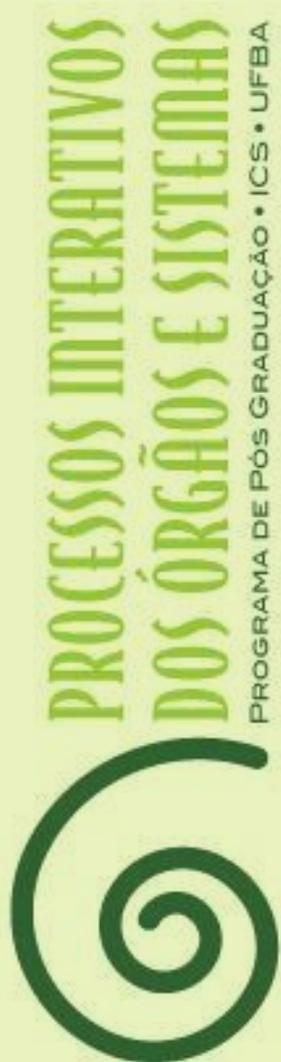


ANA CLARA OLIVEIRA TOSTA TELLES



**REARRANJOS DOS GENES *NTRK* NO
CARCINOMA DIFERENCIADO DE
TIREOIDE EM CRIANÇAS,
ADOLESCENTES E ADULTOS JOVENS:
ESTUDO MULTICÊNTRICO EM CENTROS
DE REFERÊNCIA DA BAHIA E DA
PARAÍBA**

Salvador
2023

ANA CLARA OLIVEIRA TOSTA TELLES

**REARRANJOS DOS GENES *NTRK* EM CARCINOMA DIFERENCIADO DE
TIREOIDE EM CRIANÇAS, ADOLESCENTES E ADULTOS JOVENS:
ESTUDO MULTICÊNTRICO EM CENTROS DE REFERÊNCIA DA BAHIA
E DA PARAÍBA**

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

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos

Salvador

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T274r Telles, Ana Clara Oliveira Tosta

Rearranjos dos genes NTRK no carcinoma diferenciado de tireoide em crianças, adolescentes e adultos jovens: estudo multicêntrico em centros de referência da Bahia e da Paraíba. / Ana Clara Oliveira Tosta Telles – Salvador, 2023.

91 f : il.

Orientador: Prof. Dr. Helton Estrela Ramos
Dissertação (Mestrado) – PPGPIOS/UFBA

1. Carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) pediátrico. 2. Rearranjos NTRK. 3. Imuno-histoquímica (IH). 4. Sequenciamento de nova geração (NGS). I. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. II. Ramos, Helton Estrela. III. Título.

CDU 616.006.6(043)

Termo de Aprovação

A nossas crianças.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Professor Helton Estrela, por acreditar que este trabalho seria possível e, mais do que isto, por fazê-lo acontecer! O seu exemplo me inspira!

Ao Hospital Aristides Maltez, a casa que me ensinou o que é servir com empatia e compaixão. Obrigada pela confiança! Que os frutos deste trabalho possam um dia beneficiar aqueles que virão em busca de nosso auxílio. Este é o meu desejo.

Aos amigos e colaboradores do Instituto de Ciências e Saúde da UFBA, Hospital Dom Pedro de Alcântara, Hospital Lauro Wanderley, Instituto Integrado, Laboratório CEDAPI, Laboratório Studart-Studart, Grupo Hermes Pardini, pelo apoio e pela parceria neste projeto, e à Farmacêutica Bayer, por permitir torná-lo real.

Aos estimados Professores Dr. Ivan Agra e Dr. Leonardo Rios, aos quais dedico profunda admiração, pelo olhar técnico e minucioso sobre este trabalho. Vossa colaboração foi fundamental para nós e para o meu aperfeiçoamento acadêmico. Obrigada!

Aos queridos amigos que o mestrado me presenteou: Elisa Aires, Jocyel Oliveira, Juliana von Ammon e Gabriel Rodriguez, grandes parceiros, obrigada pela força nesta jornada. E ao amigo Fabyan Esberar, por colaborar conosco com seus conhecimentos em estatística. Este trabalho é nosso!

Aos meus venerados pais, Ana Amélia e Renato, por me mostrarem o caminho da vida, e ao meu irmão Lucas, por estar sempre ao meu lado. Vossos ensinamentos são luz para mim!

Por fim, e antes de tudo, ao meu Amado Deus, fonte de todo o conhecimento, por sempre apontar-me a direção e jamais me perder de vista. Que Seu olhar atento e amoroso me siga aonde for.

*A Criança Nova que habita onde vivo
Dá-me a mão a mim
E a outra a tudo que existe
E assim vamos os três pelo caminho que houver,
Saltando e cantando e rindo
E gozando o nosso segredo comum
Que é o de saber por toda a parte
Que não há mistério no mundo
E que tudo vale a pena.*

*Alberto Caeiro,
O guardador de rebanhos*

TELLES, Ana Clara Oliveira Tosta. **Rearranjos dos genes *NTRK* em carcinoma diferenciado de tireoide em crianças, adolescentes e adultos jovens: estudo multicêntrico em centros de referência da Bahia e da Paraíba.** 2022. Orientador: Helton Estrela Ramos. 91 f. il. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

RESUMO

Introdução: O carcinoma diferenciado de tireoide é raro em crianças, variando de 0,3-0,5% de todas as neoplasias pediátricas, mas continua sendo a malignidade endócrina mais comum nessa faixa etária e representa o terceiro tumor sólido pediátrico mais comum. A prevalência e o tipo de mutações em genes envolvidos na oncogênese do citado carcinoma parecem diferir entre adultos e crianças, apesar de os dados pediátricos ainda serem muito limitados. O papel dessas alterações no início e na progressão desse carcinoma, a prevalência e as potenciais associações dos diversos marcadores moleculares com características clínico-patológicas de agressividade tumoral e/ou pior prognóstico clínico não estão totalmente consolidados. As fusões *NTRK* têm sido apontadas como importantes marcadores de agressividade tumoral no carcinoma diferenciado de tireoide pediátrico, porém, a sua prevalência é altamente variável. **Objetivos:** Rastrear as fusões *NTRK* em carcinoma diferenciado de tireoide de crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos), em amostras de tecido tumoral fixados em formalina e conservados em blocos de parafina, utilizando imuno-histoquímica; e investigar e confirmar, por sequenciamento de nova geração (NGS), a prevalência das fusões *NTRK* nessa população. Secundariamente, investigar os aspectos clínico-patológicos e moleculares (positividade para as mutações *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *EGFR*, *PIK3CA*). **Material e Métodos:** Estudo retrospectivo de corte transversal, multicêntrico, com 79 casos não consecutivos de carcinoma diferenciado de tireoide em crianças, adolescentes e adultos jovens (< 21 anos), assistidos em quatro centros de referência no tratamento do câncer, na Bahia e na Paraíba, entre janeiro de 2010 e março de 2021. Todas as amostras foram submetidas à imuno-histoquímica para rastreamento da fusão *NTRK* e ao painel *hotspot* para detecção das mutações gênicas. Os casos positivos a esse exame foram submetidos ao NGS para confirmação do resultado. NGS também foi realizado em todos os casos com imuno-histoquímica negativa para investigação da fusão, exceto naqueles tumores portadores da mutação *BRAF*^{V600E} (74 amostras). Consideraram-se testes válidos ao NGS aqueles com resultados positivos ou negativos. Dados clínicos e patológicos foram obtidos pela revisão de lâminas e dos laudos eletrônicos. **Análise descritiva:** Avaliaram-se as variáveis quantitativas pelo teste de Mann-Whitney. Aplicou-se o teste Qui-quadrado de Person ou o teste exato de Fisher para a análise das variáveis qualitativas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. **Resultados:** A prevalência de positividade ao pan-TRK no rastreamento da fusão *NTRK* em 79 amostras tumorais de pacientes pediátricos e adultos jovens portadores de carcinoma diferenciado de tireoide foi de 3,7% (03 casos). A prevalência de fusões *NTRK* confirmadas ao NGS em 35/74 testes válidos na presente casuística foi de 11,4% (04 casos): 3 fusões *ETV6-NTRK3* e 1 fusão *TPR-NTRK1*. Em três amostras tumorais positivas à imuno-histoquímica, a frequência da fusão *NTRK* foi de 0%. Não foi possível estabelecer associação da positividade da fusão *NTRK* com demais aspectos moleculares ou com aspectos clínico-patológicos de agressividade tumoral neste estudo. **Conclusão:** A ausência da confirmação da fusão *NTRK* pelo NGS nas amostras tumorais positivas para a imuno-histoquímica sugere baixa sensibilidade desse método no rastreio dos rearranjos

NTRK; e a baixa prevalência de fusões *NTRK* neste estudo sugere uma baixa frequência das fusões na população avaliada.

Palavras-chave: carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) pediátrico; rearranjos *NTRK*; Imuno-histoquímica (IH); sequenciamento de nova geração (NGS).

T ELLES, Ana Clara Oliveira Tosta. ***NTRK* genes rearrangements in children, adolescents and young adults with differentiated thyroid carcinoma: multicenter research in referral centers from Bahia and Paraíba**. 2022. Advisor: Helton Estrela Ramos. 91 s. ill. Dissertation (Master in Interactive Processes of Organs and Systems) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador.

ABSTRACT

Introduction: Differentiated thyroid carcinoma (DTC) is rare in children, ranging from 0.3-0.5% of all pediatric neoplasms. However, it remains the most common endocrine malignancy in this age group and represents the third most common pediatric solid tumor. The prevalence and type of mutations in genes involved in the DTC oncogenesis differ between adults and children, although pediatric data are still limited. The role of these changes in the initiation and progression of this carcinoma and the prevalence and potential associations of distinct molecular markers with clinical and pathological characteristics of tumor aggressiveness and/or poor clinical outcome are not fully consolidated. Recently, *NTRK* fusions have been identified as important markers of tumor aggressiveness in pediatric DTC, however, its prevalence is highly variable. **Objectives:** To track the presence of *NTRK* fusions in tumor samples from children, adolescents and young adults (under 21 years old); the samples were fixed in formalin and kept in paraffin blocks from children, adolescents and young adults (under 21 years old), using immunohistochemistry (IH), and to investigate and confirm the prevalence of *NTRK* gene rearrangements through next-generation sequencing (NGS) in the population. Secondly, to investigate the clinical and pathological and molecular aspects (positivity for *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *EGFR*, *PIK3CA* mutations). **Material and Methods:** Retrospective multicenter and cross-sectional study involving tumor samples from 79 non-consecutive DTC cases in pediatric patients, adolescents or young adults (under 21 years old) that were treated at 04 referral centers for cancer treatment in Bahia and Paraíba, between January, 2010 and March, 2021. All samples were submitted to IH for *NTRK* fusion tracking and to *hotspot* panel for gene mutations detection. IH positive cases were submitted to NGS in order to confirm the positive result. NGS were also performed in all IH negative cases to investigate the fusion, except for those tumors with the *BRAF*^{V600E} mutation (74 samples). Positive and negative results were considered valid tests. Clinical and anatomopathological reports were obtained from slides review and electronic system. **Descriptive Analysis:** Quantitative variables were evaluated with the Mann-Whitney test. Regarding qualitative variables the chi-square test or the Exact Fisher's test was applied. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. **Results:** Positivity pan-TRK prevalence for *NTRK* fusion tracking in 79 tumors samples from pediatric and young adults with DTC was 3,7% (03 cases). The *NTRK* fusion prevalence confirmed using NGS technique for 35/74 valid tests in our casuistry was 11,4%: 03 *ETV6-NTRK3* and 01 *TPR-NTRK1* rearrangements. In 03 positive samples in IH, the frequency of *NTRK* fusions was 0%. The study was unable to establish *NTRK* fusion positivity association with other clinical and pathological and molecular aspects of tumoral aggressiveness. **Conclusion:** The absence of *NTRK* fusion confirmation by NGS technique in IH positive samples suggests a low sensitivity of the IH method for tracking *NTRK* rearrangements, and the low prevalence of *NTRK* fusions in this study suggests a low *NTRK* fusion frequency in the evaluated population.

Keywords: pediatric well-differentiated thyroid carcinoma; *NTRK* gene rearrangements; Immunohistochemistry (IH); next-generation sequencing (NGS).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Prevalência do CDT pediátrico conforme idade e gênero.	22
Figura 2	Função fisiológica dos receptores de neurotrofinas.	26
Figura 3	Estrutura da família de receptores de neurotrofinas.	27
Figura 4	Visão esquemática das vias de sinalização dos receptores TRK, mostrando as três principais vias envolvidas na diferenciação e sobrevivência celular.	28
Figura 5	Mecanismo molecular de oncogênese da fusão TRK.	29
Figura 6	Fusões TRK encontradas em diversos tipos de câncer em adultos e crianças.	30
Figura 7	Material de arquivo SAPC/HAM e coleta tecido tumoral.	42
Figura 8	Fluxograma da amostragem	48
Figura 9	Fluxograma do Sequenciamento das amostras	49
Figura 10	Pan-TRK IH: padrão de marcação dos casos positivos.	53
Figura 11	Comparação dos tumores com e sem mutações pontuais em relação a idade e tamanho tumoral.	59
Figura 12	Comparação dos tumores $BRAF^{V600E}$ e $BRAF^{non-V600E}$ em relação à idade e tamanho tumoral.	60
Figura 13	Fusão $ETV6-NTRK3$	62
Figura 14	Fusão $TPR-NTRK1$	62
Figura 15	Comparação dos tumores com fusão e sem fusão detectada em relação a idade e tamanho tumoral	65
Figura 16	Comparação da classificação de risco de recorrência (ATA) em relação à idade	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Função dos receptores de neurotrofinas	26
Tabela 2	Estudos que avaliaram a frequência da fusão NTRK em CDT de populações pediátricas e adultos jovens	32
Tabela 3	Dados epidemiológicos, histológicos e clínicos de 79 pacientes com CDT incluídos no estudo conforme idade	51
Tabela 4	Dados do <i>screening</i> com IH da fusão NTRK de todos os pacientes incluídos no estudo	52
Tabela 5	Características clinico-patológicas dos tumores pan-TRK com resultado positivo na Imunohistoquímica (n=3)	53
Tabela 6	Resultados do painel de fusão de NGS em CDT (n=79)	55
Tabela 7	Características clinico-patológicas em 21 casos de CDT com resultados positivos no painel <i>Hotspot</i>	58
Tabela 8	Resultados do painel de fusão de NGS conforme a idade (n=74)	61
Tabela 9	Positividade das fusões ao painel de NGS conforme a idade (n=35)	61
Tabela 10	Características clinico-patológicas em função dos achados moleculares (n=79)	63
Tabela 11	Características clinico-patológicas dos tumores com fusão NTRK	64
Tabela 12	Relação da presença de fusões e mutações pontuais e risco de recorrência, segundo os critérios da ATA.	65
Tabela 13	Relação das variáveis clinico-patológicas e risco de recorrência, segundo os critérios da ATA..	66
Tabela 14	Comparação de variáveis clínico-patológicas e moleculares em relação à idade < 18anos vs. ≥ 18 anos	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Anatomopatológico
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog b1</i>
CDT	Carcinoma diferenciado de tireoide
CEDAPI	Centro de Diagnóstico Pires
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos
CFT	Carcinoma folicular de tireoide
CID	Classificação Internacional de Doenças;
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPT	Carcinoma papilífero de tireoide
CPTC	Carcinoma papilífero de tireoide clássico
CPTED	Carcinoma papilífero de tireoide variante esclerosante difusa
CPTVF	Carcinoma papilífero de tireoide variante folicular
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
Dntp	<i>Desoxirribonucleotídeo fosfatado</i>
EEN	Extensão extranodal
EET	Extensão extra-tireoidiana
FDA	<i>U.S Food and Drug Administration</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>
HAM	Hospital Aristides Maltez

HE	<i>Hematoxilina-eosina</i>
HULW	Hospital Univesitário Lauro Wanderley
HRAS	<i>V-ha-ras harvey rat sarcoma viral oncogene homolo</i>
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IH	Imuno-histoquímica
KRAS	<i>V-ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
LBCC	Liga Baiana Contra o Câncer
LET	Laboratório de Estudo da Tireoide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
Mg	Micrograma (10^{-3} grama)
ml	Mililitro (10^{-3} litro)
mm	Milímetro (10^{-3} metro)
Mrna	<i>Messenger RNA</i>
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
Ng	Nanograma (10^{-9} grama)
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGS	<i>Next generation sequence</i>
NIS	<i>Sodium-iodide symporter</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma ras viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NTRK	<i>Neurotrophic tropomyosin receptor tyrosine kinase</i>
PAX8	<i>Paired box gene 8</i>
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction;</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>

PIP2	Fosfatidilinositol difosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PPFP	<i>PAX8/PPARγ fusion protein</i>
CPT	<i>Papillary thyroid câncer</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SAPC	Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia
SCCP	Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
SCMFS	Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana
SP	Serviço de Patologia
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TFG	<i>Trk-fused gene</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>
TNM	<i>Tumor, node, metastasis</i>
TRK	<i>Tropomyosin receptor kinase</i>
TPM3	<i>Tropomyosin 3</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
TPR	<i>Translocated promoter region (to activated met oncogene)</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
WT	<i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 CÂNCER DE TIREOIDE PEDIÁTRICO.....	21
2.1.1 Aspectos Epidemiológicos	21
2.1.2 Aspectos Anatomopatológicos	22
2.1.3 Aspectos Clínicos E Prognósticos	23
2.1.4 Aspectos Moleculares do CPT Em Crianças e Adolescentes	24
<i>Rearranjos RET/PTC</i>	<i>24</i>
<i>Mutação do gene BRAF</i>	<i>25</i>
<i>Mutação do gene RAS</i>	<i>25</i>
<i>Mutação do Gene TERT</i>	<i>25</i>
<i>Mutação do gene PIK3CA</i>	<i>25</i>
2.2 REARRANJOS CROMOSSÔMICOS DOS RECEPTORES NEUROTROFICO TIROSINA QUINASES – NTRK	26
2.2.1 Genes e Proteínas NTRK	26
2.2.2 Papel Fisiológico e Mecanismo de Ação.....	26
2.2.3 NTRK e Oncogênese	29
2.2.4 Rearranjos NTRK e Câncer De Tireoide Pediátrico.....	30
2.2.5 Rearranjos NTRK e Terapia Alvo	32
2.3 RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO DOS REARRANJOS NTRK.....	33
2.3.1 Imuno-histoquímica	33
2.3.2 Teste de Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i>	34
2.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa.....	35
2.3.4 Sequenciamento de Nova Geração.....	35
3 OBJETIVOS.....	37

3.1 GERAL	37
3.2 ESPECÍFICOS.....	37
3.3 HIPÓTESES	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA.....	39
4.2 CÁLCULO AMOSTRAL.....	40
4.3 GRUPO AMOSTRAL.....	40
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	41
4.5 REVISÃO DE LÂMINAS E COLETA DE AMOSTRA DE TECIDO TUMORAL PARAFINADO.....	41
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA	42
4.7 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	43
4.8 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - PAINEL DE FUSÃO..	44
4.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO - PAINEL HOTSPOT..	45
5 ASPECTOS ESTATÍSTICOS.....	46
6 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS.....	47
7 RESULTADOS	48
7.1 SELEÇÃO DE PACIENTES E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	48
7.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	50
7.2.1 Aspectos Sociodemográficos	50
7.2.2 Aspectos Clínico-Patológicos	50
7.3 RESULTADOS DA IH PAN-TRK PARA A FUSÃO NTRK	52
7.4 RESULTADOS DO PAINEL HOTSPOT DE NGS	54
7.5 RESULTADOS DO PAINEL DE FUSÃO DE NGS	60
8 DISCUSSÃO.....	68
9 CONCLUSÃO.....	74
10 PERSPECTIVAS	75

REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A: Protocolo de Revisão de Lâminas	84
APÊNDICE B: Ficha de Coleta de Dados Clínicos	88
ANEXO: Parecer Consubiaciado do Comitê de Ética em Pesquisa	91

1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer diferenciado de tireoide (CDT) está aumentando em todo o mundo, inclusive na população pediátrica (1). O CDT é raro em crianças, variando de 0,3-0,5% em todas as neoplasias pediátricas, mas continua sendo a malignidade endócrina mais comum nessa faixa etária e representa o terceiro tumor sólido pediátrico mais recorrente (2,3). Alguns fatores ambientais podem ter relevância na crescente incidência do CDT em crianças com exposição à radiação ionizante ou radioterapia externa para tratamento de demais neoplasias malignas, como leucemia e linfoma (4,5).

Na vasta maioria dos casos, carcinomas de tireoide pediátricos são do subtipo carcinoma papilífero (CPT), que se caracteriza por maior disseminação linfática e metástases linfonodais, enquanto o carcinoma folicular de tireoide (CFT) tende à disseminação hematogênica, com metástases a distância (6,7). Em geral, o CDT em crianças e pacientes jovens é uma doença mais agressiva, com tamanho tumoral maior do que nos adultos. Apesar disso, eles apresentam um melhor prognóstico, sendo visto que o comportamento local mais agressivo não tem um papel determinante na evolução do paciente. A idade pode então ser considerada o fator mais importante na determinação do prognóstico, ao se comparar essa população aos adultos, o que sugere que fatores biológicos, mais do que fatores relacionados ao tratamento, teriam um maior efeito no desfecho. (8, 9,10). Em termos gerais, a taxa de sobrevida global é maior que 90%, sendo que 60 a 80% desses pacientes já apresentam metástase regional e 10 a 20% apresentam metástase a distância. Além disso, a taxa de sobrevida livre de progressão de doença é de aproximadamente de 65-70%, em cinco anos após o diagnóstico (11).

A prevalência e o tipo de alterações em genes envolvidos na oncogênese do CDT parecem diferir entre adultos e crianças, apesar dos dados pediátricos ainda serem muito limitados. A patogênese do CPT envolve, principalmente, distúrbios da via MAPK, que regula o crescimento celular e a diferenciação. Distúrbios dessa via são causados por alterações já conhecidas de alguns oncogenes específicos: rearranjos *RET/PTC* e *TRK*, mutações dos genes *BRAF* e *RAS* (12). Em crianças e adolescentes, as translocações do gene *RET/PTC* são a alteração genética mais comum, enquanto as mutações nos genes *BRAF*, *RAS* e região promotora do gene *TERT* são mecanismos genéticos mais relevantes na tumorigênese do CDT dos adultos (13,14). As mutações *BRAF*^{V600E}, na faixa pediátrica, são significativamente menos comuns do que no adulto (0-20%) e não parecem estar tão bem associadas às características clínicas e histopatológicas de agressividade do tumor (15-17).

Essas diferenças moleculares podem, parcialmente, explicar a melhor resposta à terapia com iodo radioativo e à baixa mortalidade em crianças com CPT, além da rara progressão para tumores mais indiferenciados (18).

Atualmente, sabe-se que o câncer é uma doença do genoma. Estudos indicam que 30% a 49% dos pacientes que realizam a determinação do perfil genômico tumoral podem apresentar uma alteração acionável, o que significa que os pacientes podem estar aptos a utilizar uma terapia em estudo ou aprovada. *Drivers* oncogênicos, os fatores desencadeadores dos eventos que resultam na carcinogênese, são frequentemente associados ao CPT infantil e, definitivamente, a genômica tumoral pode ser útil para orientar possíveis terapias moleculares (26,27).

