções do fabricante. Diante disso, as amostras de tecidos tumorais oriundas dos blocos de parafina foram submetidas a um tratamento prévio de desparafinização com xilol e, após término do processo de extração, as amostras foram armazenadas em freezer a -20°C , até a sua utilização nos centros de análise. Foram utilizados dois microlitros da amostra para determinação da concentração e pureza do DNA extraído, utilizando-se Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo K23-0002 (KASVI, Brasil). Foi considerado $\text{DO}_{260 \text{ nm}} = 1$ equivalente a $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de DNA. Os valores de referência para amostras de boa qualidade foram os rários $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ e $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{230}$ entre 1,7 e 2,0.

5.5 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

Esta seção será apresentada em duas partes: mutações pontuais e fusões gênicas.

5.5.1 Mutações Pontuais

No LSS, a genotipagem das regiões genômicas alvo foi realizada por NGS na plataforma *iSeq 100 Sequencing System* (Illumina Inc, Estados Unidos). O método utilizado para seleção das regiões de interesse foi o *amplicon-based*, através do *AmpliSeq for Illumina Custom Panel* (Illumina Inc, Estados Unidos), conforme validação e padronização interna. As análises de bioinformática foram conduzidas na plataforma *cloud-based*, da Varstation™, com *pipeline* padronizado para tecnologia e laboratório, considerando as regras da

Association for Molecular Pathology [174-176]. Trata-se de um ensaio qualitativo e quantitativo. *Cut-off* laboratório: VAF >5%. Cobertura média em regiões de interesse 350x, percentual de leituras em regiões de interesse com cobertura $\geq 300x$ >90,00% e percentual de leitura com Q-value >30 >95%. Sensibilidade: $\geq 95\%$ e especificidade: 95,9%. Variantes que podem ser detectadas: SNP e indels. Variantes reportadas: patogênicas e provavelmente patogênicas.

No Grupo Hermes Pardini, o material recebido foi submetido à avaliação microscópica por patologista para determinação da área tumoral da amostra. Para garantir a sensibilidade do teste, apenas amostras com mínimo de 5% de área tumoral foram utilizadas. O DNA presente no bloco de parafina/lâmina foi desparafinado e extraído com o kit *Cobas DNA Sample Preparation* (Roche, Suíça). As regiões *hotspots* de interesse foram amplificadas com o painel customizado (ThermoFisher, Estados Unidos) e submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) por meio do equipamento *Ion S5 System* (ThermoFisher, Estados Unidos). As sequências geradas foram alinhadas contra o genoma de referência GRCh37/hg19 e processadas em *pipeline* de bioinformática *Ion Torrent* (versão 5.10 - ThermoFisher, Estados Unidos). Os resultados foram analisados no *software Ion Reporter* (versão 5.10 - ThermoFisher, Estados Unidos).

Quadro 3 – Painel NGS utilizado para detecção de mutações pontuais.

Gene	Referência	Éxons
<i>EGFR</i>	NM_005228.5	18, 19, 20 e 21
<i>KRAS</i>	NM_004985.5	2, 3 e 4
<i>NRAS</i>	NM_002524.4	2, 3 e 4
<i>BRAF</i>	NM_004333.4	11 e 15
<i>PIK3CA</i>	NM_006218.4	7, 9 e 20

Fonte: Dados da pesquisa.

5.5.2 Fusões Gênicas

No LSS, a análise dos genes alvo *ABL1*, *ALK*, *AKT3*, *AXL*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERG*, *ETV1*, *ETV5*, *ETV4*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *PDGFRA*, *PPARG*, *RAF1*, *RET*, *ROS1* e *MET*, foi realizada pela plataforma *iSeq 100 Sequencing System*

(Illumina, Estados Unidos). Por amostra tumoral, obtiveram-se quatro lâminas FFPE com seção de 10 µm de espessura, o suficiente para fornecer quantidade satisfatória de DNA ou RNA por reação. Isso permitiu a análise em amostras tumorais de pequeno tamanho ou de qualidade inferior. Utilizaram-se dois cortes de 10 µm de FFPE para extração do RNA com o kit *ReliaPrep™ FFPE RNA Miniprep System* (Promega, Estados Unidos). A qualidade foi verificada com o *Qubit™ RNA HS Assay Kit assay* (LifeTechnologies, Estados Unidos). A síntese do cDNA foi realizada com o *Ampliseq™ cDNA Synthesis* (Illumina, Estados Unidos), conforme recomendações do fabricante. O método de enriquecimento de biblioteca foi *amplicon-based*, com o *AmpliSeq for Illumina Focus Panel* (Illumina Inc, Estados Unidos), conforme validação e padronização interna. Para a verificação da qualidade da biblioteca, utilizaram-se o *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit assay* (LifeTechnologies, Estados Unidos) e o *QIAxcel Advanced System*, com o *QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200)* (QIAGEN, Alemanha).

As análises de bioinformática foram conduzidas na plataforma *cloud-based* Varstation™ com *pipeline* padronizado para tecnologia e laboratório, considerando as regras da Association for Molecular Pathology [174–176]. Referência de genoma: GRCh37/hg19. Ensaio qualitativo e quantitativo. *Cut-off* laboratório: VAF>5%. Sensibilidade: ≥90%, Especificidade: 96,9%. Variantes que podem ser detectadas: fusões gênicas. Variantes reportadas: patogênicas e provavelmente patogênicas.

No grupo Hermes Pardini, o material recebido foi submetido à avaliação microscópica por patologista, para determinação da área tumoral da amostra. Para garantir a sensibilidade do teste, foram utilizadas apenas amostras com mínimo de 5% de área tumoral. O RNA foi extraído com o *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE*. As regiões alvo (*ABL1, AKT3, ALK, AXL, BRAF, ERG, ETV1, ETV4, ETV5, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRA, PPARG, RAF1, RET, ROS1*) foram amplificadas e processadas para NGS com o kit *Oncomine® Focus Assay* através do equipamento *Ion S5 System* (ThermoFisher, Estados Unidos).

As sequências geradas foram alinhadas contra o genoma de referência GRCh37/hg19 e processadas em *pipeline* de bioinformática (*Ion Torrent*, versão 5.10 – ThermoFisher, Estados Unidos). Os resultados foram analisados no *software Ion Reporter* (versão 5.10 – ThermoFisher, Estados Unidos). As variações detectadas no NGS foram avaliadas com *software Oncomine Knowledgebase Reporter* para emissão do relatório final.

5.6 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

Analisaram-se as seguintes variáveis: idade à época da cirurgia, sexo, tamanho do tumor, subtipo histológico, multifocalidade, extensão extratireoidiana, invasão angiolinfática, invasão perineural, metástases linfonodais, estadiamento tumoral, estratificação de risco de recorrência e positividade para fusão *RET*.

Realizaram-se as análises dos dados utilizando o pacote estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* for Windows (SPSS), versão 22. As variáveis quantitativas foram expressas em mediana e intervalo interquartil e as variáveis qualitativas foram expressas em frequência absoluta e frequência relativa. Avaliaram-se as variáveis quantitativas e como não apresentavam distribuição normal para comparar os grupos aplicou-se o teste de Mann-Whitney. Para a análise das variáveis qualitativas foi aplicado o teste Qui-quadrado de Person ou o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.7 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS

Este trabalho foi executado, em consonância com o que estabelece a Resolução N° 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto foi submetido 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); da Liga Baiana Contra o Câncer (CEP/LBCC/HAM); e da Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP/HULW), conforme Parecer Consubstanciado N° 5.470.375 (*vide* ANEXO B).

Esta pesquisa foi executada com apoio financeiro da farmacêutica Bayer, sob o contrato de número BR135321023503P, administrados pela interveniente Fundação de Apoio à Pesquisa e à Extensão (FAPEX), projeto número 200038.

6 RESULTADOS

Esta seção apresenta os resultados deste estudo, compreendendo duas partes, sendo uma referente à caracterização da amostra e a outra, sobre o sequenciamento de nova geração.

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Esta caracterização está detalhada em duas partes, apresentadas a seguir.

6.1.1 Aspectos Sociodemográficos

Os 79 pacientes avaliados na presente casuística foram tratados em quatro centros de referência para tratamento de câncer, sendo 43 (54,4%) deles oriundos do HAM e 8 (10,1%) do IT, da cidade de Salvador; 11 (13,9%) pacientes foram tratados no serviço da SCMFS, na cidade de Feira de Santana, na Bahia; e 17 (21,5%), operados no HULW, na Paraíba. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 18 anos, variando entre 6 e 21 anos; 30 pacientes (37,9%) tinham idade inferior a 18 anos e 49 (62,1%), idade variando de 18 a 21 anos. Em relação ao sexo dos pacientes, a grande maioria era do sexo feminino (61/79; 77,2%), com apenas 18 casos do sexo masculino (18/79; 22,8%).

6.1.2 Aspectos Clínico-patológicos

Os pacientes incluídos no estudo apresentaram laudo que, de acordo com a OMS [177], diagnosticam CDT, com a seguinte distribuição em relação às variantes deste tipo histológico: 66 casos de CPTC (83,5%), 9 de CPTVF (11,4%), 3 de CFT (3,8%) e 1 de CPTED (1,3%).

Segundo a 8ª edição do *Estadiamento Tumoral TNM*, do American Joint Committee on Cancer (AJCC) [173], o tamanho tumoral variou de 0,3 a 7,5 cm, com uma mediana de 2,2 cm. Nesta casuística, 31/79 casos (39,2%) foram classificados como pT1, sendo 9/31 (29,0%) pT1a configurando-se como microcarcinomas, medindo até 1 cm; e 22/31 (71,0%) pT1b, medindo entre 1 e 2 cm. Do total de tumores avaliados, 22/79 (27,8%) foram classificados como pT2, tumores entre 2 e 4 cm; 23/79 (29,1%) foram pT3; e 03/79 (3,8%) foram pT4. Dentre os casos pT3, 06/23 (26,1%) foram pT3a, tumores com mais de 4 cm; e 17/23 (73,9%) pT3b, tumores com extensão extratireoidiana (EET).

Quanto às metástases para os linfonodos cervicais, foram detectadas em 41/79 pacientes (51,9%), sendo 21/41 (51,2%) em linfonodos do compartimento central (N1a) e 20/41 (48,8%) em linfonodos do compartimento lateral (N1b). Metástases a distância foram registradas em 8/79 (10,1%) pacientes e, dentre esses, 7 apresentavam metástase pulmonar e 1 óssea.

