

Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES COMO
POTENCIAIS PREDITORES DE MALIGNIDADE EM
TUMORES EPITELIAIS DA TIREOIDE

Silvia Antonia Sá Gaspar

São Luís
2021

SILVIA ANTONIA SÁ GASPAR

**ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES
COMO POTENCIAIS PREDITORES DE
MALIGNIDADE EM TUMORES EPITELIAIS DA
TIREOIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Linha de Pesquisa: Alterações Endócrinas

Orientador: Profº. Dr. Marcelo Magalhães Silva

Co-orientador: Profº. Dr. Manuel dos Santos Faria

Coordenador: Prof.^a. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Sá Gaspar, Silvia Antonia.

ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES COMO POTENCIAIS
PREDITORES DE MALIGNIDADE EM TUMORES EPITELIAIS DA
TIREOIDE / Silvia Antonia Sá Gaspar. - 2021.
80 p.

Coorientador(a): Manuel dos Santos Faria.

Orientador(a): Marcelo Magalhaes Silva.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luis, 2021.

1. BRAF. 2. Cancer de Tireoide. 3. Carcinoma
Papilífero. 4. TERT. I. Faria, Manuel dos Santos. II.
Silva, Marcelo Magalhaes. III. Título.

ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES COMO POTENCIAIS PREDITORES DE MALIGNIDADE EM TUMORES EPITELIAIS DA TIREOIDE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 21/06/2021

Prof. Dr. Marcelo Magalhães Silva (Orientador)
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão – HUUFMA

Prof. Dr. Gilvan Cortês Nascimento (Examinador)
Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão- HUUFMA

Prof.^a. Dr.^a. Raimunda Ribeiro da Silva (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof.^a. Dr.^a. Haissa Oliveira Brito (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof.^a. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico

Aos meus pais Raimundo e Lourdes Gaspar;

Aos meus irmãos Aparecida, Junior e Meire

Aos meus sobrinhos Daniel, Gabriel, Miguel e Samuel

Ao meu namorado Diones por todo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Quero iniciar recitando um texto das sagradas escrituras que diz: “Grandes coisas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres.” Salmos 126: 3

Gostaria de agradecer a Deus por estar sempre ao meu lado, me conduzindo em todos os momentos, colocando as melhores pessoas no meu caminho, e me fazendo acreditar cada vez mais que podemos construir um mundo melhor.

Aos meus pais Maria de Lourdes e Raimundo Gaspar, por todo incentivo e carinho demonstrados a mim.

Aos meus irmãos, Aparecida, Júnior e Meire, por me ajudarem e incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus amados sobrinhos Gabriel, Daniel, Samuel e Miguel pela compreensão e paciência.

Aos meus tios, Teresa, Amelia e Guilherme, que sempre me encorajaram a permanecer focada na minha caminhada.

Ao meu namorado Diones pelo apoio e incentivo.

Aos meus familiares que se fizeram presente ao longo dessa caminhada, obrigada pela confiança.

À Rita de Nazaré uma amiga que o mestrado me deu. Obrigada por estar comigo em todos os momentos sempre me apoiando e incentivando.

Meus sinceros agradecimentos a Universidade Federal Maranhão – UFMA e ao Programa de Pós-Graduação Saúde do Adulto -PPGSAD pela oportunidade do Mestrado, e aos professores e demais funcionários pela construção do que sou, pois fazem parte da minha formação acadêmica desde o início.

Agradeço imensamente o amor e a disponibilidade de várias pessoas, as quais manifesto os meus sinceros reconhecimento e agradecimento, pois a realização de um projeto de pesquisa como este só seria possível com o apoio delas:

Em particular, agradeço ao meu orientador Prof. PhD Marcelo Magalhães Silva, pela orientação, confiança e paciência em conduzir-me neste processo. Ele quem me incentivou a encarar todo o processo do mestrado de maneira desafiadora, por ser incansável no estímulo do crescimento intelectual, sem deixar de citar que o faz de forma sábia, com maestria, gentileza e ética. Obrigada pela oportunidade.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Manuel dos Santos Faria por todo auxílio, dedicação e por sua simplicidade e a doçura de quem verdadeiramente ama o que faz. A

Ciência e o ensino agradecem sua dedicação, muito obrigada!

A M.^a Carla Souza Sobral, muito obrigada por me acolher de braços abertos e por acreditar em mim. Agradeço a Deus por sua vida e todo conhecimento.

Ao Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA – CEPEC, que me possibilitou realizar toda parte molecular para realização do meu trabalho.

Aos meus colegas de Laboratório Wellyandra Santos, Eduardo Soares, Josete Santos, em especial ao Cossi Yves Gbefon, por partilhar angustias e gargalhadas, e por estarmos sempre contando um com outro nessa árdua etapa das nossas vidas, meu obrigada Gbefon!

Ao Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCAB), centro de referência em cirurgias da tireoide, por acreditar na relevância da investigação científica para a melhoria da assistência aos pacientes. Somos imensamente gratos à diretoria administrativa, à equipe de enfermagem do Centro Cirúrgico, ao corpo de cirurgiões de cabeça e pescoço e ao Serviço de Patologia, em especial Dra. Raimunda Ribeiro pelo engajamento na coleta e análise das amostras tumorais.

Agradeço a FAPEMA pelo suporte financeiro, que possibilitou dedicação exclusiva para o desenvolvimento deste trabalho.

E, finalmente e com muito respeito, agradecer aos verdadeiros incentivadores do progresso científico, os pacientes que doaram os tecidos do tireoide para a pesquisa.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, ‘planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro.’”

Jeremias 29.11

RESUMO

Introdução: O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia endócrina mais frequente em todo o mundo e sua incidência vem crescendo significativamente nas últimas três décadas, sendo atualmente responsável por cerca 1% de todas as neoplasias malignas. A causa mais comum do carcinoma papilífero da tireoide (CPT) é uma única mutação no gene *BRAF*, presente em cerca de 51% dos casos, dependendo da idade do paciente e do subtipo histológico tumoral. **OBJETIVO:** Avaliar as principais alterações genéticas em membros das vias MAPK e de ativação da telomerase em pacientes com tumores de tireoide de diferentes tipos histológicas no Maranhão. **METODOLOGIA:** Foram analisadas 112 peças cirúrgicas obtidas de pacientes submetidos a tireoidectomia no hospital do câncer Aldenora Bello (HCAB) entre 2018 à 2021. O DNA genômico foi extraído a partir de tecido fresco e posteriormente feito a PCR em tempo real para avaliação da variante *BRAFV600E* e sequenciamento de DNA (Sanger) para investigação de alterações em *NRAS* (códon 61) e na região promotora de *TERT* (posições C228T e C250T). **RESULTADOS:** Foi detectada a presença da variante *BRAFV600E* em 60 dos 112 pacientes avaliados (53,5%). Todas as alterações genéticas foram observadas em pacientes com diagnóstico histopatológico de CPT sendo a variante clássica mais abundante. Em relação às análises do gene *NRAS*, foi detectada a presença da variante CAA>CGA (Q61R), em 6 dos 87 pacientes estudados (6,89%). Para às análises do gene *TERT*, foi identificada a presença da alteração C228T em 3 dos 84 pacientes estudados (3,57%). Adicionalmente, também foi observado a ocorrência simultânea de variantes em *TERT* e *BRAF* em 2 dos pacientes estudados. Neste estudo foram observadas associações entre *BRAFV600E* e os fatores de risco de recorrência como EET e o grau elevada da PAAF, e o gene *TERT* C228T ao tamanho do tumor e o risco de recorrência. **CONCLUSÃO:** As frequências das mutações genéticas na população estudada estão de acordo com o descrito na literatura. As alterações em *BRAFV600E* e *TERT* foram associadas à características de agressividade, indicando o potencial desses marcadores no auxílio prognóstico de pacientes com tumores tireoidianos.

Palavras-chave: Cancer de Tireoide, *BRAF*, *TERT*, Carcinoma Papilífero

ABSTRACT

Introduction: Thyroid cancer (CT) is the most frequent endocrine neoplasm worldwide and its incidence has been growing significantly in the last three decades, currently representing about 1% of all malignancies. The most common cause of papillary thyroid carcinoma (PTC) is a single mutation in the BRAF gene, present in 51% of cases, depending on age and histological subtype. **OBJECTIVE:** To evaluate the main genetic alterations in members of the MAPK and telomerase activation pathways in patients with thyroid tumors of different histological types in Maranhão. **METHODOLOGY:** We analyzed 112 surgical specimens obtained from patients undergoing thyroidectomy at Hospital do Cancro Aldenora Bello (HCAB) between 2018 and 2021. Genomic DNA was extracted from fresh tissue and subsequently performed by real-time PCR to assess the BRAFV600E variant and DNA sequencing (Sanger) to investigate alterations in NRAS (codon 61) and the TERT promoter region (positions C228T and C250T). **RESULTS:** The presence of the BRAFV600E variant was detected in 60 of 112 patients evaluated (53.5%). All genetic alterations were observed in patients with histopathological diagnosis of TLC, with the classic variant being the most abundant. Regarding NRAS gene analysis, the presence of the CAA>CGA(Q61R) variant was detected in 5 of 89 patients studied (5.6%). For the TERT gene analysis, the presence of the C228T alteration was identified in 3 of the 89 patients studied (3.4%). In addition, the occurrence of variants in TERT and BRAF was also observed in 2 of the patients studied. In this study, associations were observed between BRAFV600E and recurrence risk factors, such as TSE and high FNAB grade, and TERT gene C228T with tumor size and recurrence risk. **CONCLUSION:** The frequencies of gene mutations in the study population are in agreement with what is described in the literature. The presence of BRAFV600E mutation was observed exclusively in CPT with predominance in the classic variant. The coexistence of BRAF and TERT alterations seems to indicate a worse prognosis.

Keywords: Thyroid Cancer, BRAF, TERT, Papillary Carcinoma

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação e definição dos tumores tireoidianos	21
Quadro 2: Classificação de Bethesda para citologia de lesões de tireoide	24
Quadro 3: Classificação TNM dos carcinomas diferenciados de tireoide	25
Quadro 4: Classificação de risco de recorrência dos carcinomas diferenciados de tireoide.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição do tipo histopatológico da amostra de carcinoma Diferenciado de tireoide incluída no estudo.....	51
Tabela 2. Características histopatológicas do carcinoma Diferenciado de tireoide.....	52
Tabela 3. Frequência dos marcadores <i>BRAF V600E</i> , <i>NRAS Q61R</i> e <i>TERT C228T</i> na amostra avaliada e distribuição de acordo com o tipo de carcinoma papilífero ou não papilífero.....	54
Tabela 4. Associação entre características citopatológicas, histopatológicas e Risco de recorrência em carcinoma diferenciado de tireoide e presença de alterações moleculares nos genes avaliados.....	55
Tabela 5. Modelos de regressão linear múltipla dos fatores moleculares na predição dos desfechos histopatológicos avaliados.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Anatomia e histologia da glândula tireoide.....	19
Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2020 entre homens e mulheres pelo INCA	20
Figura 3: Arquitetura papilífera em carcinoma de tireoide.	22
Figura 4: Carcinoma Folicular	22
Figura 5: Punção Aspirativa por Agulha Fina.....	23
Figura 6: Principais vias de sinalização envolvidas na carcinogênese da tireoide.	29
Figura 7: Representação esquemática mostrando a localização do gene BRAF no cromossomo 7.....	30
Figura 8: Modelo de ativação da proteína RAS.....	31
Figura 9: Representação esquemática mostrando a localização do gene <i>RAS</i> no cromossomo1.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i> (Comitê Unificado Americano sobre o Câncer)
BRAF	Isoforma B da proteína Raf
<i>BRAF</i>	Homólogo b1 do oncogene viral de sarcoma de murino v- raf
<i>BRAF V600E</i>	Substituição do aminoácido valina por ácido glutâmico no códon 600 da proteína braf
CCH	Carcinoma de células Hurthle
CT	Câncer de tireoide
CPT	Carcinoma Papilífero da Tireoide
CFT	Carcinoma Folicular da Tireoide
CDT	Carcinoma Diferenciado da Tireoide
CCR	Carcinoma Colorretal
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP's	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
EET	Extensão extra-tireoideana
<i>et al</i>	E colaboradores
ERK	Cinase Regulada por sinal extracelular
GDP	Guanosina Difosfato
GTP	Guanosina Trifosfato
HCBA	Hospital do Câncer Aldenora Bello
<i>HRAS</i>	Gene, do Inglês, <i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>KRAS</i>	Gene, do Inglês, <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
MAPK	Do inglês, <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEK	Do inglês, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
<i>NRAS</i>	Gene, do inglês <i>Neuroblastoma Rat Sarcoma</i>
PAAF	Punção Aspirativa por Agulha Fina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAS	<i>Do inglês, Rat Sarcoma Viral Oncogene</i>

<i>TERT</i>	<i>Transcriptase reversa da telomerase</i>
T3	Hormônio tireoidiano triiodotironina
T4	Hormônio tireoidiano tetraiodotironina
<i>TBSRTC</i>	<i>The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology</i>
TNM	Sistema de classificação de estágio clínico de tumores
US	Ultrassonografia
UICC	Do inglês, Union for International Cancer Control (União para Controle Internacional do Câncer)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
2. Referencial Teórico.....	18
2.1 Glândula Tireoide.....	18
2.1.1 Doença Nodular da Tireoide.....	19
2.1.2 Epidemiologia do CT	20
2.1.3 Classificação dos tumores tireoidianos	20
2.3 Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)	23
2.4 Classificação citopatológica de nódulos de tireoide.....	24
2.5 Estadiamento tumoral.....	24
2.6 Risco de recorrência (RR) do câncer de tireoide	26
2.7 Patogênese Molecular	28
2.7.1 Alterações do gene <i>BRAF</i>	29
2.7.2 Alterações do gene <i>RAS</i>	30
2.7.3 Promotor <i>TERT</i>	32
2.8. Abordagens terapêuticas	34
3. Objetivos.....	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36
4. Referências	37
ARTIGO	46
Introdução	46
Materiais e métodos.....	47
Extração de DNA genômico e tipagem molecular por PCR em tempo real	48
Resultados	49
Discussão	57
Referências	60

1. INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide (CT) é a principal neoplasia endócrina, representando cerca de 96% de todos os tumores desse sistema e 3% dos demais cânceres diagnosticados em todo o mundo (Siegel et al. 2018). Esse tipo de neoplasia ocorre em maior frequência no sexo feminino na maioria das regiões geográficas e grupos demográficos (proporção mulher/homem de 3:1), sendo o quinto câncer mais comum em mulheres (Barbus et al. 2017).

Considerando seus aspectos histológicos, os CTs podem ser classificados em: carcinomas diferenciados da tireoide (CDTs), carcinomas anaplásicos da tireoide (CATs) e carcinomas medulares da tireoide (CMTs) (Arribas et al. 2015; Carneiro et al. 2015).

Originados a partir de células foliculares, os CDTs são classificados em carcinoma papilífero da tireoide (CPT), carcinoma folicular da tireoide (CFT) e carcinoma de células de Hurthle (CCH). Dentre esses tumores, o CPT é o subtipo histológico mais comum de CT, correspondendo a 90% dos novos casos (Seib et al. 2019). Embora essa neoplasia apresente um prognóstico geralmente favorável, não obstante, as taxas de morbimortalidade por essa doença vêm aumentando significativamente nas últimas três décadas em todo mundo (Lim et al. 2017).

O CAT é o subtipo histológico mais agressivo de neoplasia tireoidiana. Embora represente cerca de 5% dos casos de CT, essa variante neoplásica é responsável por mais da metade dos óbitos em pacientes diagnosticados com tumores tireoidianos, apresentando taxa de mortalidade superior a 90% e tempo de sobrevida média de seis meses após o diagnóstico (Ragazz et al. 2014; Dibelius et al. 2014; Nachalon et al. 2015).

A maioria dos tumores de tireoide apresenta-se como nódulo à palpação da região cervical, com uma prevalência nodular de cerca de 5% em mulheres e 1% nos homens, notadamente naqueles que vivem em áreas suficientes de iodo. Adicionalmente, alguns autores têm sugerido que a prevalência de tais nódulos podem chegar a 66% na população geral quando utilizado exames ultrassonográficos (US) como método de investigação (Koster et al. 2018).

Com o objetivo determinar os mecanismos moleculares implicados na oncogênese da tireoide, diferentes estudos têm identificado um conjunto de alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na hiperativação da via de sinalização proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Nikoforova et al. 2013; Liu et al. 2014).

No CPT, mutações pontuais no gene *BRAF* (*Rapid accelerating fibrosarcoma type B*) parecem ser o principal mecanismo de desregulação da via MAPK. Por outro lado, no CFT, acredita-se que o processo oncogênico seja mediado majoritariamente por mutações no gene *RAS* (*Rat sarcoma*) (Nikiforov, 2011).

Mais recentemente, mutações no promotor do gene *TERT* têm sido apontadas como importante fator relacionado à patogênese do CPT (Horn et al. 2013; Huang et al. 2013). Um aumento da atividade da enzima telomerase na presença dessas alterações moleculares tem sido identificado em cerca 10% dos CPT e parece estar intimamente associada ao comportamento clínico agressivo desse tipo tumoral (Liu et al. 2016; Liu et al. 2013; Xing et al. 2014; Landa et al. 2013; Vinagre et al. 2013).

Alterações moleculares na via MAPK observadas na maioria dos CDT, em função das mutações no gene *RAS* ou no gene *BRAF*, parecem ser eventos genéticos comuns em neoplasias de tireoide. Acredita-se que o estudo dessa via de sinalização exerça um papel importante na regulação de genes associados com o desenvolvimento de CPT, e seu estudo pode contribuir para uma melhor compreensão do papel das mutações geralmente detectadas. Mutações no promotor do gene *TERT*, também tem sido considerado um importante fator ligado a patogênese do CPT e parece estar associado ao comportamento clínico mais agressivo em função de um possível aumento da atividade da telomerase. Entretanto, estudos sobre o prognóstico dos marcadores moleculares atuantes no CT, principalmente o promotor *TERT* ainda são escassos. Diante desse contexto, a realização de estudos abordando essa temática é justificado pela emergente necessidade de investigação de marcadores impacto diagnóstico e prognóstico. Adicionalmente, a identificação de um biomarcador capaz de prever o comportamento biológico, agressividade e potencial recidiva tumoral poderia auxiliar a condução clínica mais adequada a esses pacientes.

2. Referencial Teórico

2.1 Glândula Tireoide

A tireoide é uma glândula endócrina localizada na região anterior do pescoço (Figura 1). Sua principal função é produzir os hormônios tireoidianos tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) que são responsáveis por regular o metabolismo energético, bem como influenciar o funcionamento de diversos órgãos como coração, cérebro, fígado e rins (Rodrigues et al. 2015).

O epitélio tireoidiano é formado por uma camada única de células cubóides, denominadas células foliculares, que se organizam em círculos compondo o folículo tireoidiano - unidade anátomo-funcional que armazena o coloide, substância gelatinosa rica em tireoglobulina. As células parafoliculares correspondem a outro tipo celular da tireoide, denominadas células C, que são responsáveis pela síntese da calcitonina (White et al. 2013) (Figura 1).

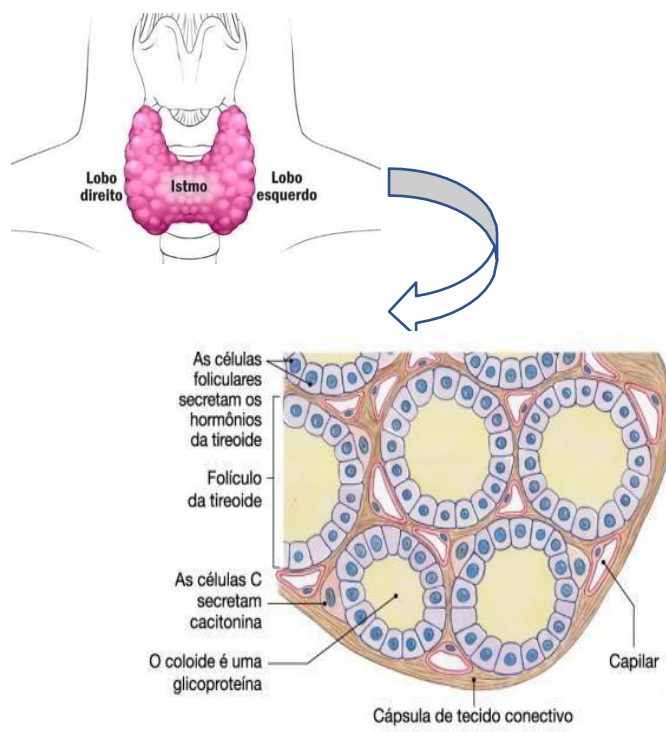


Figura 1: Anatomia e histologia da glândula tireoide.