Mais recentemente, outros proto-oncogenes têm se mostrado importantes *drivers* oncogênicos na tumorigênese tireoidiana: os genes *NTRK*, codificadores dos receptores neurotróficos tirosina quinase (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*), com alta afinidade para o fator de crescimento neuronal (NGF), atuam regulando a diferenciação e a morte celular programada durante o desenvolvimento neural (19). Tais alterações levam à ativação constante dos sinais celulares para crescimento e divisão, desencadeando, assim, o início e a progressão da tumorigênese tireoideana (63).

No CPT, a prevalência dos rearranjos *NTRK1* pode ser variável em diferentes populações, com estudos demonstrando prevalência de até 26% (29,44,45). No câncer pediátrico, as fusões *NTRK* podem estar associadas à doença de estadiamento mais avançado (33). Na população pediátrica, CPT com rearranjos *NTRK* parece apresentar-se como doença mais extensa e patologia mais agressiva do que o CPT associado à mutação *BRAF*^{V600E}. No entanto, novos estudos populacionais precisam ser desenvolvidos para demonstrar a prevalência e o comportamento biológico dos tumores de tireoide que apresentam proteínas de fusão TRK (12,47).

Atualmente, existe um medicamento disponível no Brasil para o tratamento de cânceres *NTRK* positivos (54). A substância é o larotrectinibe, um inibidor seletivo da TRK, amplamente testado em adultos e crianças (48-52). Uma das principais novidades dessa terapia é - além do alvo - sua abordagem agnóstica do tumor. O larotrectinibe pode ser aplicado em todos os cânceres com fusão *NTRK* comprovada, independentemente da entidade tumoral e da idade dos pacientes (51).

Esses casos destacam a potencial utilidade clínica do uso da genômica tumoral para guiar racionalmente a terapia direcionada a um determinado alvo molecular. Inibidores seletivos da TRK resultam em melhora radiológica (e tumoral), rápida e sustentada, sem

toxicidade significativa. É muito importante conhecer os possíveis *drivers* oncogênicos para potencial tratamento do CPT pediátrico avançado, sobretudo se houver contexto de recidiva de doença e refratariedade ao tratamento convencional de terapia com iodo radioativo (50).

Portanto, existe forte interesse na pesquisa das fusões *NTRK*, sobretudo em pacientes com doença mais avançada, o que leva a uma necessidade urgente de padronizar, sobretudo no SUS, teste diagnóstico de rotina para identificar essas fusões gênicas como um método diagnóstico complementar que dê suporte às decisões clínicas.

Encontrar pacientes com a fusão *NTRK* é difícil, pois se trata de uma alteração molecular rara em cânceres comuns e frequente apenas em cânceres raros. Porém, é importante considerar o rastreamento em pacientes sem outras mutações. Com enfoque nos rearranjos dos genes *NTRK* envolvidos na tumorigênese do CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens, resolveu-se investigar a frequência das fusões *NTRK* em estudo multicêntrico, envolvendo amostras tumorais de casos atendidos no Hospital Aristides Maltez (HAM), maior hospital oncológico de Salvador/Bahia; no Instituto Integrado (IT), localizado em Salvador, Bahia; na Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana (SCMFS), localizado na cidade de Feira de Santana, Bahia; e no Hospital Univesitário Lauro Wanderley (HULW), localizado na cidade de João Pessoa, Paraíba, e, simultaneamente, estabelecer correlação com o grau de agressividade tumoral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta seção compreende a base teórica que dá sustentação ao desenvolvimento deste estudo.

2.1 CÂNCER DE TIREOIDE PEDIÁTRICO

Esta seção abarca o tema objeto de estudo, em quatro partes, a seguir detalhadas.

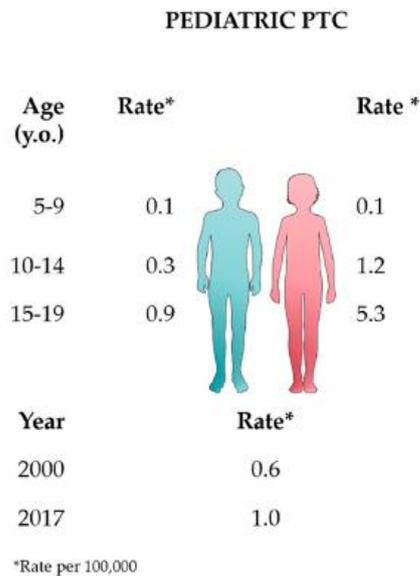
2.1.1 Aspectos Epidemiológicos

Os nódulos de tireoide, de modo geral, afetam cerca de 1% da faixa etária pediátrica, com um incremento na incidência de aproximadamente 1.1% ao ano no mundo. O risco de malignidade é maior nos nódulos pediátricos, quando comparado com os adultos, sendo 26% *versus* 7-15%, respectivamente (68,70-71).

O CDT é a neoplasia endócrina mais frequentemente documentada, representando 3-4% do todas as neoplasias humanas. A incidência tem aumentado nas últimas décadas em todo mundo, inclusive na população pediátrica, variando de 0,6 a 1,0 /100.000 indivíduos (1,67,72,85).

Ainda assim, CDT é raro em pacientes pediátricos (idade até 18 anos), correspondendo a 6% de todas as neoplasias pediátricas. É mais frequente com o aumento da idade, em adolescentes e adultos jovens. Entre adolescentes de 15-19 anos, o CDT é o oitavo câncer mais prevalente. Considerando o gênero, a prevalência é maior no sexo feminino, com idade maior do que 10 anos, mais precisamente entre 13-19 anos (72, 85). (Figura 1)

Figura 1: Prevalência do CDT pediátrico conforme idade e gênero.



Fonte: Adaptado de Cerutti e colaboradores (85).

Apesar desse crescimento na incidência ser atribuído principalmente ao aumento da detecção de tumores pequenos, um aumento real da incidência de neoplasia de tireoide também é identificado nos tumores maiores (69). As possíveis razões para esse aumento são os avanços no cuidado à saúde, incluindo ultrassonografia e biópsia aspirativa por agulha fina, carcinogênese ambiental e exposição à radiação (67,70).

Na população pediátrica, a exposição à radiação é um fator de risco de malignidade bem consolidado, como demonstrado após os acidentes nucleares de Chernobyl, em 1986, e de Fukushima, em 2011 (20, 23, 45). No Brasil, um grande estudo com mais de 11 mil sujeitos, abrangendo as cinco regiões do país, mostrou que a taxa global de incidência do CPT aumentou entre crianças e adultos jovens, especialmente no sexo feminino, com uma taxa de 2,8 e 115,3 por milhão, respectivamente (95).

2.1.2 Aspectos Anatomopatológicos

O tipo histológico mais comumente encontrado é o CPT, que representa 90% ou mais das neoplasias de tireoide pediátricas (68). A aparência macroscópica do CPT é variável. Geralmente, são lesões firmes, brancas e não encapsuladas; e calcificações, necroses ou alterações císticas podem estar aparentes (74).

Outros diferentes tipos de neoplasia tireoidiana são descritos: CFT (8-10%), carcinoma pobremente diferenciado (CPDT) (5-7%), carcinoma anaplásico (CAT) (2-3%), os quais se originam das células foliculares da tireoide, e o carcinoma medular (CMT) (5-7%), que se origina das células parafoliculares da tireoide. Os CPT, CFT e CAT raramente são familiares (apenas em cerca de 5% dos pacientes com CPT), enquanto o CMT pode ocorrer em uma herança familiar autossômica dominante em 25% dos casos (67).

Algumas variantes histológicas do CPT apresentam maior agressividade, tais como a variante de células altas, variante de células colunares e variante esclerosante difusa. Esses subtipos agressivos têm sido associados a altas taxas de multifocalidade, extensão extra-tireoidiana, metástases locais e a distância e recorrência (73,74). O CMT e o CFT são relativamente raros. O CMT é mais familiar do que esporádico em crianças e adolescentes. O CPDT e o CAT da tireoide têm sido identificados em apenas alguns pacientes pediátricos (68).

2.1.3 Aspectos Clínicos e Prognósticos

O CDT em crianças e adolescentes é mais agressivo do que em adultos, de acordo com vários estudos. Por outro lado, eles oferecem um prognóstico melhor, uma baixa taxa de desdiferenciação tumoral e de mortalidade relacionada à doença, menor que 2% (68, 72, 75).

Dentre os critérios utilizados para estadiamento tumoral e linfonodal, tais como tamanho do tumor e localização de linfonodos acometidos na região cervical, a idade e a presença de extensão extra-tireoidiana grosseira do tumor se mostraram importantes fatores prognósticos para recorrência da doença, com impacto na sobrevida (55, 79).

Alessandri e colaboradores, em uma casuística inteiramente pediátrica com 38 pacientes portadores de CDT, com menos de 17 anos de idade, sendo 12 deles com até 10 anos, identificaram a idade como principal determinante do momento de recorrência em CDT. Pacientes mais jovens recorreram mais frequentemente e de forma mais precoce do que pacientes com maior idade, havendo relação entre idade mais jovem e doença localmente invasiva, que não havia sido descrita anteriormente (78).

A sobrevida global do CDT pediátrico é de 98,3% em cinco anos. Apesar disso, o risco de recorrência locorregional varia entre 14-25% e 34-40% aos 5 e 10 anos de seguimento, respectivamente; e metástases a distância, em aproximadamente 10%, sendo os pulmões o sítio mais comum de acometimento de metástases (50%), seguido pelos ossos (25%) (72,75).

Em razão da apresentação mais agressiva da doença e de altas taxas de recorrência e metástase a distância, grande número de pacientes jovens necessitará de terapia adjuvante com iodo radioativo. No entanto, uma característica favorável é que o simportador sódio-iodo (NIS), proteína responsável pela captação do iodo radioativo circulante, é frequentemente bem expressa em CDT de crianças e a resposta ao tratamento é geralmente satisfatória, ainda que na doença avançada, o que favorece ainda mais o prognóstico nessa população. (10, 11, 74).

2.1.4 Aspectos Moleculares do CPT em Crianças e Adolescentes

Diferentes marcadores moleculares diagnósticos e prognósticos têm sido identificados no CPT (85). No CPT pediátrico, os rearranjos têm sido reportados mais frequentemente e, com menor frequência, as mutações pontuais em comparação aos CPT dos adultos (68).

Os genes *RAS*, *BRAF* e *TERT* e os rearranjos *RET/PTC* causam ativação descontrolada das vias de sinalização MAPK e PI3K (68).

Rearranjos oncogênicos dos proto-oncogenes *RET* e *NTRK1* são frequentemente detectados no CPT, sendo mais frequentes em pacientes com menos de 20 anos de idade (81). As mutações da região promotora do gene *TERT* e dos genes *NRAS* e *PIK3Ca* também são *drivers* oncogênicos para o câncer nessa faixa de idade (82). No entanto, os estudos publicados têm apenas um número limitado de pacientes pediátricos ou um baixo número de genes investigados, especialmente em relação aos rearranjos *NTRK* (12, 68).

Rearranjos RET/PTC

As translocações *RET/PTC* são o principal evento molecular na população pediátrica, correspondendo a 22-65% dos CPT pediátricos esporádicos (77) e sendo encontradas em alta frequência nas crianças expostas à radiação (67). Nos adultos, translocações *RET/PTC* geralmente associam-se a bom prognóstico e à boa resposta ao tratamento com radio-iodo, enquanto nos pacientes pediátricos essas fusões estão associadas a fatores como extensão extra-tireoidiana, metástase linfonodal e pulmonar, variantes mais agressivas e de pior prognóstico (62, 65A, 67-68, 81, 85).

Mutação do gene BRAF

As mutações $BRAF^{V600E}$ são as mais encontradas em CPT de adultos, porém, são significativamente menos comuns nos CDT pediátricos, variando de 0-20% em prevalência e não parecem, como acontece nos adultos, estar tão bem associadas às características clínicas e histopatológicas do tumor, em relação à agressividade tumoral (12,15–17,77). Por outro lado, há um aumento na prevalência de mutações $BRAF^{V600E}$ com o aumento da idade, sendo documentada a associação dessa mutação com tumores de maior tamanho (> 2 cm), em ambos CPT adultos e pediátricos, sendo mais frequentemente encontradas no tipo clássico. (12, 14). Ainda assim, a literatura demonstra resultados muito contraditórios em relação ao valor prognóstico da mutação $BRAF^{V600E}$ na população pediátrica (13, 58, 85).

Mutação do gene RAS

Os três genes da família são *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*. As mutações *RAS* são raras nos CPT pediátricos e são observados em menos de 5% dos casos esporádicos, particularmente nos genes *NRAS* e *HRAS*. São mais encontrados na variante folicular do CPT (12, 62). Em adultos, as mutações *RAS* são mais frequentes em CFT (~40%) e no CPTVF (~15-20%) (16). Seu valor prognóstico não é claro, apesar de haver associação com metástase a distância em adultos (85).

Mutação da região promotora do gene TERT

Em adultos, a mutação na região promotora do gene *TERT* é associada à doença mais avançada, extensão extra-tireoidiana, invasão vascular, metástase regional e a distância e recorrência (85,86) Na faixa pediátrica, a sua prevalência é extremamente baixa. O primeiro estudo com um número maior de pacientes pediátricos demonstrou uma prevalência de apenas 1,8%, sugerindo um papel limitado nesta população (17).

Mutação do gene PIK3CA

As mutações *PIK3CA* são raras em CPT de adultos, mais frequentemente reportadas em carcinomas pouco diferenciados. Em crianças, estima-se que sua prevalência seja bem menor, em torno de 1%, não sendo clara sua associação com critérios de mau prognóstico (16).

2.2 REARRANJOS CROMOSSÔMICOS DOS RECEPTORES NEUROTROFICOS TIROSINA QUINASES – *NTRK*

Esta seção desenvolve o tema supra, detalhado em cinco partes.

2.2.1 Genes e Proteínas *NTRK*

Os genes *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*) codificam, cada um, uma proteína TRK isolada: TRKA, TRKB e TRKC, respectivamente. Essas quinases são proteínas transmembrana, ativadas por meio da transmissão dependente de ligante de sinais extracelulares até o núcleo, ativando o crescimento, a proliferação e as vias de sobrevivência das células, como as vias MAPK/ERK e PI3K/AKT. Em seu contexto biológico normal, as proteínas TRK são expressas em células neuronais e cada uma desempenha um papel diferente e importante no desenvolvimento e na manutenção do sistema nervoso, assim como na sobrevivência celular (19, 24–27,29).

2.2.2 Papel Fisiológico e Mecanismo de Ação

O *NTRK1* está envolvido na regulação da dor e na termorregulação; *NTRK2* controla os movimentos, memória, cognição, humor, apetite e peso corporal; e o *NTRK3* é importante para a função de propriocepção. Portanto, o desenvolvimento neural e a manutenção do funcionamento neurológico são regulados pelas vias de sinalização de neurotrofinas de ambos os sistemas nervoso central e periférico (19, 30). (Tabela 1)

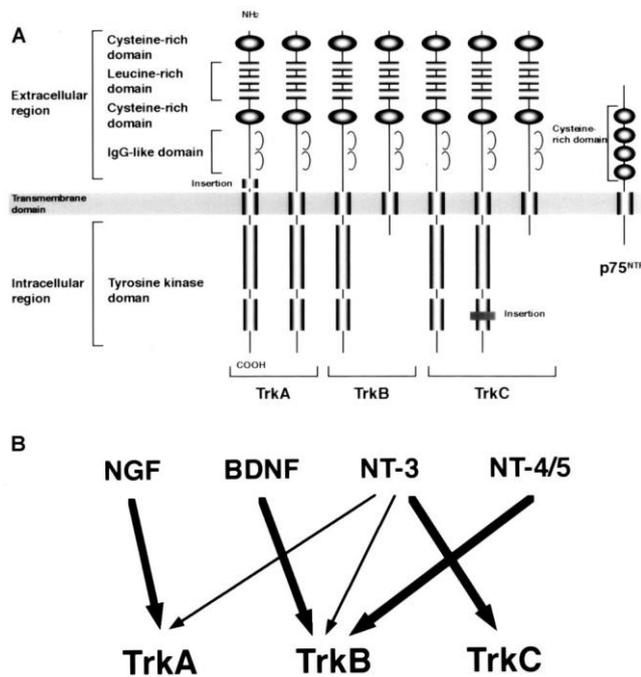
Figura 2: Função fisiológica dos receptores de neurotrofinas

Receptor (gene)	Função
TRKA (<i>NTRK1</i>)	Dor, termorregulação
TRKB (<i>NTRK2</i>)	Movimento, memória, cognição, humor, apetite, peso.
TRKC (<i>NTRK3</i>)	Propriocepção

Fonte: Adaptado de Markl e colaboradores (30)

Cada um desses receptores é formado por um domínio extracelular para ligação ao ligante, uma região transmembrana e um domínio intracelular, com um domínio quinase (26,29). Para exercer suas funções, as proteínas TRK são ativadas pelas neurotrofinas (NT). Apesar de altamente homólogos, cada receptor tem um ligante de preferência: TRKA tem alta afinidade pelo fator neurotrófico de crescimento neural (NGF); TRKB tem alta afinidade pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF); e NT-4; e a TRKC tem alta afinidade pela NT-3. (19, 29,34) (Figura 2)

Figura 3: Estrutura da família de receptores de neurotrofinas.

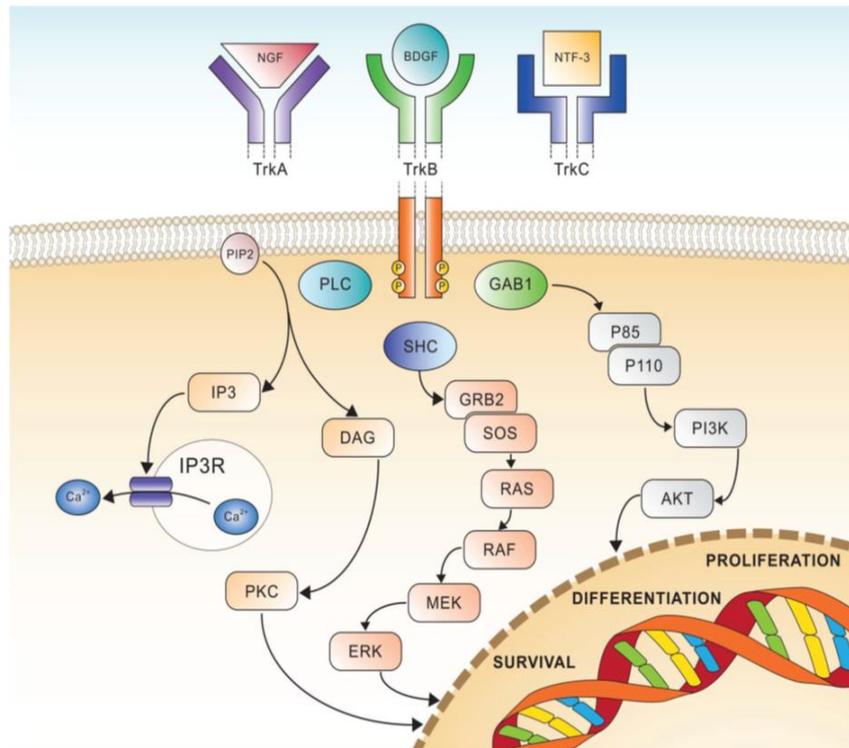


Fonte: Adaptado de Nakagawara e colaboradores (2001) (19).

Legenda: (A) TRK e seus ligantes. TRKA tem uma curta inserção na região justamembrana do seu domínio extracelular. Ambos TRKB e TRKC têm isoformas truncadas sem um domínio quinase. p75^{NTR} estruturalmente pertence ao receptor de fator de necrose tumoral. (B) Neurotrofinas e seus receptores de alta afinidade.

A ligação da TRKA pelo NGF causa ativação da via RAS/MAPK, leva ao aumento da proliferação e ao crescimento celular, por meio da sinalização ERK mediada. Outras vias, como a fosfolipase-C (PLC-gama) e a PI3K, também são ativadas: TRKC acoplada à NT-3 causa ativação preferencial da via PI3/AKT, prevenindo apoptose e promovendo a sobrevivência da célula, enquanto que a TRKB transduz o sinal do BDNF pela via RAS-ERK, PI3K e PLC-gama (29). (Figura 3)

Figura 4: Sinalização dos receptores TRK, mostrando as três principais vias envolvidas na diferenciação e sobrevivência celular.



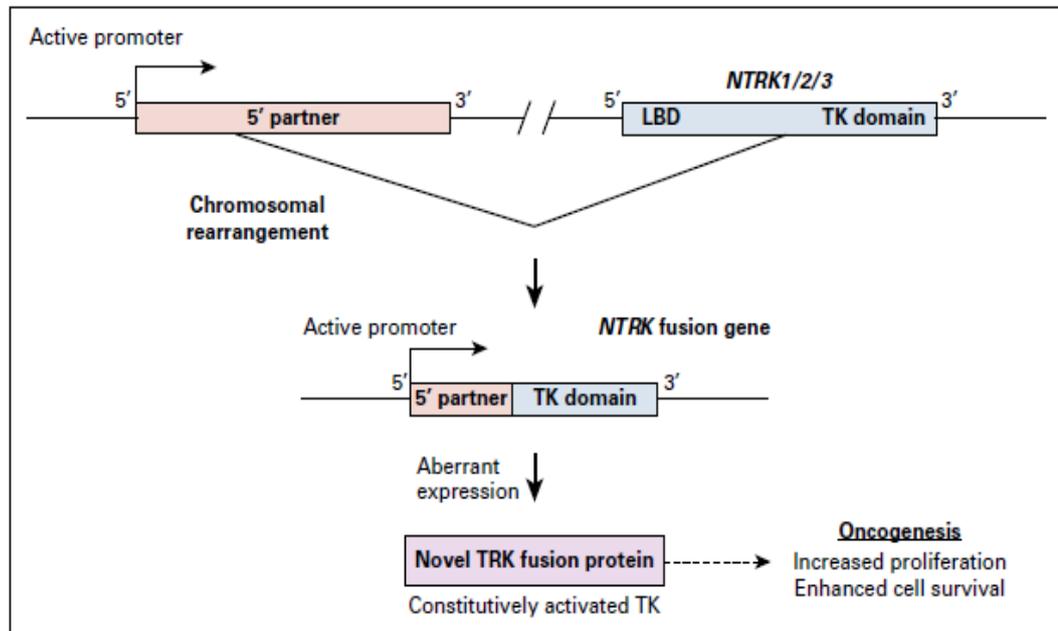
Fonte: Adaptado de Amatu colaboradores (2016). (29)

Legenda: A ativação das vias de sinalização RAS/MAPK, PI3/AKT e PLC-gama.

