



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CRISTIANE JEYCE GOMES LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PAREADA DOS TUMORES
PRIMÁRIO E METASTÁTICO DE CARCINOMA DIFERENCIADO DE
TIREOIDE REFRACTÁRIO AO IODO RADIOATIVO**

Brasília – DF, 2021



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

CRISTIANE JEYCE GOMES LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PAREADA DOS TUMORES
PRIMÁRIO E METASTÁTICO DE CARCINOMA DIFERENCIADO DE
TIREOIDE REFRACTÁRIO AO IODO RADIOATIVO**

Tese apresentada como requisito para
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Lofrano Alves Porto

Brasília – DF
2021

CRISTIANE JEYCE GOMES LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PAREADA DOS TUMORES PRIMÁRIO E
METASTÁTICO DE CARCINOMA DIFERENCIADO DE TIREOIDE REFRACTÁRIO AO
IODO RADIOATIVO**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

A candidata foi considerada APROVADA em 19 de março de 2021.

Banca Examinadora

1- Prof. Dr. Luiz Claudio Gonçalves de Castro (*Presidente*)

Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília

2- Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Silva Maia (*Examinador Externo*)

Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

3- Prof. Dr. Claudio Eduardo de Oliveira Cavalcanti (*Examinador Externo*)

Hospital de Base do Distrito Federal – IGES-DF

4- Prof^a. Dr^a. Angélica Amorim Amato (*Examinador Interno*)

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

5- Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves (*Examinador Suplente*)

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília

Gomes-Lima, Cristiane Jeyce

Caracterização molecular pareada dos tumores primário e metastático de carcinoma diferenciado de tireoide refratário ao iodo radioativo. Brasília, 2021.

105p.:il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – UnB.

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Orientador: Luiz Claudio Gonçalves de Castro; Coorientadora: Adriana Lofrano Alves Porto

1. câncer diferenciado de tireoide 2. metástases 3. resistência ao iodo radioativo 4. perfil molecular pareado 5. sequenciamento de nova geração.

Dedico este trabalho a meu esposo Ivan e às nossas filhas, Natália e Isabela, por sonharem meus sonhos, pelo apoio incondicional e pelas horas de convivência subtraídas durante os anos de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me inspirou a iniciar este trabalho e a Nossa Senhora, que me acalentou nos momentos de desânimo, dando-me forças para continuar.

A meus amados pais, Dilma e Obédio, que sempre acreditaram em mim e, ao estimularem o gosto pelo conhecimento, plantaram em mim a semente da curiosidade científica.

A minha querida Bini, que me ensinou a brincar e a sonhar.

A minha tia Almerinda (*in memoriam*), por sua presença constante em minha vida, mesmo à distância.

A meus sogros, Lúcia e Ivo, que torcem e vibram com minhas conquistas como se fossem suas próprias conquistas.

Aos amigos que fiz durante esta pesquisa, Thanos, Di, Donika, Dorina e Leila, com quem compartilhei dúvidas, angústias e risos, e agora compartilho uma amizade intercontinental.

Aos amigos e professores Adriana Lofrano, minha co-orientadora, e Francisco Neves, pelo constante estímulo ao conhecimento científico e pelas valiosas dicas em pesquisa.

A minha amiga “ponte”, Valéria Guimarães, que, com seu talento ímpar de unir as pessoas, me apresentou ao Dr. Leonard Wartofsky, e esteve sempre presente, vibrando a cada conquista.

Aos amigos que tornam a caminhada mais leve, em especial meu amigo e orientador Luiz Claudio, pelo apoio contínuo, pelo estímulo à conclusão deste trabalho, por seu grande exemplo de dedicação e competência.

Aos meus co-mentores nos Estados Unidos, Dr. Leonard Wartofsky, Dr. Douglas Van Nostrand, Dra. Jacqueline Jonklaas, Dra. Joanna Klubo-Gwiezdzinska, Dr. Vasily Vasko, que me transmitiram valores que vão muito além da pesquisa clínica.

Ao meu querido mentor Dr. Kenneth Burman, exemplo de pessoa, de médico e de pesquisador, que me acolheu em Washington, DC, me ensinou palavras novas em inglês e, acima de tudo, me mostrou como exercer a Medicina e a fazer pesquisa de forma ética e nobre.