Em relação à focalidade dos casos, 51/79 (64,5%) pacientes apresentaram a doença de forma unifocal, enquanto 28/79 (35,5%) manifestaram multifocalidade. Nessas, o acometimento multifocal foi mais frequente nos pacientes com 18 anos de idade ou mais (18/28), quando comparados aos menores de 18 anos (10/28). A multifocalidade foi mais bilateral, em ambos os lobos tireoidianos, com dois ou mais focos tumorais, presentes em 16/28 pacientes. Invasão angiolinfática (IAL) foi detectada em 7/79 (8,8%) dos tumores avaliados e a EET em 21/79 (26,5%).

Com base no protocolo da American Thyroid Association (ATA) (18) para a classificação de risco de recorrência, 34/79 (43%) pacientes foram classificados como risco baixo; 16/79 (20,3%), como risco intermediário; e 29/79 (36,7%) apresentaram alto risco de recorrência para a neoplasia; dentre esses, os pacientes com mais de 18 anos de idade eram a maioria, com 21/29 indivíduos (72,4%). A **Tabela 1** apresenta as características sociodemográficas e anatomopatológicas dos pacientes incluídos no estudo e suas respectivas amostras tumorais.

Tabela 1 – Perfil sociodemográfico e anatomopatológico dos participantes do estudo

Variáveis	Total 79 (100,0%)	<18 anos 30 (37,9%)	≥18 anos 49 (62,1%)
Idade (anos), mediana	18 (6-21)	17 (6-17)	19 (18-21)
Sexo , n (%)			
Feminino	61 (77,2)	14	47
Masculino	18 (22,8)	8	10
Procedência , n (%)			
HAM	43 (54,4)	11	32
SCMFS	11 (13,9)	3	8
HULW	17 (21,5)	8	9
IT	8 (10,1)	8	0
Subtipo histológico , n (%)			
CPTC	66 (83,5)	14	52
CPTVF	9 (11,4)	2	7
CFT	3 (3,8)	1	2
CPTED	1 (1,3)	1	0

Estadiamento T, n (%)			
T1a	9 (11,3)	3	6
T1b	22 (27,8)	4	18
T2	22 (27,8)	5	17
T3a	6 (7,5)	4	2
T3b	17 (21,5)	4	13
T4	3 (3,7)	0	3
Estadiamento N, n (%)			
N0	38 (48,1)	12	26
N1a	21 (26,5)	3	18
N1b	20 (25,3)	5	15
Estadiamento M, n (%)			
M0	71 (89,8)	29	42
M1	8 (10,2)	1	7
Tamanho tumor (cm), mediana	2,2 (0,3-7,5)	2 (0,5-7,5)	2,3 (0,3-6,8)
Focalidade, n (%)			
Unifocal	51 (64,5)	11	40
Multifocal	28 (35,5)	10	18
EET, n (%)			
Positiva	21 (26,5)	7	14
Negativa	58 (73,5)	12	46
IAL, n (%)			
Positiva	7 (8,8)	2	5
Negativa	72 (91,2)	27	45
Risco ATA, n (%)			
Baixo risco	34 (43)	8	26
Risco intermediário	16 (20,2)	3	13
Alto risco	29 (36,7)	8	21

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: CFT - Carcinoma folicular da tireoide; CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide de variante clássica; CPTED - Carcinoma papilífero da tireoide de variante esclerosante difusa; CPTVF - Carcinoma papilífero da tireoide de variante folicular; EET - extensão extratireoidiana; IAL - invasão angiolinfática; ATA - *American Thyroid Association*.

6.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

A abordagem desta seção compreende duas partes, detalhadas a seguir.

6.2.1 Mutações Pontuais

A técnica NGS para detecção de mutações pontuais (*HotSpot*) foi realizada em 79/79 (100%) amostras tumorais. Inicialmente, detectaram-se cinco amostras previamente positivas para a mutação $BRAF^{V600E}$ e, por se tratar de uma alteração genética excludente para rearranjos *RET/PTC* [178], elas não seguiram para a avaliação de positividade para fusões gênicas. O resultado dessa análise apontou 21/79 (26,6%) resultados inconclusivos, 21/79 (26,6%) mutados e 37/79 (46,8%) tipo selvagem, como exposto na **Tabela 2**. Entre os mutados, 10/21 (47,6%) casos foram positivos para mutação em *BRAF*, 08/21 (38,1%) para *EGFR*, 04/21 (19,0%) para *KRAS*, 03/21 (14,3%) para *NRAS* e 01/21 (4,8%) para *PIK3CA*, com ocorrência de mutações pontuais simultâneas.

Tabela 2 – Análise molecular por NGS da casuística de estudo

Paciente	Idade	Sexo	Tipo histológico	Tamanho do maior tumor (cm)	Estadiamento tumoral (TNM)	BRAF	EGFR	KRAS	NRAS	PIK3CA	Fusão detectada
1	21	F	CPTC	3,7	T2N1aM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
2	21	F	CPTC	4*	T3bN1aM0	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Não
3	21	M	CPTC	3	T2N1bM0	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não
4	21	F	CPTC	2,5	T2N0M0	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não
5	21	F	CPTC	2	T1bN0M0	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
6	21	F	CPTC	0,7	T1aN0M0	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
7	21	M	CPTC	4,3*	T3bN1aM1	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
8	21	F	CPTC	1,2*	T3bN1aM0	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
9	21	F	CPTC	2,8*	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
10	21	F	CPTC	2*	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
11	20	M	CPTC	6,6*	T3bN1b M1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
12	20	F	CPTC	1,4	T3bN1aM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
13	20	F	CPTC	1,6	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
14	20	M	CPTC	2,5	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
15	20	F	CPTC	3,2	T3bN1aM1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
16	20	F	CPTC	2,3*	T3bN1a M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
17	20	M	CPTC	1,5	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
18	20	F	CPTC	2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
19	20	F	CPTC	3,5	T3bN1bM1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>ETV6::NTRK3</i>
20	20	F	CPTC	2,7	T3bN0M0	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
21	19	F	CPTC	5,5	T3bN0M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
22	19	F	CPTC	4,5*	T3bN1b M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
23	19	F	CPTC	3,1*	T3bN1a M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
24	19	M	CPTC	2,5	T3bN1aM1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não

25	19	F	CPTVF	1,4	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
26	19	M	CPTC	3	T3bN1bM1	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Não
27	18	F	CPTC	0,8	T3bN1aM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
28	18	F	CPTC	3,2	T3bN1aM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
29	18	F	CPTC	4*	T3bN1a M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
30	18	F	CPTC	1,2	T3bN1aM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
31	18	F	CPTC	1,2	T3bN1b M0	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
32	18	F	CPTC	0,8	T3bN0M0	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
33	17	F	CPTC	7,5*	T3bN1a M0	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
34	17	F	CPTC	3,5*	T3bN1bM0	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Não
35	17	F	CPTC	3*	T3bN0 M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
36	17	F	CPTC	1,5	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
37	17	F	CPTC	0,8	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
38	17	M	CPTC	1,5	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
39	15	F	CFT	6,5	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
40	15	M	CPTVF	3,2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
41	14	F	CPTC	4	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
42	13	F	CPTC	2,5	T3bN1a M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
43	12	F	CPTC	2*	T3bN1b M1	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>TPR::NTRK1</i>
44	14	F	CPTVF	2,7	T3bN0M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
45	21	F	CPTC	1,4	T3bN1aM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
46	21	F	CPTC	0,7*	T3bN1aM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
47	21	F	CPTVF	3*	T3bN1aM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
48	18	F	CFT	6,8	T3bN0M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
49	20	F	CPTC	0,8*	T3bN0M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
50	17	M	CPTC	4,5	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
51	18	F	CPTC	0,3	T3bN0M0	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
52	15	F	CPTVF	3	T3bN0M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
53	19	F	CPTC	0,6	T3bN0M0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não

54	20	M	CPTC	3,1	T3bN0M1	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Não
55	14	F	CPTVF	2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
56	21	F	CPTVF	1,3	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Não
57	13	M	CPTC	3	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Não
58	20	F	CPTC	2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
59	21	F	CPTVF	2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
60	21	M	CPTC	2,7	T3bN1aM0	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
61	18	M	CPTC	1,6	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
62	18	F	CPTC	1,2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
63	21	F	CPTC	1,6	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
64	16	F	CPTVF	0,6	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
65	17	M	CPTC	1,3	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
66	15	F	CPTC	2,5	T3bN0M0	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
67	11	F	CPTC	1,7*	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>STRN::ALK</i>
68	18	F	CFT	2,2	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>PAX8::PPARG</i>
69	19	F	CPTC	1,1	T3bN1aM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
70	17	M	CPTC	1,6*	T3bN1bM0	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
71	17	F	CPTC	2,5	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>PAX8::PPARG</i>
72	14	F	CPTC	3,3	T3bN1bM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>CCDC6::RET</i>
73	13	F	CPTC	0,9	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>ETV6::NTRK3</i>
74	11	F	CPTC	1,5	T3bN1bM0	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	Inconclusivo	<i>TRIM24::RET</i>
75	15	M	CPTC	4,5*	T3bN1bM0	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
76	16	M	CPTC	1,5	T3bN1bM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não
77	15	F	CPTC	1,7	T3bN0M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>ETV6::NTRK3</i>
78	6	F	CPTED	4,8*	T3bN1bM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>NCOA4::RET</i>
79	15	F	CPTC	0,5	T3bN1aM0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CFT - Carcinoma folicular da tireoide; CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide de variante clássica; CPTED - Carcinoma papilífero da tireoide de variante esclerosante difusa; CPTVF - Carcinoma papilífero da tireoide de variante folicular. * Presença de extensão extratireoidiana.

Das 10 mutações encontradas no gene *BRAF*, 60% delas foram V600E, o seu tipo mais frequente em CPT [179]. O percentual restante foi caracterizado por alterações genéticas menos comuns nesse gene, as chamadas $BRAF^{non-V600E}$, tendo sido detectadas: 1 mutação $BRAF^{G464R}$, 1 $BRAF^{G469E}$ e 2 $BRAF^{S467L}$. No **Quadro 4**, é possível visualizar que as mutações encontradas em *EGFR*, *KRAS*, *NRAS* e *PIK3CA* foram detectadas em 14 tumores, em associação ou isoladamente.