No câncer de tireoide, um dos genes *NTRK* funde-se a outro gene não relacionado, por meio de pareamento terminal não homólogo durante o processo de reparo de danos do DNA (24, 28, 29). Essas fusões podem ocorrer por inversões, deleções ou translocações cromossômicas (34). Exceto quando silenciado, o gene de fusão *NTRK* acarreta a expressão de uma proteína quimérica que retém o domínio quinase de TRK, mas não o domínio de ligação ao ligante (24). Os genes *NTRK1*, *NTRK2* ou *NTRK3* tendem a se fundir com genes constitutivos (*housekeeping*) (21) e essas fusões oncogênicas podem ocorrer em qualquer dos três genes localizados nos cromossomos humanos 1q23.1, 9q21.33 a 15q25.3, respectivamente. A fusão codifica um domínio tirosina quinase ativo, a partir da ligação N-terminal do gene parceiro a C-terminal da proteína TRK (31), levando à homodimerização do receptor, à fosforilação e à ativação das vias de sinalização (34). Normalmente, a dimerização das proteínas de fusão TRK é mediada pelo parceiro de fusão 5', que possibilita que as partes TRK das proteínas se autofosforem, independentemente de qualquer regulação. Como resultado dessa ativação independente de ligante, as proteínas de fusão TRK são constitutivamente ativas e propagam uma cascata de sinais constantes, que causa a proliferação excessiva e a sobrevivência das células. (24–26, 33). (Figura 4) Após a fusão, os

genes resultantes dessa alteração permanecem constitutivamente ativos e podem resultar no desenvolvimento de tumores sólidos em diversos tipos de tecidos, independentemente do gene com o qual ocorre a fusão. (25–27).

Figura 5: Mecanismo molecular da oncogênese da fusão TRK mediada.



Fonte: Adaptado de Albert CM e colaboradores (33)

Legenda: Ligação N-terminal do gene parceiro à C-terminal da proteína TRK levando à homodimerização do receptor, fosforilação e ativação das vias de sinalização com proliferação e sobrevivência celular.

2.2.3 *NTRK* e Oncogênese

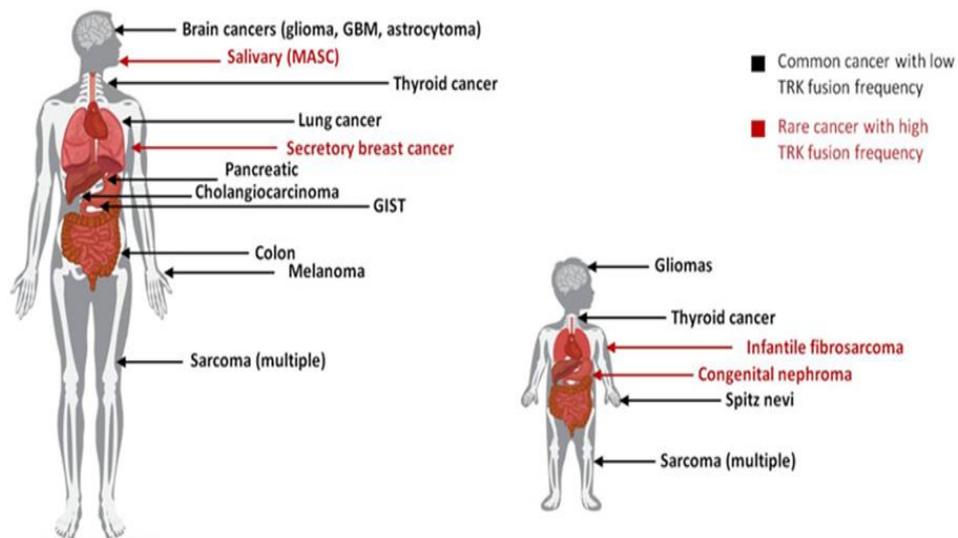
As proteínas de fusão TRK são desencadeadores (ou *drivers*) oncogênicos encontrados em ampla gama de tumores e com frequência bastante variável, tanto em pacientes pediátricos, quanto em adultos (22,30). As fusões TRK são conhecidas desde 1982 (66). No momento, sabe-se que as proteínas de fusão TRK são raras em tumores sólidos comuns, sendo encontradas em frequência <1%, mas costumam ocorrer com maior frequência em tumores pediátricos raros (31).

Os tumores com fusões *NTRK* são classificados em relação à sua frequência de acometimentos pela fusão, em tumores com alta e baixa frequência. Dentre os tumores com alta frequência, estão o carcinoma de mama secretório e fibrossarcoma infantil congênito, com uma prevalência da fusão maior que 90%, sendo mais comuns as fusões dos genes *NTRK1* e *NTRK3* e menos frequente no gene *NTRK2*, este ocorrendo especialmente em

gliomas, demonstrando que os receptores podem estar envolvidos de maneira diferente, de acordo com cada doença (19,30–33,65, 90, 91).

Outras neoplasias descritas com alta prevalência das fusões *NTRK* são o carcinoma de glândula salivar, análogo ao carcinoma de mama secretório (MASC), e o nefroblastoma mesoblástico congênito. Os tumores com baixa frequência de fusões *NTRK* podem ser ainda subdivididos em tumores com fusões que variam de 5-25% e com menos de 5%. No primeiro grupo, estão os carcinomas de tireoide e o tumor estromal gastrointestinal (GIST). Dentre os tumores com frequência muito baixa, < 5% ou até mesmo <1%, citam-se o carcinoma colorretal, o astrocitoma de alto grau, a neoplasia de cabeça e pescoço, incluindo de glândula salivar, e a neoplasia de pulmão não pequenas células, porém as fusões TRK já foram descritas em diversas outras doenças (29, 30, 38, 50, 65). (Figura 5)

Figura 6 - Fusões TRK encontradas em diversos tipos de câncer.



Fonte: Adaptado de Hyman DM e colaboradores (65)

Legenda: A figura demonstra os tumores com a fusão TRK mais frequentes em adultos e crianças. Tumores raros estão com alta frequência de fusão TRK estão presentes na população pediátrica.

2.2.4 Rearranjos *NTRK* e Câncer de Tireoide Pediátrico

A primeira descrição de rearranjo *NTRK* em neoplasia de tireoide ocorreu em 1989, com a identificação da fusão do gene *NTRK1* no CPT (65). Ainda que a frequência da fusão *NTRK* na população pediátrica seja aproximadamente oito vezes mais comum do que em adultos, desde então, estudos de pequenas séries têm demonstrado baixa prevalência das fusões *NTRK* em suas casuísticas, variando de 2,28%-18% (20,23,45,91), exceto por uma alta

prevalência observada em uma série nos Estados Unidos, com uma prevalência de 26% (46). (Tabela 2)

Os rearranjos do gene *NTRK* são menos frequentes no CPT, em comparação com as fusões gênicas *RET*. De modo geral, as fusões *RET* são as mais prevalentes, seguidas pela fusão *ETV6-NTRK*. Embora menos frequentes, os rearranjos *NTRK1* encontrados no CPT desempenham papéis diretos, representando evento precoce no processo de carcinogênese (61,64). Inicialmente, rearranjos *ETV6-NTRK3* foram observados no CDT em associação à exposição à radiação ionizante, com fusões gênicas ativadoras da via de sinalização MAPK. Após o acidente nuclear de Chernobyl em 1986, as fusões *NTRK* em CDT foram mais comuns, com um maior risco naqueles expostos em idade muito jovem, sendo reportadas prevalências variando de 3-15% (20, 23,45,47). Posteriormente, essas fusões *ETV6-NTRK3* também foram reportadas em CDT na ausência de radiação prévia, sendo associado a comportamento mais agressivo. (72) Apesar dos rearranjos *NTRK2* não serem reportados no CDT até o momento, a presença dessa fusão não pode ser excluída até que sejam realizados mais estudos com análise genética (38).

As fusões *NTRK* ocorrem tipicamente de maneira mutuamente excludente com outros *drivers* mitogênicos fortes, que são alterações genéticas que afetam os genes mais comuns, envolvidos na via de sinalização MAPK: *KRAS*, *NRAS* e *BRAF* (31), sendo que, em raras ocasiões, a mutação *BRAF*^{V600E} pode coexistir com os rearranjos *NTRK* (23, 91).

Apesar da significância prognóstica dos rearranjos *NTRK1/3* ainda não ser muito clara em razão do número limitado de casos (38), estudos recentes envolvendo pacientes pediátricos, adolescentes e adultos jovens com CDT demonstraram doença mais extensa, características anatomopatológicas mais agressivas e piores desfechos clínicos para os tumores positivos para os rearranjos *NTRK*. (12, 20, 23). Os estudos mostram uma apresentação multinodal pouco usual e uma propensão à disseminação linfovascular, o que pode ser útil para o reconhecimento dos carcinomas de tireoide associados aos rearranjos *NTRK* (45-47,62). Em uma dessas séries de pacientes, Prasad e colaboradores verificaram que 71% dos tumores com fusões *NTRK* tinham tumores T2/T3 e invasão vascular, quando comparados a 22% de pacientes com demais alterações genéticas (46). Clinicamente, esses tumores demonstram alta taxa de recorrência e prevalência de metástase a distância, não sendo ainda possível determinar com clareza as diferenças de comportamento biológico dos rearranjos *NTRK 1 x NTRK2* no CDT (87). Um estudo, no entanto, demonstrou que carcinomas de tireoide com fusão *NTRK1* apresentaram maior multifocalidade e agressividade do que neoplasias de tireoide com a fusão *NTRK3* (91). A apresentação fenotípica é bastante

diversa nos tumores com fusões *NTRK*, com séries demonstrando tumores com padrão de arquitetura folicular predominante, como também padrões de arranjos papilares com estruturas glomeruloides (87,90).

Tabela 2: Estudos que avaliaram a frequência da fusão *NTRK* em CDT de populações pediátricas e adultos jovens

Autor	País	Idade	N	% Fusão <i>NTRK</i>	Risco
Sassolas <i>et al</i> , 2012	França	8-35 anos	28 (< 20 anos)	1,9% (2 casos TRK, idade > 20 anos, 0% <20 anos)	alto
Prassad <i>et al</i> , 2016	EUA	≤18 anos	28 ≤ 18 anos	26% (7 casos: 5 <i>ETV6-NTRK3</i> ; 1 <i>TPR-NTRK1</i> ; 1 <i>NTRK3</i>)	alto
Pekova <i>et al</i> , 2021	Rep Tcheca	6-77 anos	104 < 20 anos	16,3% (17 casos: 8 tipos de fusão <i>NTRK3</i> e <i>NTRK1</i>)	alto
Newfiled <i>et al</i> , 2022	EUA	7-18 anos, mediana 14,7 anos	39 ≤ 18 anos	10,3 % (3: 2 <i>ETV6- NTRK3</i> , 1 <i>TPR-NTRK1</i>)	alto
Macerola <i>et al</i> , 2021	Itália	< 18 anos , mediana 16 anos	163 ≤ 18 anos	11% (23 casos: 18 <i>NTRK3</i> , 5 <i>NTRK1</i>)	alto
Pekova <i>et al</i> , 2019	Rep Tcheca	6-20 anos, mediana 14,5 anos	93 < 20 anos	18% (7 casos: 4 <i>NTRK3</i> , 3 <i>NTRK1</i>)	alto
Cordioli <i>et al</i> , 2016	Brasil	4-18 anos, mediana 11,8 anos	35 ≤ 18 anos	9% (3 casos <i>ETV6-NTRK3</i>)	alto
Zaho <i>et al</i> , 2020	EUA	< 20 anos	73 < 20 anos	13% (10 casos: 6 <i>ETV6-NTRK3</i> , 4 <i>NTRK1</i>)	alto
Potter <i>et al</i> , 2020	EUA	0-24 anos	36 < 24 anos	11% (4 <i>NTRK3</i>)	alto
Alzahrani <i>et al</i> , 2020	Arábia Saudita	5-18 anos , mediana 17 anos	48 < 18 anos	12,5% (6 casos: 5 <i>NTRK3</i> , 1 <i>NTRK1</i>)	alto

Fonte: Dados da pesquisa.

2.2.5 Rearranjos *NTRK* e Terapia Alvo

As fusões de *NTRK1/2/3* atualmente representam novos alvos terapêuticos em oncologia, pois podem ser inibidas com sucesso por inibidores de quinase, direcionados independentemente do parceiro do gene 5' e da histologia tumoral. Ao considerar esse grupo específico de pacientes, recentes estudos têm buscado oferecer tratamento direcionado à inibição da fusão *NTRK*, com o intuito de controlar e tratar as neoplasias portadoras dessa fusão (43,51).

A terapia alvo com larotrectinibe (VITRAKVI®) recebeu aprovação acelerada da Food Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos, em novembro de 2018, para tumores sólidos adultos e pediátricos com fusões *NTRK*, fusão sem mutações de resistência conhecidas (53,54); e o Brasil foi o segundo país do mundo a aprovar esse tratamento pela ANVISA, em 1º de julho de 2019, sob o número de registro 170560117 (54). A aprovação baseou-se em resultados de estudos clínicos que mostraram altas taxas de resposta e respostas duradouras, além de sobrevida livre de progressão com o uso desse medicamento. Os tumores avaliados

foram tumores de glândula salivar, sarcoma de tecidos moles, fibrossarcoma infantil, tumor de tireoide, câncer colorretal, câncer de pulmão, melanoma, GIST, colangiocarcinoma, tumor de apêndice, câncer de mama e de pâncreas, em um total de 55 pacientes. Nos ensaios de fase 1/2, foram incluídos 55 pacientes com diferentes fusões *NTRK*. Todos os três genes *NTRK* foram representados e a faixa etária foi de 4 meses a 76 anos. A taxa de resposta geral foi de 75%. Após um ano, a resposta se manteve em 71% dos pacientes, enquanto 55% deles apresentavam sobrevida livre de progressão (50,51).

Entrectinibe é outro inibidor seletivo dos receptores TRK. Tem registro no FDA para o tratamento de pacientes adultos e pediátricos (≥ 12 anos) com tumores sólidos, localmente avançados, metastáticos ou irresssecáveis, positivos para fusão *NTRK*, que progrediram após tratamento ou que não tenham outra opção terapêutica satisfatória, porém, ainda sem registro para qualquer indicação na ANVISA (54).

Diante da possibilidade de identificação dos pacientes portadores da fusão *NTRK*, elegíveis para receberem o tratamento com terapia alvo com inibidor de *NTRK*, diversos métodos de rastreamento têm sido estudados nas últimas décadas (84).

2.3 RASTREAMENTO E DIAGNÓSTICO DOS REARRANJOS *NTRK*

Existem quatro opções para a testagem de fusões *NTRK*, em ordem de complexidade e custo: imuno-histoquímica (IH), FISH (*fluorescence in situ hybridization*), RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) e NGS (*next-generation sequencing*). Cada técnica contém suas vantagens específicas e limitações. Nos casos de tipos tumorais (raros), com alta frequência de fusões *NTRK* específicas e patognomônicas, a investigação com IH inicial é a maneira mais barata, rápida e eficaz de rastreamento, embora a confirmação por um segundo método, como RT-PCR, FISH ou NGS seja recomendado. Em instituições onde o NGS está disponível e o painel já utilizado inclui alterações *NTRK*, essa técnica também pode ser aplicada como primeira-escolha. Quando o NGS não é facilmente acessível ou há importantes preocupações com o custo, a IH usando um anticorpo pan-TRK é o método de escolha, razoavelmente sensível para rastrear fusões *NTRK* (30).

2.3.1 Imuno-histoquímica (IH)

Os anticorpos pan-TRK para IH detectam as proteínas TRK A, B e C, que podem ser expressas tanto nas proteínas selvagens, quanto nas de fusão (29,30). Atualmente, existem

dois anticorpos disponíveis comercialmente: um é específico para TRKA (EP 1058Y - Abcam), enquanto o outro é um anticorpo pan-TRK (clone EPR17341-Abcam e Ventana) (34).

A IH é certamente a técnica que tem a maior disponibilidade, melhor custo e facilidade de padronização. O teste oferece alta sensibilidade e especificidade, baixo custo e tempo de execução rápido, sendo uma ferramenta valiosa para identificar a expressão *NTRK* (30, 31, 39).

A sensibilidade global da técnica é de 85-90%, sendo maior na detecção da fusão *NTRK1* e 2, quando geralmente é reportada em torno de 90%, do que em relação à detecção do *NTRK3*. A menor taxa de detecção da fusão *NTRK3* é de cerca de 50%, sendo reportados resultados falso-negativos nessa fusão. A alta especificidade da IH varia 95-100% em tecidos não-sistema nervoso central (33-35).

A positividade da IH é definida com ao menos 1% de células positivas para o anticorpo pan-TRK em qualquer padronização, incluindo membranosa, citoplasmática, perinuclear ou nuclear. Enquanto que a maioria das fusões *NTRK* apresenta marcação citoplasmática, a localização varia, dependendo do gene parceiro (35, 36, 38). O padrão de marcação varia e depende do gene parceiro na fusão. A fusão *ETV6-NTRK3* demonstra uma forte marcação nuclear como característica peculiar, com marcação citoplasmática fraca difusa, sendo virtualmente diagnóstica dessa fusão. A fusão *LMNA-NTRK1* apresenta uma marcação perinuclear, enquanto que fusões envolvendo outros parceiros frequentemente demonstram um padrão citoplasmático difuso granular ou uma marcação membranosa predominante (87,93).

Como a IH detecta ambas as proteínas TRK selvagens e de fusão, há um risco de resultado falso positivo, de modo que a expressão proteica pode não ser propriamente resultante de um evento de fusão gênica, sendo necessário um teste molecular confirmatório (29,30-31). Portanto, em tecidos com expressão endógena basal da proteína TRK selvagem como músculo liso, testículos, ovários e sistema nervoso central e periférico, a IH não pode discriminar entre os produtos da fusão *NTRK* e a proteína TRK selvagem (94).

2.3.2 Teste de Hibridização Fluorescente *In Situ* (Fish)

O teste de hibridação fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization*, FISH) é um método robusto e amplamente disponível, com vantagens quanto aos custos, de alta velocidade de execução e com boa sensibilidade e especificidade. Nessa técnica, é crucial que

todas as três fusões de genes *NTRK* sejam avaliadas com sondas separadas. Isso causa um trabalho adicional em relação ao trabalho analítico *per se* e ao número de seções de parafina necessárias (37). O FISH pode ter utilidade limitada na identificação de genes de fusão *NTRK* porque não foi desenvolvido para análise multiplex. Para detecção de fusões em diversos locais, como nos três genes *NTRK*, diversos testes de FISH precisariam ser realizados (29,39).

2.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR)

A reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR) também é bastante adequada, sobretudo quando os tumores apresentam alta frequência de fusões conhecidas (exemplo: câncer de mama secretório, MASC - *mammary analog secretory cancer* – de glândulas salivares, ou fibrossarcoma congênito). O RT-PCR é relativamente barato, rápido e bem estabelecido em muitos laboratórios. As desvantagens são os recursos limitados de multiplex dessa técnica, ou seja, a capacidade limitada de avaliação simultânea de vários *locus* independentes (30). A RT-PCR foi concebida para identificar apenas pontos de quebra e parceiros de translocação conhecidos e não pode identificar novos pontos de quebra ou novos parceiros de fusão (40).

2.3.4 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*, NGS) é a ferramenta mais poderosa para procurar aberrações genéticas, incluindo fusões (30). O NGS baseado em DNA é capaz de detectar as fusões *NTRK*; no entanto, devido à natureza quimérica das transcrições das fusões, o sequenciamento de RNA é um melhor método para detecção *de novo* de fusões gênicas transcritas, incluindo os três membros da família *NTRK* (31). O NGS tem sido amplamente utilizado nos ensaios clínicos atuais e suas maiores vantagens são a altíssima sensibilidade do método e a oportunidade de detectar outras aberrações moleculares. É capaz de proporcionar uma visão mais abrangente de grande quantidade de genes e pode identificar as fusões do gene *NTRK*, assim como outras alterações desencadeadoras, requerendo uma quantidade mínima de tecido. No entanto, é importante saber se o ensaio de NGS usado para os testes de *NTRK* realmente têm a capacidade específica de detectar fusões do gene *NTRK* (30-31,40).

O tempo de execução relativamente longo é sua principal desvantagem e o painel baseado em amplificadores pode falhar em detectar as aberrações desconhecidas. Outro aspecto importante é que a técnica NGS está presente apenas em uma minoria de laboratórios, porque os investimentos para essas tecnologias são altos, além da necessidade de equipe altamente capacitada (30, 40).

Nos casos de tipos tumorais (raros), com alta frequência de fusões *NTRK* específicas e patognomônicas, a investigação com IH inicial é a maneira mais barata, rápida e eficaz de rastreamento. Embora seja recomendada a confirmação por um segundo método, como RT-PCR, FISH ou NGS. Em instituições onde o NGS está disponível e o painel já utilizado inclui alterações *NTRK*, essa técnica também pode ser aplicada como primeira-escolha. Quando o NGS não é facilmente acessível ou há importantes preocupações com o custo, a IH usando um anticorpo pan-TRK é o método de escolha, razoavelmente sensível para rastrear fusões *NTRK*. Casos positivos, idealmente, também devem ser confirmados novamente por uma segunda técnica (30). Albert e colaboradores recomendam abordagem adaptada à frequência em casos pediátricos. Em tumores com alta frequência de fusões conhecidas *ETV6-NTRK3*, recomenda-se começar com IH/FISH (*ETV6* e/ou *NTRK3*) / RT-PCR. Os resultados negativos precisam ser reavaliados pelo NGS. Em tumores considerados intermediários, como o CPT, considerar IH/NGS. Gliomas de alto grau devem ser testados com a técnica NGS, porque os tecidos gliais podem fisiologicamente expressar TRK. O sarcoma indiferenciado ou de células fusiformes também deve ser avaliado com NGS (33, 41–43).

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

Esta seção apresenta os objetivos estabelecidos para serem alcançados com o desenvolvimento deste estudo, bem como as hipóteses sugeridas pelo problema de pesquisa, a serem confirmadas ou refutadas.

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a frequência, através de IH e NGS, das fusões *NTRK*, em amostras tumorais de casos de CDT em crianças, adolescentes e adultos jovens (< 21 anos), de quatro centros de referência para tratamento oncológico da Bahia e da Paraíba: (i) Hospital Aristides Maltez (HAM), (ii) Instituto Integrado Endocrinologia e Cirurgia (IT), (iii) Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana (SCMFS) e (iv) Hospital Univesitário Lauro Wanderley (HULW).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Averiguar a concordância entre dois métodos de rastreamento (IH e NGS) para fusões *NTRK*, em amostras tumorais de casos de CDT, em crianças, adolescentes e adultos jovens (< 21 anos), de quatro centros de referência para tratamento oncológico da Bahia e da Paraíba.

ii) Identificar a associação de positividade para fusões *NTRK* pelo método NGS, com aspectos clínico-patológicos como idade, sexo, estadiamento tumoral, subtipo histológico e estratificação de risco de recorrência.

iii) Conhecer, através de painel customizado (*hotspot*) de NGS, mutações nos genes *BRAF*, *RAS*, *KRAS*, *EGFR*, *PIK3Ca*, em amostras tumorais negativas ou com resultado inconclusivo para a presença de fusões.

3.3 HIPÓTESES

H0: Existe alta frequência de fusões *NTRK* em amostras de CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos) atendidos no HAM, IT, SCMFS e HULW.

H1: Existe baixa frequência de fusões *NTRK* em amostras de CDT de crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos) atendidos HAM, IT, SCMFS e HULW.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção compreende o percurso metodológico adotado para dar cumprimentos aos objetivos do presente estudo.

4.1 DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA

Estudo retrospectivo de corte transversal multicêntrico, com 79 casos de CDT em pacientes pediátricos, adolescentes ou adultos jovens, com idade igual ou inferior a 21 anos de idade, diagnosticados e tratados no Hospital Aristides Maltez (HAM) e no Instituto Integrado Endocrinologia e Cirurgia (IT), ambos localizados na cidade de Salvador, Bahia; na Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana (SCMFS), localizada na cidade de Feira de Santana, Bahia; e no Hospital Univesitário Lauro Wanderley (HULW), localizado na cidade de João Pessoa, Paraíba, entre janeiro de 2010 e março de 2021. Selecionaram-se pacientes não consecutivos (amostragem não probabilística, por conveniência) e suas amostras tumorais, fixadas em formalina e conservadas em blocos de parafina, resultantes de ressecções cirúrgicas da tireoide realizadas pelos serviços de cirurgia de cabeça e pescoço dos respectivos hospitais.