Aos pacientes que participaram deste estudo, que se equilibram nas incertezas de suas enfermidades e, ainda assim, aceitaram contribuir com esta pesquisa de forma tão generosa.

“O êxito na vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”

Abraham Lincoln, 1809-1865

RESUMO

Introdução: O manejo do paciente com carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) refratário ao iodo é um desafio clínico. Em caso de progressão da doença, desenvolvimento de resistência ao iodo radioativo e necessidade de terapia sistêmica, o conhecimento do perfil molecular do tumor e do tecido metastático pode ser de grande valia. Entretanto, ainda pouco se sabe e tem sido descrito sobre a análise combinada do perfil molecular pareado do tumor primário de tireoide e de suas metástases, o padrão de tendência dessas lesões compartilharem ou não as mesmas anormalidades genéticas e o impacto clínico desse conhecimento na condução do paciente. Desta forma, entende-se que o pareamento molecular de tumores primários e metastáticos do CDT pode fornecer subsídios para o melhor conhecimento da patogênese envolvida no processo de metastatização tumoral e, quando acessível e indicado, contribuir na decisão da terapia alvo-específica mais apropriada a cada caso.

Objetivos: Esta pesquisa teve como objetivo analisar e correlacionar os dados clínicos, histológicos e moleculares dos tecidos tumorais de indivíduos com CDT refratário ao iodo radioativo, com foco na investigação e caracterização do perfil molecular pareado entre os tumores primários e suas lesões metastáticas. Foi também objeto deste estudo explorar o perfil de interação entre as proteínas codificadas pelos genes mutados descritos nos tecidos tumorais dos pacientes dessa coorte com proteínas fisiologicamente mais expressas na tireoide.

Metodologia: Neste estudo construiu-se uma coorte de 12 indivíduos adultos com diagnóstico de CDT e metástases refratárias ao iodo radioativo, selecionados a partir de uma amostragem de conveniência e em seguimento no *MedStar Washington Hospital Center* ou no *MedStar Georgetown University Hospital* (Washington, DC – Estados Unidos). As informações clínicas e histopatológicas desse grupo foram obtidas dos prontuários eletrônicos. DNA e RNA foram extraídos do tumor primário e de sítios metastáticos. As análises moleculares foram realizadas a partir do sequenciamento de nova geração (NGS) utilizando-se um painel de 592 genes e da análise de fusões gênicas por sequenciamento de RNA. Mutações do promotor do gene *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*) foram investigadas por reação de polimerase em cadeia (PCR) digital

microfluidica. Variantes gênicas menos conhecidas foram analisadas com o uso da ferramenta computacional *PolyPhen-2* para predição do seu impacto funcional sobre as respectivas proteínas codificadas. O perfil de imunogenicidade dos tumores foi avaliado a partir da análise da expressão do PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand*) por imunohistoquímica e do estudo de dois biomarcadores, o teste de instabilidade de microssatélites (MSI) e a carga de mutação tumoral (TMB). Análise de bioinformática através do banco de dados *STRING* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) foi realizada com o objetivo de se investigar a existência de uma rede de associações funcionais e estruturais proteína-proteína que possam estar envolvidas na patogênese dos tumores da tireoide.

Resultados: Dos 12 participantes do estudo, dez eram do sexo masculino. A média de idade do grupo ao diagnóstico de CDT foi de $61 \pm 15,9$ anos (variação, 25-82 anos). Nove indivíduos apresentaram CDT papilar (PTC); um, CDT folicular (FTC); e dois, CDT de célula Hürthle (CCH). A análise do panorama genético de todos os sítios emparelhados incluiu o estudo dos genes *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53*, *ATM*, *MUTYH*, *POLE* e *NTRK*, englobando as fusões nos genes *BRAF* e *NTRK*. *BRAF V600E* foi a mutação pontual mais frequente entre os espécimes emparelhados dos pacientes (7/12). Destes sete indivíduos, apenas um apresentou mutação de ponto *BRAF* não V600E (*BRAF H542Y*), não descrita previamente em CDT, além de mutação no *NRAS* (p.Q61R) em tecidos primário e metastático (ósseo). Este mesmo indivíduo, com tumor bastante agressivo e metástases em diferentes tecidos, foi o único da coorte em que se detectou mutação do promotor do *TERT* (p.C228T), no tecido metastático analisado. Uma fusão gênica ainda não descrita na literatura foi encontrada em um paciente, *BRAF-CEP152*. As anormalidades genéticas foram consistentes entre os sítios primário e metastático, com discordância molecular encontrada em três indivíduos para mutações pontuais. A baixa imunogenicidade do CDT desses pacientes foi evidenciada pelo perfil de estabilidade encontrado no teste de MSI, pela TMB classificada como baixa a intermediária e pela expressão PD-L1 ter permanecido positiva em apenas um paciente com CCH.