Fonte: <https://doctorlib.info/physiology/medical-physiology-molecular/50.html>

2.1.1 Doença Nodular da Tireoide

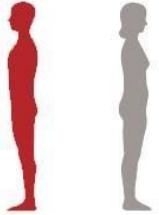
A tireoide apresenta dois grandes grupos de doenças: (i) disfunções fisiológicas/funcionais e (ii) anatômicas.

Os nódulos tireoidianos são muito comuns na população em geral, mas apenas 7–15% dos nódulos são malignos. Por isso, é importante distinguir as lesões malignas das benignas.

2.1.2 Epidemiologia do CT

Ao longo das últimas décadas, a incidência de CT tem aumentado significativamente em países ocidentais (Du Lingbin et al. 2015). Essa neoplasia é comumente diagnosticada em pacientes com idade entre 45 a 55 anos, podendo ocorrer em qualquer faixa etária, com predileção pelo sexo feminino que representa aproximadamente 3 em cada 4 casos (Ferreira et al. 2017).

Segundo o INCA, estima-se 2.310 casos novos de CT no sexo masculino e 11.950 para o sexo feminino, para cada ano do triênio 2020/2022, com um risco estimado de 2,17 casos novos a cada 100 mil homens e 11,15 casos a cada 100 mil mulheres, ocupando a 13ª e 5ª posições dos cânceres no Brasil, respectivamente (INCA, 2020) (Figura 2).

Localização primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil estimados para o ano de 2020 entre homens e mulheres pelo INCA. Fonte: INCA 2020

De acordo com alguns estudos, o aumento significativo da incidência do CT na população mundial pode estar relacionado ao aumento da sensibilidade de técnicas diagnósticas e exames de imagem que permitem a detecção de tumores pequenos e subclínicos (Kent et al. 2007; Morris et al. 2013; Yoo et al. 2013; Davies et al. 2014). Contudo, outros autores postulam um real aumento da incidência do CT, onde possivelmente existem diferentes fatores contribuintes, não sendo atribuído somente à detecção do nódulo pela US (Li, N et al. 2013; Pellegriti et al. 2013; Veiga et al. 2013; Lim et al. 2017).

2.1.3 Classificação dos tumores tireoidianos

O CDT tem origem nas células foliculares da tireoide e representa 90% de todas as neoplasias malignas desta glândula (Seib et al. 2019) (Quadro 1). Fazem parte do CDT: (i) carcinoma papilífero de tireoide (CPT), que é responsável por 80% de todos os

cânceres de tireoide; (ii) carcinoma folicular de tireoide (CFT), sendo responsável por 10% a 20% e; (iii) carcinoma de células de Hurtle (CCH) que é responsável por 4,5 a 10% de todos os cânceres de tireoide (DeLellis et al. 2004; Jemal et al. 2011; Howlader et al. 2012).

Cerca de 10% dos CTs englobam o carcinoma anaplásico ou indiferenciado e o carcinoma medular da tireoide (Quadro 1). Essas neoplasias geralmente apresentam pior prognóstico comparadas aos CDTs (Brown et al. 2005; Sung 2012).

Quadro 1: Classificação dos tumores malignos da tireoide de origem epitelial

CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIROIDE	
CARCINOMA PAPILÍFERO DA TIROIDE	
Variante clássica	Variante de células claras
Variante folicular	Variante “ <i>spindle-cell</i> ”
Variante de células altas	Variante células de Hurtle ou oncocítica
Variante de células colunares	Variante Warthin-símile
Variante esclerosante difusa	Variante cribriforme-morular
Variante sólida/trabecular	Variante estroma fasciíte-nodular símile
Variante encapsulada	Variante microcarcinoma papilífero
Variante “ <i>hobnail</i> ”	Variante macrofolicular
CARCINOMA FOLICULAR DA TIROIDE	
Minimamente invasivo	Encapsulada angio-invasivo
Francamente invasivo	
CARCINOMA DE CÉLULAS DE HURTHLE	
CARCINOMA POUCO DIFERENCIADO	
CARCINOMA ANÁPLÁSICO DA TIROIDE	
CARCINOMA MEDULAR DA TIROIDE	
OUTROS TUMORES MALIGNOS DA TIROIDE	

Fonte: Adaptado (Livolsi et al. 2019; Lloyd et al. 2017).

O CPT é caracterizado histologicamente pela formação de papilas e por um conjunto de alterações nucleares (Figura 3). A presença de necrose e altas taxas de mitose, pouco frequentes no CPT, são associadas a um comportamento agressivo semelhante ao carcinoma anaplásico de tireoide (Melmed, 2015).

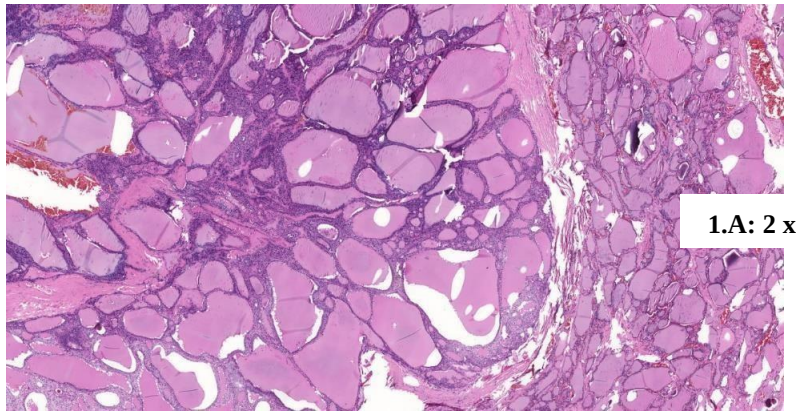


Figura 3: Arquitetura do carcinoma papilífero da tireoide.
Fonte: Unidade de Patologia – HUUFMA.

O CFT é mais comum em áreas com deficiência de iodo. Esse tipo de neoplasia é caracterizado histologicamente por folículos bem formados, presença de invasão de cápsula, vasos sanguíneos e/ou invasão do tecido tireoidiano adjacente (Melmed, 2015) (Figura 4).

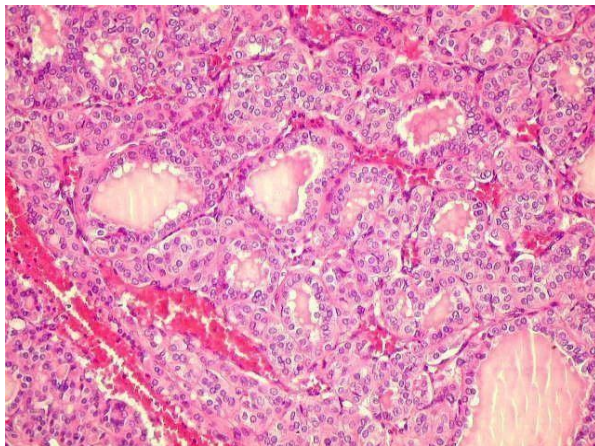


Figura 4: Carcinoma Folicular de tireoide.
Fonte: Unidade de Patologia – HUUFMA.

O carcinoma de células Hurthle (CCH) da tireoide, também chamado de carcinoma oncocítico, é uma forma rara de CDT. Correspondem a apenas 3 a 4% de todas as doenças malignas da tireoide, podendo apresentar-se como tumor minimamente invasivo ou amplamente invasivo (Lloyd et al. 2017; Hundahl 1998). O CCH geralmente tem um comportamento clínico mais agressivo em comparação com os outros CDTs e está associado a uma taxa maior de metástases à distância (Lloyd et al. 2017).

Além dos CDT, destaca-se também o carcinoma medular, oriundo das células da crista neural, e o carcinoma anaplásico ou indiferenciado, que normalmente surge a partir de uma desdiferenciação do CDT e apresentam prognóstico mais severo (Sherma, 2003; Sipos e Mazzaferri, 2010).

2.3 Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF)

A punção aspirativa por agulha fina (PAAF) é uma modalidade de exame citológico que visa o estudo de células colhidas por meio de uma agulha fina e um sistema a vácuo acoplados a uma seringa (Figura 5). Com esse exame, é possível reconhecer as alterações morfológicas em células isoladas de uma determinada lesão (Kline, 1998; Koss, 1992; Dhurandhar, 2001;).

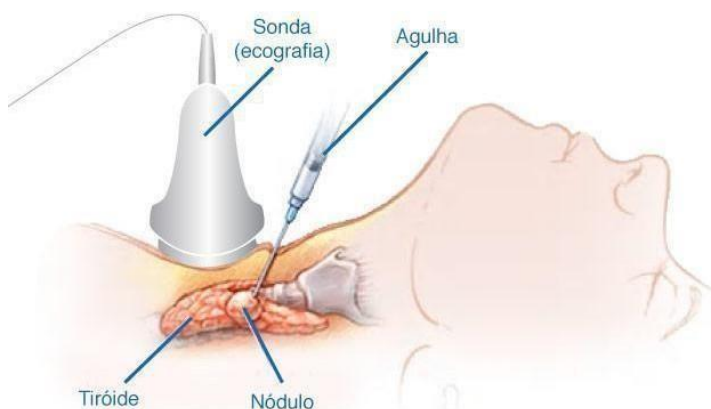


Figura 5: Punção Aspirativa por Agulha Fina

Fonte: <https://www.saudebemestar.pt/>

A PAAF é um método de baixo custo, fácil execução e com reduzido risco de complicações, além de ser uma importante ferramenta no manejo da doença tireoidiana nodular (Bomeli et al. 2010). O exame citopatológico de nódulos de tireoide realizado a partir da PAAF apresenta especificidade e sensibilidade diagnóstica de 99% e 93%, respectivamente (Abu-Salem, 2002; Hegedüs, 2004). Esse tipo de aspiração pode ser realizado com ou sem orientação por imagem, porém, é aconselhável a realização da PAAF guiado por ultrassonografia devido a melhor visualização e seleção do local a ser puncionado, diminuindo a ocorrência de resultado falso negativo (Danese et al. 1998). A PAAF é indicada em nódulos de acordo com a história clínica e familiar do indivíduo, tamanho do nódulo, funcionalidade e achados ultrassonográficos (Rosário et al. 2013; Alexander et al. 2016).

2.4 Classificação citopatológica de nódulos de tireoide

No Brasil e em vários países do mundo, os laudos de citopatológicos de tireoide são reportados de acordo com o Sistema Bethesda (Cibas et al. 2017). No entanto, outros países utilizam sistemas classificatórios próprios como é o caso da Itália, Reino Unido, Japão e Austrália (Poller et al. 2016).

O Sistema Bethesda para Laudos Citopatológicos de Tireoide (*The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology – TBSRTC*), tem a finalidade de categorizar os laudos de acordo com seu risco de malignidade estimado, sendo possível assim, direcionar a conduta clínica a ser tomada frente a cada resultado citológico (Quadro 2).

Quadro 2: Classificação de Bethesda para citologia de lesões de tireoide.

Classe	Descrição	Conduta clínica
I	Não diagnóstico ou insatisfatório	Repetir PAAF
II	Benigno	Acompanhamento clínico e ultrassonográfico
III	Atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado	Repetir PAAF e realizar teste molecular e/ou lobectomia
IV	Neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia folicular	Teste molecular e/ou lobectomia
V	Suspeito de malignidade	Tireoidectomia subtotal ou lobectomia
VI	Maligno	Tireoidectomia subtotal ou lobectomia

Fonte: adaptado de cibas et al. 2018.

2.5 Estadiamento tumoral

O sistema de estadiamento Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) do Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC) / União para Controle Internacional do Câncer (UICC) tem sido amplamente utilizado para prever o prognóstico de CDT na prática clínica (Kim et al. 2017b). Este sistema baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em consideração as características do tumor primário (T), dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de

metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente (Brasil, 2014).

Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser subdivididas em graduações alfabéticas (a, b). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada (Quadro 3).

Quadro 3 - Classificação TNM dos carcinomas diferenciados de tireoide

T - Tumor primário	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor $\leq$ 2 cm na maior dimensão limitada à tireoide
T1a	Tumor $\leq$ 1 cm na maior dimensão limitada à tireoide
T2b	Tumor $>$ 1 cm, mas $\leq$ 2 cm na maior dimensão limitada à tireoide
T2	Tumor $>$ 2 cm, mas $\leq$ 4 cm na maior dimensão limitada à tireoide
T3	Tumor $>$ 4 cm limitado à tireoide ou extensão extratireoidiana macroscópica invadindo apenas os músculos do cinto
T3a	Tumor $>$ 4 cm limitado à tireoide
T3b	Extensão extratireoidiana macroscópica invadindo apenas os músculos da cinta (músculos esterno-hioideo, esternotireoideo, tireo-hióideo ou omo-hióideo) de um tumor de qualquer tamanho
T4	Inclui extensão extratireoidiana grosseira nas principais estruturas do pescoço
T4a	Extensão extratireoidiana macroscópica invadindo tecidos moles subcutâneos, laringe, traquéia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente de um tumor de qualquer tamanho
T4b	Extensão extratireoidiana macroscópica invadindo a fáscia pré-vertebral ou envolvendo a artéria carótida ou vasos mediastinais de um tumor de qualquer tamanho
Nota: Todas as categorias podem ser subdivididas: (s) tumor solitário e (m) tumor multifocal (o maior tumor determina a classificação)	
N - Linfonodos regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais.

N0a	Um ou mais linfonodos benignos confirmados citologicamente ou histologicamente
N0b	Nenhuma evidência radiológica ou clínica de metastase de linfonodo loco-regional.
N1	Metástase em linfonodos regionais.
N1a	Metástase no nível VI (linfonodos pré-traqueal e paratraqueal, incluindo pré-laríngeo e o de <i>Delphian</i>).
N1b	Metástases unilateral, bilateral ou contralateral cervical (níveis I, II, III, IV e V) ou retrofaríngea ou linfonodo mediastinal superior (nível VII).
M - Metástase à distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

2.6 Risco de recorrência (RR) do câncer de tireoide

A recorrência tumoral é mais comum que a mortalidade. Diversos fatores estão associados ao maior risco de recorrência tais como: metástase de linfonodo, variante histológica, tamanho do tumor, extensão extratireoidiana, extensão extranodal, sexo masculino e idade acima de 45 anos no momento do diagnóstico (Durante et al. 2013).

De acordo com *American Thyroid Association* (ATA) a estratificação do risco para o CDT categoriza os pacientes em grupos de baixo, intermediário e alto risco (Quadro 4). Os pacientes que se enquadram no grupo intermediário e de alto risco apresentam maiores taxas de recorrência (Haugen et al 2016).

Quadro 4 - Classificação de risco de recorrência dos carcinomas diferenciados de tireoide.

Recorrência	Definição	Risco estimado (%)
Baixo	• Ausência de metástase à distância • Tumor intratireoidiano, com tamanho <4 cm; ausência de extensão extratireoidiana grosseira • Ausência de metástase linfonodal clinicamente evidente • Se metástase linfonodal: ≤5 metástases linfonodais microscópicas (<2 mm) • Ausência de histologia agressiva (tem que ser clássico) • Ausência de invasão vascular (se folicular, pode ter até 4 focos de invasão vascular) • Ressecção tumoral macroscópica completa • Sem captação fora do leito tireoidiano na cintilografia de corpo inteiro (PCI) se a ablação com radioiodo for realizada.	< ou = 5
Intermediário	• Invasão microscópica do tumor para tecidos moles em torno da tireoide • Histologia agressiva (variantes células altas, colunar e <i>hobnail</i>) • Presença de metástases linfonodais clinicamente evidentes (<3 cm) ou > 5 microscópicas (<2 mm) • Carcinoma papilífero multifocal quando 1 dos focos for maior que 1 cm ou multifocal <i>BRAF</i> + • Captação no pescoço, porém fora do leito da tireoide (LN), na PCI após o tratamento.	>5 - 20
Alto	• Invasão macroscópica do tecido e / ou estruturas em torno da tireoidianas • Metástases linfonodais ≥ 3 cm de tamanho ou com extensão extranodal • Câncer de tireoide folicular com invasão vascular extensa (> 4 vasos envolvidos) • Câncer de tireoide pouco diferenciado • Ressecção de tumor incompleta • Metástases distantes • Tireoglobulina sérica sugestiva de metástases distantes. • Mutação <i>TERT</i>	>20%

Fonte: American Thyroid Association (ATA), 2015 (Modificado)

2.7 Patogênese Molecular

A oncogênese é um processo decorrente do acúmulo de modificações genéticas ou epigenéticas que alteram a modulação de processos celulares fundamentais tais como crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose (Hanahan et al. 2000). Esses processos são regulados com base nas complexas redes interligadas de sinalização celular (Martin, 2003; Alberts et al. 2010).

Em relação à tumorigênese da tireoide, a via de sinalização celular mais estudada tem sido a MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos), considerada crucial para a formação inicial do tumor (Figura 6). Esta via transmite os sinais extracelulares de vários fatores de crescimento, hormônios e citocinas ao núcleo celular através da ativação de cascatas de sinais (Tang, 2010). A junção dos ligantes aos seus receptores de superfície conduzem à dimerização dos receptores e à auto fosforilação de resíduos de tirosina presentes no domínio citoplasmático do receptor, culminando na sua ativação (Tang, 2010). Os receptores ativados, através de proteínas adaptadoras, ativam a proteína quinase RAS (*Rat Sarcoma*). Em seguida, a quinase RAS ativa a fosforilação de quinases de RAF (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*). A RAF quinase do tipo B (BRAF), o mais abundante e potente membro da família RAF, fica livre para ativar as proteínas quinases de especificidade dupla: MAP quinase-quinases (MAPKK, também conhecidas como MAP / quinases reguladas por sinal extracelular, MEK) 1 e 2 (Mccubrey et al. 2007; Mohammadi et al. 2017). MEK 1/2 fosforilam e ativam quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1 e 2. Quando ativada, a ERK fosforila proteínas citoplasmáticas e é translocada para dentro do núcleo, onde regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Mccubrey et al. 2007; Mohammadi et al. 2017; Lee et al. 2010).

A via PI3K/AKT representa uma via de sinalização intracelular extremamente importante no controle do ciclo celular e age fisiologicamente semelhantemente a via MAPK (Giudice, 2013), uma vez que ambas podem ser ativadas por estímulos extracelulares que atuam em receptores membranares e também regular em conjunto mecanismos fundamentais como a proliferação e a sobrevivência. Além disso, existe uma comunicação estreita entre as duas vias (Brzezianska et al. 2011, Xing, 2010) (Figura 6).