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

O IT é hoje um centro de referência no tratamento do câncer de tireoide na cidade de Salvador, de rede privada, com atendimento multidisciplinar, especialmente para os casos de neoplasia avançada e refratária, com serviços de Endocrinologia, Radiologia, Ultrassonografia, Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Medicina Nuclear, Patologia e Nutrição, a fim de tratar cada paciente de forma integral e individualizada.

A SCMFS, mantenedora do Hospital Dom Pedro de Alcântara (HDPA), é uma entidade filantrópica de direito privado, sem fins lucrativos, que faz parte da rede complementar de saúde, prestando serviços na área de assistência à saúde há mais de 100 anos, ao município de

Feira de Santana e macrorregião. O hospital é referência em oncologia e atende, majoritariamente – através do SUS e demais convênios –, pacientes de Feira de Santa e mais 71 municípios da Macrorregião Centro – Leste do Estado da Bahia

O HULW, integrado à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), hoje é configurado como hospital-escola. O HULW conta com 218 leitos e tem importante papel na atenção à saúde no estado da Paraíba. A instituição oferece serviços de saúde de média e alta complexidade, com 48 especialidades médicas. Cerca de 200 mil consultas ambulatoriais e 9,5 mil internações são realizadas a cada ano.

4.2 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo do tamanho amostral baseou-se taxa de prevalência média de 12% das fusões *NTRK* em CDT pediátrico, observada em recentes estudos (45,46,50). Com base numa população infinita e considerando grau de confiança de 95% e margem de precisão absoluta de 5%, o número mínimo de casos obtidos após cálculo amostral foi de 100.

4.3 GRUPO AMOSTRAL

Os casos foram selecionados após a pesquisa de pacientes que obtiveram diagnóstico de neoplasia maligna da tireoide ao exame anatomopatológico (código C.73, segundo a Classificação Internacional de Doenças - CID), registrados em base de dados disponível em sistema eletrônico interno dos serviços de anatomia patológica: a) SAPC/HAM, Salvador; b) IT, Salvador, c) SCMFS ou no Centro de Diagnóstico Pires (CEDAPI), Feira de Santana; c) SP/HULW, João Pessoa. Os pacientes inicialmente elegíveis para o estudo foram aqueles cujos laudos anatomopatológicos, registrados no sistema eletrônico, indicavam diagnóstico de CDT.

Após a seleção dos pacientes diagnosticados com CDT, foi realizada a busca das respectivas lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE), previamente confeccionadas na época do diagnóstico anatomopatológico, bem como dos respectivos blocos de parafina contendo tecido tumoral. Ambos, blocos e lâminas, estavam mantidos em seus respectivos serviços. Nas ocasiões em que as lâminas estavam ausentes ou inadequadas para avaliação e identificação da área tumoral, novas lâminas foram confeccionadas e coradas com HE. Com

intuito de confirmar o diagnóstico de CDT, as lâminas HE foram submetidas a revisões às cegas (*blind review*) por dois médicos patologistas, vinculados às instituições participantes do estudo (MVP, RS).

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO, NÃO INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A seleção dos casos elegíveis para o estudo obedeceu ao seguinte critério de inclusão: a) pacientes com idade igual ou inferior a 21 anos, tratados cirurgicamente pelo HAM, IT, SCMFS e HULW, diagnosticados com CDT pelo SAPC/HAM, SCMFS ou no Centro de Diagnóstico Pires (CEDAPI) e SP/HULW, entre janeiro de 2010 e março de 2021.

Não foram incluídos no estudo: a) pacientes que não dispunham de laudo anatomopatológico registrado em sistema eletrônico; b) pacientes que não tinham estadiamento tumoral completo pela classificação TNM (55); c) casos cujos blocos de parafina contendo tecido tumoral estavam ausentes; d) casos com escassez de tecido tireoidiano para análise molecular.

Foram excluídos do estudo: a) casos com insucesso na confecção de lâminas para IH; b) casos em que não houve sucesso na realização de IH; c) casos com amostra tumoral em quantidade escassa para realização dos experimentos. Os casos excluídos foram substituídos por casos subsequentes de acordo com a data da realização da tireoidectomia.

4.5 REVISÃO DE LÂMINAS E COLETA DE AMOSTRA DE TECIDO TUMORAL PARAFINADO

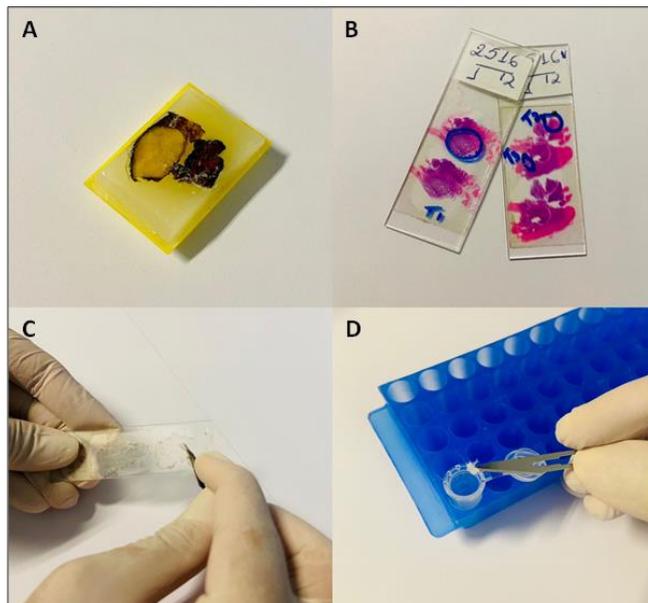
As lâminas dos tumores foram classificadas de acordo com os critérios da *Classificação Mundial de Tumores*, da Organização Mundial de Saúde (56) e estadiados conforme o *Manual de Estadiamento do Câncer AJCC*, 8ª edição. (55) A partir da avaliação microscópica da amostra pelos médicos patologistas (MVP, RS), a área tumoral foi descrita por marcação direta na lâmina corada com HE. Durante a revisão das lâminas, os dados relativos ao paciente e ao tumor foram registrados em ficha estruturada (Anexo A). Com base nas informações coletadas, todos os pacientes foram classificados quanto ao risco de recorrência tumoral, de acordo com os protocolos elaborados e publicados pela ATA (57).

O tecido tumoral foi obtido por meio de cortes histológicos de blocos de parafina, contendo amostras de carcinomas armazenados nos arquivos dos respectivos serviços de anatomia patológica das instituições participantes. Realizaram-se quatro cortes histológicos

sequenciais de 10 μm de espessura de cada caso/bloco para confecção de novas lâminas, as quais foram sobrepostas às suas correspondentes lâminas HE, com as áreas tumorais previamente marcadas. As áreas de tecido tumoral das novas lâminas foram dissecadas manualmente com navalhas descartáveis e estéreis (*Leica Biosystems*, Alemanha) e transferidas para microtubos *ependorf* (1,5 mL), previamente autoclavados e identificados, estocados a temperatura ambiente até o processamento (Figura 7). Em casos de multifocalidade, selecionaram-se todos os focos tumorais, mas somente o foco de maior extensão foi utilizado no estudo.

Para o estudo por IH, rastreamento de mutações pontuais e de fusões gênicas, através de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), as amostras foram – inicialmente – processadas no Laboratório Studart-Studart (LSS), localizado na cidade de Salvador, enquanto as amostras remanescente foram analisadas pelo Grupo Hermes Pardini, no município de Vespasiano, Distrito Industrial de Minas Gerias.

Figura 7: Material de arquivo SAPC/HAM e coleta tecido tumoral.



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Legenda: A: blocos de parafina com tecido tireoideano. B: demarcação manual da área tumoral a partir de corte de tecido tireoideano corado com hematoxilina-eosina. C e D: coleta de tecido tumoral em lâminas com cortes histológicos.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração de DNA genômico, utilizou-se o estojo comercial *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Life Technologies, Carlsbad, CA), conforme

instruções do fabricante. As amostras de tecidos tumorais oriundas dos blocos de parafina foram submetidas a um tratamento prévio de desparafinização com xilol, de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante. Após término do processo de extração, as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C, até a sua utilização no Biorrepositório do LET/UFBA. Utilizaram-se dois microlitros da amostra para determinação da concentração e pureza do DNA extraído, utilizando Nano Espectrofotômetro KASVI Modelo K23-0002 (KASVI, Curitiba). Foi considerado $DO_{260} \text{ nm} = 1$ equivalente a 50 ng/ μL de DNA. Os valores de referência para amostras de boa qualidade foram os rácios DO_{260}/DO_{280} e DO_{260}/DO_{230} entre 1,7 e 2,0.

4.7 REAÇÃO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA (IH)

A coloração de IH para a expressão de Trk A, B e C foi realizada com o clone de anticorpo monoclonal pan-Trk (mAb) EPR17341 (Abcam, Cambridge, MA). O anticorpo é reativo a uma região homóloga de Trk-A, -B e -C perto do terminal C. Esse anticorpo comercial é aprovado pelo FDA para uso clínico. A IH foi realizada utilizando lâminas de 4- μm de espessura, a partir de secções de tecido tumoral parafinado dos blocos tumorais selecionados com material representativo. O EPR17341 foi utilizado a 6 ug/ml, na diluição 1:200. Todos os ensaios foram realizados em uma plataforma de coloração automática Dako Autostainer Link 48 (Agilent, Santa Clara, CA), utilizando um método de recuperação de antígeno baseado em calor e solução tampão de alto pH (EnVision Flex High pH, Agilent). Tecido testicular, gânglios do plexo colônico submucoso e tecido cerebral cortical foram utilizados como tecidos de controle positivo. Linfócitos não neoplásicos, hepatócitos, epitélio colorretal, epitélio alveolar e córtex renal foram utilizados como controles externos negativos do banco de lâminas do LSS. Casos disponíveis com rearranjos *NTRK*, bem como dez tumores consecutivos sem evidência de fusão *NTRK*, foram corados como controles. As lâminas foram avaliadas e revisadas por dois patologistas. A positividade da marcação foi definida como qualquer imunopositividade inequívoca citoplasmática e/ou nuclear com claro contraste com o tecido não tumoral ao redor. A porcentagem da positividade das células marcadas e a intensidade da marcação foram documentadas: negativa (0% de células marcadas e positivas $\geq 1\%$ de células marcadas).

4.8 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) - PAINEL DE FUSÃO

NGS foi realizado por meio da plataforma Illumina com kit Oncomine Focus Assay para análise das fusões por RNA, capaz de avaliar todas as classes de alvos relevantes, incluindo mutações pontuais, inserções ou exclusões curtas (*indels*), variantes de número de cópias (CNV) e fusões gênicas, adaptada para tecidos fixados em formalina e parafinados (FFPE). Três lâminas FFPE com seção de 5 µm de espessura foram obtidas por amostra tumoral, suficientes para fornecer cerca de 10 ng de DNA ou RNA por reação. Isso permitiu a análise mesmo em amostras tumorais de pequeno tamanho ou de qualidade inferior. Três cortes de 5µm de FFPE foram utilizados para extração do DNA de origem somática, com o ReliaPrep™ FFPE RNA Miniprep System, Promega (Madison, WI, USA). A qualidade foi verificada com Qubit™ RNA HS Assay Kit assay (LifeTechnologies, USA). A síntese do cDNA foi realizada com o Ampliseq™ cDNA Synthesis for Illumina® (USA), conforme recomendações do fabricante. As genotipagens dos genes alvos *ABL1*, *ALK*, *AKT3*, *AXL*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERG*, *ETV1*, *ETV5*, *ETV4*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *PDGFRA*, *PPARG*, *RAF1*, *RET*, *ROS1* e *MET* foram realizadas por sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*) na plataforma iSeq 100 Sequencing System, Illumina Inc (USA), mean sequencing depth 300x. O método de enriquecimento de biblioteca foi amplicon-based, AmpliSeq for Illumina Focus Panel (USA), conforme validação e padronização interna. Para a verificação da qualidade da biblioteca, utilizou-se o Qubit™ dsDNA HS Assay Kit assay (LifeTechnologies, USA) e QIAxcel Advanced System QIAGEN® (Hilden, Alemanha) com o QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200) e o método LP NGS DNA high resolution. As análises de bioinformáticas foram conduzidas na plataforma cloud-based Varstation™, com pipeline padronizado, exclusivamente para tecnologia e laboratório considerando as regras da Association for Molecular Pathology (AMP)1-3. Referência de genoma: *GRCh37/hg19*. Ensaio qualitativo e quantitativo. Cut-off laboratório: VAF>5%. Sensibilidade: 99%, Especificidade: 99,9%. Variantes que podem ser detectadas: fusões gênicas. Limitações: o teste não pode detectar SNPs e *indels*. Variantes reportadas: patogênicas e provavelmente patogênicas. Limitações pré- analíticas: *allele drop-out*, características intrínsecas da amostra (qualidade, conservação, amostra exígua, área tumoral restrita <5%, baixa concentração e/ou DNA degradado) etc (59,60)

4.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) - PAINEL HOTSPOT

A genotipagem das regiões genômicas alvos – EGFR (éxons 18, 19, 20 e 21), KRAS (éxons 2, 3 e 4), NRAS (éxons 2, 3 e 4), BRAF (éxons 11 e 15) e PIK3CA (éxons 7, 9 e 20) – foi realizada por sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing*) na plataforma iSeq 100 Sequencing System, Illumina Inc (USA). O método de enriquecimento de biblioteca foi amplicon-based, AmpliSeq for Illumina Custom Panel (USA), conforme validação e padronização interna. As análises de bioinformáticas foram conduzidas na plataforma cloud-based Varstation™, com pipeline padronizado, exclusivamente para tecnologia e laboratório, considerando as regras da Association for Molecular Pathology (AMP)1-3. PIK3CA RefSeq: NM_006218. BRAF Ref Seq: NM_004333.4. KRAS RefSeq: NM_004985.5. NRAS RefSeq:NM_002524.4. EGFR RefSeq: NM_005228.5. Ensaio qualitativo e quantitativo. *Cut-off* laboratório: VAF >5%. Cobertura média em regiões de interesse 350x, Percentual de reads em regiões de interesse com cobertura $\geq 300x$ >90,00% e Percentual de reads com Q-value >30 >95%. Sensibilidade: $\geq 95\%$ Especificidade: 95,9%. Variantes que podem ser detectadas: SNP e *indels*. Variantes reportadas: patogênicas e provavelmente patogênicas. Limitações: detecção de *indels* >20bp (inserções e deleções), fusões gênicas, inversões e translocações, grandes rearranjos exônicos (deleção ou duplicação de éxons), mutações em regiões promotoras e intrônicas e allele drop-out. Limitações pré-analíticas: características intrínsecas da amostra (qualidade, conservação, amostra exígua, área tumoral restrita (<5%), baixa concentração e/ou DNA degradado).

5 ASPECTOS ESTATÍSTICOS

Analisaram-se as seguintes variáveis: idade à época da cirurgia, sexo, tamanho do tumor, subtipo histológico, multifocalidade, extensão extra-tireoidiana, invasão angiolinfática, invasão perineural, metástase regional e a distância, estadiamento tumoral, estratificação de risco de recorrência, positividade para fusão *NTRK* à IH e ao NGS.

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

6 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCEIROS

Este trabalho foi executado de acordo com a Resolução N° 466/2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS). O projeto foi submetido para análise ética no sistema eletrônico da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registros de pesquisas envolvendo seres humanos e apreciado e aprovado pelos Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS), da Liga Baiana Contra o Câncer (CEP/LBCC/HAM), da Santa Casa de Misericórdia de Feira de Santana (SCMFS), do Instituto Integrado Endocrinologia e Cirurgia (IT) e da Gerência de Ensino e Pesquisa (GEP/ HULW), conforme Parecer Consubstanciado N° 4.319.796. (Anexo C)

Esta pesquisa foi executada com recursos financeiros da farmacêutica Bayer, sob de número de contrato BR135321023503P, administrados pela interveniente Fapex, (número do processo 23066.020493/2020-97).

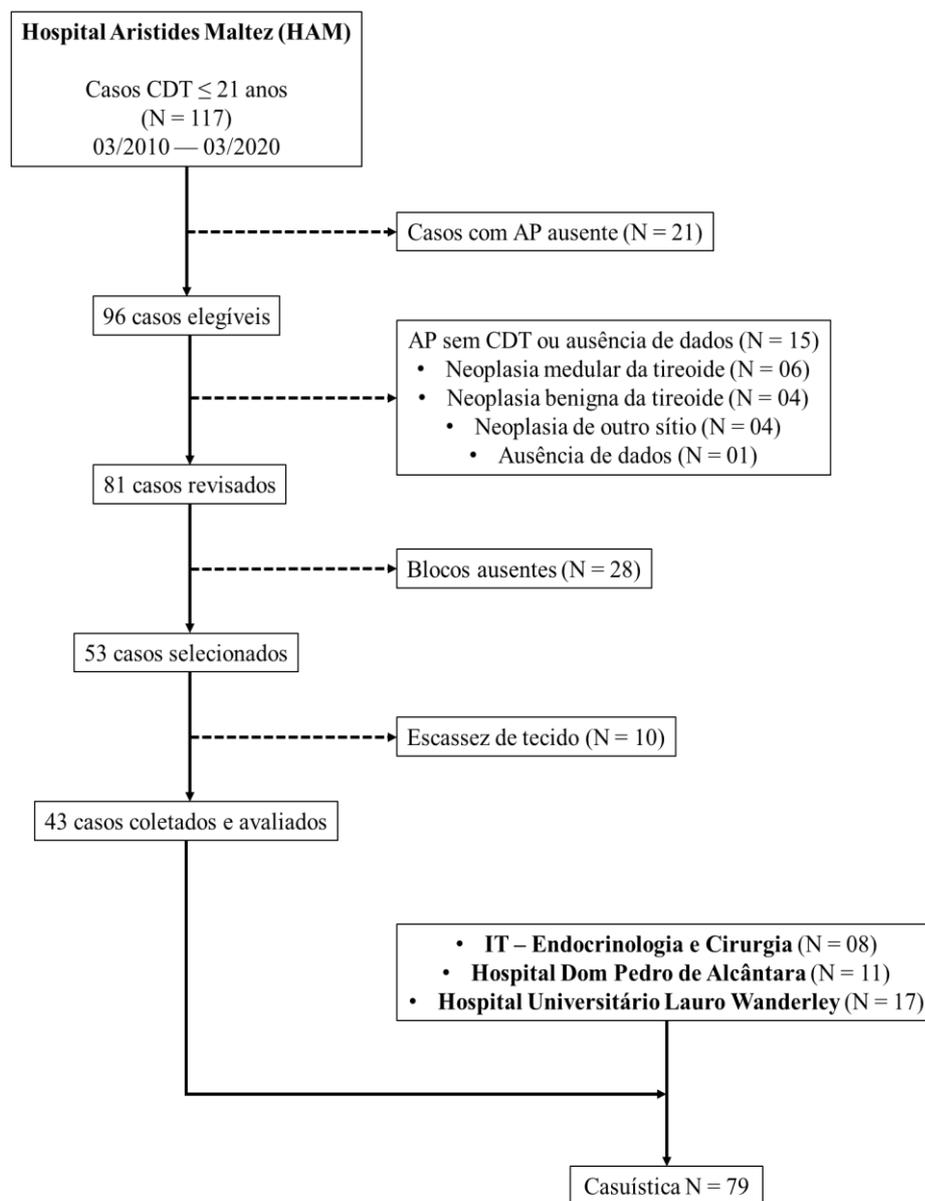
7 RESULTADOS

Esta seção apresenta os resultados obtidos neste estudo, detalhados e cinco partes.

7.1 SELEÇÃO DE PACIENTES E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A Figura 8 ilustra as etapas de seleção do grupo amostral.

Figura 8: Fluxograma da amostragem



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CDT- carcinoma diferenciado da tireoide; AP – laudo de anatomia-patológica

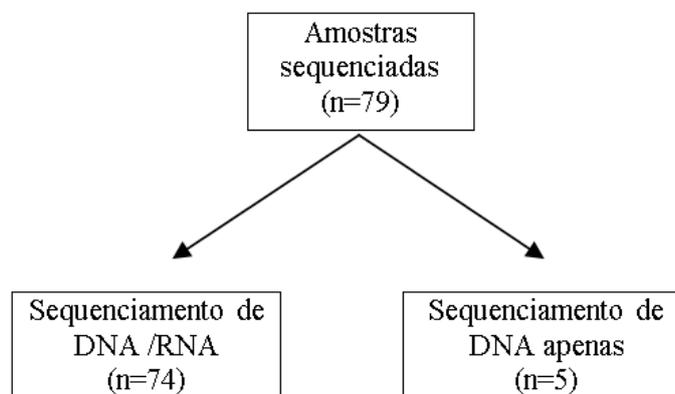
Após uma busca inicial no sistema eletrônico dos hospitais participantes, aplicando-se o descritor “CID: C.73.0”, que corresponde à neoplasia maligna da glândula tireoide, identificaram-se 117 casos para o estudo, após uso dos filtros de idade (até 21 anos ao diagnóstico), no período compreendido entre 1º de março de 2010 e 01º de março de 2021.

Destes, 21 casos não foram incluídos no estudo pela indisponibilidade do laudo anatomopatológico. Dos 96 casos elegíveis para integrar o grupo amostral, 15 foram excluídos por não serem CDT. Dos 81 casos restantes, todos foram submetidos à revisão anatomopatológica para confirmação do diagnóstico de CDT e identificação dos tumores primários a serem coletados, dentre os quais 28 não foram incluídos devido à indisponibilidade dos blocos de parafina e 10 por escassez de tecido tireoidiano para análise molecular.

Ao final, foram selecionados 43 pacientes oriundos do HAM. Agregando a casuística, foram estabelecidas parcerias com os demais centros de tratamento do câncer de tireoide no estado da Bahia e da Paraíba, sendo o processo de seleção replicado nos demais centros de pesquisa, somando-se 8 casos do IT, 11 do HDPA e 17 do HULW, totalizando 79 casos.

Destes, extraíram-se DNA de suas respectivas amostras tumorais, que foram submetidos ao estudo molecular (painel *hotspot*). As amostras negativas para a mutação *BRAF*^{V600E} (74 amostras tumorais) foram submetidas ao estudo do painel de NGS para pesquisa das fusões *NTRK* por RNA. (Figura 9)

Figura 9: Fluxograma do sequenciamento das amostras tumorais



Fonte: Dados da pesquisa.

7.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Esta seção compreende o detalhamento das amostras, em duas partes, apresentadas a seguir.

7.2.1 Aspectos Sociodemográficos

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

7.2.2 Aspectos Clínico-patológicos

Em relação ao subtipo histológico de acordo com a World Health Organization (56), todos os pacientes incluídos no estudo apresentaram carcinoma diferenciado da tireoide, com a seguinte distribuição: 66 (83,5%) CPT clássico (CPTC), 9 (11,4%) CPT variante folicular (CPTVF), 3 (3,8%) CFT e 1 (1,3%) CPT variante esclerosante difusa (CPTED).