Quadro 4 – Resultado do painel *HotSpot* por amostra tumoral.

Paciente	Mutação pontual encontrada
02	NM_002524.5 (NRAS):c.181C>T:p.(Gln61Ter) - VAF 29% NM_005228.5 (EGFR):c.2549_2610del:p.(His850Argfs*26) - VAF 92% NM_004985.5(KRAS):c.355G>A:p.(Asp119Asn) - VAF 4%
03	NM_004333(BRAF):c.1390G>A:p.(Gly464Arg) - VAF 7% NM_004985.5(KRAS):c.355G>A:p.(Asp119Asn) - VAF 7%
04	NM_004985.5(KRAS):c.173C>T:p.(Thr58Ile) - VAF 21%
05	NM_005228.5(EGFR):c.2174C>T:p.(Thr725Met) - VAF 6%
06	NM_004333 (BRAF):c.1400C>T:p.(Ser467Leu) - VAF 6% NM_005228.5(EGFR):c.2470_2534del:p.(Gly824Glufs*51) VAF -60%
07	NM_004333.6:(BRAF):c.1799T>A:p.(Val600Glu) - VAF 32%
08	NM_005228.5(EGFR):c.2073_2076del:p.(Leu692Hisfs*12) - VAF 59%
20	NM_004333.6(BRAF):c.1400C>T:p.(Ser467Leu) - VAF 18%
26	NM_004333.6 (BRAF):c.1406G>A:p.(Gly469Glu) - VAF - 5 % NM_002524(NRAS):c.35G>A:p.(Gly12Asp) - VAF 5%
31	NM_005228.5 (EGFR):c.2549_2610del:p.(His850Argfs*26) - VAF 6%

32	NM_004333.6(BRAF):c.1799T>A:p.(Val600Glu) - VAF 6%
33	NM_004333.6(BRAF):c.1799T>A:p.(Val600Glu) - VAF 10%
34	NM_002524.5(NRAS):c.198delC:p.(Met67*) - VAF 25%
43	NM_005228.5 (EGFR):c.2470_2610del:p.(Gly824_His870del) - VAF 6%
51	NM_005228.5 (EGFR):c.2549_2610del:p.(His850Argfs*26) - VAF 26%
56	NM_004985.5(KRAS):c.184G>A:p.(Glu62Lys) - VAF 6%
57	NM_006218.4(PIK3CA):c.2911_2912insC:p.(Cys971Serfs*8) - VAF 21%
60	NM_004333.6(BRAF):c.1799T>A:p.(Val600Glu) - VAF 24%
66	NM_004333.6(BRAF):c.1799T>A:p.(Val600Glu) - VAF 30%
70	NM_005228.5:(EGFR):c.2351C>T:p.(Ser784Phe) - VAF 4%
75	NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A:p.(Val600Glu) - VAF 32%

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: VAF - Frequência do alelo variante.

6.2.2 Fusões Gênicas

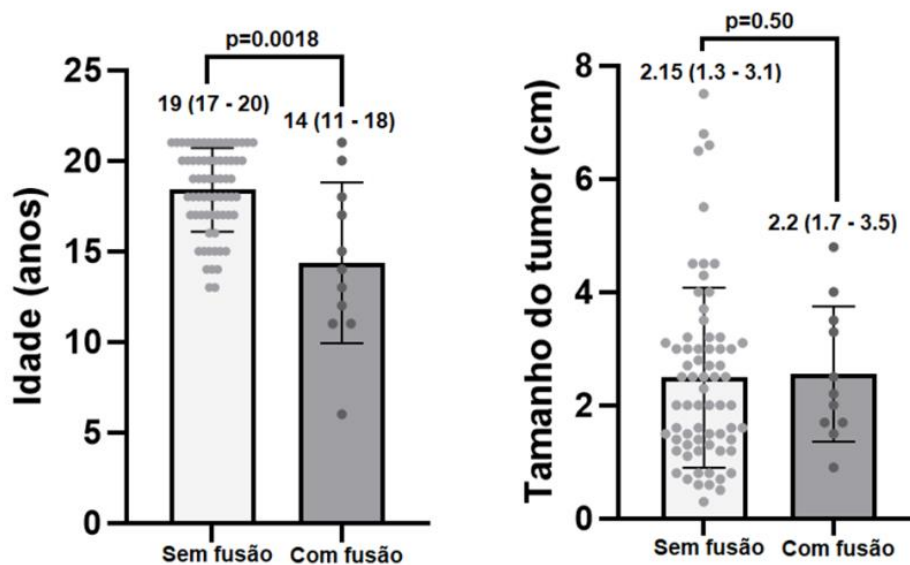
Quanto à análise molecular para detecção de fusões gênicas, 39/74 (52,7%) tiveram resultados inconclusivos, 10/74 (13,5%) apresentaram positividade para um rearranjo e 25/74 (33,8%) foram classificados como tipo selvagem (**Tabela 2**). Dentre os casos positivos para fusões gênicas, 3 foram do gene *RET* (01 *CCDC6::RET* ou *RET/PTC1*, 01 *NCOA4::RET* ou *RET/PTC3*, e 1 *TRIM24::RET* ou *RET/PTC6*); 4 foram do gene *NTRK* (03 *ETV6::NTRK3* e 01 *TPR::NTRK1*); 2 fusões *PAX8::PPARG*; e 1 *STRN::ALK*. Ou seja, a frequência de fusões do gene *RET* nesta casuística foi de 8,6% (3/35) e embora a quantidade de participantes com idade maior ou igual a 18 anos tenha predominado o estudo a frequência de fusões gênicas foi maior em indivíduos com menor idade (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Resultado do painel de fusões gênicas de acordo com a idade.

Idade	Total n (%)	Inconclusivo	Positivo	Negativo
	74 (100%)	39/74 (52,7%)	10/74 (13,5%)	25/74 (33,8%)
< 18 anos	28 (37,8%)	10 (25,6%)	8 (80%)	10 (40%)
≥ 18 anos	46 (62,2%)	29 (74,4%)	2 (20%)	15 (60%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Diante disso, ao comparar os tumores portadores de fusões gênicas com aqueles em que não foram detectadas as fusões, houve – estatisticamente – diferença significativa entre os grupos (**Figura 10**), demonstrando que as fusões são mais encontradas na população mais jovem (mediana 14 anos, IIQ 11-18, $p < 0.0018$). Neste estudo, não houve associação entre a presença de fusões e tamanho do tumor ($p=0,5$).

Figura 10 – Comparativo dos casos com e sem positividade para fusões gênicas, em relação à idade e tamanho tumoral

Fonte: Dados da pesquisa.

Os três casos com positividade em fusões *RET* eram do tipo papilífero e diagnosticados em pacientes do sexo feminino, com menos de 15 anos de idade. Todas apresentaram estadiamento tumoral e risco de recorrência variados, entretanto, a portadora do tumor com a fusão *NCOA4-RET* apresentou alto risco de recorrência para o câncer de tireoide (**Quadro 5**). Em razão do pequeno número de casos positivos, não foi possível estabelecer associação entre a presença das fusões *RET* com agressividade tumoral, risco de recorrência de doença ou idade maior ou menor do que 18 anos.

Quadro 5 – Características clínico-patológicas dos casos positivos para fusão no gene *RET*.

Fusão RET	Sexo	Idade	Subtipo histológico	Estadiamento tumoral	Focalidade	Maior tumor (cm)	Risco de recorrência (ATA)
<i>CCDC6::RET</i>	F	14	CPTC	T2N1bM0	Unifocal	3,3	Intermediário
<i>TRIM24::RET</i>	F	11	CPTC	T1bN1bM0	Multifocal	1,5	Intermediário
<i>NCOA4::RET</i>	F	06	CPTED	T3bN1bM0	Multifocal	4,8	Alto

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide de variante clássica; CPTED - Carcinoma papilífero da tireoide de variante esclerosante difusa; ATA - American Thyroid Association.

A presença de fusões, assim como de mutações no gene *BRAF* e demais *HotSpots* não apresentaram relação com uma maior classificação para risco de recorrência, de acordo com os critérios da ATA, neste estudo (**Tabela 4**).

Tabela 4 – Relação do risco de recorrência, segundo os critérios da ATA, e a presença de fusões e mutações pontuais.

	Risco de Recorrência			Valor de <i>p</i>
	Total (n=79)	Baixo risco (n=34)	Risco Intermediário/Alto (n=45)	
Presença de fusão (%)	10 (12,6%)	3 (8,8%)	7 (15,5%)	0,372
BRAF (%)	10 (12,6%)	4 (11,7%)	6 (13,3%)	0,835
Outras mutações pontuais (%)	21 (26,6%)	9 (26,5%)	12 (26,7%)	0,984

Fonte: Dados da pesquisa.

7 DISCUSSÃO

As fusões *RET* são os eventos moleculares mais comuns no CT pediátrico e, com a frequência de 8,6% (03/35) encontrada, é possível notar que este resultado se mostra inconsistente, com a margem percentual de 22 a 65% relatada em outros estudos [180]. Três genes parceiros de fusão com o *RET* foram encontrados: *CCDC6 (RET/PTC1)*, *NCOA4 (RET/PTC3)* e *TRIM24 (RET/PTC6)*. Tais rearranjos estão associados a uma doença mais agressiva e o CPT com positividade para fusão *NCOA4::RET* apresentou maior tamanho tumoral, multifocalidade, metástase linfonodal e alto risco de recorrência [181].

Nas últimas seis décadas, a incidência de casos de CT pediátrico dobrou e, diante desse cenário, as diferenças na apresentação clínica entre as fases infantil e adulta se tornaram significativas [182]. Entre elas, características moleculares passaram a ser mais estudadas, sobretudo as envolvidas nas vias MAPK e PIK3-AKT, a fim de compreender o impacto de mutações pontuais e fusões gênicas no prognóstico da doença, em indivíduos de distintas faixas etárias [12,16].