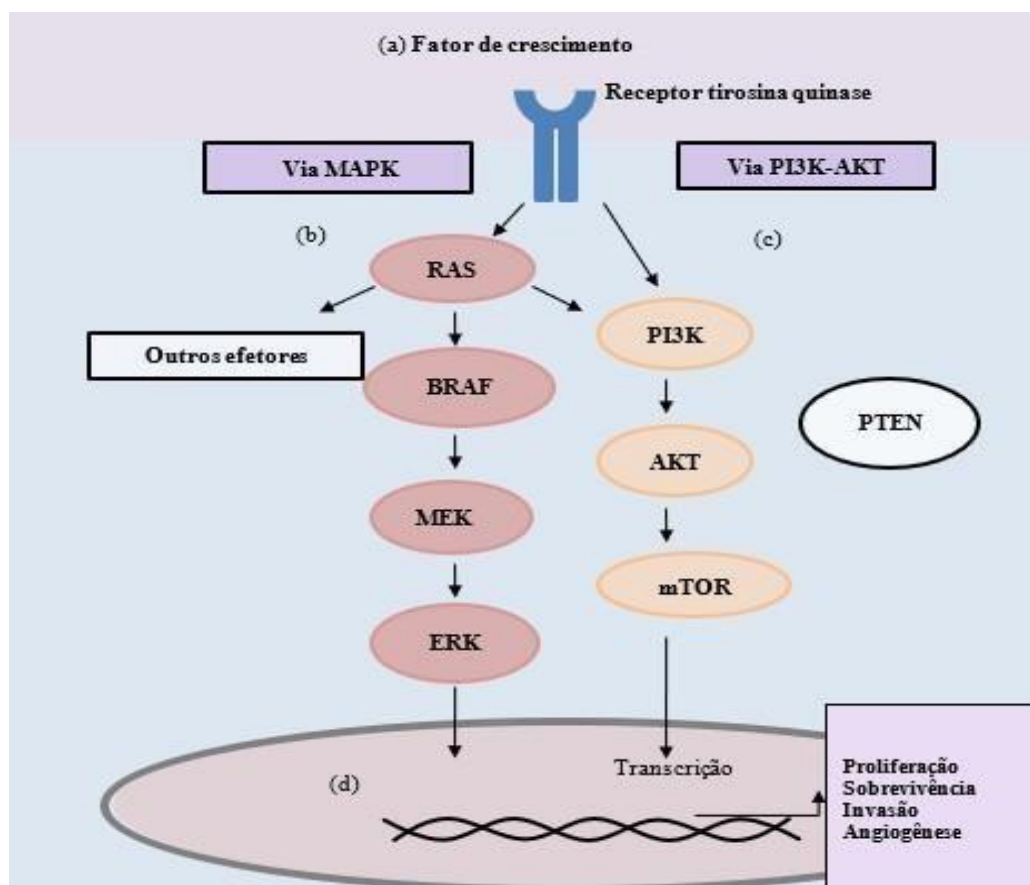


Figura 6: Principais vias de sinalização envolvidas na carcinogênese da tireoide.

Legenda: (a): A ligação de fatores de crescimento a RTKs (receptor tirosina quinase) resulta na ativação de (b): MAPK e/ou (c): PI3K-AKT. (d): a sinalização dessas vias ativa múltiplos fatores de transcrição associados a diferentes processos celulares, tais como: proliferação e sobrevivência. Fonte: SOBRAL; MAGALHÃES; FARIA, 2019 (modificado).

2.7.1 Alterações do gene *BRAF*

A proteína BRAF pertence à família das quinases de serina-treonina RAF, que apresentam três isoformas funcionais nas células de mamíferos: A-RAF, B-RAF e C-RAF. O gene que codifica BRAF está localizado no braço longo do cromossomo 7 (7q34), é composto por 17 íntrons e 18 éxons abrangendo uma região de 190.284 pb (Figura 7) (Lopes, 2011). Este gene é o mais frequente ativador da via da MAPK e, portanto, mutações nessa região genômica podem levar à perda do controle sobre o ciclo celular, iniciando assim o desenvolvimento de neoplasias (Tang et al. 2010). BRAF expressa-se em níveis elevados em células neuronais, hematopoiéticas e no testículo, e é igualmente a isoforma predominante nas células foliculares da tireoide (Tang et al. 2010; Fagin et al. 2008; Garnett et al. 2008; Fagin et al. 2004).

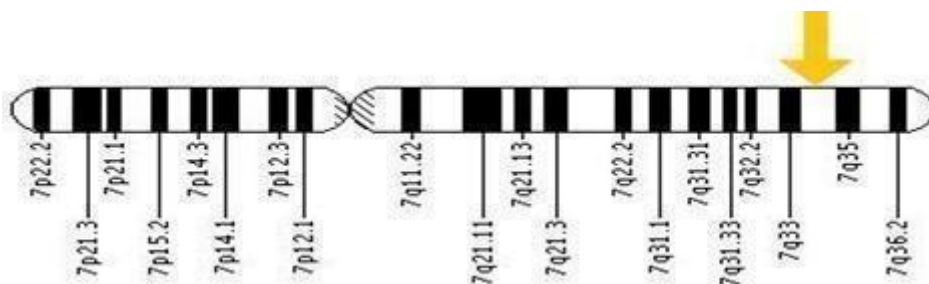


Figura 7: Representação esquemática mostrando a localização do gene *BRAF* no cromossomo 7.

Fonte: Genetics Home Reference-site: ghr.nlm.nih.gov

As mutações ativadoras do gene *BRAF* já foram descritas em diversas neoplasias humanas incluindo melanoma, carcinoma de ovário e carcinoma colorretal (Czarniecka et al. 2015). As mutações em *BRAF* são os eventos moleculares mais prevalentes na patogênese dos CPT em adultos. Dentre essas modificações genéticas destaca-se *BRAFV600E*, uma mutação pontual missense que ocorre frequentemente em CPT e corresponde a mais de 90% das mutações do gene *BRAF* (Czarniecka et al. 2015; Katoh et al. 2015). Essa alteração consiste na transversão timina-adenina na posição 1799 (T1799A) no éxon 15 do gene gerando uma substituição do aminoácido valina pelo glutamato no resíduo 600 da proteína (V600E). *BRAFV600E* causa uma ativação descontrolada e contínua de proteínas quinases, por meio da via da MAPK, que induzem uma excessiva proliferação das células tumorais (Schulten et al. 2013).

A variante *BRAFV600E* está presente em cerca de 40-45% dos casos com CPT (Nikiforova et al. 2009) sendo mais frequente nas formas clássica (45%) e variante de células altas (80%) e menos presente na variante folicular (15%) (Xing, 2013; Sobrinho et al. 2011).

Em relação a variante folicular, a alteração *BRAFV600E* está presente nos tumores infiltrativos não capsulados (Eloy et al. 2011). Esta mutação não foi até hoje descrita em carcinomas foliculares nem em lesões benignas da tireoide.

2.7.2 Alterações do gene *RAS*

As mutações em genes da família *RAS* (*NRAS*, *HRAS* e *KRAS*) são a segunda alteração genética mais frequente no CT (Nikiforov, 2008). Essa região do genoma é responsável pela codificação de uma família de proteínas ligadas à superfície interna da membrana celular, as quais são ativadas por receptores de membrana com atividade

tirosina-quinase ou acoplados à proteína G, transmitindo a sinalização intracelular subsequente através das vias MAPK e PI3K/AKT, entre outras (Miller et al. 2009) (Figura 8).

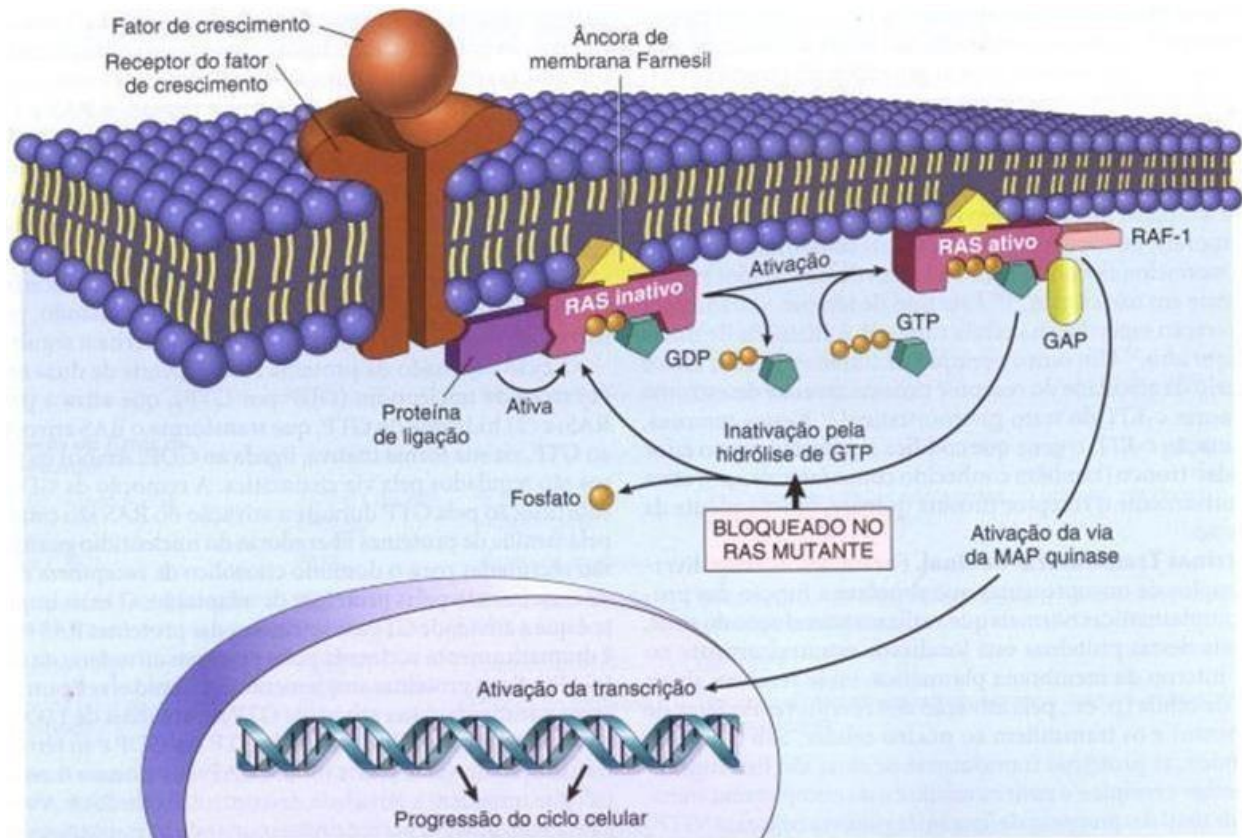


Figura 8: Modelo de ativação da proteína RAS

No CPT, mutações pontuais em *RAS* ocorrem em 10% dos casos, em geral associadas à variante folicular. Estas mutações localizam-se nos códons 12, 13, 59, 61, 117, 146, sendo mais frequente nos códons 12, 13 ou 61, levando à ativação constitutiva das vias de sinalização dos genes *NRAS*, *HRAS* e *KRAS* e estabilizam a proteína na sua conformação ativa, ligada à guanina-trifosfato (GTP), o que leva ao estímulo autônomo e permanente de diversas vias de sinalização, dentre elas a das MAPKs e a PI3K/AKT, ambas ligadas à proliferação celular (Namba et al. 1990; Ezzat et al. 1996; Vasko et al. 2004). Estas mutações parecem estar associadas também à encapsulação do tumor, a alterações morfológicas nucleares mais discretas e a uma menor frequência de metástases linfonodais (Zhu et al. 2003; Adeniran et al. 2006). As proteínas RAS desempenham um papel fundamental na gênese e progressão de fenótipos malignos de neoplasias como de pulmão, pele, bexiga, mama, pâncreas, trato gastrointestinal, rim e múltiplas formas de leucemia, além de tumores da tireoide (Tyner et al. 2009).

O gene *NRAS* está situado no *locus* 1p13.2 e tem 7 éxons distribuídos por 12,4 kb (Figura 9). Esse gene produz uma proteína chamada NRAS que regula o ciclo celular através de sua ação GTPase estimulando a proliferação e desenvolvimento celular (Adrienne et al. 2010).

As mutações em *RAS* ocorrem em 30-45% dos CFT e na variante folicular do CPT, podendo também ocorrer em 20-40% nos tumores pouco diferenciados (PDTC) e raramente na variante clássica do CPT.

As mutações no gene *N-RAS* são muito prevalentes em CT, atrás apenas das mutações do *BRAF*. A proteína codificada pelo *RAS* é ativada ao se ligar no trifosfato de guanosina (GTP) e ao ser hidrolisado a difosfato de guanosina (GDP) (Figura 8). Nos tumores de tireoide, a proteína RAS mutada fica consecutivamente ativada, pois o GTP não é desfosforilado. Assim, há ativação tanto da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), importante para regulação e sobrevivência celular, e da PI3K/AKT, que regula metabolismo, crescimento e proliferação celular e síntese proteica, com predominância desta última (Riesco et al. 2016) (Figuras 6 e 8).

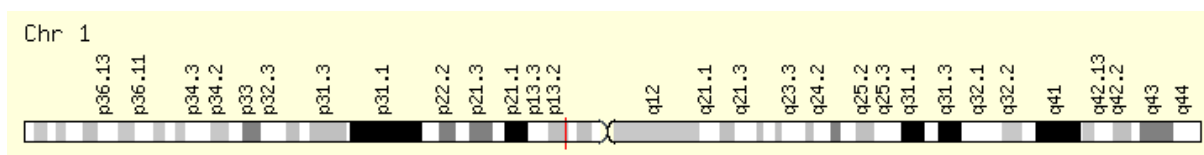


Figura 9: Representação esquemática mostrando a localização do gene *RAS* no cromossomo 1.

Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NRAS>

2.7.3 Promotor *TERT*

A transcriptase reversa da telomerase humana (*TERT*) é um importante gene envolvido na manutenção da integridade cromossômica e estabilidade do genoma (Alzahrani et al. 2016). *TERT* codifica a subunidade da transcriptase reversa catalítica da enzima telomerase (Alzahrani et al. 2016). O gene *TERT* possui extensão de 35 kb e está localizado no cromossomo 5, contendo 16 exons e uma região promotora de 330 pares de bases (Henke et al. 2015). Mutações nas regiões codificantes desse gene parecem raras, contudo, alterações genéticas em sua região promotora têm sido recentemente descritas em um grande número de cânceres (Davies 2014; Alzahrani et al. 2016; Nasirden et al. 2016). No CT, duas mutações específicas têm sido recorrentemente observadas no promotor *TERT* (Horn et al. 2013, Huang et al. 2013). Tais alterações genéticas estão

localizadas nas posições -124 e -146 pb a montante de seu local de início da tradução e são caracterizadas por uma mutação C> T na posição 1.295.228 (C228T) e 1.295.250 do cromossomo 5 (C250T), respectivamente.

Mutações no promotor *TERT* parecem induzir a superexpressão desse gene criando um sitio de ligação ao fator de transcrição E-vinte e seis (ETS), facilitando assim o crescimento do câncer (Vinagre; Huang et al. 2013). Nesse sentido, Horn et al. identificaram uma mutação do promotor *TERT* da linha germinativa em uma família propensa ao melanoma e mutações do promotor *TERT* somático em um número significativo de melanomas esporádicos. Essas mutações ocorreram com mais frequência nas lesões metastáticas do que nos melanomas primários. Adicionalmente, Huang et al. relataram mutações do promotor *TERT* em 71% dos melanomas e em 16% de 150 linhas de células cancerosas derivadas de diversos tipos de tumor com altas frequências em gliomas, câncer de bexiga, carcinomas hepatocelulares e câncer de tireoide (Huang et al. 2013; Liu et al. 2013).

As mutações do promotor *TERT* têm sido também associadas a casos de CT, especialmente em tipos mais agressivos (Landa et al. 2013; Liu X et al. 2013). Estas alterações têm sido relatadas no CPT com uma prevalência de 7,5 a 27% (Liu et al. 2013). Além disso, mutações *TERT C228T* combinadas com mutações *BRAF* parecem possuir uma associação sinérgica no aumento da recorrência do tumoral e mortalidade do paciente com CPT (Jin et al. 2016; Liu X et al. 2014).

Evidências recentes têm indicado uma relação entre alterações no promotor *TERT* e a ativação da via MAPK. As mutações em *TERT* ocorrem na região promotora do núcleo da transcriptase reversa da telomerase onde codifica a subunidade catalítica da telomerase, estes por sua vez são conhecidos por gerar novos locais de ligação para a família ETS de fatores de transcrição (Bell et al. 2015).

Em um estudo com melanoma observou-se que fatores de transcrição ETS1 quando regulado positivamente pela MAPK em decorrência das mutações *BRAF* ou *NRAS*, geram o aumento da transcrição de *TERT* em células mutadas (Vallarelli et al. 2016). Em adição, outro estudo recente em gliomas demonstrou que a coexistência das mutações *BRAFV600E* e *TERT* seria capaz induzir a expressão e fosforilação de ETS1 seletivamente ligados a mutação do promotor e regulada negativamente pela inibição de *BRAFV600E*, levando a expressão reduzida de *TERT* devido à inibição do fator ETS (Gabler et al. 2019).

De acordo com Liu (2018), a mutação *BRAFV600E* ativa a alteração em

TERT através do proto-oncogene *FOS*, que é um efetor a jusante da sinalização de *MAPK*, e o complexo da proteína de ligação ao *GA* (*GABP*). A via *BRAF* V600E / *MAPK* fosforila e liga o fator de transcrição *FOS* ao promotor *GABPB*, aumentando a expressão de *GABPB* e a formação do complexo *GABPA-GABPB*. Este complexo por sua vez liga-se seletivamente a mutação do promotor *TERT* aumentando assim a expressão de *TERT*. Apesar das evidências já mencionadas, o mecanismo molecular subjacente às operações oncogênicas sinérgicas de *BRAFV600E* e *TERT* permanece controverso.

2.8. Abordagens terapêuticas

O tratamento do CDT é principalmente cirúrgico através da lobectomia ou tireoidectomia total com ou sem dissecação de linfonodos. Apesar da baixa taxa de mortalidade do CPT, alguns casos dependendo da extensão extratireoidiana e do potencial metastático podem progredir para estágios inoperáveis e não responsivos ao radioiodo (Haugen et al. 2015).

Atualmente, o tratamento do CDT envolve tireoidectomia com supressão do hormônio estimulador da tireoide (TSH) usando levotiroxina (Cooper et al. 2009; NCCN, 2013). O iodo radioativo (RAI) é frequentemente administrado no pós-operatório para remover o tecido tireoidiano remanescente, eliminar qualquer suspeita de micrometástases ou eliminar doenças recorrentes (Cooper et al. 2009; Colevas et al. 2012; NCCN, 2013).

A estratificação do RR é a ferramenta mais importante para definir a melhor conduta terapêutica baseando-se nos critérios clínico patológicos tais como idade ao diagnóstico, sexo, tamanho tumoral, EET, metástases locais ou à distância (Hamzany et al. 2012; Jonklaas et al. 2012; Ito et al. 2014).

Em pacientes de baixo RR, a vigilância ativa ocorre através do monitoramento com auxílio do ultrassom de pescoço (US) sem intervenção cirúrgica, se o tamanho permanecer estável ao longo do tempo (Haugen et al. 2015). Em contrapartida os casos com RR alto e intermediário com evidência de metástases recomenda-se tratamento com radioiodo, pois o mesmo tem demonstrado maior eficiência na redução da mortalidade e morbidade.

A recente descoberta de alvos moleculares específicos do CT responsáveis pela proliferação, diferenciação e apoptose celular levou a aprovação de novos medicamentos

por exemplo, Sorafenibe que é um inibidor de tirosina quinase usado para inibição de moléculas como VEGFR 1-2-3, RET, RAF, PDGFR- β , c-KIT e FLT3 (Kloos et al. 2009). Evidências clínicas têm sugerido que o Sorafenibe possa bloquear o crescimento de tumores da tireoide por meio de mecanismos antiproliferativos e antiangiogênicos (Kloos et al. 2009). Outro fármaco disponível é o Lenvatinibe que possui mecanismo de ação por meio da inibição de VEGFR1–3, RET, c-KIT e PDGFR β (Matsui et al. 2008; Okamoto et al. 2013). O Vemurafenibe atua inibindo a via da MAPK através do bloqueio de ligação ao domínio ATP da *BRAF* mutada (Yang et al. 2012) enquanto que o Selumetinibe tem como alvo as quinases MAP MEK-1 e 2, podendo reverter a refratariedade ao iodo em pacientes com câncer metastático da tireoide. Além disso, a mutação do *NRAS* parece ser um biomarcador preditivo da eficácia do Selumetinibe (Hoet al. 2013).