Segundo o TNM, Estadiamento Tumoral, na sua oitava edição AJCC (55), o tamanho tumoral variou de 0,3cm a 7,5cm, com uma mediana de 2,2cm. Nesta casuística, 31 pacientes foram classificados como pT1 (39,2%), sendo 9 (11,3%) pT1a configurando-se microcarcinomas, medindo até 1 cm; e 22 pT1b (27,8%), medindo entre 1 e até 2 cm. Do total de tumores avaliados, 22/79 tumores (27,8%) foram classificados como T2, tumores entre 2 e 4 cm; e 23 (29,1%) foram de pT3. Dentre os tumores pT3, 6 foram pT3a (7,5%), tumores com mais de 4 cm; e 17, pT3b (21,5%), tumores com extensão extra-tireoidiana. Houve 3 pacientes pT4 (3,7%).

Metástases para os linfonodos cervicais: 41/79 pacientes (54,4%), sendo 21 (26,5%) em linfonodos do compartimento central (N1a) e 20 (25,3%), em linfonodos do

compartimento lateral (N1b). Metástases a distância: 8/79 (10,2%) pacientes. Dentre os pacientes com metástases a distância, 7 apresentavam metástase pulmonar e 1, óssea.

A maioria dos tumores era unifocal 51/79 (64,5%). Em 28/79 (35,5%) pacientes, a doença era multifocal. Nelas, o acometimento multifocal foi mais frequentemente encontrado nos pacientes com 18 anos de idade ou mais (18/28), quando comparados aos menores de 18 anos (10/28). A multifocalidade ocorreu mais bilateralmente, em ambos os lobos tireoidianos, presente em 16/28 pacientes. Invasão angiolinfática foi detectada em 7/79 (8,8%) dos tumores avaliados e a extensão extra-tireodiana (EET) em 21/79 (26,5%).

Em relação ao risco de recorrência baseado no protocolo da ATA, de 2015 (18) para a classificação de risco de recorrência, 34/79 (43%) pacientes foram classificados como risco baixo; 16/79 (20,2%), como risco intermediário; enquanto que 29/79 (36,7%) pacientes apresentavam alto risco de recorrência para a neoplasia. Dentre aqueles classificados como alto risco, os pacientes com mais de 18 anos eram a maioria 21/29 (72,4%). A Tabela 3 apresenta as características sociodemográficas e anatomopatológicas dos pacientes incluídos no estudo e suas respectivas amostras tumorais.

Tabela 3: Características sociodemográficas e anatomopatológicas (n=79)

Variáveis	Total 79 (100,0%)	<18 anos 30 (37,9%)	≥18 anos 49 (62,1%)
Idade (anos), mediana	18 (6-21)	17 (6-17)	19 (18-21)
Sexo , n (%)			
Feminino	61 (77,2)	14	47
Masculino	18 (22,8)	8	10
Procedência , n (%)			
HAM	43 (54,4)	11	32
SCMFS	11 (13,9)	3	8
HULW	17 (21,5)	8	9
IT	8 (10,1)	8	0
Subtipo histológico , n (%)			
CPTC	66 (83,5)	14	52
CPTVF	9 (11,4)	2	7
CFT	3 (3,8)	1	2
CPTED	1 (1,3)	1	0
Estadiamento T , n (%)			
T1a	9 (11,3)	3	6
T1b	22 (27,8)	4	18
T2	22 (27,8)	5	17
T3a	6 (7,5)	4	2
T3b	17 (21,5)	4	13
T4	3 (3,7)	0	3
Estadiamento N , n (%)			
N0	38 (48,1)	12	26
N1a	21 (26,5)	3	18
N1b	20 (25,3)	5	15
Estadiamento M , n (%)			

M0	71 (89,8)	29	42
M1	8 (10,2)	1	7
Tamanho tumor (cm), mediana	2,2 (0,3-7,5)	2 (0,5-7,5)	2,3 (0,3-6,8)
Focalidade , n (%)			
Unifocal	51 (64,5)	11	40
Multifocal	28 (35,5)	10	18
EET , n (%)			
Positiva	21 (26,5)	7	14
Negativa	58 (73,5)	12	46
IAL , n (%)			
Positiva	7 (8,8)	2	5
Negativa	72 (91,2)	27	45
Risco ATA , n (%)			
Baixo risco	34 (43)	8	26
Risco intermediário	16 (20,2)	3	13
Alto risco	29 (36,7)	8	21

Fonte: Dados da pesquisa.

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

7.3 RESULTADOS DA IH PAN-TRK PARA A FUSÃO *NTRK*

Todas as 79 amostras tumorais desta casuística foram submetidas à IH para rastreamento da fusão *NTRK*. A maioria das amostras tumorais 64/79 (81%) apresentou resultado negativo à IH. Apenas 3 amostras (3,7%) foram positivas ao pan-TRK. Houve 12 casos com resultado duvidoso (15,1%), nos quais não foi possível estabelecer a positividade da marcação do anticorpo. (Tabela 4)

Em relação à positividade da marcação, 1 amostra apresentava 1% de células positivas e 2 amostras, 10% de células positivas. As características clínico-patológicas dos tumores positivos à IH são descritas na Tabela 5. Em todos os casos positivos, o padrão de marcação foi nuclear e a intensidade da marcação foi fraca. (Figura 10)

Tabela 4: Dados do *screening* com IH da fusão *NTRK* de todos os pacientes incluídos no estudo conforme idade < 18anos e ≥ 18 anos (n=79)

Idade	Total n (%)	Duvidosos	Positivo	Negativo
	79 (100%)	12/79 (15,1%)	3/79 (3,7%)	64/79 (81%)
< 18 anos	28 (35,45%)	4 (5%)	1 (1,2%)	23 (29,1%)
≥ 18 anos	51 (64,55%)	8 (10,1%)	2 (2,5%)	41 (51,9%)

Fonte: Dados da pesquisa.

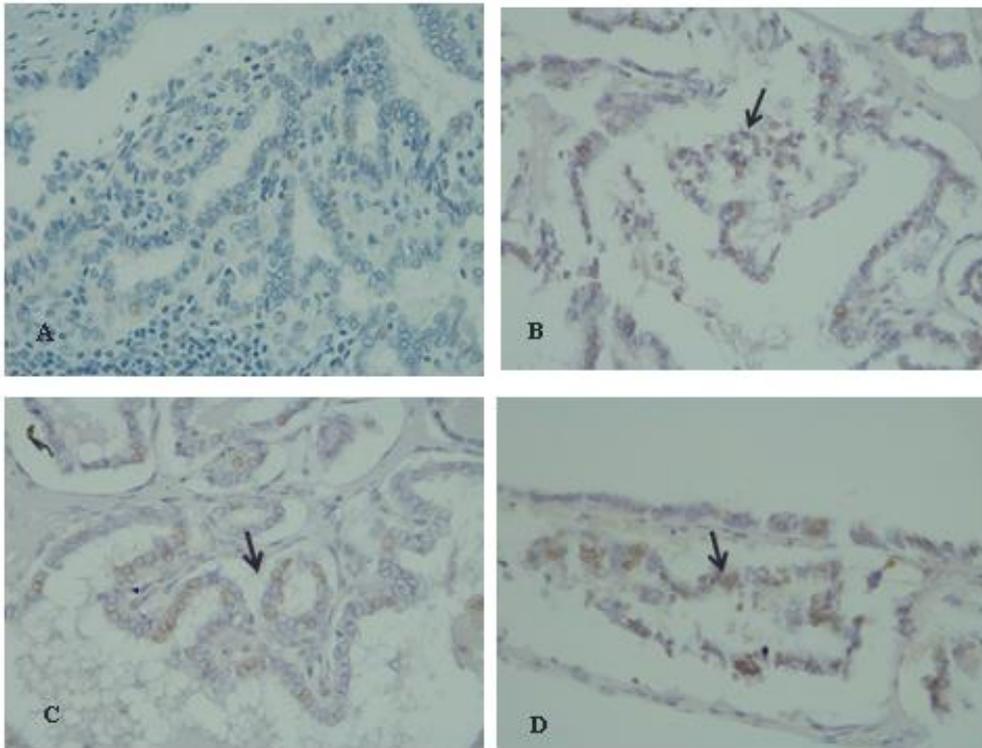
Tabela 5: Características clínico-patológicas dos tumores pan-TRK com resultado positivo na Imuno-histoquímica (n=3)

Positividade Padrão, Intensidade	Sexo	Idade (anos)	Subtipo histológico	Estadiamento tumoral	Focalidade	Maior tumor (cm)	Risco de recorrência (ATA)
1% nuclear, fraca	F	21	CPTC	T3N1bM1	Multifocal	0,7	Alto
10%, nuclear, fraca	F	20	CPTC	T2N1bM1	Multifocal	1,6	Intermediario
10%, nuclear, fraca	M	15	CPTVC	T2N0M0	Unifocal	3,2	Baixo

Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide clássica; ATA - American Thyroid Association.

Figura 10: pan-TRK IH: padrão de marcação dos casos positivos



Fonte: Arquivo fotográfico da autora.

Legenda: Fig.10A, 200x, caso negativo. Fig.10B, 200x, fraca positividade nuclear em 1% das células tumorais; Fig. 10C e 10D 200x, fraca positividade nuclear em 10% das células tumorais.

7.4 RESULTADOS DO PAINEL *HOTSPOT* DE NGS

Todas as 79 amostras da casuística foram submetidas ao painel *hotspot* de NGS para a pesquisa das mutações BRAF, NRAS, KRAS, EGFR, PIK3Ca, sendo detectadas 21 delas. Nesse painel, houve 37 resultados negativos ou selvagens (*WildType*) e 21 resultados inconclusivos ao método. Excluindo-se os testes inconclusivos, consideraram-se 58 testes válidos (positivos e negativos). A Tabela 6 sumariza os achados moleculares do painel de NGS de mutações pontuais (*hotspot*) e de fusão.

Dentre as mutações pontuais, a mutação do gene *BRAF* foi a mais frequente neste estudo, ocorrendo em 10 tumores. A mutação *BRAF*^{V600E} estava presente isoladamente em 5 amostras tumorais ao painel *hotspot*. Estas amostras não foram encaminhadas ao estudo de fusão de NGS, por serem estas mutações e as fusões gênicas mutuamente excludentes entre si.

Posteriormente, apenas ao painel de fusão de NGS, foi identificada mais uma mutação *BRAF*^{V600E} em outra amostra tumoral, totalizando 6 amostras com essa mutação, neste estudo. Considerando-se os testes válidos (58/79), a frequência das mutações *BRAF*^{V600E} foi 10,3% (06/58) na presente casuística.

Outras 3 mutações diferentes do gene *BRAF* foram detectadas ao painel *hotspot*. Do total de 10 mutações encontradas nesse gene, 60% delas foram *BRAF*^{V600E} (6/10), o seu tipo mais frequente em CPT. O percentual restante foi caracterizado por alterações genéticas menos comuns nesse gene, as chamadas *BRAF*^{non-V600E}: *BRAF*^{G464R} em 1 tumor em associação à mutação *KRAS*^{D119N}; *BRAF*^{G469E} em 1 tumor em associação à mutação *NRAS*^{G12D}; e a mutação *BRAF*^{S467L} em 2 tumores, sendo 1 em associação à mutação *EGFR*^{G824E} e outra, isolada. As mutações *BRAF*^{non-V600E} encontradas foram resultado de: (i) troca do aminoácido glicina pela arginina na posição 464 (*BRAF*^{G464R}); (ii) troca do aminoácido glicina pelo ácido glutâmico na posição 469 (*BRAF*^{G469E}); (iii) troca do aminoácido serina pela leucina na posição 467 (*BRAF*^{S467L}), respectivamente.

Mutações nos genes *NRAS*, *KRAS*, *EGFR*, *PIK3Ca* foram detectadas em associação e/ou isoladamente. A mutação mais encontrada foi a *EGFR*, presente em 8 amostras tumorais (3 *EGFR*^{H850R}, 1 *EGFR*^{H72M}, 1 *EGFR*^{G824E}, 1 *EGFR*^{L692H} e 1 *EGFR*^{G824H} e 1 *EGFR*^{S784F}). Outras mutações encontradas: (i) 4 tumores com mutações do gene *KRAS* (2 *KRAS*^{D119N}, 1 *KRAS*^{T581I} e 1 *KRAS*^{E62K}); (ii) 3 tumores com mutações do gene *NRAS* (*NRAS*^{Q61T}, *NRAS*^{G12D}, *NRAS*^{M67*}); (iii) 1 tumor com mutação *PIK3CA*^{C971S}. A Tabela 7 apresenta as características clínico-patológicas dos pacientes com tumores portadores de mutações pontuais.

Tabela 6 – Resultados do painel de NGS em CDT (n=79)

Paciente	Idade	Sexo	Tipo histológico	Resultado do Painel HotSpot	BRAF	EGFR	KRAS	NRAS	PIK3CA	Resultado do Painel de Fusão	Fusão detectada
1	21	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
2	21	F	CPTC	Detectado	Negativo	EGFR ^{H850R}	KRAS ^{D119N}	NRAS ^{Q61T}	Negativo	Inconclusivo	Não
3	21	M	CPTC	Detectado	BRAF ^{G464R}	Negativo	KRAS ^{D119N}	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
4	21	F	CPTC	Detectado	Negativo	Negativo	KRAS ^{T581I}	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
5	21	F	CPTC	Detectado	Negativo	EGFR ^{H72M}	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
6	21	F	CPTC	Detectado	BRAF ^{S467L}	EGFR ^{G824E}	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
7	21	M	CPTC	Detectado	BRAF ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não realizado	Não
8	21	F	CPTC	Detectado	Negativo	EGFR ^{L692H}	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
9	21	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
10	21	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
11	20	M	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
12	20	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
13	20	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
14	20	M	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
15	20	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
16	20	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
17	20	M	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
18	20	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
19	20	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	ETV6-NTRK3
20	20	F	CPTC	Detectado	BRAF ^{S467L}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
21	19	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
22	19	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
23	19	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
24	19	M	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
25	19	F	CPTVF	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
26	19	M	CPTC	Detectado	BRAF ^{G469E}	Negativo	Negativo	NRAS ^{G12D}	Negativo	Inconclusivo	Não
27	18	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
28	18	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
29	18	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
30	18	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
31	18	F	CPTC	Detectado	Negativo	EGFR ^{H850R}	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não

32	18	F	CPTC	Detectado	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não realizado	Não
33	17	F	CPTC	Detectado	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não realizado	Não
34	17	F	CPTC	Detectado	Negativo	Negativo	Negativo	<i>NRAS</i> ^{M67*}	Negativo	Inconclusivo	Não
35	17	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
36	17	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
37	17	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
38	17	M	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
39	15	F	CFT	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
40	15	M	CPTVF	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
41	14	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
42	13	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
43	12	F	CPTC	Detectado	Negativo	<i>EGFR</i> ^{G824H}	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>TPR-NTRK1</i>
44	14	F	CPTVF	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
45	21	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
46	21	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
47	21	F	CPTVF	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
48	18	F	CFT	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
49	20	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
50	17	M	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
51	18	F	CPTC	Detectado	Negativo	<i>EGFR</i> ^{H850R}	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
52	15	F	CPTVF	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
53	19	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
54	20	M	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
55	14	F	CPTVF	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
56	21	F	CPTVF	Detectado	Negativo	Negativo	<i>KRAS</i> ^{E62K}	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
57	13	M	CPTC	Detectado	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>PIC3CA</i> ^{C971S}	Inconclusivo	Não
58	20	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
59	21	F	CPTVF	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
60	21	M	CPTC	Detectado	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não realizado	Não
61	18	M	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
62	18	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
63	21	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
64	16	F	CPTVF	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
65	17	M	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não

66	15	F	CPTC	Detectado	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Não realizado	Não
67	11	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>STRN-ALK</i>
68	18	F	CFT	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>PAX8-PPARG</i>
69	19	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
70	17	M	CPTC	Detectado	Negativo	<i>EGFR</i> ^{S784F}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não
71	17	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>PAX8-PPARG</i>
72	14	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>CCDC6-RET</i>
73	13	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>ETV6-NTRK3</i>
74	11	F	CPTC	Inconclusivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>TRIM24-RET</i>
75	15	M	CPTC	Detectado	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
76	16	M	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Tipo Selvagem	Não
77	15	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>ETV6-NTRK3</i>
78	6	F	CPTED	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Detectado	<i>NCOA4-RET</i>
79	15	F	CPTC	Tipo Selvagem	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Inconclusivo	Não

Fonte: Dados da pesquisa.

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

Tabela 7: Características clínico-patológicas em 21 casos de CDT com resultados positivos no painel *Hotspot*

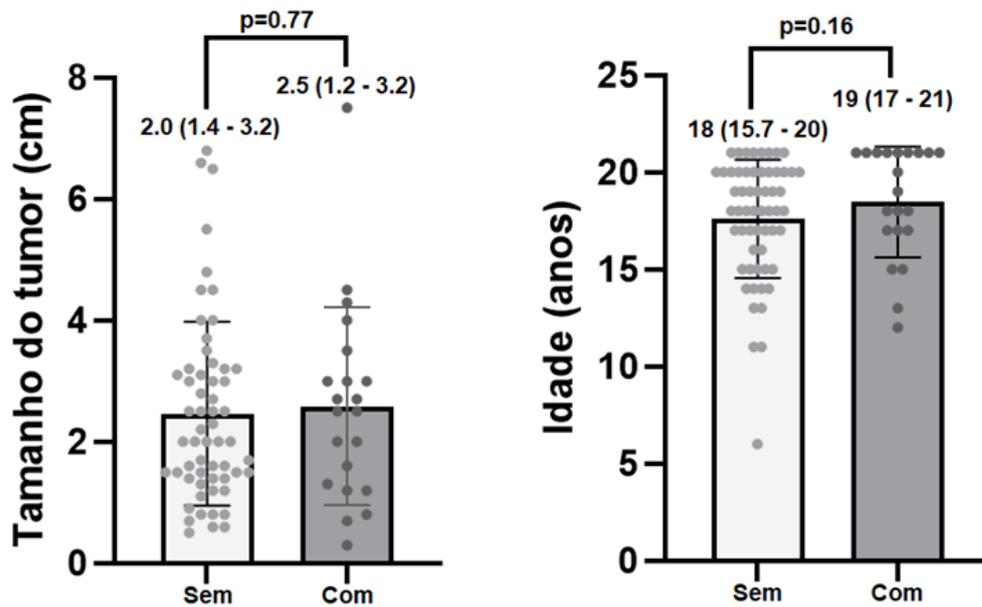
Paciente	Idade	Sexo	Tipo		Maior tamanho (cm)	T	N	M	<i>BRAF</i> ^{V600E}	<i>BRAF</i> ^{non-V600E}	EGFR	KRAS	NRAS	PIK3CA
			histológico	Focalidade					n=6	n=4	n=8	n=4	n=3	n=1
2	21	F	CPTC	Multifocal	4	T3b	N1a	M0	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{H850R}	<i>KRAS</i> ^{D119N}	<i>NRAS</i> ^{Q61T}	Negativo
3	21	M	CPTC	Multifocal	3	T2	N1b	M0	Negativo	<i>BRAF</i> ^{G464R}	Negativo	<i>KRAS</i> ^{D119N}	Negativo	Negativo
4	21	F	CPTC	Unifocal	2,5	T2	N0	M0	Negativo	Negativo	Negativo	<i>KRAS</i> ^{T581I}	Negativo	Negativo
5	21	F	CPTC	Multifocal	2	T1b	N0	M0	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{H72M}	Negativo	Negativo	Negativo
6	21	F	CPTC	Multifocal	0,7	T1a	N0	M0	Negativo	<i>BRAF</i> ^{S467L}	<i>EGFR</i> ^{G824E}	Negativo	Negativo	Negativo
7	21	M	CPTC	Multifocal	4,3	T3b	N1a	M1	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	21	F	CPTC	Multifocal	1,2	T3b	N1a	M0	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{L692H}	Negativo	Negativo	Negativo
20	20	F	CPTC	Multifocal	2,7	T2	N0	M0	Negativo	<i>BRAF</i> ^{S467L}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
26	19	M	CPTC	Multifocal	3	T2	N1b	M1	Negativo	<i>BRAF</i> ^{G469E}	Negativo	Negativo	<i>NRAS</i> ^{G12D}	Negativo
31	18	F	CPTC	Unifocal	1,2	T1b	N1b	M0	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{H850R}	Negativo	Negativo	Negativo
32	18	F	CPTC	Unifocal	0,8	T1a	N0	M0	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
33	17	F	CPTC	Unifocal	7,5	T3b	N1a	M0	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34	17	F	CPTC	Multifocal	3,5	T3b	N1b	M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>NRAS</i> ^{M67*}	Negativo
43	12	F	CPTC	Multifocal	2	T3b	N1b	M1	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{G824H}	Negativo	Negativo	Negativo
51	18	F	CPTC	Unifocal	0,3	T1a	N0	M0	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{H850R}	Negativo	Negativo	Negativo
56	21	F	CPTVF	Unifocal	1,3	T1b	N0	M0	Negativo	Negativo	Negativo	<i>KRAS</i> ^{E62K}	Negativo	Negativo
57	13	M	CPTC	Multifocal	3	T3a	N0	M0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	<i>PIK3CA</i> ^{C971S}
60	21	M	CPTC	Unifocal	2,7	T2	N1a	M0	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66	15	F	CPTC	Unifocal	2,5	T2	N0	M0	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
70	17	M	CPTC	Multifocal	1,6	T3b	N1b	M0	Negativo	Negativo	<i>EGFR</i> ^{S784F}	Negativo	Negativo	Negativo
75	15	M	CPTC	Multifocal	4,5	T3a	N1b	M0	<i>BRAF</i> ^{V600E}	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CFT - Carcinoma folicular da tireoide; CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide de variante clássica; CPTVF - Carcinoma papilífero da tireoide de variante folicular

Indivíduos com idade mais avançada (mediana 19 anos, IIQ 17-21) e com maior tamanho tumoral (mediana 2,5cm, IIQ 1,2-3,2) apresentavam mais mutações gênicas (NRAS, KRAS, EGFR, PIK3Ca), no entanto, essa relação não foi estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,16$ e $p=0,77$, respectivamente). (Figura 11)

Figura 11: Comparação dos tumores com e sem mutações pontuais em relação a idade e tamanho tumoral.