O advento do NGS contribuiu para ampliar a investigação de fusões no CPT, trazendo maior sensibilidade para detecção de rearranjos já conhecidos, bem como o descobrimento de novos [166]. A frequência de fusões no nossa casuística — sem histórico de exposição à radiação — foi de 28,6% (10/35) e, em comparação com outros estudos envolvendo a população infantojuvenil com casos esporádicos, a taxa está dentro do intervalo esperado. As frequências relatadas anteriormente variam de 23,7 a 64,7%, entretanto, os valores são dependentes do tamanho de corte, número de fusões testadas e qualidade do material a ser analisado [135,149].

Na literatura, a frequência de metástases linfonodais na população pediátrica varia entre 50 e 75%, enquanto para metástases a distância varia entre 6 e 33% [96,183–186]. Os achados no presente estudo confirmam essa agressividade ao diagnóstico, com prevalência de 51,8% para positividade linfonodal e 10,2% para metástases à distância. Um dos pacientes de 21 anos da casuística apresentou as mutações NM_004985.5(*KRAS*):c.355G>A:p.(Asp119Asn), NM_002524.5(*NRAS*):c.181C>T:p.(Gln61Ter) e NM_005228.5(*EGFR*):c.2549_2610del:p.(His850Argfs*26) de forma simultânea, além de aspectos de agressividade tumoral e pior prognóstico, como: tamanho de maior tumor sendo 4 cm, presença de EET e metástase linfonodal.

RAS é uma família de proteínas de ligação ao GTP, codificadas pelos genes *NRAS*, *HRAS* e *KRAS*, cuja função é regular as vias de sinalização MAPK e PI3K-AKT. Quando mutadas nos códons 12 e 13 (domínio GTP) ou 61 (domínio GTPase), ocorre uma alteração na sequência de aminoácidos e, como resultado, sua ativação constitutiva [187]. No câncer de tireoide adulto, as mutações pontuais *NRAS*^{Q61K} e *HRAS*^{Q61R} são as mais frequentes, sendo observadas em nódulos tireoidianos benignos e malignos [126]. Em alguns estudos [188–190], as mutações *RAS* foram correlacionadas a um pior prognóstico, mostrando uma possível associação entre essas mutações e metástases distantes no CPT adulto, como o encontrado no presente estudo. Por outro lado, mutações *RAS* são raras em população pediátrica e não costumam ser identificadas em mais de 5% de tumores esporádicos [145,149,191,192]. Do total de 10 mutações *BRAF* encontradas neste estudo, 6 são do tipo V600E, a alteração molecular mais prevalente no CPT [193]. Embora não seja muito encontrada em casos de CPT expostos à radiação, a *BRAF*^{V600E} teve uma frequência de, aproximadamente, 70% em indivíduos jovens pós-Fukushima [194]. Em casos esporádicos, as taxas de incidência podem variar devido a diferenças geográficas, étnicas, fatores ambientais e à abordagem utilizada no rastreamento. Além disso, a faixa etária desempenha um papel importante, pois estudos têm demonstrado um aumento na positividade para essa mutação à medida que a idade avança [195,196]. No presente estudo, identificou-se a presença de *BRAF*^{V600E} em indivíduos com idades entre 15 e 21 anos.

Mutações no gene *EGFR* são mais frequentes em cânceres de tireoide com maior grau de indiferenciação do que em bem diferenciados [46,44,13,197]. De acordo com o estudo de Masago e colaboradores [198], as mutações do *EGFR* foram evidentes em 30,4% dos pacientes com CPT; já no presente estudo a frequência foi de 38,1% (08/21), resultado próximo do estudo citado, embora as variantes encontradas sejam distintas. Foi relatado que 42,8% dos pacientes apresentaram mutação no gene *EGFR* associada à variante *BRAF*^{V600E}, porém, não houve associação significativa com gravidade da doença nesses pacientes [198]. Na presente casuística, também foi evidenciada a coexistência de mutações *BRAF* e *EGFR* em 4,8% (1/21) dos casos, entretanto, a variante de coexistência foi a *BRAF*^{S467L}, nunca antes relatada em carcinoma tireoidiano, mas frequente em melanomas [199–201]. Ademais, em concordância com o estudo Masago e colaboradores, não foram encontrados aspectos clínico-patológicos que apontassem gravidade da doença, no caso de duas mutações.

A fusão *STRN::ALK*, neste estudo encontrado em um paciente de 11 anos, é relatada em 1,4 a 7% dos casos pediátricos expostos à radiação e até 6,5% de casos esporádicos [194,202–

204]. Nos casos de CPT em adultos, a frequência do rearranjo é reduzida e não ultrapassou 3% e, embora tenha sido relatado em casos de doença avançada, a sua associação com o estágio da doença ainda não é clara [14,205]. Já a fusão *PAX8::PPARG* – encontrada em duas amostras da presente casuística – é comum no CPT adulto, mas raro em crianças e foi relatada em até 9% de casos esporádicos e 4% dos expostos à radiação, além de já ter sido identificada em casos de adenoma folicular da tireoide [28,144,146,149,206].

O sucesso da extração de amostras preservadas em blocos de parafina foi afetado por diversos fatores: quantidade de células, tipo de fixador utilizado, tempo de fixação, idade do bloco, conservação e presença de inibidores de PCR. De acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e do Colégio Americano de Patologistas (CAP) [207], os principais fatores relacionados com a qualidade do DNA e RNA extraídos são o tipo de fixador e o tempo de fixação, sendo recomendado para fixação a utilização de formalina neutra tamponada a 10%, por um período de 6 a 48 horas.

8 CONCLUSÃO

Na América Latina, este trabalho de pesquisa foi o primeiro a investigar a frequência de fusões *RET* em pacientes pediátricos com câncer de tireoide, tendo uma das maiores casuísticas já relatadas na literatura. A frequência encontrada foi de 8,6%, sugerindo que esses rearranjos são relativamente raros na população de estudo. Embora a disponibilidade limitada de amostras tumorais e material degradado tenha contribuído para a subestimação dessa taxa, foi estatisticamente significativo estabelecer que as fusões *RET* são mais comuns em pacientes mais jovens. Não houve associação entre a presença e o tipo de fusões *RET* e características clínico-patológicas de agressividade tumoral, estratificação de risco de recorrência, tamanho do tumor, sexo ou subtipo histológico dos CPTs investigados, nem com mutações pontuais avaliadas.

Além disso, foram encontradas novas mutações no gene *BRAF* que ainda não haviam sido descritas em CTDCF. Embora essas variantes não tenham relevância estatística para corroborar a agressividade da doença ou qualquer aspecto clínico-patológico, é importante destacar a frequência dessas alterações no CTDCF e seus possíveis impactos em longo prazo.

Esses dados destacam a necessidade de novos estudos multicêntricos com uma maior casuística, melhor delineamento e uso de tecido fresco para obtenção de DNA. É fundamental estabelecer parcerias com outras instituições médicas e acadêmicas para alcançar uma frequência mais precisa de fusões *RET* em jovens pacientes com câncer de tireoide.

REFERÊNCIAS

- [1] Vergamini LB, Frazier AL, Abrantes FL, Ribeiro KB, Rodriguez-Galindo C. Increase in the Incidence of Differentiated Thyroid Carcinoma in Children, Adolescents, and Young Adults: A Population-Based Study. *J Pediatr* 2014;164:1481–5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2014.01.059>.
- [2] Massimino M, Evans DB, Podda M, Spinelli C, Collini P, Pizzi N, et al. Thyroid cancer in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer* 2018;65:e27025. <https://doi.org/10.1002/pbc.27025>.
- [3] Souza Reis R, Gatta G, de Camargo B. Thyroid carcinoma in children, adolescents, and young adults in Brazil: A report from 11 population-based cancer registries. *PloS One* 2020;15:e0232416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232416>.
- [4] Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014;64:9–29. <https://doi.org/10.3322/caac.21208>.
- [5] Bauer AJ. Pediatric Thyroid Cancer: Genetics, Therapeutics and Outcome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2020;49:589–611. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2020.08.001>.
- [6] 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;33:27–63. <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>.
- [7] Tuttle RM, Ball DW, Byrd D, Dilawari RA, Doherty GM, Duh Q-Y, et al. Thyroid carcinoma. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN* 2010;8:1228–74. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2010.0093>.
- [8] Goldschmidt H. Dermatologic radiotherapy and thyroid cancer. *Arch Dermatol* 1977;113:362–4.
- [9] Cléro É, Doyon F, Chungue V, Rachédi F, Boissin J-L, Sebbag J, et al. Dietary Iodine and Thyroid Cancer Risk in French Polynesia: A Case–Control Study. *Thyroid* 2012;22:422–9. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0173>.
- [10] Paulson VA, Rudzinski ER, Hawkins DS. Thyroid Cancer in the Pediatric Population. *Genes* 2019;10:723. <https://doi.org/10.3390/genes10090723>.
- [11] Gianì F, Mastro R, Trovato MA, Malandrino P, Russo M, Pellegriti G, et al. Heavy Metals in the Environment and Thyroid Cancer. *Cancers* 2021;13:4052. <https://doi.org/10.3390/cancers13164052>.
- [12] Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:569–77. <https://doi.org/10.5858/2010-0664-RAIR.1>.
- [13] Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer* 2013;13:184–99. <https://doi.org/10.1038/nrc3431>.