Diante desse contexto, a realização de estudos abordando essa temática é justificado pela emergente necessidade de investigação de possível associação entre a ocorrência de mutações na via de sinalização MAPK (*BRAF* e *RAS*) e a ativação da telomerase, bem com aspectos histológicos de pacientes portadores de câncer de tireoide. Adicionalmente, a identificação de um biomarcador capaz de prever o comportamento biológico, agressividade e potencial recidiva tumoral poderia auxiliar a condução clínica mais adequada a esses pacientes

A identificação nas amostras tumorais reveste-se de fundamental importância para o seguimento clínico, além de ensejar o uso de novos medicamentos que agem na inibição, proliferação e apoptose, o que pode possibilitar uma maior eficácia terapêutica.

3. Objetivos

3.1 Geral

✓ Avaliar as principais alterações genéticas em membros das vias MAPK e de ativação da telomerase em pacientes com tumores malignos de tireoide de diferentes tipos histológicas no Maranhão.

3.2 Específicos

✓ Descrever os principais tipos histológicos de tumores de tireoide em pacientes atendidos no Maranhão.

✓ Determinar a prevalência de mutações nos genes *BRAF*, *NRAS* e *TERT* nos diferentes tipos histológicos de tumores de tireoide.

✓ Estabelecer um perfil de mutações em *BRAF*, *NRAS* e *TERT* nas amostras de tumores e relacioná-lo aos dados histopatológicos.

4. Referências

1. Abu-Salem, O. FNAB thyroid gland: comparison study between pre-and post-operative histological diagnosis. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, v. 80, n. 1-4, p. 57-60, 2002. ISSN 0020-2509
2. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. Am J Surg Pathol 2006; 30:216-22
3. Adrienne, D.; Cox, And Channing, J. Der. Ras history: The saga continues. Mall GTPases 1:1, 2-27; July/August 2010
4. Alberts, B. et al. Cancer. In: _. Biologia molecular da célula. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 1205-1268.
5. Alzahrani AS, Alsaadi R, Murugan AK, Sadiq BB. TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. Horm Cancer. 2016 Jun;7(3):165-77. doi: 10.1007/s12672-016-0256-3. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26902827
6. Alexander, E. K. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. Thyroid, v. 26, p. 1-133, 2016.
7. Amedee RG, Dhurandhar NR. Fine needle aspiration biopsy. Laryngoscope.2001 Sep; 111(9):1551-57.
8. Arribas J, Castellví J, Marcos R, Zafón C, Velázquez A. Expression of YY1 in Differentiated Thyroid Cancer. Endocr Pathol. 2015 May;26(2):111-8. doi: 10.1007/s12022-015-9359-6. PMID: 25698133.
9. Barbus, E. et al. Quality of life in thyroid cancer patients: A Literature Review. Clujul Medical. v. 90, n. 2, p. 147-153, 2017.
10. Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, Choi S, Hong C, He D, Pekmezci M, Wiencke JK, Wrensch MR, Chang SM, et al. Câncer. O fator de transcrição GABP se liga e ativa seletivamente o promotor TERT mutante no câncer. Ciência. 2015; 348: 1036–1039.
11. Bomeli, S. R.; Lebeau, S. O.; Ferris, R. L. Evaluation of a thyroid nodule. Otolaryngologic clinics of North America, v. 43, n. 2, p. 229-238, 2010. ISSN 0030-6665.
12. Brown RL, Cohen EEW. Novel approaches in the treatment of thyroid cancer. ELSEVIER. 2008.

13. Brzezianska E, Pastuszak-Lewandoska D 2011 A minireview: the role of MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways in thyroid follicular cell-derived neoplasm. *Frontiers in bioscience* 16:422-439
14. Carneiro RM, Carneiro BA, Agulnik M, Kopp PA, Giles FJ. Targeted therapies in advanced differentiated thyroid cancer. *Cancer Treat Rev.* 2015 Sep;41(8):690-8. doi: 10.1016/j.ctrv.2015.06.002. Epub 2015 Jun 17. PMID: 26105190.
15. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2017;27(11):1341–6.
16. Colevas, A., Shah, M. (2012) Avaliação de pacientes com câncer de tireoide disseminado ou locorregionalmente avançado: um primer para oncologistas médicos. *Am Soc Clin Oncol Educ Livro* 32: 384 - 388
17. Cooper, D., Doherty, G., Haugen, B., Kloos, R., Al, E. (2009) Revised American Thyroid Association diretrizes de gestão para pacientes com nódulos da tireóide e câncer diferenciado da tireóide. *Thyroid* 19: 1167 - 1214
18. Czarniecka, A.; Oczko-Wojciechowska, M.; Barczyński, M. Braf V600e mutation in prognostication of papillary thyroid cancer (PTC) recurrence. *Gland surgery*, v. 5, n. 5, p. 495, 2015.
19. Danese, D. et al. Diagnostic accuracy of conventional versus sonography-guided fineneedle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Thyroid*, v. 8, n. 1, p. 15-21, 1998. ISSN 1050- 7256.
20. Davies, L.; Welch, H. G. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngol. Head Neck. Surg.*, Chicago, v. 140, n. 4, p. 317-322, 2014.
21. DeLellis, RA, Lloyd, RV, Heitz, PU & Eng, C. Classificação de Tumores da Organização Mundial de Saúde. *Pathology And Genetics of Tumors of Endocrine Organs* (IARC Press, 2004). Este livro descreve a versão mais recente da classificação de tumores da tireoide da Organização Mundial da Saúde.
22. Dibelius G, Mehra S, Clain JB, Urken ML, Wenig BM. Noninvasive anaplastic thyroid carcinoma: report of a case and literature review. *Thyroid.* 2014 Aug;24(8):1319-24. doi: 10.1089/thy.2013.0586. Epub 2014 Jul 2. PMID: 24865498.
23. Du Lingbin, Zhao Zixuan, Zheng Rongshou, Li Huizhang, Zhang Siwei, Li Runhua, Wei Wenqiang, He Jie. Epidemiology of Thyroid Cancer: Incidence and Mortality in China, 2015. *Frontiers in Oncology.* v. 10, p 1702, 2020. ISSN=2234-943X
24. Durante C, Montesano T, Torlontano M, et al. Papillary thyroid cancer: time course of recurrences during postsurgery surveillance. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:636-42.

25. Elizabeth J de Koster, Lioe-Fee de Geus-Oei, Olaf M Dekkers, Ilse van Engen-van Grunsven, Jaap Hamming, Eleonora PM Corssmit, Hans Morreau, Abbey Schepers, Jan Smit, Wim JG Oyen, Dennis Vriens, Utilitário de diagnóstico de Molecular and Imaging Biomarkers in Cytological Indeterminate Thyroid Nodules, *Endocrine Reviews*, Volume 39, Issue 2, April 2018, Pages 154-191, <https://doi.org/10.1210/er.2017-00133>
26. Eloy C, Santos J, Soares P, Sobrinho-Simões M. The preeminence of growth pattern and invasiveness and the limited influence of BRAF and RAS mutations in the occurrence of papillary thyroid carcinoma lymph node metastases. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 28, 2011.
27. Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL. Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* 1996; 6:409-16.
28. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol* 2004; 183:249-56
29. Giudice FS, Squarize CH. The determinants of head and neck cancer: Unmasking the PI3K pathway mutations. *J Carcinog Mutagen* 2013
30. Hamzany, Y. et al. Early death from papillary thyroid carcinoma. *Am. J. Otolaryngol.*, Cherry Hill, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2012.
31. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 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 Jan;26(1):1-133. doi: 10.1089/thy.2015.0020. PMID: 26462967; PMCID: PMC4739132.
32. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell, Cambridge*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
33. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll, Nagore E & Hemminki K 2013 mutações do promotor TERT em melanoma familiar e esporádico. *Ciência* 33:959-961. (doi: 10.1126 / science.1230062).
34. Howlader, N. et al. SEER Cancer Statistics Review 1975–2009 (Populações da safra de 2009). National Cancer Institute [online], (2012).

35. Hegedüs, L. The thyroid nodule. *New England Journal of Medicine*, v. 351, n. 17, p. 1764-1771, 2004. ISSN 0028-4793.
36. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L & Garraway LA 2013 Mutações do promotor TERT altamente recorrentes em melanoma humano. *Ciência* 339:957- 959. (doi: 10.1126 / science.1229259).
37. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. Um relatório da Base de Dados Nacional do Câncer sobre 53.856 casos de carcinoma da tireoide tratados nos EUA, 1985-1995. *Câncer*. 1998; 83 (12): 2638-48.
38. Instituto Nacional do Cancer (INCA) PRÓ-ONCO. Estimativas 2020, Disponível:<http://www.inca.org.br/releases/press/estimativa-2020.html>. (capturado em 01 de janeiro de 2020).
39. Ito, Y. et al. B. Prognosis and prognostic factors of differentiated thyroid carcinoma after the appearance of metastasis refractory to radioactive iodine therapy. *Endocr. J.*, Tokyo, v. 61, n. 8, p. 821-824, 2014
40. Jemal, A. et al. Estatísticas globais de câncer. *CA Cancer J. Clin.* 61, 69–90 (2011).
41. Jin A, Xu J, Wang Y. The role of TERT promoter mutations in postoperative and preoperative diagnosis and prognosis in thyroid cancer. *Medicine (Baltimore)* 2018;97: e11548. 10.1097/MD.00000000000011548
42. Jonklaas, J. et al. The impact of age and gender on papillary thyroid cancer survival. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Springfield, v. 97, n. 6, p. E878-887, 2012.
43. Katoh, H.; Yamashita, K.; Enomoto, T.; Watanabe, M. Classification and general considerations of thyroid cancer. *Ann Clin Pathol*, v. 3, n. 1, p. 1045, 2015.
44. Kent, W. D. et al. Increased incidence of differentiated thyroid carcinoma and detection of subclinical disease. *CMAJ*, Ottawa, v. 177, n. 11, p. 1357-1361, 2007.
45. Kim TH, Kim YN, Kim HI, Park SY, Choe JH, Kim JH, Kim JS, Oh YL, Hahn, Shin JH, et al. 2017b Valor prognóstico da oitava edição da classificação AJCC TNM para carcinoma diferenciado de tireoide. *Oral Oncology* 71:81- 86. (<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.06.004>)
46. Kline TS. *Handbook of fine needle aspiration biopsy cytology*. 2nd. New York: Churchill Livingstone; 1998
47. Kondo, t.; Ezzat, S.; Asa, S. L. Pathogenetic Mechanisms in thyroid follicular – cell neoplasia. *Nature Reviews*. 2006; 6: 292-306.
48. Koss LG. *Diagnostic Cytology and its histopathologic bases*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott; 1992

49. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA*. 2017 Apr 4;317(13):1338-1348. doi: 10.1001/jama.2017.2719.
50. Liu, S., A. Gao, et al. Assessment of molecular testing in fine-needle aspiration biopsy samples: an experience in a Chinese population. *Exp Mol Pathol*, v.97, n.2, Oct, p.292-7.
51. Liu R, Xing M. Mutações do promotor TERT no câncer de tireoide. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23: R143 – R155.
52. Liu X, Bispo J, Shan Y et al. Mutações do promotor TERT altamente prevalentes em cânceres de tireoide agressivos. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20: 603–610.
53. Landa I, Ganly I, Chan Ta et al. Mutações somáticas do promotor TERT frequentes no câncer de tireoide: maior prevalência nas formas avançadas da doença. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E1562 – E1566.
54. Li, N. et al. Impact of enhanced detection on the increase in thyroid cancer incidence in the United States: review of incidence trends by socioeconomic status within the Surveillance, Epidemiology, and End Results Registry, 1980–2008. *Thyroid*, New York, v. 23, n. 1, p. 103-110, 2013.
55. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in Thyroid Cancer Incidence and Mortality nos Estados Unidos, 1974-2013. *JAMA*. 2017; 317 (13): 1338–1348. doi: 10.1001 / jama.2017.2719
56. Liu, R., Zhang, T., Zhu, G. *et al.* Regulation of mutant *TERT* by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/*GABP* in human cancer. *Nat Commun* 9, 579 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03033->
57. Lloyd, Ricardo V. *et al.* tumours of the thyroid gland. *In: LLOYD, Ricardo V et al. (org.). WHO Classification of tumours of endocrine organs. 4th. ed. Lyon: IARC, 2017. p. 65–143.*
58. Livolsi, Virginia A.; Montone, Kathleen T.; Baloch, Zubair W. Pathology of the Thyroid: A review. *In: LUSTER, Markus; DUNTAS, Leonidas, H.; WARTOFSKY, Leonard (org.). The Thyroid and Its Diseases. 1st edition ed. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 455–492. E-book.*

59. Lopes, J.P.R.C. Mutação do gene BRAF na história natural do carcinoma papilar da tireoide: implicações diagnósticas e prognósticas. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina – Universidade do Porto, 2011.
60. Martin, G. S. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell*, Cambrigde, v. 4, n. 3, p. 167-174, 2003.
61. Matsui, J., Yamamoto Y., Funahashi Y., Tsuruoka A., Watanabe T., Wakabayashi T., et al. 2008. E7080, um novo inibidor que tem como alvo múltiplas quinases, tem atividades antitumorais potentes contra o fator de células-tronco produtoras de câncer de pulmão humano de células pequenas H146, com base na inibição da angiogênese. *Int. J. Cancer* 122: 664–671.
62. Mccubrey, J. A.; Steelman, L. S.; Chappell, W. H.; Abrams, S. L. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.
63. Miller KA, Yeager N, Baker K, Liao XH, Refetoff S, Di Cristofano A 2009 Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer research* 69:3689-3694
64. Mohammadi, M.; Hedayati, Mehdi. A Brief Review on The Molecular Basis of Medullary Thyroid Carcinoma. *Cell Journal (Yakhteh)*, v. 18, n. 4, p. 485, 2017.
65. Nachalon Y, Stern-Shavit S, Bachar G, Shvero J, Limon D, Popovtzer A. Aggressive Palliation and Survival in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2015 Dec;141(12):1128-32. doi: 10.1001/jamaoto.2015.2332. PMID: 26512447.
66. Nikiforova, M. N., A. I. Wald, et al. Targeted Next-Generation Sequencing Panel (ThyroSeq) for Detection of Mutations in Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, v.98, n.11, Nov, p.1852-60. 2013.
67. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, Yip L, Seethala RR, Tublin ME, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforova MN. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically

- indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Nov;96(11):3390-7. doi: 10.1210/jc.2011-1469. Epub 2011 Aug 31. PMID: 21880806; PMCID: PMC3205883.
68. Nikiforov Y.E. *Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets.* Mod Pathol. 2008.
 69. NCCN (2013) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Carcinoma da tireóide (verso 2.2013). Fort Washington, PA: National Comprehensive Cancer Network.
 70. Okamoto, K., Kodama K., Takase K., Sugi NH, Yamamoto Y., Iwata M., et al. 2013. Atividades antitumorais do inibidor multitirosina quinase lenvatinib (E7080) contra modelos de tumor impulsionados pela fusão do gene RET. *Cancer Lett.* 340: 97– 103.
 71. Pellegriti, G. et al. Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J. Cancer Epidemiol.*, Cairo, 2013.
 72. Poller DN, Baloch ZW, Fadda G, Johnson SJ, Bongiovanni M, Pontecorvi A, et al. Thyroid FNA: New classifications and new interpretations. *Cancer Cytopathol.* 2016;124(7):457–66.
 73. Ragazzi M, Ciarrocchi A, Sancisi V, Gandolfi G, Bisagni A, Piana S. Update on anaplastic thyroid carcinoma: morphological, molecular, and genetic features of the most aggressive thyroid cancer. *Int J Endocrinol.* 2014; 2014:790834. doi: 10.1155/2014/790834. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25214840; PMCID: PMC4158294.
 74. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Advances in the molecular pathogenesis of thyroid cancer: lessons from the cancer genome. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(5): 203-
 75. Rodrigues, BM, Toledo, KA & Nogueira, CR. (2015). Corpo humano: diversos sistemas interligados. *Aprendendo Ciência*, 4(1): 79-83.
 76. Rosário, P. W. et al. Nódulo tireoidiano e câncer diferenciado de tireoide: atualização do consenso brasileiro. *Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia.* São Paulo. Vol. 57, n. 4 (jul. 2013), p. 240-264, 2013. ISSN 0004-2730.
 77. Schulten, H. J; Salama, S.; Al-Ahmadi, A. et al. Comprehensive survey of HRAS, KRAS, and NRAS mutations in proliferative thyroid lesions from an ethnically diverse population. *Anticancer research*, v. 33, n. 11, p. 4779-4784, 2013.
 78. Seib, Carolyn Dacey; SOSA, Julie Ann. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. [S. l.: s. n.] Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.10.002>
 79. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan;68(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21442. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29313949.

80. SOBRAL, Carla Souza Pereira; MAGALHÃES, Marcelo; FARIA, Manuel dos Santos. Thyroid Cancer and Acromegaly. *In: ENGIN, Omer (org.). Knowledges on Thyroid Cancer. [S. l.]: IntechOpen, 2019. E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.84541>.*
81. Soares P, Sobrinho-Simoes M. Is BRAF mutation screening useful for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer? *Future Oncol.* 2011 Oct;5(8):1225-9.
82. Sung TY, Choi SH, Lee JM, Jeong JJ, Kang SW, Chung WY. Innovative in vitro chemohormonal drug therapy for refractory thyroid carcinomas. *Journal of Korean medical science.* 2012 Jul;27(7):729-35. PubMed PMID: 22787366. PubMed Central PMCID: 3390719, 2015. ISBN 0323297382.
83. Tang, K.; Lee, Chen-Hsen. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 73, n. 3, p. 113- 128, 2010.
84. Tyner, J.W.; Erickson, H.; Deininger, M.W.; et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. *Blood.*113:1749–55, 2009.
85. Vallarelli A. F., Rachakonda P. Sivaramakrishna, André J., Heidenreich B., Riffaud L., Bensussan A., Kumar R., Dumaz N. TERT promoter mutations in melanoma render TERT expression dependent on MAPK pathway activation. *Oncotarget.* 2016; 7: 53127-53136. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/10634/text/>
86. Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, et al. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2004; 151:779-86.
87. Veiga, L. H. et al. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997-2008. *Thyroid, New York*, v. 23, n. 6, p. 748-757, 2013.
88. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H et al. Frequência de mutações do promotor TERT em cânceres humanos. *Nat Commun* 2013; 4: 2185.
89. White, B.A, Porterfield, S.P. (2013). *Endocrine and Reproductive Physiology: Mosby Physiology Monograph Series. Endocrine and Reproductive Physiology: Mosby Physiology Monograph Series.* 1-302.
90. Xing M, Liu R, Liu X et al. As mutações do promotor BRAF V600E e TERT identificam cooperativamente o câncer papilar de tireoide mais agressivo com maior recorrência. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2718–2726.

91. Xing M 2010 Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid* 20:697-706
92. Yip L, Nikiforova Mn, Carty Se, et al. Optimizing surgical treatment of papillary thyroid carcinoma associated with BRAF mutation. *Surgery* 2009; 146:1215-23.
93. Yoo, F. et al. Characteristics of incidentally discovered thyroid cancer. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.*, Chicago, v. 139, n. 11, p. 1181-1186, 2013.
94. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:71-7.

ARTIGO

TÍTULO PRELIMINAR:

MUTAÇÕES NOS GENES *BRAF* E *TERT*: POTENCIAIS MARCADORES ASSOCIADOS À ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO EM PORTADORES CARCINOMA DIFERENCIADO DA TIREOIDE.

Introdução

O carcinoma de tireoide (CT) é a neoplasia mais frequente do sistema endócrino e compreende cerca de 3,4% de todos os cânceres diagnosticados anualmente no mundo (Bray et al., 2018a). Os CT são classificados de acordo com os tipos histológicos em diferenciados, medulares e anaplásicos, sendo os tipos diferenciados responsáveis por 90 a 95% dos casos tumores tireoidianos (Haugen et al., 2016), de forma que o seu subtipo histológico carcinoma papilífero da tireoide (CPT) é a neoplasia maligna mais comum da tireoide, compreendendo 80–90% de todas as doenças malignas nessa glândula (Nikiforov, 2014).