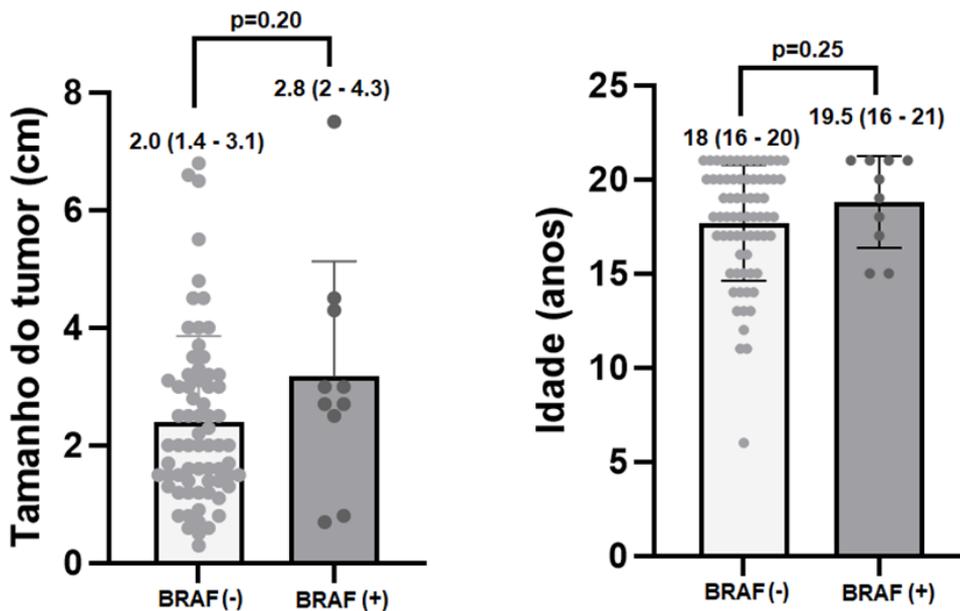


Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Idade (anos), mediana, IIQ- intervalo interquartílico. Teste de Mann-Whitney

Comparando-se os tumores BRAF mutados ($BRAF^{V600E}$ e $BRAF^{non-V600E}$) e não mutados, em relação à idade e ao tamanho tumoral, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Em relação ao tamanho tumoral, os tumores BRAF mutados apresentaram uma mediana de 2,8cm (2,0-4,3cm), enquanto que os tumores não mutados variaram em tamanho de 1,4-3,1cm (mediana de 2,0cm), $p=0,20$. A mediana da idade dos pacientes portadores de tumores com mutação BRAF foi de 19,5anos vs. 18 anos dos pacientes onde não foi encontrada essa mutação, não havendo diferença entre os grupos, $p=0,25$. (Figura 12)

Figura 12: Comparação dos tumores $BRAF^{V600E}$ e $BRAF^{\text{non-V600E}}$ em relação à idade e ao tamanho tumoral.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Idade (anos), mediana, IIQ- intervalo interquartilico. Teste de Mann-Whitney

7.5 RESULTADOS DO PAINEL DE FUSÃO DE NGS

Após o rastreamento inicial da fusão *NTRK* com a IH, todos os 3 casos positivos à IH foram submetidos ao NGS para confirmação da presença da fusão, com o objetivo de identificar casos falso-negativos à IH e esclarecer o diagnóstico dos casos duvidosos. Estas amostras tumorais também foram submetidas ao estudo de NGS.

Portanto, o painel de NGS para detecção das fusões gênicas foi realizado em 74/79 (93,6%) amostras tumorais, excluindo-se 5 amostras portadoras de mutações $BRAF^{V600E}$ identificadas, inicialmente, no painel *hotspot*. (Tabela 6)

Ao método de NGS para detecção de fusões, encontraram-se: (i) 10 resultados positivos para fusões gênicas (10/74, 13,5%); (ii) 25 resultados negativos *WildType* (25/74, 33,8%); (iii) 39 resultados inconclusivos (39/74, 52,7%). (Tabela 8)

Tabela 8: Resultados do painel de fusão de NGS conforme a idade (n=74)

Idade	Total n (%)	Positivo 10/74 (13,5%)	Negativo 25/74 (33,8%)	Inconclusivo 39/74 (52,7%)
	74 (100%)			
< 18 anos	28 (37,9%)	8 (10,8%)	10 (13,5%)	10 (13,5%)
≥ 18 anos	46 (62,1%)	2 (2,7%)	15 (20,3%)	29 (39,2%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Neste estudo, considerando-se os testes com resultado válido (positivo ou negativo, 35/74, 28,6%) no painel de NGS para fusões gênicas, detectaram-se 4 fusões *NTRK* (04/35, 11,4%.): (i) 3 fusões *ETV6-NTRK3* (8,6%) e (ii) 1 fusão *TPR-NTRK1* (2,8%). (Tabela 9)

Nesta casuística, foram detectadas outras 6 fusões gênicas: 1 fusão *STRN-ALK*, 2 fusões *PAX8-PPARG*, 1 fusão *CCDC6-RET* (*RET/PTC1*), 1 fusão *NCOA4-RET* (*RET/PTC3*) e 1 fusão *TRIM24-RET* (*RET/PTC6*). (Tabela 6 e Tabela 9)

Tabela 9: Positividade das fusões ao painel de NGS conforme a idade (n=35)

Idade	Total n (%) 10/35 (28,6/100%)	<i>NTRK</i> 4/35 (11,4%)	<i>RET</i> 3/35 (8,5%)	outras fusões 3/35 (8,5%)
< 18 anos	8 (22,9%)	3 (8,6%)	3 (8,5%)	2 (5,7%)
≥ 18 anos	2 (5,7%)	1 (2,8%)	0 (0%)	1 (2,8%)

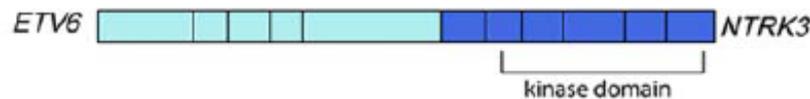
Fonte: Dados da pesquisa.

Dentre os tumores *NTRK* positivos ao NGS, apenas o único tumor com a fusão *TPR-NTRK1* apresentou também uma mutação ao painel *hotspot*: mutação no gene *EGFR*^{G824H} *EGFR*. Os outros 3 tumores com as fusões *NTRK* (*ETV6-NTRK3*) não apresentaram mutações ao painel *hotspot*. (Tabela 6)

A Figura 13 mostra a representação esquemática da fusão *ETV6-NTRK3*. Esta fusão leva a uma ativação constitutiva do domínio quinase da proteína TRKC que, por sua vez, promove a

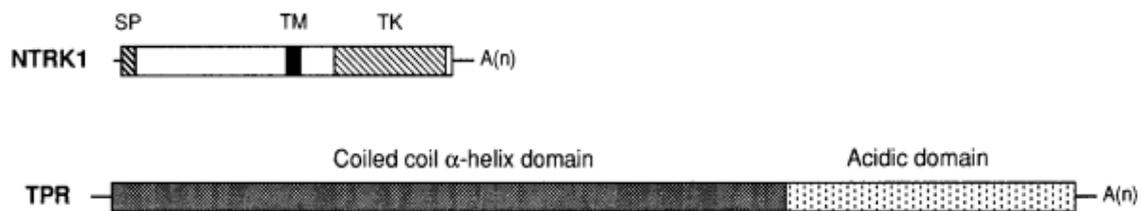
ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK (62). A fusão no cromossomo 1 envolvendo os genes *TPR* e *NTRK1* produz um oncogene específico com a ativação da proteína TRKA (64). (Figura 14)

Figura 13: Fusão *ETV6-NTRK3*



Legenda: Fusão *ETV6-NTRK3* - produto da translocação cromossômica t(12;15)(p13;q25) que resulta em uma transcrição quimérica abrangendo o exon 4, 5 ou 6 do *ETV6* e o domínio quinase do *NTRK3*.
Fonte: Adaptado de Borre et al. (62)

Figura 14: Fusão *TPR-NTRK1*



Legenda: Fusão *TPR-NTR*- produto da fusão da porção 5' do *NTRK1* com a porção 3' do *TPR*. SP: Peptídeo sinalizador; TM: domínio transmembrana; TK: domínio quinase.
Fonte: Adaptado de A. Greco e colaboradores. (64)

Todos estes tumores *NTRK* positivos ao NGS tiveram resultado prévio negativo à IH e todos os três tumores positivos à IH tiveram resultado negativo ao NGS. Portanto, nesta casuística, não foi confirmada a fusão *NTRK* nos tumores positivos à IH, configurando-se assim como resultados falso-positivos à IH.

As características genóticas e fenotípicas mais relevantes dos pacientes da casuística e suas respectivas amostras tumorais em relação à mutação *BRAF* e às fusões gênicas são sumarizadas na Tabela 10.

Tabela 10: Características clínico-patológicas em função dos achados moleculares de CDT.
(n=79)

Variáveis	Total, n (%) n=79 (100)	<i>BRAF</i> ^{V600E} n=6	<i>BRAF</i> ^{Non-V600E} n=4	Fusão <i>NTRK 1/3</i> n=4	Fusão <i>RET</i> n=3	outras fusões n=3
Idade anos, med	17	17	20	14	11	17
Nº sexo feminino/masculino	61:18[3,3:1]	3:3 [1:1]	2:2 [1:1]	4:0 [1:0]	3:0 [1:0]	3:0 [1:0]
Tamanho tumoral (cm), med	2,2	3,5	2,85	1,85	3,3	2,2
TNM						
T1a: <= 1cm	9/79 (11,3)	1	1	1	0	0
T1b: > 1cm a <= 2 cm	22 (27,8)	0	0	1	1	0
T2: > 2cm a <= 4cm	22 (27,8)	2	3	1	1	2
T3: > 4cm ou EET	23 (29,1)	3	0	1	1	1
T4	08/79 (10,1)	0	0	0	0	0
Focalidade						
Unifocal	51 /79(64,5)	4	0	2	1	3
multifocal	28/79 (35,5)	2	4	2	2	0
Subtipo histológico						
CPTC	66/79 (83,5)	6	4	4	3	2
CPTVF	9/79 (11,4)	0	0	0	0	0
CFT	3 /79 (3,8)	0	0	0	0	1
CPTED	1/79 (1,3)	0	0	0	1	0
EET	21 /79 (26,5)	2	0	1	1	1
IAL	7 /79 (8,8)	1	0	0	0	1
Metástase cervical						
Todos	41 (54.4)	4	2	2	0	0
central apenas N1a	21 (26,5)	3	0	0	0	0
central e lateral N1b	20 (25,3)	1	2	2	0	0
Metástase à distância	08 (10,1)	1	1	2	0	0

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide clássica; CPTVF - Carcinoma papilífero da tireoide de variante folicular; CFT - Carcinoma folicular da tireoide; CPTED: Carcinoma papilífero da tireoide de variante esclerosante difusa; EET: extensão extra tireoidiana; IAL: invasão angiolinfática

Todos os tumores *NTRK* positivos ao NGS eram do tipo papilífero clássico e de pacientes do sexo feminino. Os pacientes se apresentavam com estadiamento tumoral e risco de recorrência variados, sendo o paciente portador de tumor com a fusão *TPR-NTRK1* classificado como alto risco de recorrência. Nos pacientes portadores de fusão *ETV6-NTRK3*, o risco de recorrência foi alto em 1 caso e baixo nos outros 2 casos. (Tabela 11)

Em razão do pequeno número de casos positivos, não foi possível estabelecer associação entre a presença e tipos das fusões *NTRK* com agressividade tumoral, risco de recorrência de doença ou idade maior ou menor do que 18 anos.

Tabela 11: Características clínico-patológicas dos tumores com fusão *NTRK*

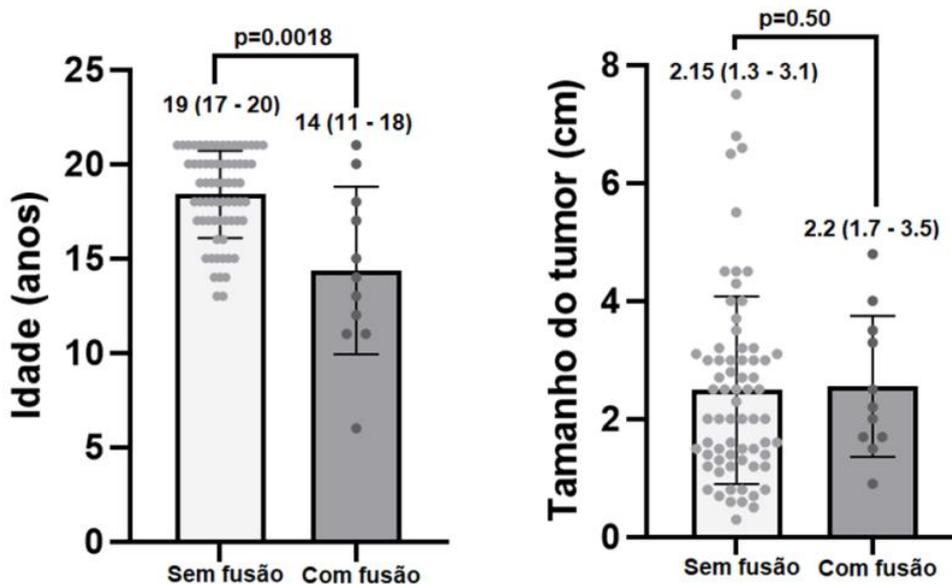
Fusão <i>NTRK</i>	Sexo	Idade (anos)	Subtipo histológico	Estadiamento tumoral	Focalidade	Maior tumor (cm)	Risco de recorrência (ATA)
<i>TPR- NTRK1</i>	F	12	CPTC	T3N1bM1	Multifocal	2,0	Alto
<i>ETV6- NTRK3</i>	F	20	CPTC	T2N1bM1	Unifocal	3,5	Alto
<i>ETV6- NTRK3</i>	F	13	CPTC	T1aN0M0	Multifocal	0,9	Baixo
<i>ETV6- NTRK3</i>	F	15	CPTC	T1bN0M0	Unifocal	1,7	Baixo

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: CPTC - Carcinoma papilífero da tireoide clássica; ATA - American Thyroid Association.

Em relação à idade, ao comparar os tumores portadores de fusões gênicas com aqueles em que não foram detectadas as fusões, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, demonstrando que as fusões são mais encontradas na população mais jovem (mediana de 14 anos, IIQ 11-18, $p < 0.0018$). Neste estudo, não houve associação entre a presença de fusões e tamanho do tumor ($p=0,5$) (Figura 15).

Figura 15: Comparação dos tumores com fusão e sem fusão detectada em relação a idade e tamanho tumoral.



Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: Idade (anos), mediana, IIQ- intervalo interquartilico. Teste de Mann-Whitney

A presença de fusões, assim como de mutação no gene BRAF e demais mutações pontuais não apresentaram relação com uma maior classificação para risco de recorrência neste estudo, segundo os critérios da ATA (51) ($p=0,372$; $p=0,835$; $p=0,984$, respectivamente). (Tabela 12)

Tabela 12: Relação da presença de fusões e mutações pontuais e risco de recorrência, segundo os critérios da ATA.

	Risco de Recorrência (ATA)			
	Total (n=79)	Baixo (n=34)	Intermediário/Alto (n=45)	Valor de <i>p</i>
Presença de fusão (%)	10 (12,6%)	3 (8,8%)	7 (15,5%)	0.372
BRAF (%)	10 (12,6%)	4 (11,7%)	6 (13,3%)	0.835
Outras mutações pontuais (%)	21 (26,6%)	9 (26,5%)	12 (26,7%)	0.984

Legenda: ATA - American Thyroid Association
Teste de Qui-quadrado de Pearson

Indivíduos do sexo masculino, multifocalidade e extensão extra-tireoidiana se configuraram como variáveis relacionadas a uma classificação de maior risco de recorrência neste estudo, $p=0,04$, $p=0,004$, $p<0,0001$, respectivamente. Não houve diferença entre os grupos de risco de recorrência em relação à idade: baixo risco (mediana 18 anos) e intermediário/alto risco de recorrência (mediana 19 anos, $p=0,623$ (Tabela 13 e Figura 16)

Tabela 13: Relação das variáveis clínico-patológicas e risco de recorrência, segundo os critérios da ATA.

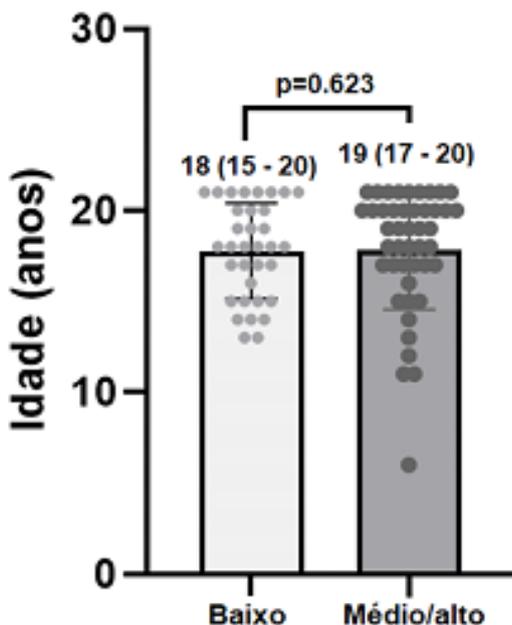
Variáveis	Risco de recorrência (ATA)			p
	Total (n = 79)	Baixo (n = 34)	Intermediário/Alto (n =45)	
Idade, med., (anos) (IIQ)	18 (16 - 20)	18 (15 - 20.2)	19 (17 - 20)	0.623
Tamanho do tumor (cm) (IIQ)	2.2 (1.4 - 3.2)	2.5 (1.5 - 3.3)	2.0 (1.25 - 3.1)	0.436
Sexo masculino. n (%)	18 (22.8%)	4 (11.7%)	14 (31.1%)	0.04
Multifocalidade (%)	28 (35.4%)	6 (17.6%)	22 (48.9%)	0.004
EET (%)	21 (26.6%)	0 (0%)	21 (46.7%)	<0.000

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: ATA - American Thyroid Association ; EET- extensão extra-tireodiana

IIQ- intervalo interquartilico. Teste de Mann-Whitney ou Teste de Qui-quadrado de Pearson

Figura 16: Comparação da classificação de risco de recorrência (ATA) em relação à idade.



Fonte: Dados da pesquisa

Legenda: Idade (anos), mediana, IIQ- intervalo interquartilico. Teste de Mann-Whitney

Quando comparados os grupos em relação à idade, um maior tamanho tumoral e a presença de fusões foram observados com maior frequência nos indivíduos com idade inferior a 18 anos: mediana do tumor 2,7cm [IIQ 1,17-2,7], $p = 0,013$ e $p = 0,005$, respectivamente. (Tabela 14)

Tabela 14: Comparação de variáveis clínico-patológicas e moleculares em relação à idade < 18anos vs. ≥ 18 anos

Variáveis	Total (n = 79)	< 18anos (n = 30)	≥ 18 anos (n = 49)	<i>p</i>
Tamanho do tumor (cm)	2.2 (1.4 - 3.2)	2.7 (1.55 - 3.5)	1.65 (1.17 - 2.7)	0.013
Sexo masculino. n (%)	18 (22.8%)	8 (26.7%)	10 (20.4%)	0.585
Multifocalidade (%)	28 (35.4%)	11 (36.7%)	17 (34.7%)	>0.999
Presença de fusão (%)	10 (12.6%)	8 (26.7%)	2 (4%)	0.005
EET (%)	21 (26.6%)	13 (26.5%)	8 (26.7%)	>0.999

Fonte: Dados da pesquisa.

Legenda: EET- extensão extra-tireodiana. IIQ- intervalo interquartilico. Teste de Mann-Whitney ou Teste de Qui-quadrado de Pearson

8 DISCUSSÃO

O aumento do diagnóstico CDT em crianças é um fenômeno mundial e demonstra características enigmáticas. O CDT nessa faixa etária habitualmente apresenta-se como um nódulo cervical volumoso e, com frequência, é acompanhado por metástase regional e a distância. (7,10,16,62) O conhecimento molecular subjacente a essa carcinogênese é a chave para um tratamento individualizado, com maiores chances de sucesso no desfecho clínico da evolução da doença. (59, 69, 86)

Este trabalho buscou estabelecer a frequência das fusões *NTRK* e identificar os aspectos clínico-patológicos relacionados a achados moleculares em casos de CDT da faixa pediátrica e de adultos jovens, com foco na avaliação das fusões do gene *NTRK* por diferentes metodologias (IH e NGS). Neste projeto, como recomendado pelo protocolo da ESMO (European Society of medical Oncology) (41), as amostras tumorais foram inicialmente avaliadas por imunohistoquímica como teste de rastreamento para identificar fusão *NTRK* e, caso a expressão de *NTRK* estivesse presente, as amostras foram posteriormente avaliadas pela técnica de NGS.

As múltiplas tecnologias disponíveis para a detecção das fusões *NTRK* deram origem à seguinte pergunta: - há um melhor método para essa avaliação, sobretudo se considerarmos custo-efetividade haja vista o alto custo para realização desses testes diagnósticos, especialmente para o NGS. A resposta é que depende do tipo de tumor que está sendo estudado e da estratégia mais ampla para detecção de outros biomarcadores dessa neoplasia, assim como a situação clínica em particular. (41, 60) No presente estudo, o custo para a realização dos testes de IH e NGS para cada amostra tumoral foi de R\$135,00 (cento e trinta e cinco reais) e R\$ 1.885,00 (hum mil oitocentos e oitenta e cinco reais), respectivamente.

Neste cenário, a IH tem sido empregada mais rotineiramente como rastreamento inicial da fusão *NTRK*, em razão da sua maior disponibilidade e melhor custo para sua execução. (30, 31 39). Apesar de haver vários anticorpos TRK disponíveis, o clone EPR 17341 tem sido o mais amplamente utilizado. Esse anticorpo detecta a região C- terminal das proteínas TRK A, B e C, sendo portanto considerado pan-TRK. A IH com pan-TRK é uma técnica sensível para a identificação das fusões *NTRK*, com uma sensibilidade global reportada de 85 a 90% e a especificidade em torno de 80%. (39- 40, 44, 63-64). Neste trabalho, a IH com pan-TRK foi escolhida como método de rastreamento da fusão *NTRK*, considerando-se o custo e aplicabilidade prática do método.

Todas as 79 amostras tumorais desta casuística foram submetidas à IH para rastreamento da fusão *NTRK*. Apenas 3 (3,7%) amostras tumorais foram positivas ao pan-TRK (3,7%): 1

amostra com 1% de células positivas e 2 amostras, com 10% de células positivas. Nesta casuística, as amostras foram classificadas pan-TRK positivas quando apresentavam ao menos 1% de células positivas ao anticorpo. A celularidade positiva encontrada foi de 1% em 1 caso e de 10% em outros 2 casos. Todas as amostras positivas à IH apresentavam padrão de marcação nuclear e com fraca intensidade na reação.

O ponto de corte para determinar se um caso é positivo varia de 1 a 10% e há diversos padrões de positividade para o pan-TRK à IH. Enquanto a maioria das fusões *NTRK* apresenta marcação citoplasmática, o padrão de marcação em tecido tireoidiano é variável e depende do parceiro onde a fusão específica está presente; ademais, pode ser nuclear, citoplasmática e membranosa ou ainda demonstrar uma combinação de padrões. (30, 35, 36, 38) Em amostras de tecido tireoidiano parafinado, Rudzinski e colaboradores identificaram que o padrão de coloração difere entre as fusões *NTRK1/2* e as fusões *NTRK3*. Os casos positivos de *NTRK1/2* mostram apenas coloração citoplasmática, enquanto as fusões de *NTRK3* mostram coloração nuclear +/- citoplasmática. (36) Os estudos de Solomon e colaboradores sobre *ETV6- NTRK3* demonstram tipicamente uma forte marcação nuclear como característica peculiar, com marcação citoplasmática fraca difusa, sendo virtualmente diagnóstica dessa fusão. (87,93)

No entanto, em nenhum deles foi confirmada a fusão *NTRK*, sendo 1 tumor com resultado negativo e 2 tumores com resultados inconclusivos ao NGS, configurando-se como resultados falso-positivos. Desse modo, a frequência de fusões *NTRK* nas três amostras tumorais de pacientes portadores de CDT positivas à IH foi de 0%.