- [14] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014;159:676–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>.
- [15] Liu T, Wang N, Cao J, Sofiadis A, Dinets A, Zedenius J, et al. The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene* 2014;33:4978–84. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.446>.
- [16] Cordioli MICV, Moraes L, Bastos AU, Besson P, Alves MT de S, Delcelo R, et al. Fusion Oncogenes Are the Main Genetic Events Found in Sporadic Papillary Thyroid Carcinomas from Children. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2017;27:182–8. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0387>.
- [17] Cordioli MICV, Moraes L, Carnevalheira G, Sisdelli L, Alves MTS, Delcelo R, et al. AGK-BRAF gene fusion is a recurrent event in sporadic pediatric thyroid carcinoma. *Cancer Med* 2016;5:1535–41. <https://doi.org/10.1002/cam4.698>.
- [18] Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* 2005;115:94–101. <https://doi.org/10.1172/JCI200523237>.
- [19] Sisdelli L, Cordioli MICV, Vaisman F, Moraes L, Colozza-Gama GA, Alves PAG, et al. AGK-BRAF is associated with distant metastasis and younger age in pediatric papillary thyroid carcinoma. *Pediatr Blood Cancer* 2019;66:e27707. <https://doi.org/10.1002/pbc.27707>.
- [20] Pasini B, Hofstra RM, Yin L, Bocciardi R, Santamaria G, Grootsholten PM, et al. The physical map of the human RET proto-oncogene. *Oncogene* 1995;11:1737–43.
- [21] Goodman KM, Kjær S, Beuron F, Knowles PP, Nawrotek A, Burns EM, et al. RET recognition of GDNF-GFR α 1 ligand by a composite binding site promotes membrane-proximal self-association. *Cell Rep* 2014;8:1894–904. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.040>.
- [22] Plaza-Menacho I. Structure and function of RET in multiple endocrine neoplasia type 2. *Endocr Relat Cancer* 2018;25:T79–90. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0354>.
- [23] Ibáñez CF. Structure and physiology of the RET receptor tyrosine kinase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a009134. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009134>.
- [24] De Falco V, Carlomagno F, Li H-Y, Santoro M. The molecular basis for RET tyrosine-kinase inhibitors in thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2017;31:307–18. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.04.013>.
- [25] Redaelli S, Plaza-Menacho I, Mologni L. Novel targeted therapeutics for MEN2. *Endocr Relat Cancer* 2018;25:T53–68. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0297>.
- [26] Cordioli MICV, Moraes L, Cury AN, Cerutti JM. Are we really at the dawn of understanding sporadic pediatric thyroid carcinoma? *Endocr Relat Cancer* 2015;22:R311–324. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0381>.

- [27] Yakushina VD, Lerner LV, Lavrov AV. Gene Fusions in Thyroid Cancer. *Thyroid* 2018;28:158–67. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0318>.
- [28] Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3947–52. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.8.8756>.
- [29] Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1016–23. <https://doi.org/10.1097/00000478-200208000-00006>.
- [30] Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, et al. Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:354–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021020>.
- [31] Chia WK, Sharifah NA, Reena RMZ, Zubaidah Z, Clarence-Ko CH, Rohaizak M, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis using PAX8- and PPARG-specific probes reveals the presence of PAX8-PPARG translocation and 3p25 aneusomy in follicular thyroid neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;196:7–13. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2009.08.001>.
- [32] Ohori NP, Wolfe J, Hodak SP, LeBeau SO, Yip L, Carty SE, et al. “Colloid-rich” follicular neoplasm/suspicious for follicular neoplasm thyroid fine-needle aspiration specimens: cytologic, histologic, and molecular basis for considering an alternate view. *Cancer Cytopathol* 2013;121:718–28. <https://doi.org/10.1002/cncy.21333>.
- [33] Swierniak M, Pfeifer A, Stokowy T, Rusinek D, Chekan M, Lange D, et al. Somatic mutation profiling of follicular thyroid cancer by next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol* 2016;433:130–7. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.007>.
- [34] Kim P, Jia P, Zhao Z. Kinase impact assessment in the landscape of fusion genes that retain kinase domains: a pan-cancer study. *Brief Bioinform* 2018;19:450–60. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw127>.
- [35] Santoro M, Moccia M, Federico G, Carlomagno F. RET Gene Fusions in Malignancies of the Thyroid and Other Tissues. *Genes* 2020;11:424. <https://doi.org/10.3390/genes11040424>.
- [36] Khan MS, Qadri Q, Makhdoomi MJ, Wani MA, Malik AA, Niyaz M, et al. RET/PTC Gene Rearrangements in Thyroid Carcinogenesis: Assessment and Clinico-Pathological Correlations. *Pathol Oncol Res POR* 2020;26:507–13. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0540-3>.
- [37] Gild ML, Bullock M, Robinson BG, Clifton-Bligh R. Multikinase inhibitors: a new option for the treatment of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:617–24. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.141>.

- [38] National Cancer Institute. What is Cancer? - NCI 2007. EUA, [2022?]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: jun. 2022.
- [39] Bergers G, Fendt S-M. The metabolism of cancer cells during metastasis. *Nat Rev Cancer* 2021;21:162–80. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2>.
- [40] Wishart DS. Is Cancer a Genetic Disease or a Metabolic Disease? *EBioMedicine* 2015;2:478–9. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.05.022>.
- [41] Bauer AJ. Molecular Genetics of Thyroid Cancer in Children and Adolescents. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017;46:389–403. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2017.01.014>.
- [42] Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, Angelos P, Benvenga S, Cerutti JM, et al. Management Guidelines for Children with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2015;25:716–59. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0460>.
- [43] Neiva F, Mesquita J, Paco Lima S, Matos MJ, Costa C, Castro-Correia C, et al. Thyroid carcinoma in children and adolescents: A retrospective review. *Endocrinol Nutr* 2012;59:105–8. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2011.11.003>.
- [44] Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest* 2016;126:1052–66. <https://doi.org/10.1172/JCI85271>.
- [45] Davies L, Morris LGT, Haymart M, Chen AY, Goldenberg D, Morris J, et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: The Increasing Incidence Of Thyroid Cancer. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* 2015;21:686–96. <https://doi.org/10.4158/EP14466.DSCR>.
- [46] Fagin JA, Wells SA. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med* 2016;375:1054–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1501993>.
- [47] SEER*Explorer Application n.d. https://seer.cancer.gov/statistics-network/explorer/application.html?site=1&data_type=1&graph_type=2&compareBy=sex&chk_sex_3=3&chk_sex_2=2&rate_type=2&race=1&age_range=1&hdn_stage=101&advopt_precision=1&advopt_show_ci=on&advopt_display=2 (accessed May 22, 2022).
- [48] Dermody S, Walls A, Harley EH. Pediatric thyroid cancer: An update from the SEER database 2007-2012. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2016;89:121–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2016.08.005>.
- [49] Bernier M-O, Withrow DR, Berrington de Gonzalez A, Lam CJK, Linet MS, Kitahara CM, et al. Trends in pediatric thyroid cancer incidence in the United States, 1998-2013. *Cancer* 2019;125:2497–505. <https://doi.org/10.1002/cncr.32125>.
- [50] Qian ZJ, Jin MC, Meister KD, Megwalu UC. Pediatric Thyroid Cancer Incidence and Mortality Trends in the United States, 1973-2013. *JAMA Otolaryngol-- Head Neck Surg* 2019;145:617–23. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2019.0898>.

- [51] Chernock RD, Rivera B, Borrelli N, Hill DA, Fahiminiya S, Shah T, et al. Poorly differentiated thyroid carcinoma of childhood and adolescence: A distinct entity characterized by DICER1 mutations. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2020;33:1264–74. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-0458-7>.
- [52] Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis - *The Lancet Diabetes & Endocrinology* n.d. [https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587\(20\)30115-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587(20)30115-7/fulltext) (accessed January 25, 2022).
- [53] Morris LGT, Sikora AG, Tosteson TD, Davies L. The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2013;23:885–91. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0045>.
- [54] Ahn HS, Kim HJ, Welch HG. Korea’s thyroid-cancer “epidemic”--screening and overdiagnosis. *N Engl J Med* 2014;371:1765–7. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1409841>.
- [55] Brito JP, Davies L. Is there really an increased incidence of thyroid cancer? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2014;21:405–8. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000094>.
- [56] 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. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.
- [57] Davies L, Welch HG. Current Thyroid Cancer Trends in the United States. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* 2014;140:317–22. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2014.1>.
- [58] Lerner J, Goldfarb M. Pediatric Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2015;22:4187–92. <https://doi.org/10.1245/s10434-015-4546-8>.
- [59] Hogan AR, Zhuge Y, Perez EA, Koniaris LG, Lew JI, Sola JE. Pediatric thyroid carcinoma: incidence and outcomes in 1753 patients. *J Surg Res* 2009;156:167–72. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2009.03.098>.
- [60] Kwon H, Han K-D, Park C-Y. Weight change is significantly associated with risk of thyroid cancer: A nationwide population-based cohort study. *Sci Rep* 2019;9:1546. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38203-0>.
- [61] Weeks KS, Kahl AR, Lynch CF, Charlton ME. Racial/Ethnic Differences in Thyroid Cancer Incidence in the United States, 2007-2014. *Cancer* 2018;124:1483–91. <https://doi.org/10.1002/cncr.31229>.
- [62] International Agency for Research on Cancer. CI5 Cancer incidence in five continents. Lyon, France. [2022?]. Disponível em: <https://ci5.iarc.fr/Default.aspx>. Acesso em: maio 2022.
- [63] Balmant NV, de Souza Reis R, de Oliveira Santos M, de Camargo B, Gatta G. Rare cancers in childhood and adolescence in Brazil: First report of data from 19 population-based cancer registries. *Cancer* 2019;125:2638–46. <https://doi.org/10.1002/cncr.32121>.

- [64] Vejbjerg P, Knudsen N, Perrild H, Carlé A, Laurberg P, Pedersen IB, et al. Effect of a mandatory iodization program on thyroid gland volume based on individuals' age, gender, and preceding severity of dietary iodine deficiency: a prospective, population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1397–401. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2580>.
- [65] Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:1612–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2390>.
- [66] World Health Organization, Aburto NJ, Abudou M, Candeias V, Wu T. Effect and safety of salt iodization to prevent iodine deficiency disorders: a systematic review with meta-analyses. World Health Organization; 2014.
- [67] Rose J, Wertheim BC, Guerrero MA. Radiation treatment of patients with primary pediatric malignancies: risk of developing thyroid cancer as a secondary malignancy. *Am J Surg* 2012;204:881–6; discussion 886-887. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2012.07.030>.
- [68] Turcotte LM, Liu Q, Yasui Y, Arnold MA, Hammond S, Howell RM, et al. Temporal Trends in Treatment and Subsequent Neoplasm Risk Among 5-Year Survivors of Childhood Cancer, 1970-2015. *JAMA* 2017;317:814–24. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.0693>.
- [69] Ron E, Lubin JH, Shore RE, Mabuchi K, Modan B, Pottern LM, et al. Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* 1995;141:259–77.
- [70] Sadetzki S, Chetrit A, Lubina A, Stovall M, Novikov I. Risk of thyroid cancer after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4798–804. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0743>.
- [71] Sigurdson AJ, Ronckers CM, Mertens AC, Stovall M, Smith SA, Liu Y, et al. Primary thyroid cancer after a first tumour in childhood (the Childhood Cancer Survivor Study): a nested case-control study. *Lancet Lond Engl* 2005;365:2014–23. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66695-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66695-0).
- [72] Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999;18:4388–93. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202824>.
- [73] Demidchik YE, Saenko VA, Yamashita S. Childhood thyroid cancer in Belarus, Russia, and Ukraine after Chernobyl and at present. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:748–62. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302007000500012>.
- [74] Williams D. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene* 2008;27 Suppl 2:S9-18. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.349>.
- [75] Ishikawa T. Radiation Doses and Associated Risk From the Fukushima Nuclear Accident. *Asia Pac J Public Health* 2017;29:18S-28S. <https://doi.org/10.1177/1010539516675703>.