Conclusão: A análise pareada das anormalidades moleculares encontradas nos genes *driver* dos tumores primários e sítios metastáticos dos indivíduos com CDT estudados mostrou que apesar das mutações tenderem a ser concordantes, identificou-se três

indivíduos que apresentaram heterogeneidade molecular entre as lesões. O padrão de expressão da PD-L1, da TMB e do MSI encontrados neste estudo corroboram o conceito da baixa imunogenicidade do CDT, na maioria dos casos. Na exploração das associações entre as proteínas codificadas pelos genes mutados descritos nas lesões tumorais deste estudo com as proteínas fisiologicamente mais expressas na tireoide, observou-se forte associação da proteína BRAF com as proteínas HRAS, NRAS e NTRK1; e forte associação da proteína TP53 com as proteínas HRAS, NRAS, MUTYH e ATM. Encontrou-se também uma conexão em rede das proteínas BRAF, HRAS, NRAS, TP53, ATM com proteínas essenciais à fisiologia da tireoide, em especial com a proteína PAX8.

Palavras-chave: *câncer diferenciado de tireóide; metástases; resistência ao iodo radioativo; pareamento molecular; sequenciamento de nova geração.*

ABSTRACT

Background: The management of individuals with metastatic radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (DTC) is a clinical challenge. In case of disease progression with development of radioactive iodine resistance and need of systemic therapy, exploring the paired genetic profile of primary tumor and its metastatic tissue may be a worthy tool. Moreover, to the moment little is known and has been reported about the paired molecular profile of the primary tumor and its metastases, their pattern and tendency of harboring the same genetic abnormalities, and the clinical impact of this knowledge on the patient's management. So, the molecular pairing of DTC primary and metastatic lesions could subside means for a better comprehension of some steps of the pathogenesis mechanisms involved in tumor metastases and, when feasible and recommended, assisting in the decision of the most appropriate target-specific therapy for each case.

Objectives: This research aimed to analyze and correlate clinical, histological and molecular data from tumor tissues of individuals with radioactive iodine-refractory DTC, focusing on the investigation and characterization of the paired molecular profile between primary tumors and their metastasis. It was also the object of this study to explore the association between the proteins coded by the mutated genes found in the tumor tissues from the individuals in this cohort with proteins which are physiologically more expressed in the thyroid gland.

Methodology: In this study we designed a cohort of 12 adult individuals diagnosed with DTC and radioactive iodine-refractory metastasis, selected from a convenience sampling, and being followed at MedStar Washington Hospital Center or MedStar Georgetown University Hospital (Washington, DC - United States). Clinical and histopathological data of this group were obtained from the electronic medical records. DNA and RNA were extracted from the primary tumor and metastatic sites. Molecular analyses were performed by next-generation sequencing (NGS) using a panel of 592 genes and gene fusions were analyzed by RNA sequencing. Mutations of the *TERT* (telomerase reverse transcriptase) gene promoter were investigated by microfluidic digital polymerase chain reaction (PCR). Uncommon gene variants were analyzed using *PolyPhen-2* software for predicting the functional impact on the respective proteins. Protein expression of PD-L1

(programmed cell death 1 ligand) in paired tumor samples was determined by immunohistochemistry. The biomarkers used for identification of the genomic signature of the tumors were microsatellite instability (MSI) test and tumor mutation burden (TMB). Bioinformatics analysis using the STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) database was performed in order to investigate the existence of a functional and structural protein-protein associations network potentially related to the pathogenesis of thyroid tumors.