A desregulação da via de sinalização intracelular MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos) tem sido descrita como componente fundamental na tumorigênese da tireoide (Tang, 2010). Esta via de sinalização atua principalmente na regulação do ciclo celular e, portanto, alterações na mesma estariam relacionadas ao desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (Cuevas et al., 2007; Moorwood et al., 2010; Lin et al., 2015).

Mutações no gene *BRAF*, um membro da via MAPK, têm sido apontadas como um importante evento na patogênese do CT em adultos. Dentre tais alterações genéticas, a mutação pontual *BRAFV600E* tem sido frequentemente observada em CPT e corresponde a mais de 90% das mutações do gene *BRAF* descritas nesse tipo tumoral (Czarniecka et al., 2015; Katoh et al., 2015). Por outro lado, nos carcinomas foliculares da tireoide (CFTs), alterações no gene *RAS*, outro importante membro da MAPK, parecem ser o principal fator genético ligado ao processo de tumorigênese (Reuter et al., 2000).

Evidências têm sugerido que alterações no gene da transcriptase reversa da telomerase humana (*TERT*) estejam associadas ao desenvolvimento de CT (Alzahrani et

al., 2016). *TERT* codifica a subunidade da transcriptase reversa catalítica da enzima telomerase, sendo essencial para a manutenção da integridade cromossômica e estabilidade do genoma (Alzahrani et al., 2016). Mutações no promotor desse gene podem levar a um aumento das suas atividades transcricionais resultando em maior risco de recorrência e menor sobrevida de pacientes com CPT (Kim 2017; Liu R 2016).

Estudos recentes têm demonstrado uma estreita relação entre a hiperativação da via MAPK – causada principalmente por mutações nos oncogenes *BRAF* ou *NRAS* – com o aumento da atividade da telomerase em tumores portadores de mutação no promotor *TERT* (Xing et al., 2014; Vallarelli et al., 2016; Liu et al., 2018). Em termos moleculares, a ativação constitutiva da MAPK parece regular positivamente o fator de transcrição ETS1, o qual adquire maior afinidade de ligação à região promotora de *TERT* mutada, gerando o aumento da transcrição desse gene em células neoplásicas (Xing et al., 2014; Liu et al., 2018). Em adição, também tem sido proposto que a hiperativação da MAPK poderia causar aumento da fosforilação e ligação da proteína FOS ao promotor GABPB levando a uma maior expressão desse gene e consequente formação do complexo GABP que atua como um fator de transcrição de *TERT* (Liu et al. 2018). Apesar dos estudos supracitados, a possível associação entre a via MAPK e a mutação do promotor *TERT* permanece incerto.

O estudo de alterações moleculares em membros da via de sinalização MAPK, tais como *BRAF*, *RAS* e no promotor *TERT*, parece ser uma estratégia promissora na identificação de marcadores genéticos relacionados ao processo de transformação neoplásica, pois estes podem auxiliar numa melhor distinção entre tumores benignos e malignos, sinaliza um comportamento biológico mais agressivo, prognóstico e tratamento mais adequado aos pacientes (Holohan et al., 2013). Diante disto, este estudo visa avaliar o impacto prognóstico das principais alterações genéticas em membros das vias MAPK e de ativação da telomerase em pacientes com tumores de tireoide de diferentes tipos histológicas em uma população do nordeste do Brasil.

Materiais e métodos

Participantes e amostras

Um estudo transversal foi conduzido no intuito de avaliar impacto prognóstico de alterações moleculares em pacientes com diagnóstico ou suspeita diagnóstica de

neoplasias da tireoide acompanhados pelo Hospital do Câncer Aldenora Bello (HCBA), São Luís, Maranhão, Brasil.

Esta investigação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário da UFMA (Parecer número 2.674.175). Todos os pacientes foram informados sobre os protocolos de pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foram incluídos 149 pacientes de ambos os sexos com nódulo suspeito de neoplasia na tireoide tratados cirurgicamente entre 2018 à 2021 que atenderam aos critérios de inclusão e não apresentou nenhum parâmetro de não inclusão, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Destes, um total de 112 pacientes foram selecionados por apresentar CDT. Foram excluídos pacientes com carcinoma medular e neoplasias benignas diagnosticado a partir do exame histopatológico.

Extração de DNA genômico e tipagem molecular por PCR em tempo real

O DNA genômico foi extraído a partir de tecido fresco utilizando o Biopur Kit de Extração Mini Spin Plus (Mebius, PR, Brasil). Posteriormente, foi realizada a PCR em tempo real para avaliação da mutação *BRAFV600E* utilizando ensaios rhAmp™ SNP Genotyping System (IDT – Integrated DNA Technologies, Coralville, USA). As reações de amplificação foram compostas por 5ng de DNA e receberam a adição Master Mix, Repórter, rhAmp SNP assay, H₂O nucleasfree (IDT – Integrated DNA Technologies). A PCR em tempo real foi realizada em equipamento Light Cycler® Nano SW 1.0, seguindo as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 68 °C a 20 segundos. Controles positivos (amostras com genótipos conhecidos para homozigoto selvagem, heterozigoto e homozigoto variante, para o gene estudado) e controles negativos foram utilizados em cada reação e a discriminação alélica foi realizada pela medida da fluorescência final dos fluoróforos FAM® (alelo selvagem) e VIC® (alelo variante) presentes nas diferentes sondas utilizadas (IDT – Integrated DNA Technologies, Coralville, USA).

Análise de mutação por sequenciamento de DNA

A análise em *NRAS* (códon 61) e na região promotora de *TERT* (posições C228T e C250T), foram realizadas as reações de PCR compostas por Tampão10X (Tris-HCl 200 M PH 8,4 e KCl 500 mM), 2,4 mM de MgCl₂, 0,24 mM de cada dNTP's, 0,15 µM de

ambos primers senso e anti-senso, uma unidade de Taq DNA polimerase e 50ng de DNA genômico. As reações de amplificação ocorreram em termociclador GeneAmp®PCR System 9700 com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 30 segundos a 95°C (desnaturação), 45 segundos a 55°C (anelamento) e 45 segundos a 72°C (extensão). A extensão final foi realizada a 72°C durante 2 minutos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, purificados com o kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) e posteriormente sequenciados pelo método de terminação de cadeia dideoxi utilizando equipamento ABI 3500 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento foram avaliados utilizando o programa ChromasPro.

Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando os recursos do software GraphPad Prism versão 9.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). A estatística descritiva foi realizada utilizando medidas de frequência absoluta e relativa. Os resultados foram apresentados por meio de tabelas, gráfico de barras e setores. As variáveis categóricas foram comparadas através do teste Qui-quadrado ou exato de Fisher. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% ($P < 0,05$).

Resultados

Um total de 112 amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de CT no exame histopatológico foram incluídas no presente estudo, sendo 101 dos casos do sexo feminino e 11 do sexo masculino. Todos os pacientes foram avaliados quanto a presença de mutação em *BRAF*. Contudo, devido às limitações técnicas e logísticas inerentes ao sequenciamento, até o momento foi analisada a presença de mutação nos genes *NRAS* e *TERT* em 87 e 84 amostras, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta a classificação histopatológicas das lesões diagnosticadas. A maioria dos tumores incluídos foram diagnosticadas como CPT (96,43%). Deste grupo, 62,04% (67/112) apresentavam a forma clássica deste tipo de lesão. Foi detectada a mutação *BRAFV600E* em 53,57% (60/112) dos casos. Considerando a presença de alterações em *NRAS*, 6 dos 87 pacientes avaliados (6,89%) apresentaram a mutação *NRASQ61R*, enquanto que no promotor *TERT* foi identificada a mutação C228T em 3 das 84 amostras avaliadas (3,57%).

As características histopatológicas dos carcinomas estão expressas na Tabela 2. A maior parte dos tumores apresentava até 1 cm de tamanho (37,5%) ou média entre 1 e 2

cm (40,18%). Observou-se as seguintes frequências de achados histopatológicos nos tumores: presença de linfonodos (29,46%), presença de multicentricidade (23,21%), invasão vascular (33,93%), presença de extensão extratiroideia (20,54%), margens comprometidas (2,68%), alto risco de recorrência (9,82%).

A Classificação Bethesda está ilustrada na Figura 2. A maioria das lesões malignas foi classificação como Bethesda V (68,75%).

O marcador *BRAFV600E* foi detectado apenas em tumores papilífero ($P = 0,043$), ocorrendo em 55,56% dos tumores avaliados (Figura 2).

A Tabela 3 expressa a frequência de detecção do marcador *BRAFV600E* de acordo com os achados histopatológicos. Observou-se que a frequência de *BRAFV600E* foi estatisticamente mais elevada ($P = 0,033$) em tumores com tamanho maior que 1 até 2 cm (68,89%). Houve maior frequência deste marcador em tumores com invasão vascular ($P = 0,033$), com extensão extratireoidea ($P = 0,008$) e em lesões classificadas como Bethesda V e VI ($P = 0,002$).

A Tabela 4 apresenta a descrição dos casos com identificação de *TERT C228T* nas amostras avaliadas. Observou-se detecção de simultânea de *BRAFV600E* em 2 das 3 da amostra positivas para *TERT C228T*. A presença de linfonodos, multicentricidade invasão vascular, extensão foi detectada nas amostras que havia detecção de ambos os fatores genéticos. Risco Alto e Bethesda VI foi observado nas amostras com detecção dos dois fatores. Além disso, não foi detectado *NRAS Q61R* em nenhuma das 3 amostras.

A análise de predição dos fatores moleculares para a presença dos achados histopatológicos está expressa na Tabela 5. Os coeficientes ajustados mostraram que a presença de mutação *BRAFV600E* foi relacionada presença de extensão extratireoidiana (Coeficiente = 0,252; $P = 0,015$) e maior grau Bethesda (Coeficiente = 0,173; $P = 0,028$), *NRASQ61R* foi relacionada a menor tamanho tumoral (Coeficiente = -0,799; $P = 0,014$) e grau mais baixo de PAAF (Coeficiente = -0,300; $P = 0,038$). Além disso, a alteração *TERT C228T* foi associada a maior tamanho de tumor (Coeficiente = 1,074; $P = 0,012$) e aumento do risco de recorrência (Coeficiente = 0,780; $P = 0,042$).

Tabela 1. Distribuição do tipo histopatológico da amostra de carcinoma diferenciado de tireoide incluída no estudo.

Variáveis	n	(%)
Tipo histopatológico		
Carcinoma papilífero	108	(96,43)
Carcinoma folicular	3	(2,68)
Carcinoma de células de Hurtle	1	(0,89)
Variante histológica (Carcinoma papilífero)		
Clássica	67	(62,04)
Folicular	34	(31,48)
Células altas	4	(3,70)
Células colunares	3	(2,78)
<i>BRAFV600E</i>		
Positivo	60	(53,57)
Negativo	52	(46,43)
<i>NRASQ61R</i>		
Positivo	6	(6,89)
Negativo	81	(93,11)
<i>TERT C228T</i>		
Positivo	3	(3,57)
Negativo	81	(96,43)

Tabela 2. Características histopatológicas do carcinoma diferenciado de tireoide.

Variáveis	n	(%)
Tamanho do tumor		
Até 1 cm	42	(37,50)
Maior que 1 cm até 2 cm	45	(40,18)
Maior que 2 cm até 4 cm	19	(16,96)
Maior que 4 cm	5	(4,46)
Sem informação	1	(0,89)
Linfonodo		
Presente	33	(29,46)
Ausente	62	(55,36)
Sem informação	17	(15,18)
Multicentricidade		
Sim	26	(23,21)
Não	74	(66,07)
Sem informação	12	(10,71)
Invasão vascular		
Sim	38	(33,93)
Não	72	(64,29)
Sem informação	2	(1,79)
Extensão extratiroideia		
Sim	23	(20,54)
Não	88	(78,57)
Sem informação	1	(0,89)
Margens livres		
Livre	108	(96,43)
Comprometida	3	(2,68)
Sem informação	1	(0,89)
Risco de recorrência		
Baixo	66	(58,93)
Intermediário	33	(29,46)
Alto	11	(9,82)
Sem informação	2	(1,79)

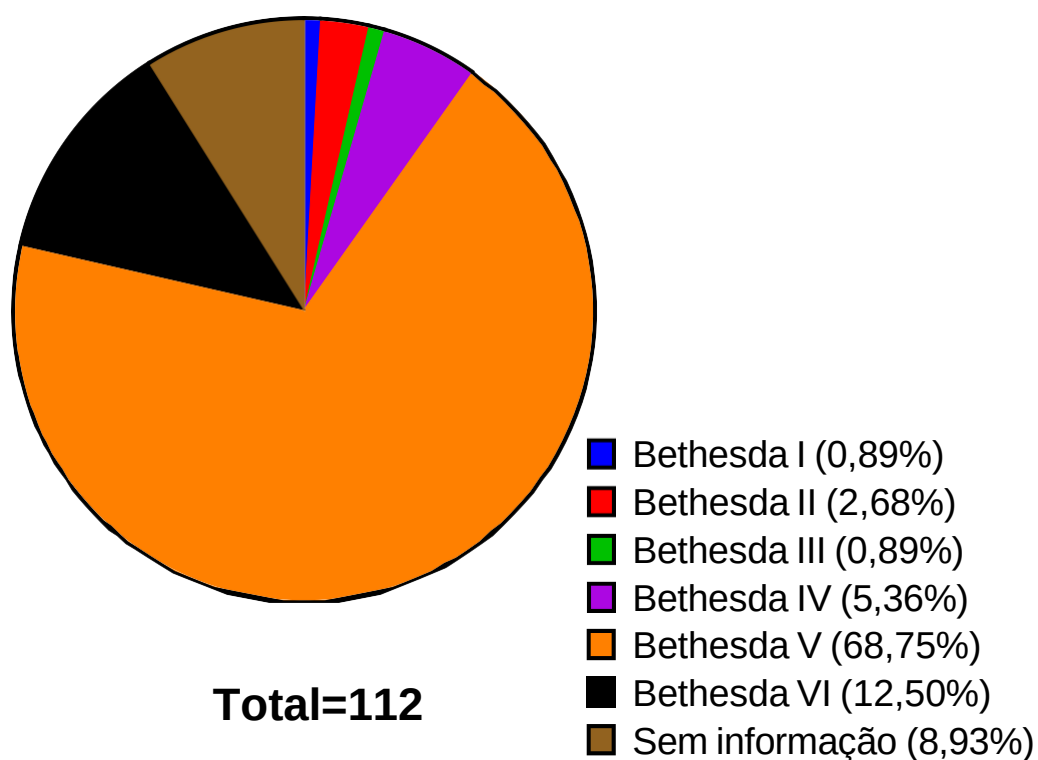


Figura 1. Distribuição das lesões de tireoide de acordo com a Classificação Bethesda.

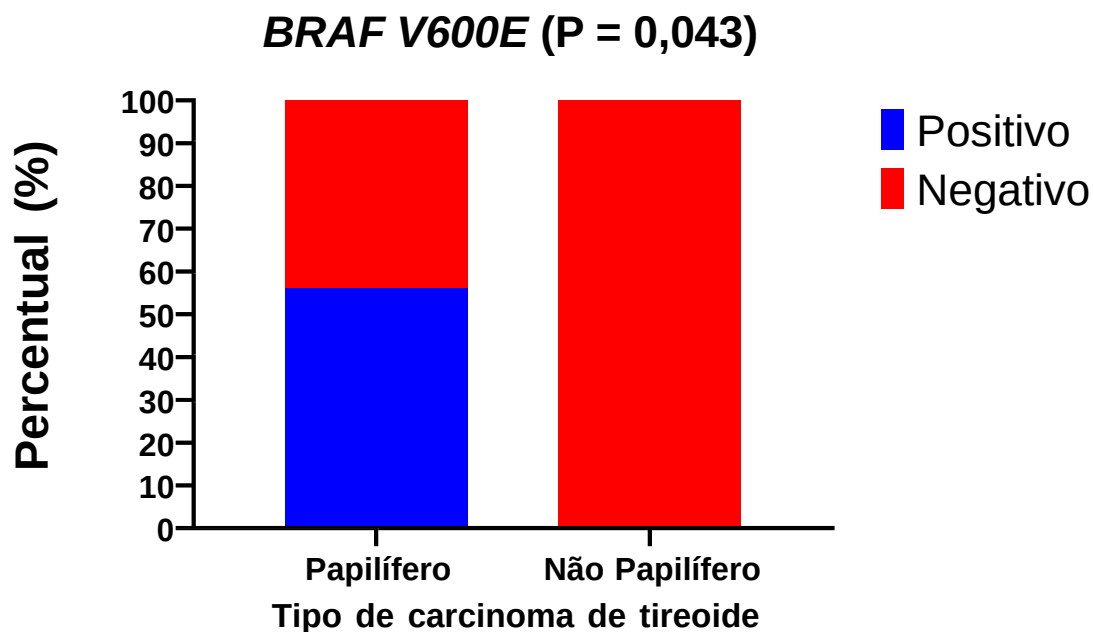


Figura 2. Distribuição da presença de BRAF V600E de acordo com o tipo de carcinoma

de tireoide.

Tabela 3. Distribuição da presença de *BRAF V600E* de acordo com as características identificadas no exame histopatológico.

Variáveis	BRAF V600E				P valor
	Positivo		Negativo		
	N	(%)	N	(%)	
Tamanho do tumor					0,033*
Até 1 cm	19	(45,24)	23	(54,76)	
Maior que 1 cm até 2 cm	31	(68,89)	14	(31,11)	
Maior que 2 cm	10	(41,67)	14	(58,33)	
Linfonodo					0,329
Presente	21	(63,64)	12	(36,36)	
Ausente	33	(53,23)	29	(46,77)	
Multicentricidade					0,262
Sim	17	(65,38)	9	(34,62)	
Não	39	(52,70)	35	(47,30)	
Invasão vascular					0,033*
Sim	26	(68,42)	12	(31,58)	
Não	34	(47,22)	38	(52,78)	
Extensão extratiroidea					0,008*
Sim	18	(78,26)	5	(21,74)	
Não	42	(47,73)	46	(52,27)	
Margens livres					0,593
Livre	59	(54,63)	49	(45,37)	
Comprometida	1	(33,33)	2	(66,67)	
Risco de recorrência					0,214
Baixo	31	(46,97)	35	(53,03)	
Intermediário	20	(60,61)	13	(39,39)	
Alto	8	(72,73)	3	(27,27)	
Bethesda					0,002*
I a IV	1	(9,09)	10	(90,91)	
V e VI	53	(58,24)	38	(41,76)	

*Diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,05$).

Tabela 4. Descrição dos achados histopatológicas nos três casos com detecção de *TERT C228T*.

Amostra	<i>BRAF</i> <i>V600E</i>	Avaliação histopatológicos							
		Tamanho	Linfonodo	Multicêntrico	Invasão vascular	Extensão extratiroidea	Margens	Risco de recorrência	Bethesda
Amostra 37	Positivo	> 2 cm	Ausente	Não avaliado	Sim	Sim	Livre	Alto	VI
Amostra 39	Positivo	> 2 cm	Presente	Sim	Não	Não	Livre	Alto	VI
Amostra 50	Negativo	> 2 cm	Não avaliado	Não avaliado	Não	Não	Livre	Baixo	Não avaliado

Tabela 5. Modelos de regressão linear múltipla dos fatores moleculares na predição dos desfechos histopatológicos avaliados.