- [76] Yasumura S, Hosoya M, Yamashita S, Kamiya K, Abe M, Akashi M, et al. Study protocol for the Fukushima Health Management Survey. *J Epidemiol* 2012;22:375–83. <https://doi.org/10.2188/jea.je20120105>.
- [77] Yamashita S, Takamura N. Post-crisis efforts towards recovery and resilience after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident. *Jpn J Clin Oncol* 2015;45:700–7. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyv076>.
- [78] Nagataki S, Takamura N, Kamiya K, Akashi M. Measurements of individual radiation doses in residents living around the Fukushima Nuclear Power Plant. *Radiat Res* 2013;180:439–47. <https://doi.org/10.1667/RR13351.1>.
- [79] Cardis E, Kesminiene A, Ivanov V, Malakhova I, Shibata Y, Khrouch V, et al. Risk of thyroid cancer after exposure to ¹³¹I in childhood. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:724–32. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji129>.
- [80] Mitsutake N, Fukushima T, Matsuse M, Rogounovitch T, Saenko V, Uchino S, et al. BRAF(V600E) mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Sci Rep* 2015;5:16976. <https://doi.org/10.1038/srep16976>.
- [81] Krishna M, Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3525–44. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8170-7>.
- [82] Zaballos MA, Santisteban P. Key signaling pathways in thyroid cancer. *J Endocrinol* 2017;235:R43–61. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0266>.
- [83] Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol* 2007;213:589–602. <https://doi.org/10.1002/jcp.21246>.
- [84] Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993;268:14553–6.
- [85] Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007;26:3279–90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>.
- [86] Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>.
- [87] Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 2010;40:310–22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.026>.
- [88] Rah C-S, Kim WW, Lee Y-M, Kim WG, Song DE, Chung K-W, et al. Recent Trends in the Clinicopathological Features of Thyroid Nodules in Pediatric Patients: A Single Tertiary Center Experience over 25 Years. *Int J Endocrinol* 2019;2019:1829043. <https://doi.org/10.1155/2019/1829043>.
- [89] Mussa A, De Andrea M, Motta M, Mormile A, Palestini N, Corrias A. Predictors of Malignancy in Children with Thyroid Nodules. *J Pediatr* 2015;167:886–892.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.06.026>.

- [90] Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA* 2018;319:914–24. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.0898>.
- [91] Welch Dinauer CA, Tuttle RM, Robie DK, McClellan DR, Svec RL, Adair C, et al. Clinical features associated with metastasis and recurrence of differentiated thyroid cancer in children, adolescents and young adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:619–28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.1998.00584.x>.
- [92] Samuel AM, Sharma SM. Differentiated thyroid carcinomas in children and adolescents. *Cancer* 1991;67:2186–90. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910415\)67:8<2186::aid-cnrcr2820670830>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910415)67:8<2186::aid-cnrcr2820670830>3.0.co;2-0).
- [93] Wada N, Sugino K, Mimura T, Nagahama M, Kitagawa W, Shibuya H, et al. Pediatric differentiated thyroid carcinoma in stage I: risk factor analysis for disease free survival. *BMC Cancer* 2009;9:306. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-306>.
- [94] Savio R, Gosnell J, Palazzo FF, Sywak M, Agarwal G, Cowell C, et al. The role of a more extensive surgical approach in the initial multimodality management of papillary thyroid cancer in children. *J Pediatr Surg* 2005;40:1696–700. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2005.07.029>.
- [95] Pekova B, Dvorakova S, Sykorova V, Vacinova G, Vaclavikova E, Moravcova J, et al. Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocr Connect* 2019;8:796–805. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0069>.
- [96] Grigsby PW, Gal-or A, Michalski JM, Doherty GM. Childhood and adolescent thyroid carcinoma. *Cancer* 2002;95:724–9. <https://doi.org/10.1002/cncr.10725>.
- [97] Giuffrida D, Scollo C, Pellegriti G, Lavenia G, Iurato MP, Pezzin V, et al. Differentiated thyroid cancer in children and adolescents. *J Endocrinol Invest* 2002;25:18–24. <https://doi.org/10.1007/BF03343956>.
- [98] Demidchik YE, Demidchik EP, Reiners C, Biko J, Mine M, Saenko VA, et al. Comprehensive Clinical Assessment of 740 Cases of Surgically Treated Thyroid Cancer in Children of Belarus. *Ann Surg* 2006;243:525–32. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000205977.74806.0b>.
- [99] Malandrino P, Russo M, Regalbuto C, Pellegriti G, Moleti M, Caff A, et al. Outcome of the Diffuse Sclerosing Variant of Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2016;26:1285–92. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0168>.
- [100] Machado GJR, Ramos HE. Carcinoma papilífero de tireoide pediátrico associado à fusão gênica RET-PTC6: relato de caso. *Rev Ciênc Médicas E Biológicas* 2021;20:472–5. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v20i3.47096>.
- [101] Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell* 1985;42:581–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90115-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90115-1).
- [102] Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Sugimura T, Tucker J, et al. Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 1989;4:1519–21.

- [103] Sarika H-L, Papathoma A, Garofalaki M, Saltiki K, Pappa T, Pazaitou-Panayiotou K, et al. Genetic screening of patients with medullary thyroid cancer in a referral center in Greece during the past two decades. *Eur J Endocrinol* 2015;172:501–9. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0817>.
- [104] Simpson NE, Kidd KK, Goodfellow PJ, McDermid H, Myers S, Kidd JR, et al. Assignment of multiple endocrine neoplasia type 2A to chromosome 10 by linkage. *Nature* 1987;328:528–30. <https://doi.org/10.1038/328528a0>.
- [105] Takahashi M, Buma Y, Hiai H. Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an amino-terminal signal sequence. *Oncogene* 1989;4:805–6.
- [106] Montor WR, Salas AROSE, Melo FHM de. Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Mol Cancer* 2018;17:55. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0792-2>.
- [107] Sugaya R, Ishimaru S, Hosoya T, Saigo K, Emori Y. A Drosophila homolog of human proto-oncogene ret transiently expressed in embryonic neuronal precursor cells including neuroblasts and CNS cells. *Mech Dev* 1994;45:139–45. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0925-4773(94)90027-2).
- [108] Ozolek JA. Selected Topics in the Pathology of the Thyroid and Parathyroid Glands in Children and Adolescents. *Head Neck Pathol* 2021;15:85–106. <https://doi.org/10.1007/s12105-020-01274-5>.
- [109] Brooks AS, Oostra BA, Hofstra RMW. Studying the genetics of Hirschsprung’s disease: unraveling an oligogenic disorder. *Clin Genet* 2005;67:6–14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00319.x>.
- [110] Jain S. The many faces of RET dysfunction in kidney. *Organogenesis* 2009;5:177–90. <https://doi.org/10.4161/org.5.4.10048>.
- [111] Drilon A, Hu ZI, Lai GGY, Tan DSW. Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving preclinical and clinical landscapes. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15:151–67. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.175>.
- [112] Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, et al. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557–63. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90659-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90659-3).
- [113] Subbiah V, Yang D, Velcheti V, Drilon A, Meric-Bernstam F. State-of-the-Art Strategies for Targeting RET-Dependent Cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2020;38:1209–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.02551>.
- [114] Prescott JD, Zeiger MA. The RET oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Cancer* 2015;121:2137–46. <https://doi.org/10.1002/cncr.29044>.
- [115] Tahira T, Ishizaka Y, Itoh F, Sugimura T, Nagao M. Characterization of ret proto-oncogene mRNAs encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 1990;5:97–102.

- [116] Myers SM, Eng C, Ponder BA, Mulligan LM. Characterization of RET proto-oncogene 3' splicing variants and polyadenylation sites: a novel C-terminus for RET. *Oncogene* 1995;11:2039–45.
- [117] Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 1999;13:313–25. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0754>.
- [118] Romei C, Elisei R. RET/PTC Translocations and Clinico-Pathological Features in Human Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol* 2012;3:54. <https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00054>.
- [119] Hayashi H, Ichihara M, Iwashita T, Murakami H, Shimono Y, Kawai K, et al. Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* 2000;19:4469–75. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203799>.
- [120] Besset V, Scott RP, Ibáñez CF. Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2000;275:39159–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006908200>.
- [121] Groot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev* 2006;27:535–60. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0017>.
- [122] Margraf RL, Crockett DK, Krautscheid PMF, Seamons R, Calderon FRO, Wittwer CT, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. *Hum Mutat* 2009;30:548–56. <https://doi.org/10.1002/humu.20928>.
- [123] Santoro M, Carlomagno F. Central Role of RET in Thyroid Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:a009233. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009233>.
- [124] Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, et al. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 1994;9:509–16.
- [125] L. Nussbaum R, R. McInnes R, F. Willard H. Princípios da Citogenética Médica. Thompson Thompson — Genética Médica. 7th ed., n.d., p. 140–93.
- [126] Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:569–80. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.142>.
- [127] Takaya K, Yoshimasa T, Arai H, Tamura N, Miyamoto Y, Itoh H, et al. Expression of the RET proto-oncogene in normal human tissues, pheochromocytomas, and other tumors of neural crest origin. *J Mol Med Berl Ger* 1996;74:617–21. <https://doi.org/10.1007/s001090050065>.
- [128] Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, et al. Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-

- Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4272–9. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031870>.
- [129] Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC Rearrangements in Thyroid Papillary Carcinomas: Effects of the Detection Methods and Genetic Heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3603–10. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1006>.
- [130] Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2021;17:296–306. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00470-9>.
- [131] Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A, Vorontsova TV, Mondellini P, Bongarzone I, et al. Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* 1995;55:5617–20.
- [132] Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 1995;11:2459–67.
- [133] Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, et al. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2006–9. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.5.8626874>.
- [134] Williams GH, Rooney S, Thomas GA, Cummins G, Williams ED. RET activation in adult and childhood papillary thyroid carcinoma using a reverse transcriptase-n-polymerase chain reaction approach on archival-nested material. *Br J Cancer* 1996;74:585–9. <https://doi.org/10.1038/bjc.1996.405>.
- [135] Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 1997;57:1690–4.
- [136] Motomura T, Nikiforov YE, Namba H, Ashizawa K, Nagataki S, Yamashita S, et al. ret rearrangements in Japanese pediatric and adult papillary thyroid cancers. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 1998;8:485–9. <https://doi.org/10.1089/thy.1998.8.485>.
- [137] Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, et al. High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4232–8. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.11.6129>.
- [138] Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1170–5. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6472>.
- [139] Santoro M, Thomas GA, Vecchio G, Williams GH, Fusco A, Chiappetta G, et al. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers. *Br J Cancer* 2000;82:315–22. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0921>.