A sensibilidade da IH é maior em detectar as fusões *NTRK1* e *NTRK2* - geralmente de 90% -, do que em detectar *NTRK3*. De fato, a fusão *ETV6-NTRK3* provavelmente tem a mais baixa taxa de detecção de todas as proteínas de fusão, em cerca de 50%. (34,35)

A especificidade é muito variável, conforme o tipo do tumor. Enquanto o anticorpo demonstra ter 100% de especificidade em carcinomas de cólon, pulmão, tireoide, pâncreas e trato biliar, a especificidade decresce em carcinomas de mama e glândula salivar. (34) Falso-positivos ocorrem geralmente em tumores com músculos e diferenciação neural (sarcomas, gliomas, tumores neuroendócrino); e falso-negativos ocorrem com cânceres com fusões *NTRK3*. (87)

Utilizando o mesmo clone de anticorpo monoclonal pan-TRK (mAb) EPR17341 (Abcam, Cambridge, MA), Hechtman e colaboradores relataram alta sensibilidade (95,2%) e especificidade (100%) da IH em amostras parafinadas de diversos tipos de câncer (intestino, cérebro, pulmão, carcinoma secretório, melanoma e sarcoma). (35) Em concordância, Rudzinski e colaboradores obtiveram sensibilidade de 97% e especificidade de 98%, usando

também o clone *EPR17341* da Abcam. No citado estudo, o anticorpo *TRKA IH* (*EP1058Y*), também da Abcam, teve sensibilidade de 100% e especificidade de 63%. (36) Já Gatalica e colaboradores investigaram uma grande coorte, incluindo 4.136 casos, com 28 fusões do gene *NTRK*, usando o clone *EPR17341* da Abcam, e encontraram sensibilidade mais baixa de 75% e uma especificidade comparável de 95,9%. (21)

O NGS baseado em DNA tem cerca de 70% de sensibilidade para fusão *NTRK3*, enquanto que o NGS baseado em RNA apresenta virtualmente 100% de sensibilidade, mas é uma tecnologia cara, com tempo de execução longo, isto é, leva cerca de duas semanas para ser realizada. É importante ter em mente que a ausência de marcação não exclui a possibilidade de um desses diagnósticos, pois há uma alta taxa de resultados falso-negativos na detecção da fusão *ETV6-NTRK3*, por exemplo. (35,40,63)

Ao painel NGS de fusão gênica, frequência de fusões *NTRK* foi de 11,4% (4 casos), com todos os casos negativos ao pan-TRK, sugere uma baixa sensibilidade da IH como método de rastreamento da fusão *NTRK*.

Dentre as 4 fusões *NTRK* encontradas, apenas 1 fusão *TPR-NTRK1* foi detectada. As outras 3 fusões foram todas *ETV6-NTRK3*, o que pode explicar a baixa sensibilidade da IH neste trabalho. No entanto, é possível que alguns casos considerados falso-positivos à IH possam ser, em verdade, resultados falso-negativos ao painel de fusão de NGS.

No presente estudo, as 3 fusões *ETV6-NTRK* foram mutuamente excludentes com alterações gênicas das vias de sinalização MAPK, exceto pela fusão *TPR-NTRK1*, associada à mutação do gene *EGFR*.

No painel de fusão deste estudo, detectaram-se outras 6 fusões gênicas, sendo 3 fusões *RET*: *CCDC6-RET* (*RET/PTC1*), *NCOA4-RET* (*RET/PTC3*) e *TRIM24-RET* (*RET/PTC6*); e ainda as fusões *STRN-ALK*, *PAX8-PPARG*. De modo geral, as fusões *RET* e *NTRK* são as mais frequentes na população pediátrica, sendo as *RET-PTC1* as mais encontradas, seguidas pela fusão *ETV6-NTRK3* (16, 65). Porém, neste trabalho, a prevalência de fusões do gene *RET* foi de 8,6% (03/35), com apenas 1 fusão *RET/PTC1* detectada, sendo menos frequente nesta série em relação às fusões *NTRK*.

Todos os tumores *NTRK* positivos da presente casuística eram do tipo CPTC e de pacientes do sexo feminino. O CPTC é o subtipo histológico mais comumente encontrado na população pediátrica e o mais relacionado à fusão *NTRK*. (68, 72, 74) Neste estudo, as fusões foram mais encontradas na população mais jovem (< 18 anos), com uma mediana de 14 anos. Em contrapartida, indivíduos com idade mais avançada apresentavam tumores com mais mutações gênicas (*NRAS*, *KRAS*, *EGFR*, *PIK3Ca*), apesar de essa relação não se mostrar

estatisticamente significativa. Essa distribuição das fusões e das mutações gênicas em estudos pediátricos e de adultos jovens está em conformidade com a literatura, apontando a maior frequência de fusões em crianças e adolescentes e de mutações em adultos. (67-68,81,85)

Até o momento, não há dados na literatura comparando as fusões os tumores tireoidianos portadores das fusões *NTRK1* e *NTRK3*. Na presente série, em 3 casos, os pacientes tinham menos de 18 anos, e 1 paciente apresentava 20 anos ao diagnóstico. Os pacientes se apresentavam com estadiamento tumoral e risco de recorrência variados, classificado como de alto risco de recorrência o paciente portador de tumor com a fusão *TPR-NTRK1*. Nos pacientes portadores de fusão *ETV6-NTRK3*, o risco de recorrência foi alto em 1 caso e baixo nos outros 2 casos. Prasad e colaboradores documentaram a mais alta prevalência de fusão *NTRK* (26%) em 28 pacientes, sendo também encontrada apenas 1 fusão *TPR-NTRK1*, associada à metástase pulmonar e à pronunciada agressividade tumoral. (46) Pekova e colaboradores observaram que a fusão *NTRK1* apresentou maior multifocalidade e agressividade do que neoplasias de tireoide com a fusão *NTRK3*. (91) No presente trabalho, de fato o paciente com a fusão *NTRK1* apresentava doença multifocal e metástase a distância pulmonar, sugerindo um comportamento mais agressivo dessa fusão.

Quando avaliadas as características clinico-patológicas da presente amostra, foi demonstrado que multifocalidade e extensão extra-tireoidiana foram variáveis relacionadas a maior risco de recorrência. Esses dados estão em acordo com a estratificação de risco de recorrência da ATA. (51) Maior tamanho tumoral também foi observado mais frequentemente em indivíduos mais jovens (<18 anos) neste trabalho, corroborando os estudos epidemiológicos que mostram uma doença mais avançada ao diagnóstico na população pediátrica. (69,72)

No presente trabalho, dois pacientes portadores da fusão *NTRK* apresentaram metástase regional para o compartimento lateral (N1b), como também metástase a distância. Em recentes estudos, a presença da fusão *NTRK* esteve associada a tumores de maior volume, metástase nodal e multifocalidade. (20,23,45). Em recente publicação, Newfield e colaboradores avaliaram 46 CDT pediátricos, sendo detectada a fusão *NTRK* em 10,3% dos casos. Apesar do pequeno número de fusões, foi descrita uma alta taxa de invasão vascular e tendência à disseminação linfática. (23)

As mutações *BRAF*^{V600E} são as mutações mais encontradas em CPT de adultos, porém são significativamente menos comuns nos CDT pediátricos, variando de 0-20% em prevalência; e não parecem, como acontece nos adultos, estar tão bem associadas às características clínicas e

histopatológicas do tumor, em relação à agressividade tumoral. (12,15–17,77) Por outro lado, há um aumento na prevalência de mutações *BRAF*^{V600E} com o aumento da idade, sendo documentada a associação dessa mutação com tumores de maior tamanho (>2cm) em ambos CPT adultos e pediátricos, sendo mais frequentemente encontradas no tipo clássico. (12, 14) No presente trabalho, a frequência das mutações *BRAF*^{V600E} foi de 10,3%, semelhante à literatura. Todos os 6 tumores portadores das mutações *BRAF*^{V600E} eram do tipo clássico (CPTC) e apresentavam um maior tamanho tumoral (mediana de 3,5cm), no entanto, não foi observado maior risco de recorrência desses tumores ou associação com demais características clínico-patológicas de agressividade tumoral. Ainda assim, a literatura demonstra resultados muito contraditórios em relação ao valor prognóstico da mutação *BRAF*^{V600E} na população pediátrica. (13, 58, 85)

No entanto, em razão do pequeno número de casos *NTRK* positivos, não foi possível estabelecer associação entre a presença e os tipos das fusões *NTRK* com agressividade tumoral, risco de recorrência de doença ou idade maior ou menor do que 18 anos, neste trabalho. Adicionalmente, a ocorrência de mutações *BRAF* e de demais mutações pontuais não se relacionou a risco aumentado de recorrência.

Apesar de contemplados os aspectos clínico-patológicos dos CDT neste trabalho, não foi possível avaliar sua associação com a positividade para a fusão *NTRK*. Contudo, fatores metodológicos, como amostragem não probabilística e pouca disponibilidade de amostra tumoral ou material tumoral degradado (baixa qualidade, conservação inadequada, amostra exígua, área tumoral restrita <5%, baixa concentração e/ou RNA degradado, tipo de fixador utilizado, tempo de fixação, idade do bloco), podem ter contribuído para a subestimação da presença da fusão *NTRK* na presente casuística.

Os indivíduos empregados nesta pesquisa foram selecionados porque as amostras tumorais estavam prontamente disponíveis e não porque tenham sido selecionados por meio de um critério estatístico. Essa conveniência representou uma maior facilidade operacional e baixo custo de amostragem, porém, tem como consequência a incapacidade de fazer afirmações gerais com rigor estatístico sobre a população analisada.

Apesar da IH ser uma técnica capaz de detectar níveis aumentados da proteína TRK e poder ser uma tecnologia de *screening* muito útil para reduzir custos, neste estudo, diante dos dados apresentados, a IH sozinha não se mostrou uma metodologia diagnóstica definitiva para detectar as fusões *NTRK* nos CDT pediátricos e de adultos jovens na população avaliada. Ainda assim, em razão da grande praticidade de uso da IH, esse método não deve ser excluído como

método de rastreamento das fusões *NTRK*, porém, sugere-se que a investigação da fusão *NTRK* por NGS seja, sempre que possível, a técnica preferível no rastreamento dessa fusão na neoplasia diferenciada de tireoide de crianças, adolescentes e adultos jovens.

Apesar dos grandes avanços na compreensão da tumorigênese, nossos conhecimentos ainda são incipientes face à complexidade da sinalização oncogênica do CDT pediátrico. Acredita-se que a relevância clínica de fatores clínico-patológicos como indicadores prognósticos poderá ser consolidada pela contínua caracterização de suas propriedades moleculares, a partir da definição dos componentes genéticos a eles associados.

9 CONCLUSÕES

Há prevalência de positividade ao pan-TRK no rastreamento da fusão *NTRK* com IH, em 79 amostras tumorais de pacientes pediátricos e adultos jovens portadores de CDT, atendidos no HAM, SCMFS e HULW foi de 3,7% (3 casos). No entanto, todas amostras tumorais positivas à IH foram negativas ao método confirmatório de NGS, configurando-se, portanto, como resultados falso-positivos.

A prevalência de fusões *NTRK* confirmadas em 35 testes válidos ao painel de fusão de NGS, na presente casuística, foi de 11,4% (4 casos), sugerindo uma baixa frequência da fusão *NTRK* em CDT de pacientes pediátricos e adultos jovens na nossa população. Vale ressaltar que fatores metodológicos relacionados à amostragem e a pouca disponibilidade de amostra tumoral ou material tumoral degradado pode ter contribuído para subestimação deste dado.

No presente estudo, houve absoluta discordância entre os testes de IH e NGS para rastreamento da fusão *NTRK* em CDT. Todas as fusões *NTRK* foram identificadas apenas ao método de NGS, com resultado negativo prévio à IH e em nenhuma amostra tumoral positiva à IH houve confirmação da fusão ao NGS. Portanto, o teste de rastreamento com IH não foi capaz de identificar os tumores portadores da fusão *NTRK* nas amostras tumorais deste estudo, sugerindo uma baixa sensibilidade da IH como método de rastreamento da fusão *NTRK*.

Neste trabalho, não se demonstrou associação entre a presença e tipos das fusões *NTRK* com aspectos clínico-patológicos de agressividade tumoral, maior estratificação de risco de recorrência de doença, idade maior ou menor do que 18 anos, sexo ou subtipo histológico nos CDT investigados, assim como sua associação com aspectos moleculares das mutações pontuais avaliadas.

10 PERSPECTIVAS

É possível que a prevalência das fusões *NTRK* na presente casuística esteja subestimada, considerando a grande quantidade de resultados inconclusivos ao NGS.

Pretende-se ampliar esta casuística e corrigir os problemas relacionados à amostragem, assim como firmar parcerias com outras instituições médicas e/ou acadêmicas do estado da Bahia e de outros estados. Ainda, sempre que possível, pretende-se priorizar a utilização do tecido fresco como fonte de obtenção do DNA genômico dos pacientes com CDT, com o intuito de garantir amostras de boa qualidade.

Em relação ao acesso aos tecidos parafinados, cautela será tomada na verificação da qualidade dos materiais. Além da utilização de métodos e kits comerciais de extração de DNA específicos para tecidos parafinados, serão usadas estratégias de amplificação que possam sobrepor ou reparar amostras de DNA com intensa degradação, devido ao processamento do tecido parafinado.

Os dados apresentados neste trabalho apontam para a necessidade de condução de estudos prospectivos multicêntricos, de grande casuística e bem delineados, com a finalidade de definir o real papel da fusão *NTRK* no prognóstico do CDT na população pediátrica.

REFERÊNCIAS

1. Vaccarella S, Franceschi S, Bray F, Wild CP, Plummer M, Dal Maso L. Worldwide thyroid-cancer epidemic? The increasing impact of overdiagnosis. *N Engl J Med.*2016; 375:614–7.
2. Tamam M, Uyanik E, Edís N, Mulazimoglu M, Ozpacaci T. Differentiated thyroid carcinoma in children: Clinical characteristics and long-term follow-up. *World J Nucl Med.* 2020; 19:28–35.
3. Prasad PK, Mahajan P, Hawkins DS, Mostoufi-Moab S, Venkatramani R. Management of pediatric differentiated thyroid cancer: An overview for the pediatric oncologist. *Pediatr Blood Cancer;*2020; 67:e28141.
4. Golpanian S, Perez EA, Tashiro J, Lew JI, Sola JE, Hogan AR. Pediatric papillary thyroid carcinoma: outcomes and survival predictors in 2504 surgical patients. *Pediatr Surg Int.*2016; 32:201–208.
5. Russo M, Malandrino P, Moleti M, Vermiglio F, D’Angelo A, La Rosa G, Sapuppo G, Calaciura F, Regalbuto C, Belfiore A, Vigneri R, Pellegriti G. Differentiated thyroid cancer in children: Heterogeneity of predictive risk factors. *Pediatr Blood Cancer.* 2018; 65:e27226.
6. Collini P, Massimino M, Leite SF, Mattavelli F, Seregini E, Zucchini N, Spreafico F, Ferrari A, Castellani MR, Cantù G, Fossati-Bellani F, Rosai J. Thyroid cancer study group of the Istituto Nazionale Tumori of Milan, Italy. Papillary thyroid carcinoma of childhood and adolescence: a 30-year experience at the Istituto Nazionale Tumori in Milan. *Pediatr Blood Cancer.* 2006; 46:300–6.
7. Stefan A-I, Piciu A, Mester A, Apostu D, Badan M, Badulescu C-I. Pediatric thyroid cancer in Europe: An overdiagnosed condition? A literature review. *Diagn Basel Switz.* 2020; 10.
8. Vriens MR, Moses W, Weng J, Peng M, Griffin A, Bleyer A, Pollock BH, Indelicato DJ, Hwang J, Kebebew E. Clinical and molecular features of papillary thyroid cancer in adolescents and young adults. *Cancer.* 2011;117:259–67.
9. Miccoli P, Minuto MN, Ugolini C, Panicucci E, Massi M, Berti P, Basolo F. Papillary thyroid cancer: pathological parameters as prognostic factors in different classes of age. *Otolaryngol--Head Neck Surg off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg.*2008;138:200–3.
10. Newman KD, Black T, Heller G, Azizkhan RG, Holcomb GW, Sklar C, Vlamis V, Haase GM, La Quaglia MP. Differentiated thyroid cancer: determinants of disease progression in patients <21 years of age at diagnosis: a report from the Surgical Discipline Committee of the Children’s Cancer Group. *Ann Surg.* 1998; 227:533–41.
11. La Quaglia MP, Black T, Holcomb GW, Sklar C, Azizkhan RG, Haase GM, Newman KD. Differentiated thyroid cancer: clinical characteristics, treatment, and outcome in patients under 21 years of age who present with distant metastases. A report from the Surgical Discipline Committee of the Children’s Cancer Group. *J Pediatr Surg.* 2000; 35:955–9; discussion 960.
12. Sassolas G, Hafdi-Nejjari Z, Ferraro A, Decaussin-Petrucci M, Rousset B, Borson-Chazot F, Borbone E, Berger N, Fusco A. Oncogenic alterations in papillary thyroid cancers of young

patients. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.*2012; 22:17–26.

13. Penko K, Livezey J, Fenton C, Patel A, Nicholson D, Flora M, Oakley K, Tuttle RM, Francis G. BRAF mutations are uncommon in papillary thyroid cancer of young patients. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.*2005; 15:320–5.

14. Givens DJ, Buchmann LO, Agarwal AM, Grimmer JF, Hunt JP. BRAF V600E does not predict aggressive features of pediatric papillary thyroid carcinoma. *The Laryngoscope.*2014; 124:E389-393.

15. Alzahrani AS, Baitei EY, Zou M, Shi Y. Clinical case seminar: metastatic follicular thyroid carcinoma arising from congenital goiter as a result of a novel splice donor site mutation in the thyroglobulin gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91:740-6.

16. Galuppini F, Vianello F, Censi S, Barollo S, Bertazza L, Carducci S, Colato C, Manso J, Rugge M, Iacobone M, Watutantrige Fernando S, Pennelli G, Mian C. Differentiated thyroid carcinoma in pediatric age: Genetic and clinical scenario. *Front Endocrinol.*2019; 10:552.

17. Alzahrani AS, Qasem E, Murugan AK, Al-Hindi HN, AlKhafaji D, Almohanna M, Xing M, Alhomaidah D, AlSwailem M. Uncommon TERT promoter mutations in pediatric thyroid cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.* 2016; 26:235–41.

18. Francis GL, Waguespack SG, Bauer AJ, Angelos P, Benvenga S, Cerutti JM, Dinauer CA, Hamilton J, Hay ID, Luster M, Parisi MT, Rachmiel M, Thompson GB, Yamashita S, American Thyroid Association Guidelines Task Force. Management guidelines for children with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.*2015; 25:716–59.

19. Nakagawara A. TRK receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 2001; 169:107–14.

20. Ricarte-Filho JC, Li S, Garcia-Rendueles MER, Montero-Conde C, Voza F, Knauf JA, Heguy A, Viale A, Bogdanova T, Thomas GA, Mason CE, Fagin JA. Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *J Clin Invest.* 2013; 123:4935–44.

21. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol off J U S Can Acad Pathol Inc.*2019; 32:147–53.

22. Cordioli MICV, Moraes L, Bastos AU, Besson P, Alves MT de S, Delcelo R, Monte O, Longui C, Cury AN, Cerutti JM. Fusion oncogenes are the main genetic events found in sporadic papillary thyroid carcinomas from children. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc.*2017; 27:182–8.

23. Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, Brenner AV, Little MP, Bogdanova TI, Evdokimova VN, Hatch M, Zurnadzy LY, Nikiforova MN, Yue NJ, Zhang M, Mabuchi K, Tronko MD, Nikiforov YE.ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer.*2014; 120:799–807.

24. Okimoto RA, Bivona TG. Tracking down response and resistance to TRK inhibitors. *Cancer Discov.*2016; 6:14–6.

25. Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, Mahale S, Davies KD, Aisner DL, Pilling AB, Berge EM, Kim J, Sasaki H, Park S, Kryukov G, Garraway LA,

- Hammerman PS, Haas J, Andrews SW, Lipson D, Stephens PJ, Miller VA, Varella-Garcia M, Jänne PA, Doebele RC. Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer. *Nat Med.* 2013; 19:1469–72.
26. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKking down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov.* 2015; 5:25–34.
27. Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find. *Genome Med.* 2015; 7:129.
28. Mahajan K, Mahajan NP. Cross talk of tyrosine kinases with the DNA damage signaling pathways. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:10588–10601.
29. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016; 1:e000023.
30. Märkl B, Hirschbühl K, Dhillon C. NTRK-Fusions - A new kid on the block. *Pathol Res Pract.* 2019; 215:152572.
31. Lassen U. How I treat NTRK gene fusion-positive cancers. *ESMO Open.* 2019; 4:e000612.
32. Shulman DS, DuBois SG. The evolving diagnostic and treatment landscape of NTRK-Fusion-driven pediatric cancers. *Paediatr Drugs.* 2020; 22:189–97.
33. Albert CM, Davis JL, Federman N, Casanova M, Laetsch TW. TRK fusion cancers in children: A clinical review and recommendations for screening. *J Clin Oncol off J Am Soc Clin Oncol.* 2019; 37:513–24.
34. Solomon JP, Benayed R, Hechtman JF, Ladanyi M 2019 Identifying patients with NTRK fusion cancer. *Ann Oncol off J Eur Soc Med Oncol* 30 Suppl 8:viii16–viii22.
35. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, Arcila ME, Dogan S, Klimstra DS, Ladanyi M, Jungbluth AA. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an efficient and reliable screen for the detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* 2017; 41:1547–51.
36. Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, Vargas SO, Sheridan R, Black JO, Rajaram V, Laetsch TW, Davis JL. Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2018; 42:927–35.
37. Cui C, Shu W, Li P. Fluorescence in situ hybridization: Cell-based genetic diagnostic and research applications. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4.
38. Lee Y.-C, Chen JY, Huang, CJ, Chen HS, Yang AH, Hang J.-F. Detection of NTRK1/3 rearrangements in papillary thyroid carcinoma using immunohistochemistry, fluorescent in situ hybridization, and next-generation sequencing. *Endocrine Pathology.* 2020; 31(4):348-358
39. Abel HJ, Duncavage EJ. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet.* 2013; 206:432–40.
40. Sabour L, Sabour M, Ghorbian S. Clinical applications of next-generation sequencing in cancer diagnosis. *Pathol Oncol Res POR.* 2017; 23:225–34.

41. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Dietel M, Hechtman JF, Troiani T, López-Rios F, Douillard J-Y, André F, Reis-Filho JS. ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2019; 30:1417–27.
42. Hsiao SJ, Zehir A, Sireci AN, Aisner DL. Detection of tumor NTRK gene fusions to identify patients who may benefit from tyrosine kinase (TRK) inhibitor therapy. *J Mol Diagn JMD*. 2019; 21:553–71.
43. Kummar S, Lassen UN. TRK Inhibition: A new tumor-agnostic treatment strategy. *Target Oncol*. 2018; 13:545–556.
44. Ronsley R, Rassekh SR, Shen Y, Lee AF, Jantzen C, Halparin J, Albert C, Hawkins DS, Amed S, Rothstein R, Mungall AJ, Dix D, Blair G, Nadel H, Jones SJM, Laskin J, Marra MA, J Deyell R. Application of genomics to identify therapeutic targets in recurrent pediatric papillary thyroid carcinoma. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*, 2018; 2;4(2):a002568.
45. Beimfohr C, Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM NTRK1 re-arrangement in papillary thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Int J Cancer*. 1999; 80:842–847.
46. Prasad ML, Vyas M, Horne MJ, Virk RK, Morotti R, Liu Z, Tallini G, Nikiforova MN, Christison-Lagay ER, Udelsman R, Dinauer CA, Nikiforov YE 2016 NTRK fusion oncogenes in pediatric papillary thyroid carcinoma in northeast United States. *Cancer* 122:1097–1107.
47. Otsubo R, Mussazhanova Z, Akazawa Y, Sato A, Matsuda K, Matsumoto M, Yano H, Matsuse M, Mitsutake N, Ando T, Niino D, Nagayasu T, Nakashima M. Sporadic pediatric papillary thyroid carcinoma harboring the ETV6/NTRK3 fusion oncogene in a 7-year-old Japanese girl: a case report and review of literature. *J Pediatr Endocrinol Metab JPEM*. 2018; 31:461–7.
48. Scott LJ. Larotrectinib: First Global approval. *Drugs*. 2019; 79:201–206.
49. Laetsch TW, Hawkins DS. Larotrectinib for the treatment of TRK fusion solid tumors. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2019; 19:1–10.
50. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A 2018 NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 15:731–747.
51. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, Nathenson M et al. Efficacy of larotrectinib in TRK fusion-positive cancers in adults and children. *N Engl J Med*. 2018; 378:731-9.
52. Chen Y, Chi P. Basket trial of TRK inhibitors demonstrates efficacy in TRK fusion-positive cancers. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol*. 2018; 11:78.
53. Food Drug Administration. Approves larotrectinib for solid tumors. EUA, 2020.
54. Vitrakvi (Larotrectinibe) e Vitrakvi TM (Larotrectinibe): novo registro - Busca - Anvisa. Accessed Jun, 2021.
55. Mahul B. Amin. AJCC cancer staging manual. | | EUA: Springer. Available at

<http://www.springer.com/la/book/9783319406176>.

56. Cancer IA for R on 2017. WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4. ed.. Lyon, 2017.
57. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, et al. 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 Off J Am Thyroid Assoc.* 2016; 26:1–133.
58. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63:1454–7.
59. Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, Tsimberidou AM, Vnencak-Jones CL, Wolff DJ, Younes A, Nikiforova MN 2017 Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD.* 2017; 19:4–23.
60. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD;* 2017; 19:341–65.
- 61 Nikiforova M N et al. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Nov;98(11):E1852-60.
62. Vanden Borre P, Schrock AB, Anderson PM, Morris JC 3rd, Heilmann AM, Holmes O, Wang K, Johnson A, Waguespack SG, Ou SI, Khan S, Fung KM, Stephens PJ, Erlich RL, Miller VA, Ross JS, Ali SM. Pediatric, adolescent, and young adult thyroid carcinoma harbors frequent and diverse targetable genomic alterations, including kinase fusions. *Oncologist.* 2017 Mar;22(3):255-63.
63. Brzeziańska E, Pastuszek-Lewandoska D., Lewiński A. Rearrangements of NTRK1 oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Neuro Endocrinology Letters.* Jun. 2007;28(3):221–9.
64. Gregco A, Miranda C, Pagliardini S, Fusetti L, Bongarzone I, Pierotti M. A chromosome 1 rearrangements involving the genes TPR and NTRK1 produce structurally different thyroid-specific TRK oncogenes. *Cancer.* 1997; 19:112–23.
64. Grego, A.; Miranda, C.; Pierotti, M. A. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. *Molecular and Cellular Endocrinology,* May 2010;321(1): 44–49..
- 65 David Michael Hyman, T.W.L., Shivaani Kummar, Steven G. DuBois, Anna F. Farago, Alberto S. Pappo, George D. Demetri, Wafik S. El-Deiry, et al. The efficacy of larotrectinib (LOXO-101), a selective tropomyosin receptor kinase (TRK) inhibitor, in adult and pediatric TRK fusion cancers. *J Clin Oncol,* 2017.
- 65A Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 1989;4:145762

- 66 S. Pulciani, E. Santos, A.V. Lauver, L.K. Long, S.A. Aaronson, M. Barbacid, oncogenes in solid human tumours, *nature*. 300 (1982) 539–42.
67. Romei C, Elisei R. A Narrative review of genetic alterations in primary thyroid epithelial cancer. *Int J Mol Sci*. Feb.2021;22(4):1726.
68. Pekova B, Dvorakova S, Sykorova V, Vacinova G, Vaclavikova E, Moravcova J, Katra R, Vlcek P, Sykorova P, Kodetova D, Vcelak J, Bendlova B. Somatic genetic alterations in a large cohort of pediatric thyroid nodules. *Endocr Connect*. 2019 Jun;8(6):796-805.
- 69 Lorusso L, Cappagli V, Valerio L, Giani C, Viola D, Puleo L, Gambale C, Minaldi E, Campopiano MC, Matrone A, Bottici V, Agate L, Molinaro E, Elisei R. Thyroid Cancers: From Surgery to Current and Future Systemic Therapies through Their Molecular Identities. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 18;22(6):3117.
- 70 Vigneri R, Malandrino P & Vigneri P. The changing epidemiology of thyroid cancer: why is incidence increasing? *Current Opinion in Oncology*;2015 (27), 1–7.
- 71 Niedziela M. Pathogenesis, diagnosis and management of thyroid nodules in children. *Endocrine-Related Cancer*. 2006; 13 427–53.
- 72 Seethala, R.R.; Chiosea, S.I.; Liu, C.Z.; Nikiforova, M.; Nikiforov, Y.E. Clinical and Morphologic Features of ETV6-NTRK3 Translocated Papillary Thyroid Carcinoma in an Adult Population Without Radiation Exposure. *Am. J. Surg. Pathol*. 2017; 41:446–57.
- 73 SILVER, C. E. et al. Aggressive variants of papillary thyroid carcinoma. *Head & Neck* Jul. 2011;3(7):1052-9
- 74 Hu J, Yuan IJ, Mirshahidi S, Simental A, Lee SC, Yuan X. Thyroid Carcinoma: Phenotypic Features, Underlying Biology and Potential Relevance for Targeting Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 16;22(4):1950.
- 75 Sugino K, Nagahama M, Kitagawa W, Shibuya H, Ohkuwa K, Uruno T, Suzuki A, Akaishi J, Masaki C, Matsuzu K, Ito K. Papillary Thyroid Carcinoma in Children and Adolescents: Long-Term Follow-Up and Clinical Characteristics. *World J Surg*. 2015 Sep;39(9):2259-65.
- 76 Rivkees SA, Mazzaferri EL, Verburg FA, Reiners C, Luster M, Breuer CK, Dinauer CA, Udelsman R. The treatment of differentiated thyroid cancer in children: emphasis on surgical approach and radioactive iodine therapy. *Endocr Rev*. 2011 Dec;32(6):798-826.
- 77 Remiker AS, Chuang J, Corathers S, Rutter MM, Rutter MJ, Myer CM 4th, Gelfand MJ, Trout AT, Geller JI. Differentiated Thyroid Cancer in the Pediatric/Adolescent Population: Evolution of Treatment. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2019 Oct;41(7):532-6.
- 78 Alessandri AJ, Goddard KJ, Blair GK, Fryer CJ, Schultz KR. Age is the major determinant of recurrence in pediatric differentiated thyroid carcinoma. *Med Pediatr Oncol*. 2000 Jul;35(1):41-6
- 79 Nam, S.H.; Bae, MR.; Roh, J.L.; Cong, G.; Cho, K.J.; Choi, S.H.; Nam, S.Y.; Kim, S.Y. A comparison of the 7th and 8th editions of the AJCC staging system in terms of predicting recurrence and survival in patients with papillary thyroid carcinoma. *Oral Oncol*. 2018, 87, 158-64.

- 80 Rubinstein JC, Dinauer C, Herrick-Reynolds K, Morotti R, Callender GG, Christison-Lagay ER. Lymph node ratio predicts recurrence in pediatric papillary thyroid cancer. *J Pediatr Surg*. 2019 Jan;54(1):129-132
- 81 Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilotti S, Pierotti MA. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 May;81(5):2006-9
- 82 Galuppini F, Vianello F, Censi S, Barollo S, Bertazza L, Carducci S, Colato C, Manso J, Rugge M, Iacobone M, Watutantrige Fernando S, Pennelli G, Mian C. Differentiated Thyroid Carcinoma in Pediatric Age: Genetic and Clinical Scenario. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Aug 7;10:552
- 83 VALERIO, L. et al. Targeted therapy in thyroid cancer: State of the art. *Clinical Oncology*, v. 29, n. 5, p. 316–324, 1 maio 2017,
- 84 Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol*. 2019 Jan;32(1):147-153
- 85 Rangel-Pozzo A, Sisdelli L, Cordioli MIV, Vaisman F, Caria P, Mai S, Cerutti JM. Genetic landscape of papillary thyroid carcinoma and nuclear architecture: An overview comparing pediatric and adult populations. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 27;12(11):3146.
- 86 Hu J, Yuan JJ, Mirshahidi S, Simental A, Lee SC, Yuan X. Thyroid carcinoma: Phenotypic features, underlying biology and potential relevance for targeting therapy. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 16;22(4):1950
- 87 Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, Jungbluth AA, Zehir A, Benayed R, Drilon A, Hyman DM, Ladanyi M, Sireci AN, Hechtman JF. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol*. 2020 Jan;33(1):38-46.
- 89 Weiss LM, Funari VA. NTRK fusions and Trk proteins: what are they and how to test for them. *Hum Pathol*. 2021 Jun;112:59-69.
- 90 Clinicopathologic and molecular characterization of NTRK- rearranged thyroid carcinoma (NRTC) Ying-Hsia Chu¹, Dora Dias-Santagata¹, Alexander A. Farahani¹, Baris Boyraz¹, William C. Faquin¹, Vânia Nosé¹, Peter M. Sadow¹ *Mod Pathol*. 2020 Nov.; 33(11): 2186–97.
- 91 Pekova, B.; Sykorova, V.; Mastnikova, K.; Vaclavikova, E.; Moravcova, J.; Vlcek, P.; Lastuvka, P.; Taudy, M.; Katra, R.; Bavor, P.; et al. NTRK Fusion Genes in Thyroid Carcinomas: Clinicopathological Characteristics and Their Impacts on Prognosis. *Cancers* 2021, 13, 1932
- 92 Pekova, B.; Sykorova, V.; Dvorakova, S.; Vaclavikova, E.; Moravcova, J.; Katra, R.; Astl, J.; Vlcek, P.; Kodetova, D.; Vcelak, J.; et al. RET, NTRK, ALK, BRAF, and MET Fusions in a Large Cohort of Pediatric Papillary Thyroid Carcinomas. *Thyroid* 2020, 30, 1771–1780.
- 93 Fazeli, S.; Dadu, R.; Waguespack, S.G.; Sherman, S.I.; Busaidy, N.L.; Hu, M.I.; Jimenez, C.; Habra, M.A.; Williams, M.; Altameemi, L.; et al. MON-491 TRK-Fusion Thyroid Cancer: A Clinical Overview in a Large Population at a Single Cancer Center. *J. Endocr. Soc.* 2020, 4.

94 Perreault S, Chami R, Deyell RJ, El Demellawy D, Ellezam B, Jabado N, Morgenstern DA, Narendran A, Sorensen PHB, Wasserman JD, Yip S. Canadian Consensus for Biomarker Testing and Treatment of TRK Fusion Cancer in Pediatric Patients. *Curr Oncol*. 2021 Jan 9;28(1):346-366.

95. Souza Reis Rde, Gatta G, Camargo B de. Thyroid carcinoma in children, adolescents, and young adults in Brazil: A report from 11 population-based cancer registries. *PLoS One*. 2020 May 1;15(5):e0232416.

APÊNDICE A: Protocolo de Revisão de Lâminas**Nome do paciente:****No do prontuário:****Idade do paciente:****Data da Cirurgia:**

01. **Número do anatamopatológico:**.....|_|_|_|_|_|_|_|

02. **Multifocalidade: (1) Não (2) Ipsilateral (3) Bilateral**
..... |_|

03. **Padrão: (1) Puramente papilífero (2) Puramente folicular (3) Papilífero e folicular (4) Presença sólida (puramente sólida; papilífero e sólida; folicular e sólida; papilífero-folicular-sólida)**|_|

04. **Padrão dominante: (1) Papilífero (2) Folicular (3) Sólida**
.....|_|

Aspectos do maior tumor:

05. **Localização: (1) Lobo Direito (2) Lobo Esquerdo (3) Istmo (999) Não especificado**
.....|_|

06. **Tamanho (mm):**.....
|_|_|_|

07. **Tipo histológico: (1) Ca. Papilífero (2) Ca. Folicular (3) Ca. de células de Hurthle (4) Ca. Medular (5) Ca. Anaplásico (6) Outros (especificar)**.....|_|

08. **Se Carcinoma papilífero, subclassificação: 1) Clássica (2) Folicular (3) Células claras (4) Células colunares (5) Cribiforme morular (6) Esclerosante difusa (7) Macrofolicular (8) Oncocítica ou oxifílicas (9) Sólida (10) Células altas (11) Warthin-like (12) Microcarcinoma (13) Outros (especificar) (999) Não se**

aplica.....
|_|

09. **Se Carcinoma papilífero, arquitetura: (1) Clássica [papilífera] (2) Cribiforme morular (3) Esclerosante difusa (4) Folicular (5) Macrofolicular (6) Sólida (7) Outra (especificar) (999) Não se aplica**|_|

10. **Se Carcinoma papilífero, citomorfologia: (1) Clássica (2) Célula clara (3) Célula colunar (4) Oncocítica ou oxifílica (5) Células altas (6) Outra (especificar) (999) Não se aplica**|_|

11. **Margens: (1) Não envolvidas pelo carcinoma (2) Envolvidas pelo carcinoma (999) Não se aplica**|_|

12. **Se não envolvida, indicar distância para a margem mais próxima (mm):**
|_|_|_|

13. **Se envolvida, indicar sítios de envolvimento:**

14. **Cápsula: (1) Totalmente capsulado (2) Parcialmente capsulado (3) Ausente (999) Não se aplica**|_|

15. **Invasão capsular: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminada (999) Não se aplica**
|_|

16. **Se invasão capsular presente: (1) Mínima (2) Amplamente invasiva (999) Não se aplica**.....|_|

17. **Invasão angiolinfática: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminada (999) Não se aplica**
|_|

18. **Se invasão angiolinfática presente, extensão: (1) Focal (menos de 4 vasos) (2) Extensa (4 vasos ou mais) (999) Não se aplica**
|_|
19. **Invasão vascular: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
|_|
20. **Invasão linfática: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
|_|
21. **Invasão perineural: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
|_|
22. **Extensão extra-tireoidiana: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
 aplica|_|
23. **Se extensão extra-tireoidiana presente: (1) Mínima (2) Extensa (999) Não se aplica**
|_|
24. **Corpos psamatomatosos: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
|_|
25. **Infiltração mononuclear: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
|_|
26. **Se infiltração mononuclear presente: (1) Escassa (2) Densa (3) Não se aplica**
|_|
27. **Fibrose extensa: (1) Ausente (2) Presente (3) Indeterminado (999) Não se aplica**
|_|
28. **Estadiamento T: (1) T0 (2) T1a (3) T1b (4) T2 (5) T3 (6) T4a (7) T4b (999) Tx**
|_|
29. **Estadiamento N: (1) N0 (2) N1a (3) N1b (999)**
 Nx.....|_|

30. **Número de linfonodos examinados:**
|_|
31. **Número de linfonodos envolvidos:**
|_|
32. **Tamanho do maior linfonodo envolvido: (1) ≤ 2mm (2) 2-10 mm (3) 10-30 mm (4) > 30 mm (999) Não se aplica**
|_
 _|
33. **Linfonodos pertenciam a cadeia cervical lateral: (1) Sim (2) Não (3) Não se aplica**
|_|
34. **Nº de linfonodos NÍVEL VI dissecados (0) N/A (999) ignorado.....** |_|_|
35. **Nº de linfonodos NÍVEL VI comprometidos (0) N/A (999) ignorado.....** |_|_|
36. **Nº de linfonodos ipsilaterais (cervical lateral) dissecados (0) N/A (999) ignorado.....** |_|_|_|
37. **Nº de linfonodos ipsilaterais (cervical lateral comprometidos: (0) N/A (999) ignorado.....** |_|_|_|
38. **Nº de linfonodos contralaterais (cervical lateral) dissecados: (0) N/A (999) ignorado.....** |_|_|_|
39. **Nº de linfonodos contralaterais (cervical lateral comprometidos: (0) N/A (999) ignorado.....** |_|_|_|

APÊNDICE B: Ficha de Coleta de Dados Clínicos**FICHA ESTRUTURADA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS DE PACIENTES COM
CÂNCER DE TIREOIDE****AVALIAÇÃO CLÍNICA DE SEGUIMENTO ONCOLÓGICO**

01. REGISTRO|_|_|_|_|_|_|_|
02. Numero do AP..... |_|_|_|_|_|_|_|_|
03. Raça (1) negro (2) pardo (3) branco (4) outros |_|
04. Sintomas:(1) Achado ao USG (2) Nódulo de tireoide visível/palpável (3) Nódulo metastático cervical visível/palpável (4) disfonia (5) disfagia (6) não relatado.....|_|

DADOS DA CIRURGIA

05. Data da cirurgia: (00/00/0000).....___/___/___
06. Tipo de Tireoidectomia: (1) Total (2) Parcial (3)totalização..... |_|
07. Esvaziamento cervical nível VI (1) não (2) |_|
08. Esvaziamento cervical lateral (1) não (2) unilateral (3) bilateral..... |_|
09. Dreno utilizado: (1) port vac (2) Penrose (3) não drenado.....|_|
10. Infiltração de musculatura pré tireoidiana macroscópica (1) não (2) sim..... |_|
11. Infiltração de nervo laringeo (1) não (2) sim.....|_|
12. Infiltração de Traqueia: (1) não (2) sim.....|_|
13. Infiltração de laringe: (1) não (2) sim.....|_|
14. Infiltração de Esôfago (1) não (2) sim.....|_|
15. Infiltração de Faringe (1) não (2) sim|_|
16. Infiltração de Carótida (1) não (2) sim|_|
17. Infiltração de Veia Jugular (1) não (2) sim|_|
18. Infiltração de Nervo acessório (1) não (2) sim.....|_|
19. Infiltração de musculo esternocleidomastóideo (1) não (2) sim.....|_|
20. Infiltração de fáscia pré vertebral (1) não (2) sim |_|
21. Lesão da traquéia (1) não (2) sim.....|_|

22. Lesão do esôfago (1) não (2) sim.....|_|
23. Lesão vascular (1) não (2) sim|_|
24. Paresia/paralisia de laringe (1) não (2) sim.....|_|
25. Hematoma pós operatório (1) não (2) sim.....|_|
26. Seroma (1) não (2) sim |_|
27. Fístula quilosa (1) não (2) sim |_|
28. Hipoparatiroidismo (1) não (2) transitório (3) definitivo |_|

IODOTERAPIA

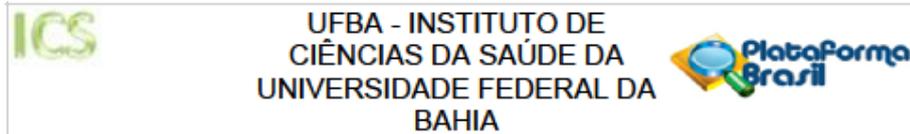
29. Data da PCI (00/00/0000) (999 se não fez PCI)....._/_/
30. Captação cervical 2 hs: (1) Não mensurada (2) < 5% (3) 5 a 10% (4) > 10%.... |_|
31. Captação cervical 24 hs: (1) Não mensurada (2) < 5% (3) 5 a 10% (4) > 10%. |_|
32. Metástase à distância: (1) Não (2) Pulmão (3) Fígado (4) Ossos (5) Ouros.... |_|
33. Dose de radioiodo (999 não fez)..... |_|_|_|
34. Data da iodoterapia (00/00/0000) (999 se não fez PCI)....._/_/
35. Tireoglobulina pré iodoterapia: (999 se não fez exame)..... |_|_|
36. TSH pré iodoterapia: (999 se não fez exame) |_|_|
37. AAT pré iodoterapia: (999 se não fez exame) |_|_|
38. Complicações agudas da iodoterapia: (1) Não (2) Náuseas e/ou vômitos (3) Xerostomia (4) Dor em região cervical (5) outras (6) Ignorada (7) N/A..... |_|_|
39. PCI pós iodoterapia: (1) Captação adequada (2) Metástases à distância (3) Captação inadequada. |_|_|
40. Tireoglobulina pós iodoterapia: |_|
41. AAT pós iodoterapia: (999 se não fez exame) |_|

FOLLOW UP

42. Te mpo de follow up (meses)
43. Data da última informação: (00/00/0000)....._/_/
44. Data da recidiva: (00/00/0000).. (999 se não)....._/_/

45. Recidiva: (1) Não (2) Local (3) Nível VI (4) pescoço homolateral (5) pescoço contralateral (6) pescoço bilateral (7) pulmão (8) osso (9) fígado (10) outros|_|
46. Tratamento da recidiva locorregional: (1) Não (2) Totalização de tireoidectomia (3) Esv. Nível VI (4) Esv. cervical ipsilateral (5) Esv. cervical contralateral (6) Esv. cervical bilateral (7) Radioterapia (8) quimioterapia (9) |_|
47. Tratamento da recidiva à distância (1) cirurgia (2) iodoterapia (3) radioterapia (4) quimioterapia (FPT) (5)|_|
48. Iodoterapia após recorrência (1) não (2) sim |_|
49. Número de doses de radioiodo.....|_|
50. Dose cumulativa de iodo (999 não fez)..... |_|_|_|
51. Doença iodorefratária (1) não (2) sim |_|
52. Status na última informação: (1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) morte por câncer (4) morte operatória (5) morte por outra causa (6) perdido de vista..... |_|
53. Resposta (1) excelente (2) bioquímica incompleta (3) estrutural incompleta (4) bioquímica indeterminada (5)|_|

ANEXO A: Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Helton Estrela Ramos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34192920.8.0000.5662

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.319.796

Apresentação do Projeto:

Atualmente, sabemos que o cancer e uma doenca do genoma. Estudos indicam que 30% a 49% dos pacientes que realizam a determinacao do perfil genomico tumoral podem apresentar uma alteracao acionavel, o que significa que os pacientes podem estar aptos a utilizar uma terapia em estudo ou aprovada. O objetivo deste estudo e rastrear a presenca de fusoes NTRK, utilizando imunohistoquimica, em carcinoma papilifero de tireoide de crianças, adolescentes e adultos jovens (<21 anos) atendidos na Santa Casa de Misericordia de Feira de Santana (SCMFS). Trata-se de um estudo retrospectivo de corte transversal multicentrico envolvendo amostras tumorais de casos de CPT em pacientes pediatricos, adolescentes ou adultos jovens com menos de 21 anos de idade, diagnosticados e tratados entre janeiro de 2010 e marco de 2020, na Santa Casa de Misericordia de Feira de Santana (SCMFS), localizado na cidade de Feira de Santana, Bahia. Foram selecionados casos consecutivos e suas respectivas amostras tumorais resultantes de ressecoes cirurgicas da tireoide realizadas pelo Servico de Cirurgia de Cabeça e Pescoco (SCCP) da SCMFS, fixadas em formalina e conservadas em blocos de parafina. O Hospital SCMFS, CNES numero 2601680, e gerenciado pela Santa Casa de Misericordia em Feira de Santana, Bahia e tambem e referencia regional no tratamento cirurgico oncologico.

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