Results: Out of the 12 participants, ten were male. The group mean age at diagnosis of DTC was 61 ± 15.9 years (range, 25-82 years). Nine individuals had papillary DTC (PTC); one, follicular DTC (FTC); and two, Hürthle cell DTC (HCC). The genetic landscape of all paired sites included *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53*, *ATM*, *MUTYH*, *POLE* and *NTRK* genes, including fusions in *BRAF* and *NTRK* genes. *BRAF V600E* was the most frequent point mutation among the paired specimens (7/12). Out of those seven individuals, only one harbored a *BRAF non-V600E* point mutation (*BRAF H542Y*), not previously described in DTC, and also a mutation in *NRAS* (p.Q61R) in primary and metastatic (bone) tissues. This same individual, who presented a very aggressive tumor and metastases in different tissues, was the only one in the cohort in whom a mutation in the *TERT* promoter (p.C228T) was detected in the analyzed metastatic tissue. A novel gene fusion was found in one patient, *BRAF-CEP152*. Genetic abnormalities were consistent between primary and metastatic sites, with molecular discordance found in three individuals for point mutations. The low immunogenicity of DTC from these patients was evidenced by the stability profile displayed by the MSI test, by the low to intermediate level of TMB, and by PD-L1 expression positivity observed in only one patient with HCC.

Conclusion: Paired analysis of the molecular abnormalities found in the driver genes of the primary tumors and metastatic sites of individuals with DTC in this cohort showed that despite the mutations tended to be concordant, we identified three individuals who showed molecular heterogeneity between lesions. The patterns of PD-L1 expression, TMB and MSI testing displayed in this study corroborate the concept of low immunogenicity of DTC, in most of the cases. In the exploratory assessment of the associations between the proteins encoded by the mutated genes described in the tumor lesions of this study and the mainly physiologically expressed proteins in the thyroid gland,

we observed a strong association between BRAF protein with HRAS, NRAS, and NTRK1 proteins; as well as a strong association between TP53 protein with HRAS, NRAS, MUTYH, and ATM proteins. A network connection of BRAF, HRAS, NRAS, TP53, ATM proteins with proteins which are essential for thyroid physiology, in particular with PAX8 protein, was also found.

Keywords: differentiated thyroid cancer; metastatic; radioiodine refractory; paired molecular profile; next generation sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos e subtipos histológicos do carcinoma de tireoide

Figura 2. Principais vias de sinalização molecular envolvidas no CDT

Figura 3. Representação esquemática das mutações da região promotora do *TERT* identificadas em tumores de tireoide

Figura 4. Ciclo câncer-imunidade

Figura 5. Fatores estimulatórios e inibitórios do ciclo câncer-imunidade

Figura 6. *Checkpoints* imunológicos

Figura 7. Microscopia com imunohistoquímica para PD-L1

Figura 8. Plataforma para realização de PCR digital

Figura 9. Página inicial de análise no *PolyPhen-2*

Figura 10. Exemplo de pesquisa no *STRING* para a proteína BRAF

Figura 11. Canais de interação do *STRING*

Figura 12. Comparação entre os perfis genéticos, imunohistoquímica e biomarcadores dos sítios primário e metastático

Figura 13. Resultados da predição do impacto da substituição de aminoácidos pelo *PolyPhen-2*

Figura 14. Associações funcionais entre as proteínas comumente expressas na tireoide e as proteínas relacionadas ao desenvolvimento de câncer, identificadas nesta coorte.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das mutações gênicas e cromossômicas no ser humano

Tabela 2. Distribuição das variáveis clínicas dos pacientes estudados

Tabela 3. Características demográficas e histopatológicas dos pacientes estudados

Tabela 4. Panorama molecular e biomarcador dos tumores analisados

Tabela 5. Detalhamento das características clínicas e genéticas dos sujeitos do estudo