- [140] Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of Radiation-induced RET and NTRK1 Rearrangements in 191 Post-Chernobyl Papillary Thyroid Carcinomas: Biological, Phenotypic, and Clinical Implications. *Clin Cancer Res* 2000;6:1093–103.
- [141] Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3211–6. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.7.7678>.
- [142] Penko K, Livezey J, Fenton C, Patel A, Nicholson D, Flora M, et al. BRAF mutations are uncommon in papillary thyroid cancer of young patients. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2005;15:320–5. <https://doi.org/10.1089/thy.2005.15.320>.
- [143] Ballester LY, Sarabia SF, Sayeed H, Patel N, Baalwa J, Athanassaki I, et al. Integrating Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Children with Thyroid Lesions. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc* 2016;19:94–100. <https://doi.org/10.2350/15-05-1638-OA.1>.
- [144] Picarsic JL, Buryk MA, Ozolek J, Ranganathan S, Monaco SE, Simons JP, et al. Molecular Characterization of Sporadic Pediatric Thyroid Carcinoma with the DNA/RNA ThyroSeq v2 Next-Generation Sequencing Assay. *Pediatr Dev Pathol Off J Soc Pediatr Pathol Paediatr Pathol Soc* 2016;19:115–22. <https://doi.org/10.2350/15-07-1667-OA.1>.
- [145] Prasad ML, Vyas M, Horne MJ, Virk RK, Morotti R, Liu Z, et al. NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer* 2016;122:1097–107. <https://doi.org/10.1002/cncr.29887>.
- [146] Nikita ME, Jiang W, Cheng S-M, Hantash FM, McPhaul MJ, Newbury RO, et al. Mutational Analysis in Pediatric Thyroid Cancer and Correlations with Age, Ethnicity, and Clinical Presentation. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2016;26:227–34. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0401>.
- [147] Gertz RJ, Nikiforov Y, Rehrauer W, McDaniel L, Lloyd RV. Mutation in BRAF and Other Members of the MAPK Pathway in Papillary Thyroid Carcinoma in the Pediatric Population. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140:134–9. <https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0612-OA>.
- [148] Vanden Borre P, Schrock AB, Anderson PM, Morris JC, Heilmann AM, Holmes O, et al. Pediatric, Adolescent, and Young Adult Thyroid Carcinoma Harbors Frequent and Diverse Targetable Genomic Alterations, Including Kinase Fusions. *The Oncologist* 2017;22:255–63. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0279>.
- [149] Mostoufi-Moab S, Labourier E, Sullivan L, LiVolsi V, Li Y, Xiao R, et al. Molecular Testing for Oncogenic Gene Alterations in Pediatric Thyroid Lesions. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2018;28:60–7. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0059>.
- [150] Wasserman JD, Sabbaghian N, Fahiminiya S, Chami R, Mete O, Acker M, et al. DICER1 Mutations Are Frequent in Adolescent-Onset Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:2009–15. <https://doi.org/10.1210/jc.2017-02698>.

- [151] Pekova B, Sykorova V, Dvorakova S, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, et al. RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2020;30:1771–80. <https://doi.org/10.1089/thy.2019.0802>.
- [152] Bae J-S, Jung S-H, Hirokawa M, Bychkov A, Miyauchi A, Lee S, et al. High Prevalence of DICER1 Mutations and Low Frequency of Gene Fusions in Pediatric Follicular-Patterned Tumors of the Thyroid. *Endocr Pathol* 2021;32:336–46. <https://doi.org/10.1007/s12022-021-09688-9>.
- [153] Machac J. Thyroid Cancer in Pediatrics. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2016;45:359–404. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2016.02.002>.
- [154] Yang S-R, Aypar U, Rosen EY, Mata DA, Benayed R, Mullaney K, et al. A Performance Comparison of Commonly Used Assays to Detect RET Fusions. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2021;27:1316–28. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3208>.
- [155] Sasaki H, Shimizu S, Tani Y, Maekawa M, Okuda K, Yokota K, et al. RET expression and detection of KIF5B/RET gene rearrangements in Japanese lung cancer. *Cancer Med* 2012;1:68–75. <https://doi.org/10.1002/cam4.13>.
- [156] Go H, Jung YJ, Kang HW, Park I-K, Kang C-H, Lee JW, et al. Diagnostic method for the detection of KIF5B-RET transformation in lung adenocarcinoma. *Lung Cancer Amst Neth* 2013;82:44–50. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.07.009>.
- [157] Liehr T, editor. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-52959-1>.
- [158] Das K, Tan P. Molecular cytogenetics: recent developments and applications in cancer. *Clin Genet* 2013;84:315–25. <https://doi.org/10.1111/cge.12229>.
- [159] Speicher MR, Carter NP. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat Rev Genet* 2005;6:782–92. <https://doi.org/10.1038/nrg1692>.
- [160] Bermingham N, Luettich K. Polymerase chain reaction and its applications. *Curr Diagn Pathol* 2003;9:159–64. [https://doi.org/10.1016/S0968-6053\(02\)00102-3](https://doi.org/10.1016/S0968-6053(02)00102-3).
- [161] Takeuchi K, Choi YL, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2008;14:6618–24. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1018>.
- [162] MERCK. Aplicaciones de la reacción en cadena la polimerasa (PCR). Darmstadt, Alemania. [2022] Disponible em: <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/applications/genomics/pcr>. Acesso em: jan. 2023.
- [163] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11:31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>.

- [164] Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev* 2011;32:177–95.
- [165] Wong D, Yip S, Sorensen PH. Methods for Identifying Patients with Tropomyosin Receptor Kinase (TRK) Fusion Cancer. *Pathol Oncol Res POR* 2020;26:1385–99. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00685-2>.
- [166] 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. <https://doi.org/10.1111/cas.13837>.
- [167] Teixidó C, Giménez-Capitán A, Molina-Vila MÁ, Peg V, Karachaliou N, Rodríguez-Capote A, et al. RNA Analysis as a Tool to Determine Clinically Relevant Gene Fusions and Splice Variants. *Arch Pathol Lab Med* 2018;142:474–9. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0134-RA>.
- [168] Schröder J, Kumar A, Wong SQ. Overview of Fusion Detection Strategies Using Next-Generation Sequencing. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2019;1908:125–38. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9004-7_9.
- [169] HAM. Hosp Aristides Maltez n.d. <https://www.aristidesmaltez.org.br/ham/> (accessed July 24, 2022).
- [170] it - Instituto Integrado Endocrinologia e Cirurgia n.d. <https://it-instituto-integrado-endocrinologia-e-cirurgia.negocio.site> (accessed July 24, 2022).
- [171] Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana - O Hospital. St Casa Miseric Feira Santana n.d. <http://www.santacasafsa.org.br/a-instituicao.php> (accessed July 24, 2022).
- [172] Hospital Universitário Lauro Wanderley. Plano Diretor Estratégico 2022-2023. João Pessoa: Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares; 2022.
- [173] Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer International Publishing; 2017.
- [174] 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 JMD* 2017;19:4–23. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.10.002>.
- [175] 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 JMD* 2017;19:341–65. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>.
- [176] 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 JMD* 2018;20:4–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003>.

- [177] AK E-N, JKC C, JR G, T T, PJ S. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. World Health Organization; 2017.
- [178] Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007;28:742–62. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0007>.
- [179] Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2008;15:191–205. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0212>.
- [180] Rangel-Pozzo A, Sisdelli L, Cordioli MIV, 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;12:3146. <https://doi.org/10.3390/cancers12113146>.
- [181] Galuppini F, Vianello F, Censi S, Barollo S, Bertazza L, Carducci S, et al. Differentiated Thyroid Carcinoma in Pediatric Age: Genetic and Clinical Scenario. *Front Endocrinol* 2019;10:552. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00552>.
- [182] Alzahrani AS, Alkhafaji D, Tuli M, Al-Hindi H, Sadiq BB. Comparison of differentiated thyroid cancer in children and adolescents (≤ 20 years) with young adults. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016;84:571–7. <https://doi.org/10.1111/cen.12845>.
- [183] Agac Ay A, Kutun S, Cetin A. Are the characteristics of thyroid cancer different in young patients? *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM* 2014;27:497–502. <https://doi.org/10.1515/jpem-2013-0192>.
- [184] Kiratli PO, Volkan-Salanci B, Günay EC, Varan A, Akyüz C, Büyükpamukçu M. Thyroid cancer in pediatric age group: an institutional experience and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol* 2013;35:93–7. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e3182755d9e>.
- [185] Wang J-T, Huang R, Kuang A-R. Comparison of presentation and clinical outcome between children and young adults with differentiated thyroid cancer. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 2014;15:7271–5. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.17.7271>.
- [186] Park S, Jeong JS, Ryu HR, Lee C-R, Park JH, Kang S-W, et al. Differentiated thyroid carcinoma of children and adolescents: 27-year experience in the yonsei university health system. *J Korean Med Sci* 2013;28:693–9. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.5.693>.
- [187] Marshall CJ, Vousden K, Ozanne B. The involvement of activated ras genes in determining the transformed phenotype. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1985;226:99–106. <https://doi.org/10.1098/rspb.1985.0084>.
- [188] 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;94:4735–41. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1233>.
- [189] Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS mutations in thyroid cancer. *The Oncologist* 2013;18:926–32. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0072>.