Variáveis	R ²	Coefficiente de regressão	P valor
Desfecho tamanho do tumor	0,150		
<i>BRAFV600E</i>		-0,060	0,714
<i>NRASQ61R</i>		-0,799	0,014*
<i>TERT C228T</i>		1,074	0,012*
Desfecho multicentricidade	0,051		
<i>BRAFV600E</i>		0,038	0,718
<i>NRASQ61R</i>		0,007	0,970
<i>TERT 228</i>		0,769	0,074
Desfecho invasão vascular	0,081		
<i>BRAFV600E</i>		0,197	0,076
<i>NRASQ61R</i>		-0,259	0,217
<i>TERT C228T</i>		-0,058	0,834
Desfecho extensão extratireoidiana	0,102		
<i>BRAFV600E</i>		0,252	0,015*
<i>NRASQ61R</i>		-0,155	0,425
<i>TERT C228T</i>		0,008	0,973
Desfecho margens comprometidas	0,014		
<i>BRAFV600E</i>		-0,039	0,380
<i>NRASQ61R</i>		-0,063	0,457
<i>TERT C228T</i>		-0,037	0,740
Desfecho risco de recorrência	0,132		
<i>BRAFV600E</i>		0,256	0,090
<i>NRASQ61R</i>		-0,381	0,183
<i>TERT C228T</i>		0,780	0,042*
Desfecho presença de linfonodo	0,044		
<i>BRAFV600E</i>		0,056	0,652
<i>NRASQ61R</i>		-0,304	0,194
<i>TERT C228T</i>		0,138	0,685
Desfecho grau PAAF	0,162		
<i>BRAFV600E</i>		0,173	0,028*
<i>NRASQ61R</i>		-0,300	0,038*
<i>TERT C228T</i>		0,026	0,909

R² = Coeficiente de determinação. *Diferenças estatisticamente significantes (P < 0,05) .

Discussão

O câncer diferenciado da tireoide (CDT) representa a grande maioria dos cânceres nessa glândula e sua incidência tem aumentado vertiginosamente nas últimas três décadas (Brito et al., 2015). O predomínio do sexo feminino observado em nossa casuística corrobora o estudo de Salamanca et al (2018) onde foi verificado um diagnóstico de CT três vezes maior em mulheres.

O tipo mais frequente de CT nesse estudo foi o CPT (96,43%), semelhante aos dados publicados na literatura (Colonna et al. 2015). Em um estudo retrospectivo de 36.725 pacientes, encontrou que o CPT foi diagnosticado em 91% dos casos e o carcinoma folicular em 9% dos casos restantes (Oyer et al. 2014).

Na nossa casuística, foi detectada presença de *BRAFV600E* em 53,57% dos casos de CT, sendo todos tumores do tipo CPT. Levando-se em consideração apenas esse tipo histológico, a frequência de *BRAFV600E* foi 55,55% (60/108). Dados da literatura mostram que a prevalência dessa alteração genética no CPT é extremamente variada, oscilando entre 27,3 a 90,2% (Tufano et al. 2012; Vuong et al. 2017). Diante dessa ampla variação de dados, nos últimos anos, estudos em diferentes populações e áreas geográficas, têm sido realizados a fim de esclarecer a prevalência da mutação *BRAFV600E* nas amostras de CPT (Fugazzola et al., 2006).

Considerando o impacto de *BRAFV600E* sobre parâmetros histopatológicos em nosso trabalho, verificou-se uma estreita associação desse marcador com tamanho tumoral, invasão vascular, EET, e maior grau Bethesda na PAAF, sendo esse, portanto, um potencial marcador prognóstico específico de CPTs.

O tamanho do tumor é um fator prognóstico muito discutido, especialmente no CPT, e a investigação e o tratamento de pequenos nódulos tireoidianos são abordados de forma diferente em alguns estudos (Huang, 2016). Portanto, a investigação da presença de *BRAFV600E* pode ser importante para um direcionamento terapêutico mais adequando desses microtumores.

Ao associar classificação sistema Bethesda e a mutação *BRAFV600E* obtivemos significância estatística ($P = 0,002$) para o diagnóstico suspeito de malignidade (Bethesda V). Estudos em citologia mostra uma alta concordância entre estes, indicando o potencial desse marcador no auxílio diagnóstico citológico (Park., et al 2016).

Em nossa casuística, 20,54% dos pacientes apresentaram a extensão extratireoidiana (EET) sendo esta considerada um importante fator de mau prognóstico no CPT. Uma meta-análise avaliou estudos com 7951 pacientes, verificou que 25,9% dos

pacientes tiveram EET mínima e se relacionou com maior RR quando comparado com aqueles sem EET (RR = 1,70, IC 95%: 1,26-2,28) (Yin et al. 2016). Quando analisada a relação entre *BRAFV600E* e EET em nossos pacientes, foi observada uma estreita associação entre ambas variáveis (P = 0,008). Frente a esses fatos podemos inferir que a presença da mutação *BRAFV600E* está relacionada a um pior prognóstico em CPTs. Tais achados estão de acordo com estudos prévios onde a presença de alteração nesse gene também foi associada a características clássicas de agressividade tumoral como a EET (Nikiforova et al., 2003; Rivera et al., 2010).

Considerando as alterações no promotor *TERT*, não foi encontrada nenhuma mutação na posição C250T. Entretanto, no grupo de portadores da mutação C228T foi verificado alto risco de recorrência (P = 0,002) e tumores maiores (P = 0,014), indicando pior prognóstico da doença (Liu, 2013). Outras investigações também têm sugerido uma associação do *TERT* C228T com risco de recorrência de CT (Liu, X. et al, 2013; Vinagre et al, 2013). Segundo esses autores, essa mutação do *TERT* estaria associada à tumores clinicamente agressivos e de mau prognóstico, principalmente em casos de CPT (Melo et al, 2014).

Em relação à presença simultânea das mutações *BRAFV600E* e *TERT* C228T, verificou-se a coexistência de ambas alterações em dois pacientes analisados. Xing et al. (2014) observaram que casos de CPT com coexistência de ambas alterações se apresentavam clinicamente mais agressivos, desenvolvendo maiores taxas de recorrência quando comparados aos tumores que possuíam apenas uma da mutação. Alguns estudos também têm sugerido que a presença de mutações da região promotora do *TERT* poderia promover e auxiliar no surgimento de alterações genéticas adicionais, tais como a mutação *BRAFV600E* (Landa et al, 2013; Liu, X. et al, 2014b).

Uma metanálise, Moon et al. analisou o papel das mutações *BRAFV600E* e *TERT* C228T no prognóstico de paciente com CPT e verificou que a mutação *TERT* isolada tem pouco impacto; no entanto, existe uma forte relação da associação dessas duas mutações com um pior prognóstico, inclusive com maior mortalidade. Vários estudos relataram que mutações no promotor *TERT* estão associadas a características clínico-patológicas agressivas, especialmente quando mutações *BRAFV600E* também foram identificadas, pacientes com estas mutações são mais propensos a desenvolver persistência ou recorrência tumoral (Jin et al., 2016; Xing et al., 2014). No entanto, outro estudo observou resultados contrastantes (De Biase et al., 2015).

Em relação ao gene *NRAS*, 5,6% dos pacientes com CT - exclusivamente CPT -

apresentaram positividade para a variante CAA > CGA (Q61R) no códon 61. Essa frequência de mutação em nosso estudo parece inferior ao relatado por investigações prévias onde tal alteração foi identificada em 10 a 20% de CPT (variante folicular), 40 a 50% de CFT e 20 a 40% de carcinomas anaplásicos (Capella 1991, Nikiforov, 2008). Um aspecto interessante em nossos achados foi a associação da mutação *NRAS*Q61R a um menor tamanho tumoral ($P=0,024$) e ao e grau mais baixo da PAAF, o que tenderia a reduzir a indicação dessa alteração como marcador de pior prognóstico.

Diante desse contexto, os nossos achados encorajam a ampliação da investigação de mutações nos genes *BRAF* e *TERT* como potenciais marcadores genéticos de prognóstico associados à estratificação de risco visando a obtenção de maior racionalidade nas decisões terapêuticas.

Referências

1. Alzahrani AS, Alsaadi R, Murugan AK, Sadiq BB. TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. *Horm Cancer*. 2016 Jun;7(3):165-77. doi: 10.1007/s12672-016-0256-3. Epub 2016 Feb 22. PMID: 26902827
2. Bray, Freddie *et al*. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
3. Capella, G.; Cronauer-Mitra, S.; Pienado, M.A.; Perucho, M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect*. 1991 Jun; 93:125-31
4. Colonna, M. *et al*. Tendências recentes na incidência, distribuição geográfica e sobrevivência do câncer papilar de tireoide na França. *Cancer Epidemiol*. 39 (4), 511–518 (2015).
5. Cuevas, B. D.; Abell, A. N.; Johnson, G. L. Role of mitogen-activated protein kinase Epidêmico kinases in signal integration. *Oncogene*, v. 26, n. 22, p.3159-3171, 2007.
6. Czarniecka, A.; Oczko-Wojciechowska, M.; Barczyński, M. Braf V600e mutation in prognostication of papillary thyroid cancer (PTC) recurrence. *Gland surgery*, v. 5, n. 5, p. 495, 2015.
7. Fugazzola, L.; Puxeddu, E.; Avenia, N.; Romei, C.; Cirello, V.; Cavaliere, A.; Faviana, P. ET AL. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:455–64.
- 8.
9. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 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 Jan;26(1):1-133. doi: 10.1089/thy.2015.0020. PMID: 26462967; PMCID: PMC4739132.
10. Jin L, Chen E, Dong S, et al. Mutações do promotor BRAF e TERT na

agressividade do carcinoma papilífero de tireoide: um estudo com 653 pacientes. *Oncotarget*. 2016; 7 (14): 18346-18355.

11. Katoh, H.; Yamashita, K.; Enomoto, T.; Watanabe, M. Classification and general considerations of thyroid cancer. *Ann Clin Pathol*, v. 3, n. 1, p. 1045, 2015.

12. Kim TH, Kim YN, Kim HI, Park SY, Choe JH, Kim JH, Kim JS, Oh YL, Hahn, Shin JH, et al. 2017b Valor prognóstico da oitava edição da classificação AJCC TNM para carcinoma diferenciado de tireoide. *Oral Oncology* 7181-86. (<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.06.004>)

13. Landa I, Ganly I, Chan Ta et al. Mutações somáticas do promotor TERT frequentes no câncer de tireoide: maior prevalência nas formas avançadas da doença. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: E1562 – E1566.

14. Lin, X.; Li, X.; MA, H. Overexpression of LC3 in papillary thyroid carcinomas and lymph node metastases. *Acta Chirurgica Belgica*, v. 115, p. 356-363, 2015.

15. Liu, R., Zhang, T., Zhu, G. *et al.* Regulation of mutant *TERT* by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/*GABP* in human cancer. *Nat Commun* 9, 579 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03033->

16. Liu X, Bispo J, Shan Y et al. Mutações do promotor TERT altamente prevalentes em cânceres de tireoide agressivos. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20: 603–610.

17. Liu R, Xing M. Mutações do promotor TERT no câncer de tireoide. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23: R143 – R155.

18. Melo, M. et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Springfield, v. 99, n. 55, p. E754-765, 2014.

19. Moon S, Park YJ, Kim EK, Bae JY, Kim J. A transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) promove a invasão do câncer modulando a catepsina D por meio da resposta de crescimento precoce (EGR) -1. *Cancer Lett*. 2016; 370 (2): 222–231.

20. Moorwood, K., Engstrom, W., Ward, A. The role of scaffold proteins in JNK signalling. *Cell Proliferation*, v. 43, p. 56–66, 2010.

21. Nikiforov Y.E. Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. *Mod Pathol*. 2008.

22. Oyer SL, Fritsch VA, Lentsch EJ Comparison of survival rates between papillary and follicular thyroid carcinomas among 36,725 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2014; 123:94-100.
23. Park, Y. M. et al. Predictive factors of right paraesophageal lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: Single center experience and meta-analysis. *PlosOne*, v. 12, n. 5, p. 1-10, 2017.
24. Rivera, M. et al. Histopathologic characterization of radioactive iodine-refractory fluorodeoxyglucose-positron emission tomography-positive thyroid carcinoma. *Cancer*, New York, v. 113, n. 1, p. 48-56, 2008.
25. Tang, K.; Lee, Chen-Hsen. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 73, n. 3, p. 113- 128, 2010.
26. Tallini, G., de Biase, D., Durante, C. *et al.* BRAF V600E e estratificação de risco de microcarcinoma de tireóide: um estudo multicêntrico patológico e clínico. *Mod Pathol* 28, 1343–1359 (2015). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.92>
27. Vallarelli A. F., Rachakonda P. Sivaramakrishna, André J., Heidenreich B., Riffaud L., Bensussan A., Kumar R., Dumaz N. TERT promoter mutations in melanoma render TERT expression dependent on MAPK pathway activation. *Oncotarget*. 2016; 7: 53127-53136. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/10634/text/>
28. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H et al. Frequência de mutações do promotor TERT em cânceres humanos. *Nat Commun* 2013; 4: 2185.
29. Xing M, Liu R, Liu X et al. As mutações do promotor BRAF V600E e TERT identificam cooperativamente o câncer papilar de tireoide mais agressivo com maior recorrência. *J Clin Oncol* 2014; 32: 2718–2726.
30. Yin, DT, Yu, K., Lu, RQ, Li, X., Xu, J., & Lei, M. (2016). Impacto prognóstico da extensão extratireoidiana mínima no carcinoma papilífero da tireoide. *Medicine*, 95 (52), e5794. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005794>
31. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 2003; 120:71-7.

ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PATOGÊNESE MOLECULAR E FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AOS TUMORES EPITELIAIS DA TIREOIDE

Pesquisador: Manuel dos Santos Faria

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 87544318.1.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.674.175

Apresentação do Projeto:

Introdução

O câncer de tireoide é a neoplasia mais comum do sistema endócrino e representa cerca de 1% de todos os novos casos de câncer diagnosticados no mundo (Leenhardt et al., 2004; Nikiforova e Nikiforov, 2008). No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) mostram que os tumores da tireoide ocupam a quinta posição entre as neoplasias com maiores incidências em mulheres (Brasil, 2014). Embora o câncer de tireoide geralmente apresente um prognóstico favorável, a taxa de mortalidade por essa neoplasia tem se elevado nas últimas décadas (Leenhardt et al., 2004; Brito et al., 2011; Santos et al., 2015). Aproximadamente 90% dos tumores tireoidianos primários são do tipo epitelial originado de células foliculares (Haugen et al., 2016). Levando-se em consideração seu grau de diferenciação celular, os carcinomas da tireoide podem ser classificados em diferenciados (CDT), pouco diferenciados (CPDT) e anaplásicos (CAT). Os CDT incluem os carcinomas papilífero (CPT) e folicular (CFT) que representam aproximadamente 80% e 15% das neoplasias tireoidianas Respectivamente. Os CPDT e CAT incluem menos de 5% dos casos de câncer de tireoide e são considerados os tipos tumorais mais agressivos (Hundahl et al., 1998). Estudos observacionais por meta-análise têm apontado a obesidade como um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de tiroide. Segundo esses estudos, pessoas obesas possuem 55% mais risco de desenvolver esse tipo tumoral em comparação a pessoas não obesas. Entretanto, esses trabalhos não identificaram os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nessa associação.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares implicados na oncogênese da tireoide, diferentes estudos têm evidenciado um conjunto de alterações genéticas (mutações, translocações, amplificações e aumento do número de cópias de genes) e epigenéticas (alteração do status de metilação gênica) envolvidas na hiperativação da via de sinalização proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) nos tumores tireoidianos (Nikiforova et al., 2013; Liu et al., 2014). No CPT, mutações pontuais no gene BRAF parece ser o principal mecanismo de desregulação da via MAPK enquanto que, no CFT, acredita-se que o processo oncogênico seja mediado majoritariamente por mutações no gene RAS. Em relação aos CPDT e CAT, além das mutações acima mencionadas, alterações adicionais nos genes TP53 são apontadas como responsáveis pela perda de controle da proliferação celular (Nikiforov, 2011). O gene BRAF localiza-se no cromossomo 7 (7q34), possui 20.622 pares de bases (bp) e é composto por 18 exons. A proteína codificada por esse gene, denominada BRAF, possui 766 aminoácidos e atua como efetora intracelular da cascata de sinalização da via MAPK. A ativação dessa via é desencadeada pela fosforilação de RAS e subsequente ativação de alvos da cascata MAPK. Mutações em BRAF podem estar presentes em 40 a 45% dos CPT (Kimura et al., 2003; Xing, 2013). A principal alteração envolvendo BRAF em câncer de tireoide é caracterizada por uma mutação que leva a troca do aminoácido valina pelo ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína (BRAFFV600E). Apesar de ser observada tipicamente em CPT, a mutação BRAFFV600E também tem sido reportada em formas mais agressivas de tumores tireoidianos como o CPDT e CAT, sobretudo nos subtipos tumorais contendo áreas bem diferenciadas. Tal observação sugere que a mutação BRAFFV600E possa ser um evento inicial na tumorigênese tireoidiana (Begum et al., 2004). Alguns trabalhos têm evidenciado associação positiva entre presença de BRAFFV600E e características de pior prognóstico (Namba et al., 2003; Liu et al., 2014). Entretanto, outros autores não observaram relação entre tal mutação e aspectos clinicopatológicos desfavoráveis e recorrência tumoral, questionando o potencial uso de BRAFFV600E como marcador prognóstico (Jin et al., 2016). A família de genes RAS inclui os membros HRAS, KRAS e NRAS. As proteínas RAS são funcionalmente relacionadas à proteína G e desempenham papel crucial no controle da proliferação celular por meio da transdução de sinais e ativação das vias MAPK e PI3K/AKT (Downward, 2003). Mutações em RAS, especialmente envolvendo códons 12/13 e 61, são predominantemente observadas em tumores de tireoide (Nikiforov, 2011). A frequente ocorrência de tais alterações em adenomas foliculares, presumidamente uma lesão pré-maligna, sugere que a hiperativação dessa via também possa ser um evento iniciador da oncogênese tireoidiana (Xing, 2013). Alguns estudos têm mostrado que mutações de RAS em carcinomas de tireoide podem estar associadas à desdiferenciação

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227**Bairro:** CENTRO**CEP:** 65.020-070**UF:** MA**Município:** SAO LUIS**Telefone:** (98)2109-1250**E-mail:** cep@huufma.br

comportamento metastático (Garcia-Rostan et al., 2003; Basolo et al., 2006). Desse modo, acredita-se que as informações sobre tais alterações possam ser importantes no prognóstico dos tumores (Xing, 2013). Localizado no braço curto do cromossomo 17, o gene TP53 é composto por 11 éxons e codifica uma fosfoproteína de 393 aminoácidos denominada p53. Essa proteína desempenha relevantes funções em eventos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e reparo do DNA (Peller & Rotter, 2003). Das mutações somáticas em TP53 registradas na base de dados da Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer (IARC), 94,2% encontra-se entre os éxons 5 e 8 (Petitjean et al., 2007). Alterações em TP53 e consequente perda de função da proteína codificada por este gene parecem ser um evento chave no estabelecimento de outras neoplasias humanas (Magalhães et al., 2015). Em câncer de tireoide, mutações de TP53 são relatadas em 60 a 80% dos CAT e 15 a 30% dos CPDT sugerindo que esse seria um evento tardio no processo de tumorigênese (Fagin et al., 1993; Ho et al., 1996). A inativação de TP53 pode levar a perda de diferenciação celular e aceleração crescimento tumoral sendo um possível marcador de progressão tumoral para formas agressivas (Nikiforov 2008). Sob o ponto de vista clínico, a presença de nódulo tireoidiano representa uma importante evidencia de doença neoplásica. A técnica de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) tem despontado como uma ferramenta crucial na identificação de nódulos malignos (Cooper et al., 2009; Jinih et al., 2016). Para a classificação consensual dos achados citológicos obtidas pela PAAF, o National Cancer Institute (NCI) introduziu o sistema Bethesda, permitindo a realização de inferências sobre a probabilidade de carcinoma (De Lellis et al., 2004). Apesar de possuir elevada sensibilidade e especificidade, a PAAF possui limitações na definição de malignidade em tumores bem diferenciados. A presença de resultados falso-negativos pela PAAF também representa dificuldades no prognóstico de neoplasias foliculares (Junih et al., 2016). Diante desse contexto, a análise de alterações em genes envolvidos nas vias MAPK, PI3K e p53 (como o BRAF, TP53 e família RAS) pode representar uma importante ferramenta para auxílio diagnóstico e avaliação prognóstica de malignidade na tireoide. A utilização de dados moleculares na prática clínica poderá facilitar a identificação precoce de câncer em nódulos tireoidianos bem com a tomada de decisão terapêutica mais adequada.

Hipótese:

Pacientes apresentando quadro clínico e laboratorial de obesidade e diabetes melito, possuem maior predisposição ao desenvolvimento de carcinomas epiteliais da tireoide. A presença de mutação nos genes BRAF, família Ras e/ou TP53 indica mau prognóstico em pacientes com tumores tireoidianos.