Tabela 6. Resultados da PCR digital para o promotor do *TERT*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK -	<i>Anaplastic Lymphoma Receptor Tyrosine Kinase</i>
BRAF -	<i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
CAT -	Carcinoma anaplásico de tireoide
CCH –	Carcinoma de células de Hürthle (<i>Hürthle cell carcinoma</i>)
CLIA -	<i>Clinical Laboratory Improvement Amendments</i>
CDT -	Carcinoma diferenciado de tireoide
CFT –	Carcinoma follicular de tireoide
CPT –	Carcinoma papilar de tireóide
CNV –	Variação do número de cópias (<i>copy number variation</i>)
CTLA-4 -	<i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
ddPCR –	<i>Droplet digital polimerase chain reaction</i> (PCR digital em gotas)
DNA –	Ácido desoxirribonucléico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
GTP -	Guanosina trifosfato
HIPAA -	<i>Health Insurance Portability and Accountability Act</i>
HRAS -	<i>HRas Proto-Oncogene, GTPase (Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog)</i>
IHQ -	Imunohistoquímica
IRB -	<i>Institutional Review Board</i>
KRAS -	<i>KRAS Proto-Oncogene, GTPase (V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog)</i>
MAP -	<i>Mitogen activating protein</i>
MHC -	Complexo maior de histocompatibilidade (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHRI -	<i>MedStar Health Research Institute</i>
MSI -	<i>Microsatellite instability</i>
mTOR -	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

NGS - *Next-generation sequencing*

NIS - *Na-I Symporter (cotransportador de Na-I)*

NK - *Natural killer*

NTRK - *Neurotrophic tropomyosin receptor kinase*

NRAS - *NRAS Proto-Oncogene, GTPase (Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog)*

OMS - *Organização Mundial da Saúde*

PAAF - *Punção aspirativa com agulha fina*

PCI - *Pesquisa de corpo inteiro*

PCR - *Polymerase chain reaction*

PD-1 - *Programmed cell death-1*

PD-L1 - *Programmed cell death 1 ligand*

PET-CT - *Tomografia por emissão de pósitrons*

PI3 - *Phosphatidylinositol-3-kinase*

RAS - *RAt Sarcoma vírus*

RECIST - *Response Evaluation Criteria In Solid Tumours*

RET - *Rearranged during transfection*

RM - *Ressonância magnética*

STRING - *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*

TC - *Tomografia computadorizada*

TCLE - *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*

TERT - *Telomerase reverse transcriptase*

THADA - *THADA Armadillo Repeat Containing (Thyroid Adenoma-Associated Protein)*

TMB - *Tumor mutation burden*

WES - *Whole-exome sequencing*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 PATOGÊNESE DO CANCER DE TIREOIDE	21
1.1.1 Conceitos em genética molecular do câncer de tireoide	23
1.1.2 Mecanismos de carcinogênese tireoidiana	24
1.1.3 Refratariedade do CDT ao iodo radioativo	29
1.1.4 Pareamento molecular entre tumor primário e tumor metastático	31
1.1.5 Oncologia e Imunologia	32
1.1.6 Ferramentas laboratoriais para a análise molecular dos tumores e de avaliação da predisposição das mutações à tumorigênese	37
2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4 MÉTODOS	44
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	44
4.2 SUJEITOS DA PESQUISA.....	45
4.3 METODOLOGIA DAS ANÁLISES LABORATORIAIS.....	46
4.3.1. Exames moleculares	46
4.3.2. Predição do impacto da substituição de aminoácidos	49
4.3.3. Análise de associações funcionais entre genes e proteínas	50
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5 RESULTADOS	54
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	54
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ACHADOS MOLECULARES.....	55
5.3. PREDIÇÃO DO IMPACTO DA SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	61
5.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS FUNCIONAIS.....	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	77

ANEXOS	84
A. APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO CEP - INICIAL	84
B. APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO CEP - CONTINUIDADE	85
C. LISTA DE GENES PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS).....	86
D. EXEMPLO DE LAUDO DE SEQUENCIAMENTO	87
APÊNDICES	89
A. TCLE.....	89
B. AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA	94
C. PLANILHA DE ORÇAMENTO	96
D. ARTIGO PUBLICADO.....	97

1 INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide é a malignidade endócrina mais frequente na população e corresponde a aproximadamente 2,1% dos diagnósticos de câncer no mundo inteiro (1). Estudos epidemiológicos realizados em diferentes populações de todos os continentes mostram que sua incidência tem aumentado. De 1990 a 2017, em âmbito mundial, o número de casos de câncer de tireoide descobertos incidentalmente aumentou 169% e o número de mortes a ele relacionados, 87%(1).