- [190] 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;24:1275–81. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0053>.
- [191] Alzahrani AS, Murugan AK, Qasem E, Alswailem M, Al-Hindi H, Shi Y. Single Point Mutations in Pediatric Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2017;27:189–96. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0339>.
- [192] Nikiforov YE, Nikiforova MN, Gnepp DR, Fagin JA. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene* 1996;13:687–93.
- [193] 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:e0231341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231341>.
- [194] Iwadate M, Mitsutake N, Matsuse M, Fukushima T, Suzuki S, Matsumoto Y, et al. The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer With BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima. *J Clin Endocrinol Metab* 2020;105:dga573. <https://doi.org/10.1210/clinem/dga573>.
- [195] Rosenbaum E, Hosler G, Zahurak M, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. Mutational activation of BRAF is not a major event in sporadic childhood papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2005;18:898–902. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800252>.
- [196] Oishi N, Kondo T, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, Kasai K, et al. Frequent BRAF V600E and Absence of TERT Promoter Mutations Characterize Sporadic Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas in Japan. *Endocr Pathol* 2017;28:103–11. <https://doi.org/10.1007/s12022-017-9470-y>.
- [197] Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2010;20:697–706. <https://doi.org/10.1089/thy.2010.1646>.
- [198] 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* 2009;124:2744–9. <https://doi.org/10.1002/ijc.24250>.
- [199] Rajkumar S, Berry D, Heney KA, Strong C, Ramsay L, Lajoie M, et al. Melanomas with concurrent BRAF non-p.V600 and NF1 loss-of-function mutations are targetable by BRAF/MEK inhibitor combination therapy. *Cell Rep* 2022;39:110634. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110634>.
- [200] Kim DW, Nowroozi S, Kim K, Davies MA, Routbort M, Lazar AJF, et al. Clinical characteristics of patients with non-V600 BRAF mutant melanomas. *J Clin Oncol* 2014;32:9100–9100. https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9100.
- [201] Zheng G, Tseng L-H, Chen G, Haley L, Illei P, Gocke CD, et al. Clinical detection and categorization of uncommon and concomitant mutations involving BRAF. *BMC Cancer* 2015;15:779. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1811-y>.

- [202] Efanov AA, Brenner AV, Bogdanova TI, Kelly LM, Liu P, Little MP, et al. Investigation of the Relationship Between Radiation Dose and Gene Mutations and Fusions in Post-Chernobyl Thyroid Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2018;110:371–8. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx209>.
- [203] Iyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Saenko V, Suzuki K, et al. Identification of Three Novel Fusion Oncogenes, SQSTM1/NTRK3, AFAP1L2/RET, and PPFIBP2/RET, in Thyroid Cancers of Young Patients in Fukushima. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2017;27:811–8. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0673>.
- [204] Kelly LM, Barila G, Liu P, Evdokimova VN, Trivedi S, Panebianco F, et al. Identification of the transforming STRN-ALK fusion as a potential therapeutic target in the aggressive forms of thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:4233–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321937111>.
- [205] Bastos AU, de Jesus AC, Cerutti JM. ETV6-NTRK3 and STRN-ALK kinase fusions are recurrent events in papillary thyroid cancer of adult population. *Eur J Endocrinol* 2018;178:83–91. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0499>.
- [206] Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Höög A, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4440–5. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021690>.
- [207] Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:907–22. <https://doi.org/10.5858/134.6.907>.

ANEXO A – Protocolo de Revisão de Lâminas de Carcinoma de Tireoide

**CARCINOMA DE TIREOIDE
PROTOCOLO DE REVISÃO DE LÂMINAS**

Nome do paciente:
DATA NASCIMENTO (idade do paciente):

No do prontuário:
Data da Cirurgia:

- 01. **Número do anamopatológico:**.....|_|_|_|_|_|_|_|
- 02. **Multifocalidade:** (0) Não (2) Ipsilateral (3) Bilateral |_|
- 03. **TU 2°(cm) /Local:** |_|_|_|_| **TU 3°(cm) /Local:** |_|_|_|_| **TU 4°(cm) /Local:** |_|_|_|_|
- 04. **TU 5°(cm) /Local:** |_|_|_|_| **TU 5°(cm) /Local:** |_|_|_|_| **TU 6°(cm) /Local:** |_|_|_|_|
- 05. **TH:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminada (999) Não se aplica |_|

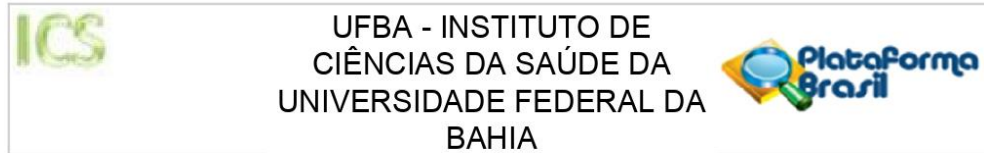
Aspectos do maior tumor:

- 06. **Tamanho(cm)/Local:**..... |_|_|_|_|
- 07. **Microrcarcinoma:** (1) SIM..... |_|
- 08. **Tipo histológico:** (1) Ca. Papilífero (2) Ca. Folicular (3) Ca. de células de Hurthle (4) Ca. Medular (5) Ca. Anaplásico (6) Outros (especificar)..... |_|
- 09. **Se Ca. papilífero, subclassificação:** (1) Clássica (2) NIFTP (3) Folicular encapsulado invasivo (4) variante folicular infiltrativo (5) Células dadas (6) Células colunares (7) Cribiforme morular (8) Esclerose difusante (9) Macrofolicular (10) Oncítica (11) *Sólida* (12) Células altas (13) Warthin-like..... |_|
- 10. **Margens:** (0) Livres (2) Comprometidas (999) Não se aplica |_|
- 11. **Cápsula:** (0) Ausente (2) Totalmente capsulado (3) Parcialmente capsulado (999) Não se aplica |_|
- 12. **Invasão capsular:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminada (999) Não se aplica |_|
- 13. **Se invasão capsular presente:** (1) Mínima (2) Amplamente invasiva (999) Não se aplica..... |_|
- 14. **Invasão angiolinfática:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminada (999) Não se aplica |_|
- 15. **Se invasão angiolinfática presente, extensão:** (1) Focal (menos de 4 vasos) (2) Extensa (4 vasos ou mais) (999) Não se aplica |_|
- 16. **Invasão vascular:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminado (999) Não se aplica |_|
- 17. **Invasão linfática:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminado (999) Não se aplica |_|
- 18. **Invasão perineural:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminado (999) Não se aplica |_|
- 19. **Extensão extra-tireoidiana:** (0) Ausente (1) Presente (2) Indeterminado (999) Não se aplica |_|
- 20. **Se extensão extratireoidiana presente:** (1) Mínima (2) Extensa (999) Não se aplica |_|
- 21. **Estadiamento T:** (1) T0 (2) T1a (3) T1b (4) T2 (5) T3 (6) T4a (7) T4b (999) Tx |_|
- 22. **Estadiamento N:** (1) N0 (2) N1a (3) N1b (999) Nx..... |_|
- 23. **Número de linfonodos examinados:** |_|
- 24. **Número de linfonodos envolvidos:** |_|

Linfonodos	Tamanho (cm)	EEN (+/-)
N1		
N2		
N3		
N4		
N5		

Observações relevantes:

ANEXO B – Parecer Consubstanciado do CEP



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

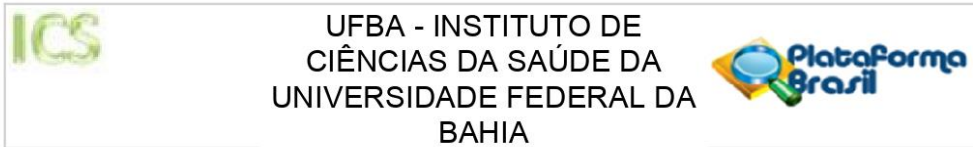
Número do Parecer: 5.470.375

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	CEP: 40.110-902
Bairro: Vale do Canela	
UF: BA	Município: SALVADOR
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-UFPB) 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:

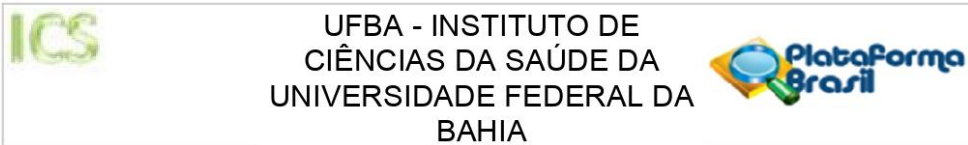
Riscos:

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

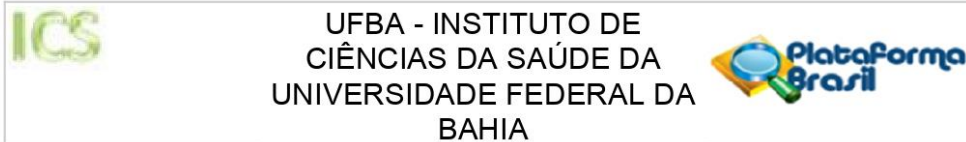
2. Inserção do Hospital Universitário Lauro Wanderley (HULW-UFPB) e Instituto Integrado como instituições coparticipantes, no tópico “Desenho do estudo e população estudada”;

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



Continuação do Parecer: 5.470.375

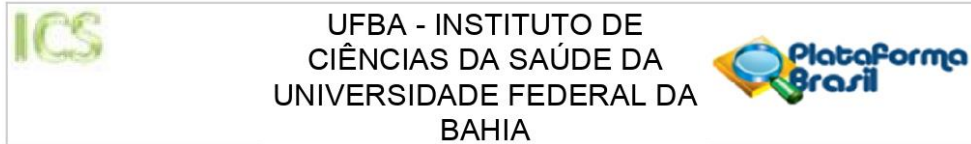
Ressalta-se que, conforme institui a referida resolução, é necessário enviar a este CEP os relatórios semestrais pertinentes ao projeto, bem como o relatório final tão logo a pesquisa seja concluída.

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_dispenza_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	Termodeanencialstituicao.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
Telefone: (71)3283-8951 **CEP:** 40.110-902
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>