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Metodologia Proposta:

Local e Período: A presente pesquisa será desenvolvida por meio de parceria envolvendo o HUUFMA e o HCAB, situados na cidade de São Luís, no Maranhão. O atendimento clínico aos pacientes, pesquisa de prontuários e punções aspirativas por agulha fina (PAAF) serão realizados pelo Serviço de Endocrinologia do HUUFMA. Os procedimentos cirúrgicos para remoção dos tumores de tireoide ocorrerão no HCAB. **Participantes do estudo** Serão incluídos pacientes, de ambos os sexos, assistidos pelo Serviço de Endocrinologia do HUUFMA com diagnóstico ou suspeita de carcinoma epitelial de tireoide. **Revisão de prontuários:** Alguns dados clínicos e demográficos serão coletados a partir dos prontuários de atendimento dos pacientes acompanhados pelo Serviço de Endocrinologia do HUUFMA. Serão preenchidas fichas protocolares com os seguintes dados demográficos e clínicos de cada paciente. **Avaliação clínica e laboratorial de obesidade e síndrome metabólica:** Os voluntários desse estudo serão atendidos no Centro de Pesquisa Clínica do HUUFMA (CEPEC) do HUUFMA onde passarão por avaliação clínica das seguintes variáveis: peso (kg), altura (cm), circunferência abdominal (cm) e diâmetro de pescoço (cm). Também no CEPEC será coletada amostra de sangue e enviada ao laboratório INLAB onde serão realizados exames bioquímicos e hormonais. **Coleta de amostras citológicas e teciduais:** As amostras citológicas obtidas por PAAF e os tumores retirados por cirurgias que são retrospectivos a esta pesquisa encontram-se armazenados em blocos de parafina na Unidade de Anatomia Patológica do HUUFMA. Em relação ao material para estudo prospectivo, os tumores, amostras citológicas e teciduais serão coletadas tanto no HUUFMA quanto no HCAB e destinados a exames histopatológicos, bioquímicos e genéticos. **Análise histopatológica:** Para a avaliação morfológica e confirmação do diagnóstico, os espécimes fixados e emblocados em parafina serão submetidos a cortes histológicos com 4µm de espessura e posteriormente corados hematoxilina e eosina (HE). O sistema de Bethesda será utilizado para classificação dos achados citológicos das PAAF, enquanto que as amostras tumorais obtidas de cirurgia serão classificadas por parâmetros definidos pela Classificação da OMS (De Lellis et al., 2004; Cibas e Ali, 2009). **Extração de ácidos nucleicos.** Para a extração de material genético, diferentes estratégias serão estabelecidas de acordo com o tipo de tecido a ser utilizado. O isolamento de DNA de tecido incluído em parafina será efetuado a partir 40 mg de amostra por meio do kit específico. **Análise de mutações em BRAF, TP53 e família RAS** Para a análise da mutação em BRAF, família Ras e TP53 as reações de PCR serão compostas por tampão 10X, 2,4 mM de MgCl₂, 0,24 mM de cada dNTP, 0,15 M de ambos primers senso e anti-senso, 1 unidade de Taq DNA polimerase e 50ng de DNA genômico. As reações de amplificação

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227**Bairro:** CENTRO**CEP:** 65.020-070**UF:** MA**Município:** SAO LUIS**Telefone:** (98)2109-1250**E-mail:** cep@huufma.br

ocorrerão em termociclador e os produtos de PCR serão visualizados em gel de agarose 2% e posteriormente sequenciados pelo método de terminação de cadeia dideoxi. Os eletroferogramas obtidos pelo sequenciamento serão editados utilizando os programas específicos. Avaliação imuno-histoquímica Para verificar o efeito do status de TP53 em relação à expressão tecidual da p53 e seu impacto sobre o controle do ciclo celular, as lâminas contendo cortes histológicos de tecido tireoidiano dos pacientes estudados serão submetidas à técnica de imuno-histoquímica. Alterações na expressão do marcador de proliferação celular antígeno Ki-67 e da proteína anti-apoptótica VDAC2 também serão avaliados por imuno-histoquímica.

Metodologia de Análise de Dados:

Os dados obtidos serão tabulados e analisados com auxílio do programa GraphPad Prism v. 5.02. As variáveis quantitativas serão expressas por média $\pm$ desvio padrão. A distribuição normal das variáveis contínuas serão comprovados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação dos dados entre dois grupos será realizada por meio do teste Mann-Whitney U. A sobrevivência dos pacientes será realizada utilizando o método de Kaplan-Meier e as diferenças entre os grupos será verificada pelo teste de Logrank. As variáveis categóricas serão analisadas através do teste de qui-quadrado ou Fisher e as variáveis contínuas através do teste t de Student. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos.

Desfecho Primário: Conforme proposto neste estudo, a implementação de tecnologias que permitam a análise de anomalias genéticas em BRAF e na família RAS em amostras citológicas obtidas por PAAF com resultados inconclusivos poderá ser um importante parâmetro no auxílio do diagnóstico de carcinomas diferenciados da tireoide. Associado a esses dados, a avaliação de alteração em outros marcadores moleculares como p53, Ki-67 e VDAC2 poderá ser utilizada para estabelecimento de uma abordagem terapêutica mais apropriada ao tipo tumoral e consequentemente um prognóstico com maior acurácia e precisão. A análise de marcadores genéticos também poderá ser utilizada pela equipe médica para definir a necessidade de aplicação de diversas modalidades terapêuticas, diminuindo de modo significativo a possibilidade de recorrência tumoral primária ou progressão para formas mais agressivas de câncer. Tais procedimentos poderão impactar positivamente para escolha de tratamento eficaz com redução de custos com internação e diversos procedimentos terapêuticos desnecessários. Além disso, os resultados obtidos pela investigação de alterações nas vias de sinalização MAPK e p53, que estão relacionadas ao controle da proliferação celular, poderão proporcionar um melhor entendimento

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SÃO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Continuação do Parecer: 2.674.175

sobre o processo de oncogênese dos pacientes com carcinomas epiteliais de tireoide. A execução do presente estudo permitirá a elaboração de protocolos clínicos mais consistentes que proporcionará um melhor acompanhamento de pacientes do Serviço de Endocrinologia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Analisar os principais fatores de risco e alterações moleculares em tumores de tireoide.

Objetivo Secundário:

- Avaliar a presença de obesidade, sobrepeso e síndrome metabólica em pacientes portadores de nódulos tireoidiano.
- Determinar a prevalência de mutações nos genes BRAF, HRAS, KRAS, NRAS e TP53 nos diferentes tipos de tumores de tireoide de forma retrospectiva e também em uma nova coorte de tumores.
- Verificar o impacto das análises moleculares em BRAF, família RAS e TP53 nos nódulos tireoidianos com resultados citopatológicos indeterminados (Bethesda II).
- Correlacionar a presença de obesidade e/ou síndrome metabólica com desenvolvimento de tumor tireoidiano, classificação e evolução clínica.
- Avaliar o status de mutações em BRAF, família RAS e TP53 nas amostras tumorais correlacionando esses achados com características histológicas e com a evolução clínica dos pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

-Riscos:

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Segundo o pesquisador "O exame de sangue é um procedimento com riscos mínimos, e serão realizados nas consultas ambulatoriais com a retirada de amostras de sangue. Essa coleta poderá causar possíveis desconforto como sangramento, manchas roxas, tontura, desmaio, infecção no local do furo da agulha. O nódulo tireoidiano é considerado de alto risco cirúrgico, pois pode invadir e comprimir as estruturas vizinhas e causar alterações no funcionamento da tireoide. No entanto procedimento cirúrgico é indicado para remoção do nódulo tireoidiano o que se faz necessário, quando o tratamento clínico não for eficaz. Importante ressaltar que o tratamento cirurgia faz parte do protocolo de tratamento do paciente e que o fragmento de tireoide removido será utilizado para investigação na pesquisa, já que o mesmo também é utilizado na rotina de análise patológica. A recuperação da cirurgia é muito rápida, cerca de 48h, no entanto, o paciente precisa ficar internado no hospital por alguns dias para observação do funcionamento dos hormônios tireoidianos no pós-operatório".

- Benefícios:

Segundo o pesquisador "Esperamos que este estudo contribua com o conhecimento sobre as alterações em genes associados com tumores tireoidianos. Da mesma forma esperamos entender como a obesidade e o sobrepeso pode estar relacionado com o desenvolvimento de carcinoma de tireoide. O estudo genético dos tumores poderá contribuir para a identificação e a distinção mais apropriada do câncer de tireoide. Assim teremos uma maior chance de investigação e os pacientes serão beneficiados pelo diagnóstico mais cedo e tratamento mais eficiente, além de contribuírem para que outros pacientes sejam beneficiados com os resultados dessa pesquisa".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os tumores de tireoide são o tipo de câncer mais comum do sistema endócrino. Apesar de ter prognóstico geralmente favorável, a taxa de mortalidade por essa neoplasia tem se elevado nos últimos anos. A obesidade e síndrome metabólica parecem ser importantes fatores de risco associados ao desenvolvimento de câncer de tireoide embora, os mecanismos moleculares para essa relação não estejam elucidados. Na busca por melhor entendimento sobre a patogênese tumoral alguns trabalhos têm apontado uma série de marcadores genéticos, tais como BRAF e família RAS, como potenciais preditores de malignidade. Contudo, ainda existem muitas controvérsias em relação à utilização desses marcadores na prática clínica. Diante desse contexto, o presente projeto propõe-se a realizar um estudo sobre a possível associação entre obesidade e

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Continuação do Parecer: 2.674.175

síndrome metabólica com o desenvolvimento de carcinomas de tireoide bem como análise do perfil molecular dos genes BRAF, família RAS e TP53 e alterações de expressão tecidual das proteínas VDAC2, p53 e Ki-67 visando identificar seus valores diagnósticos e prognósticos em pacientes com tumores epiteliais da tireoide. Amostras citológicas de nódulos e tumores Tireoidianos serão coletadas de pacientes atendidos pelo Serviço de Endocrinologia do HUUFMA. Os resultados obtidos através desse estudo poderão contribuir para a identificação de fatores de risco relacionados ao carcinoma de tireoide e a distinção mais apropriada de hiperplasias nodulares, lesões pré-malignas e carcinomas de tireoide, permitindo uma abordagem medicamentosa adequada e intervenção cirúrgica oportuna.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional no 001/2013(item 3/ 3.3).

O protocolo apresenta ainda as declarações de anuência, declaração de responsabilidade financeira, termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade e termo de anuência para armazenamento em biorrepositório.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA solicita que se possível os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares, sendo considerado APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Continuação do Parecer: 2.674.175

forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1077712.pdf	16/05/2018 11:35:44		Aceito
Outros	carta_resposta.pdf	16/05/2018 11:34:47	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_tireoide_CEP_V2.doc	15/05/2018 19:40:44	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	15/05/2018 19:38:45	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_RETROSPECTIVO.pdf	15/05/2018 19:38:03	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PROSPECTIVO.pdf	15/05/2018 19:37:44	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	15/05/2018 16:41:31	MARCELO MAGALHÃES SILVA	Aceito
Outros	Aceite_HCAB.pdf	08/03/2018 15:31:08	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Parecer_COMIC.pdf	08/03/2018 15:28:23	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	08/03/2018 15:27:03	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Declaração do Patrocinador	Patrocinador.pdf	08/03/2018 15:25:33	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio.pdf	08/03/2018 15:25:06	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Responsabilidade_financeira.pdf	08/03/2018	Manuel dos Santos	Aceito

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

CEP: 65.020-070

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

E-mail: cep@huufma.br

Continuação do Parecer: 2.674.175

Outros	Responsabilidade_financeira.pdf	15:21:17	Faria	Aceito
Declaração de Pesquisadores	dados_e_publica.pdf	08/03/2018 15:19:40	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia_participantes.pdf	08/03/2018 15:17:43	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Outros	Anuencia_gestor.pdf	08/03/2018 15:16:57	Manuel dos Santos Faria	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	08/03/2018 15:05:48	Manuel dos Santos Faria	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 24 de Maio de 2018

**Assinado por:
Rita da Graça Carvalhal Frazão Corrêa
(Coordenador)**

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227

Bairro: CENTRO

UF: MA

Município: SAO LUIS

Telefone: (98)2109-1250

CEP: 65.020-070

E-mail: cep@huufma.br

Novel Mutation in the Hemojuvelin Gene (*HJV*) in a Patient with Juvenile Hemochromatosis Presenting with Insulin-dependent Diabetes Mellitus, Secondary Hypothyroidism and Hypogonadism

Authors' Contribution:
Study Design A
Data Collection B
Statistical Analysis C
Data Interpretation D
Manuscript Preparation E
Literature Search F
Funds Collection G

ABCDE 1,2 **Rossana Santiago de Sousa Azulay**
ACDEF 1,2,3 **Marcelo Magalhães**
BCD 1,2 **Maria da Gloria Tavares**
BCD 1,2 **Roberta Dualibe**
BCDF 2 **Livia Barbosa**
CD 2 **Silvia Sá Gaspar**
DEF 4 **André M. Faria**
BCD 1,2 **Gilvan Cortês Nascimento**
BCD 1,2 **Sabrina Da Silva Pereira Damiane**
BCD 1,2 **Viviane Chaves de Carvalho Rocha**
ADE 5 **Marília B. Gomes**
ADE 1,2,3 **Manuel dos Santos Faria**

1 Endocrinology Unit, University Hospital of the Federal University of Maranhão (HUUFMA), São Luís, Brazil
2 Research Group in Clinical and Molecular Endocrinology and Metabolism (ENDOCLIM), São Luís, Brazil
3 Clinical Research Center of the University Hospital of the Federal University of Maranhão (CEPEC – HUUFMA), São Luís, Brazil
4 Neuroendocrine Unit, Functional Neurosurgery Division, Psychiatry Institute, Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School, São Paulo, Brazil
5 Diabetes Unit, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

Corresponding Author: Rossana Santiago de Sousa Azulay, e-mail: rossanaendocrino@gmail.com
Conflict of interest: None declared

Patient: Female, 26-year-old
Final Diagnosis: Juvenile hemochromatosis type 2A
Symptoms: Abdominal pain • adynamia • amenorrhea • arthralgia • dark skin • diabetic ketoacidosis • dyspnea • edema of lower limbs • hair loss
Medication: —
Clinical Procedure: Genetic analysis • hepatic biopsy • iron chelation • magnetic resonance imaging • phlebotomy
Specialty: Endocrinology and metabolic • Hematology
Objective: Rare disease

Background: Juvenile hemochromatosis is a rare genetic disease that leads to intense iron accumulation. The disease onset usually occurs before the third decade of life and causes severe dysfunction in various organs. The most classical clinical findings are hypogonadotropic hypogonadism, cardiomyopathy, liver fibrosis, glycemic changes, arthropathy and skin pigmentation. However, secondary hypothyroidism is not reported in these patients. Juvenile hemochromatosis has an autosomal recessive inheritance and might be type 2A or type 2B, due to mutation in either the hemojuvelin gene (*HJV*) or hepcidin antimicrobial peptide (*HAMP*) gene.

Case Report: A 26-year-old female patient was admitted with a recent history of diabetic ketoacidosis. Three months after that admission, she presented with arthralgia, diffuse abdominal pain, adynamia, hair loss, darkening of the skin and amenorrhea. Severe iron overload was found and findings in the hepatic biopsy were compatible with hemochromatosis. An upper abdominal magnetic resonance imaging (MRI) showed iron deposition in the liver and pancreas and pituitary MRI exhibited accumulation on the anterior pituitary. After 16 months the patient presented with dyspnea and lower limb edema, and cardiac MRI indicated iron deposition in the myocardium. The patient was diagnosed with juvenile hemochromatosis presenting with hypogonadotropic hypogonadism, cardiomyopathy, insulin-dependent diabetes mellitus, and secondary hypothyroidism. A novel homozygous mutation, c.697delC, in the *HJV* gene was detected.

Conclusions: We describe for the first time a severe and atypical case of juvenile hemochromatosis type 2A presenting classical clinical features, as well as secondary hypothyroidism resulting from a novel mutation in the *HJV* gene.

MeSH Keywords: Hemochromatosis • Hypothyroidism • Iron Overload • Pituitary Diseases
Full-text PDF: <https://www.amjcaserep.com/abstract/index/idArt/923108>



1220 1 5 15

Background

Juvenile hemochromatosis is a rare genetic disease that occurs with an intense accumulation of iron in the body [1]. This disease usually begins before the third decade of life [2] and causes serious lesions in various organs [1,2].

The most classical clinical findings are hypogonadotropic hypogonadism, cardiomyopathy, liver fibrosis [3,4], glycemic changes [2-4], arthropathy, and skin pigmentation [3,4]. However, secondary hypothyroidism has not been reported in these patients.

Juvenile hemochromatosis has an autosomal recessive inheritance and may be type 2A or type 2B, due to mutation in either the hemojuvelin gene (*HJV*) or hepcidin antimicrobial peptide (*HAMP*) gene [5]. In the Human Gene Mutation Database (HGMD) there are more than 50 mutations described in the *HJV* gene.

Here, we describe for the first time a severe and atypical case of juvenile hemochromatosis type 2A presenting classical clinical features, as well as secondary hypothyroidism resulting from a novel mutation in the *HJV* gene.

Case Report

A 26-year-old female patient of African descent was admitted to the Endocrinology Unit, transferred from another hospital, with compensated diabetic ketoacidosis. Three months after that admission, she presented with arthralgia of the small and medium joints, diffuse abdominal pain, adynamia, hair loss, and darkening of the skin. The patient also reported a 7-month history of amenorrhea.

She reported normal pregnancy and childbirth without complications 7 years ago and denied alcohol intake, smoking, and use of illicit drugs. Her family history was positive for maternal dyslipidemia and she also had a sister with type 2 diabetes.

The patient had dry skin and areas of discrete hyperpigmentation on the face, limbs and abdomen. There were no signs of joint inflammation and the rest of the physical examination was otherwise normal.

Biochemical analysis was performed on a fasting blood sample and are reported in Table 1.

Since severe iron overload was found through blood testing, a hepatic biopsy was performed which showed marked deposition of iron. The deposition was more pronounced in hepatocytes than in the Kupffer cells; these findings were compatible

with hemochromatosis, and there were no signs of fibrosis (Figure 1A, 1B).

No mutations of the *HFE* and *HAMP* genes were found. However, a homozygous mutation, c.697delC, in the *HJV* gene was detected (Figure 2A). This single nucleotide deletion occurred at codon 233 (exon 4), resulting in a frameshift mutation leading to a premature stop codon at position 245 (Q233fsX245) (Figure 2B, 2C). *In silico* analysis for pathogenicity prediction using the program Mutation Taster classified this variant as “disease causing”. The patient’s parents, one sister and her daughter were genotyped as heterozygous carriers of the mutation (Figure 2D). The patient’s husband and her other sister were identified as homozygous for the wild type allele. According to a recent systematic literature review [5] and the HGMD database, the mutation c.697delC (Q233fsX245) has not been previously described.

An upper abdominal magnetic resonance imaging (MRI) showed a slightly enlarged liver and pancreas with a reduction in volume and T2-hypointense signals in the hepatic and pancreatic parenchyma; these findings were compatible with iron deposition (Figure 3). Furthermore, a pituitary MRI also showed a marked T2-hypointense signal and mild T1-hypointense signal in the anterior pituitary (Figure 4). The thyroid ultrasound, electrocardiogram, echocardiogram and articular x-ray of this patient were unremarkable.

After the diagnosis of juvenile hemochromatosis type 2A was confirmed, the patient was referred to the Hematology Department for frequent phlebotomies and iron chelation, and to the Endocrinology Department where she was treated with basal-bolus insulin and hormonal replacement with levothyroxine and estrogen/progesterone.

After 1 year, the patient presented with sudden malaise and palpitations, and a supraventricular tachycardia was diagnosed and successfully treated. After 4 months she returned to the clinic with dyspnea and lower limb edema, and echocardiographic examination showed moderate dilation of the cardiac chambers, significant left systolic and moderate right systolic dysfunction with pulmonary hypertension (PASP: 45 mmHg). A cardiac MRI showed significant iron deposition in the myocardium, chamber dilation, and global left ventricular dysfunction and a discrete enlargement of the left atrium (Figures 5A, 5B).

Discussion

In this report, we demonstrated a novel mutation in the *HJV* gene in a patient with classical features of juvenile hemochromatosis. To the best of our knowledge, this is the first description of central hypothyroidism with pituitary imaging

Table 1. Laboratory tests of the patient.

Laboratory tests	Result	Reference range	Method
Serum ferritin	8377	13-150 µg/L	Colorimetric
Transferrin saturation	105	20-50%	Calculated using iron and TIBC
Serum iron	46.89	6.62-25.95 µmol/L	Colorimetric
Hemoglobin	12.1	12-16 g/dL	Photometric
Hematocrit	35	35-47%	Electrical bioimpedance
Direct coombs	Negative	Negative	Column agglutination
Total/direct bilirubin	0.51/0.23	Up to 1.2/up to 0.4 mg/dL	Colorimetric
Alkaline phosphatase	169	35-80 U/L	Colorimetric
GGT	202	6-71 U/L	Colorimetric
AST	217	6-46 U/L	IFCC optimized
ALT	61	6-49 U/L	IFCC optimized
Creatinine	0.05	0.035-0.124 mmol/L	Colorimetric
Sodium	139	136-145 mmol/L	Selective electrode
Potassium	4.4	3.5-5.1 mmol/L	Selective electrode
Fasting glycaemia	8.65	3.33-5.49 mmol/L	Enzymatic
HbA1c	5.3	4-6%	HPLC
C Peptide	0.56	1.1-4.4 ng/mL	ECLIA
Anti-GAD	<10	<10 U/mL	RIA
Calcium	2.32	2.15-2.55 mmol/L	Colorimetric
Phosphorus	3.5	2.5-4.5 mg/dL	Molybdate
Magnesium	0.86	0.65-1.06 mmol/L	Colorimetric
Albumin	4.3	3.5-5.2 g/dL	Colorimetric
PTH	22	4-58 pg/mL	ECLIA
Estradiol	<5	>55 pg/mL	ECLIA
FSH	1.63	25-134 UI/L	ECLIA
LH	1.1	7.7-58 UI/L	ECLIA
PRL	233.2	101.7-487.6 mUI/L	ECLIA
TSH	2.0	0.27-4.2 mUI/L	ECLIA
Free T4	0.69	0.93-1.7 ng/dL	ECLIA
AntiTPO	15	Up to 34 UI/mL	ECLIA
Antithyroglobulin	11.02	<115 UI/mL	ECLIA
Cortisol	12.5	5.0-25.0 µg/dL	ECLIA
ACTH	30	7-63 pg/mL	ECLIA
IGF-1	260	103-322 ng/mL	CLIA

GGT - gamma glutamyl transferase; AST - aspartate aminotransferase; ALT - alanine aminotransferase; FSH - follicle stimulating hormone; LH - luteinizing hormone; PRL - prolactin; TSH - thyroid stimulating hormone; ACTH - adrenocorticotrophic hormone; IGF-1 - insulin-like growth factor 1; TIBC - total iron-binding capacity; IFCC - International Federation of Clinical Chemistry; HPLC - high performance liquid chromatography; RIA - radioimmunoassay; ECLIA - electrochemiluminescence immunoassay; CLIA - chemiluminescence immunoassay.

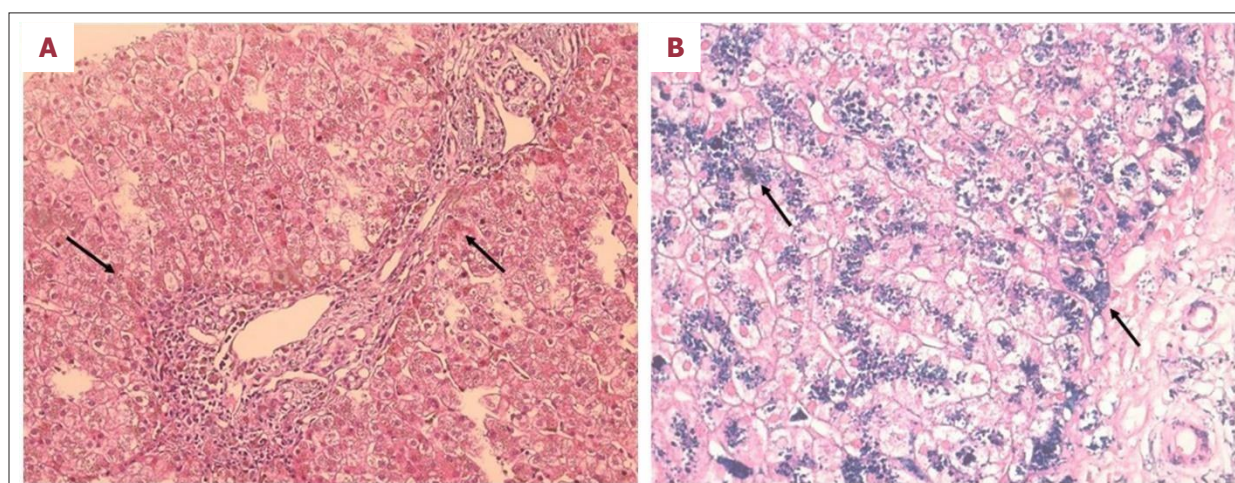


Figure 1. Photomicrography of hepatic hemochromatosis. (A) Hepatic tissue with preserved lobular architecture and presence of golden brown granular deposits within hepatocytes (indicated by the black arrow) (hematoxylin and eosin 200×); (B) Perl's stain showing bluish iron deposits in hepatocyte cytoplasm (indicated by the black arrow) (400×).

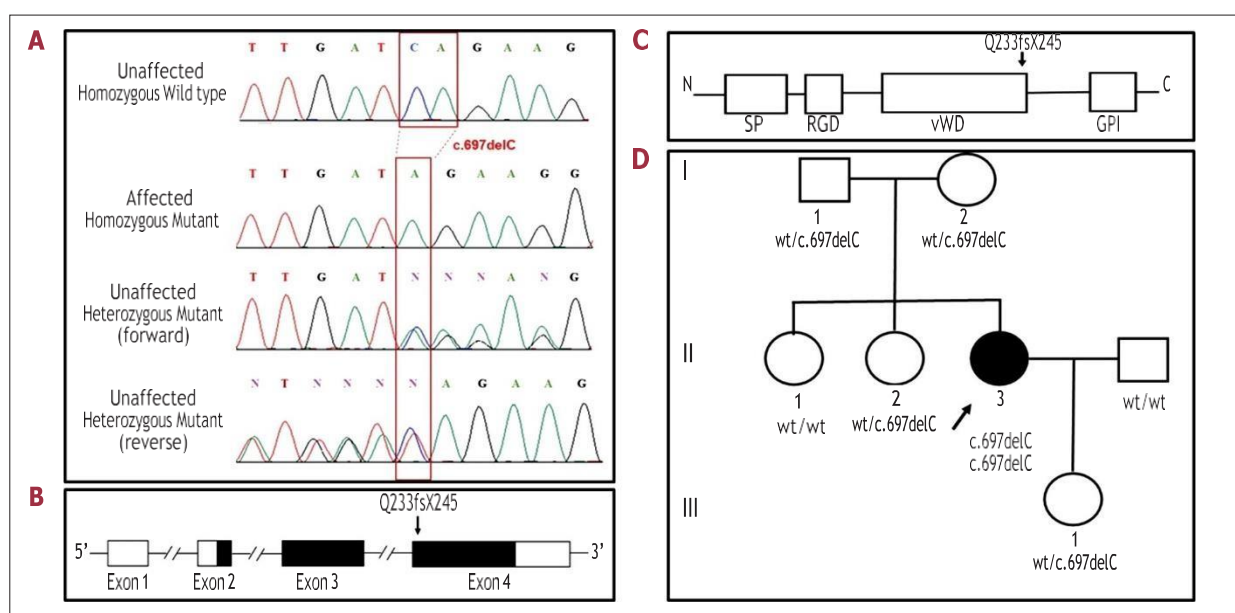


Figure 2. Genetic analysis of *HJV* gene in a Brazilian family with juvenile hemochromatosis. (A) Electropherograms showing homozygous wild type (wt), affected homozygous mutant and heterozygous carrier. The box indicates loss of the single nucleotide C in the codon 233 of the *HJV* gene (mutation c.697delC). Polymerase chain reaction (PCR) products were sequenced by Sanger method using the automatic sequencer AB 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). (B) Schematic representation of genomic organization of *HJV* gene. The novel mutation c.697delC identified in the index case was localized in the exon 4 resulting in premature stop codon at position 245 (Q233fsX245). (C) Schematic representation of hemojuvelin protein functional domains. The novel mutation Q233fsX245 (c.697delC) is indicated by the arrow. SP, signal peptide; RGD, tri-amino acid motif; vWD, von Willebrand-like domain. (D) Genealogy of the family in this study. The arrow indicates juvenile hemochromatosis index case. Open symbols represent unaffected, filled black symbols represents affected individuals. The genotypes are shown below each family member.

compatible with iron deposition in a patient with juvenile hemochromatosis.

The single nucleotide deletion in the c.697delC variant leads to a frameshift mutation and produces a short-truncated protein

without the glycosylphosphatidylinositol (GPI) 6-linked axon leader molecule. The absence of GPI, a transmembrane domain, suggests that the mutant protein cannot be expressed on the surface of the hepatocyte. Thus, patients homozygous for this mutation are unable to induce hepcidin transcription [6].

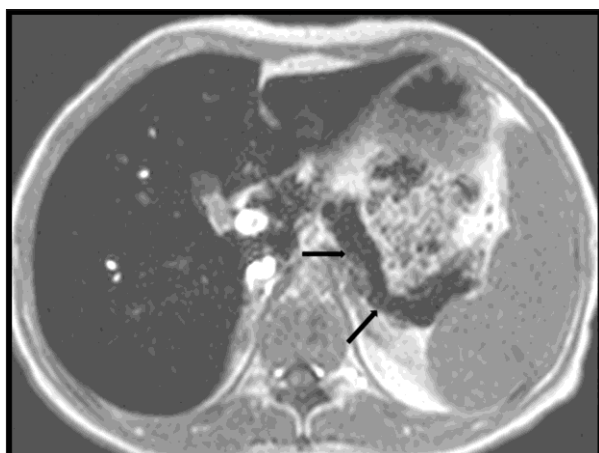


Figure 3. Magnetic resonance imaging of the abdomen, compatible with iron deposition. Axial T1-weighted image demonstrates marked signal reduction in both the pancreas (indicated by the black arrow) and liver. Signal intensity of the spleen is normal.

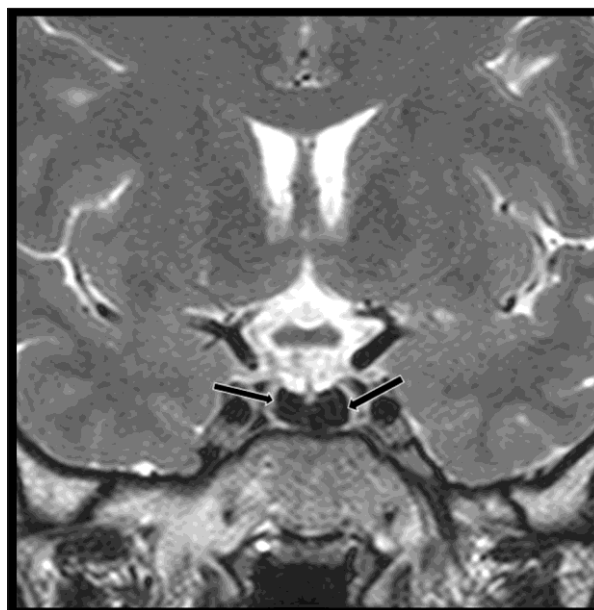


Figure 4. Magnetic resonance imaging (MRI) of the pituitary gland, compatible with iron deposition MRI coronal T2-weighted image shows the anterior lobe of the pituitary gland with a significantly low signal (indicated by the black arrow).

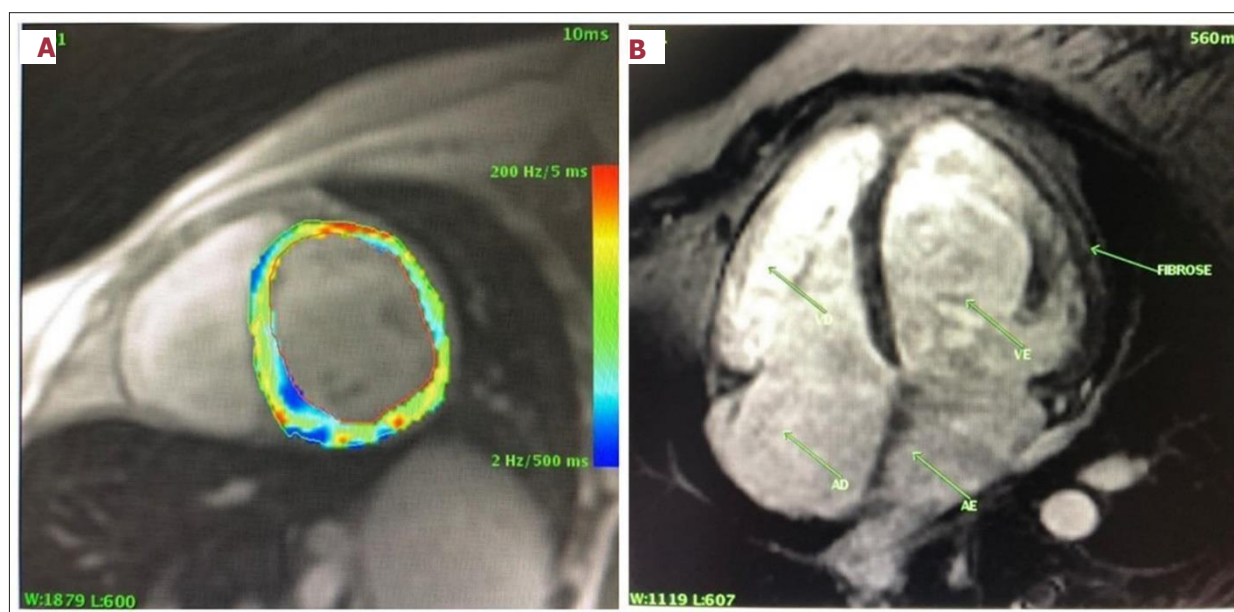


Figure 5. Cardiac magnetic resonance imaging with significant iron deposition. (A) T2 *map shows the accumulation of iron, with an estimated value of 9.5 ms. (B) Late enhancement sequence showing mesocardial fibrosis in the lateral wall of the left ventricle.

Deficiency in the synthesis of hepcidin results in elevation of plasma iron and transferrin saturation resulting in consequent iron deposition in parenchymal cells, particularly those of the endocrine system and cardiomyocytes that are rich in mitochondria and poor in antioxidant factors; therefore, these cells

are more susceptible to the oxidative stress caused by excess iron [2,4,7]. The extent of lesions in the organs is variable and depends on the moment of onset and the magnitude of iron overload, which results from the extent of hepcidin deficiency and the type of mutation [4]. In a recent review evaluating

the phenotype of patients with juvenile hemochromatosis, the median serum ferritin concentration (FS) and transferrin saturation (TS) in the *HJV* group were 2925 µg/L and 96%, respectively [3]. Our patient had significantly higher indexes (FS=8377 ng/mL and TS=105%), which suggested intense concentration and deposition of iron in several tissues and the generation of serious lesions in the affected organs.

The more intense and early accumulation of iron in juvenile hemochromatosis seems to be responsible for the greater severity and diversification of affected organs, especially the heart and pituitary gland; other affected organs included the liver, pancreas, and skin and to a lesser extent, the joints [3]. Although iron deposition has been described in all pituitary cell lines, there is a pronounced predilection for gonadotropes, with rare descriptions of involvement of the other lineages [5,8-11]. In our report, the patient presented the full spectrum of juvenile hemochromatosis lesions, with the additional finding of secondary hypothyroidism, suggested by the low free T4 levels, on more than one occasion, and inappropriately normal thyroid stimulating hormone (TSH) under stable clinical condition, negative thyroid autoimmunity and pituitary siderosis in MRI. Secondary hypothyroidism was previously described in rare patients with type 1 hemochromatosis and none of these

patients presented evidence of pituitary iron deposition by imaging methods [8,9,12-14]. Dhillon et al. [15] recently also reported hypothyroidism in 4 patients with hereditary hemochromatosis. However, in this case series there was no detailed description of the type of hypothyroidism encountered, if primary or secondary [15].

Conclusions

We conclude that in the present case, the novel mutation c.697delC (Q233fsX245) in the *HJV* gene might be related to the high iron overload seen in this patient, leading to classical features of juvenile hemochromatosis and unprecedented hypothyroidism secondary to thyrotrophic lesions. Juvenile hemochromatosis associated with *HJV* gene mutation should be also considered in the differential diagnosis of multiple endocrinopathies which are symptomatic in young adult patients.

Acknowledgments

The authors wish to thank to Ana Gisélia Cortês Nascimento, Igor M. Faria, Allysson Milhomem Rocha, and Nívea M. S. Simões for their technical and scientific assistance.

References:

1. Kawabata H: The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. *Int J Hematol*, 2018; 107(1): 31-43
2. Ramzan K, Imtiaz F, Al-Ashgar HI et al: Juvenile hemochromatosis and hepatocellular carcinoma in a patient with a novel mutation in the *HJV* gene. *Eur J Med Genet*, 2017; 60(6): 308-11
3. Sandhu K, Flintoff K, Chatfield MD et al: Phenotypic analysis of hemochromatosis subtypes reveals variations in severity of iron overload and clinical disease. *Blood*, 2018; 132(1): 101-10
4. Pietrangelo A, Caleffi A, Corradini E: Non-HFE hepatic iron overload. *Semin Liver Dis*, 2011; 31(3): 302-18
5. Bardou-Jacquet E, Brissot P: Diagnostic evaluation of hereditary hemochromatosis (HFE and Non-HFE). *Hematol Oncol Clin North Am*, 2014; 28(4): 625-35
6. Papanikolaou G, Samuels ME, Ludwig EH et al: Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis. *Nat Genet*, 2004; 36(1): 77-82
7. Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y: Seminar haemochromatosis. *Lancet*, 2016; 388(10045): 706-16
8. Gama R, Smith MJ, Wright J, Marks V: Hypopituitarism in primary haemochromatosis; recovery after iron depletion. *Postgrad Med J*, 1995; 71(835): 297-98
9. Lewis AS, Courtney CH, Atkinson AB: All patients with "idiopathic" hypopituitarism should be screened for hemochromatosis. *Pituitary*, 2009; 12(3): 273-75
10. Pelusi C, Gasparini DI, Bianchi N, Pasquali R: Endocrine dysfunction in hereditary hemochromatosis. *Endocrinol Invest*, 2016; 39(8): 837-47
11. Chung RT, Misdraji J, Sahani DV: Case 33-2006: A 43-year-old man with diabetes, hypogonadism, cirrhosis, arthralgias, and fatigue. *N Engl J Med*, 2006; 355(17): 1812-19
12. Wilkinson H: Haemochromatosis associated with arthritis and hypopituitarism. *Ann Clin Biochem*, 1996; 33(2): 171-73
13. Hudec M, Grigerova M, Walsh CH: Secondary hypothyroidism in hereditary hemochromatosis: Recovery after iron depletion. *Thyroid*, 2008; 18(2): 255-57
14. Özkaya M, Gisi K, Çetinkaya A, Köröglü S: Panhypopituitarism due to hemochromatosis. *Turkish Journal of Endocrinology Metabolism*, 2013; 17(4): 125-26
15. Dhillon B, Chopra G, Jamwal M et al: Adult onset hereditary hemochromatosis is associated with a novel recurrent Hemojuvelin (*HJV*) gene mutation in north Indians. *Blood Cells Mol Dis*, 2018; 73: 14-21