Embora tenha havido um excesso de diagnóstico de tumores incidentais devido ao amplo uso de ultrassonografia de tireoide e punção aspirativa com agulha fina (PAAF), uma proporção substancial desse aumento no número de casos pode ser atribuída a fatores ambientais modificáveis, tais como obesidade e tabagismo (2-4).

Nos Estados Unidos, o câncer de tireoide é a quinta causa de malignidade mais comum entre mulheres adultas e estima-se que tenha ocorrido mais de 52.000 casos novos entre homens e mulheres adultos em 2020 (5).

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer projetam que, para cada ano do triênio 2020-2022, deva surgir aproximadamente 1.830 novos casos de câncer de tireoide entre os homens e 11.950 casos entre as mulheres adultos do nosso país (6), correspondendo atualmente à quinta maior causa de câncer no sexo feminino.

Em relação à população pediátrica, dados epidemiológicos indicam que cerca de 2% dos casos totais de câncer de tireoide acometam crianças e adolescentes (7-9). O cancer de tireóide representa cerca de 6% dos cânceres infanto-juvenis e essa faixa etária também vem apresentando aumento na incidência dessa neoplasia nas últimas décadas, a uma taxa de incremento estimada em 4,6% ao ano nas últimas duas décadas. Assim como na população adulta, parte desse aumento deve refletir o achado de indivíduos com neoplasia clinicamente silenciosa, maior sensibilidade dos exames de imagem e seu uso mais frequente (8, 10).

O carcinoma diferenciado de tiróide (CDT) representa cerca de 90% de todos os casos de cancer de tireóide. Sob essa denominação inclui-se o carcinoma papilar de tiróide (CPT), o carcinoma folicular de tiróide (CFT) e o carcinoma de células Hürthle (HTC) (11).

A maioria dos pacientes com CDT apresenta um bom prognóstico após tratamento apropriado, que envolve a remoção cirúrgica do tumor e a terapia com iodo radioativo em casos selecionados (12, 13). No quadro geral, a taxa de sobrevivência em cinco anos dos pacientes com câncer de tireoide é de 98%, índice esse que depende de uma série de fatores, como o tipo de tumor e o estágio da doença ao diagnóstico.

Na faixa etária pediátrica a doença tende a ser mais agressiva e diagnosticada em estágio mais avançado que em adultos, devido, ao menos em parte, às diferenças biológicas e moleculares subjacentes. Entre essas diferenças são descritas a maior prevalência de fusões gênicas, atingindo 50 a 60% dos pacientes pediátricos, contra uma taxa de 15% entre adultos, e a menor frequência de mutações pontuais, que acometem cerca de 30% das crianças e cerca de 70% dos adultos (7, 14).

Estima-se que 6 a 20% dos pacientes adultos com CDT desenvolvam metástases à distância, condição que pode impactar o prognóstico desses indivíduos a longo prazo, particularmente quando as lesões se tornam não responsivas ao iodo radioativo (15-17).

A condução do paciente com CDT metastático refratário ao iodo radioativo pode ser um desafio diagnóstico e terapêutico. Em contraste com a doença metastática em outros tipos de câncer não-tiróide, os pacientes com CDT metastático geralmente têm uma progressão lenta de sua doença e o manejo pode consistir em espera sob vigilância (12). No entanto, há uma proporção desses pacientes que, eventualmente, terão progressão mais rápida e agressiva de sua doença metastática, tornando-se candidatos a terapia alvo-molecular (11, 18), que atualmente é uma realidade acessível aos pacientes em alguns poucos centros de assistência pública em nosso país, porém mais acessível em um número maior de centros médicos na América do Norte e na Europa.

Apesar da maior incidência de câncer de tireoide ser no sexo feminino, os dados literários mostram que os homens com CDT são mais propensos a apresentar doenças mais avançadas e padrões histológicos mais agressivos (19).

Os processos biológicos que resultam no crescimento tumoral, desenvolvimento de metástases e de refratariedade à terapêutica podem decorrer de alterações nos padrões de expressão gênica nas células desses tecidos, seja do tumor primário ou do metastático. Esses processos podem derivar de mecanismos de adaptação desenvolvidos pelas células tumorais que lhes conferem vantagens adaptativas e maior

potencial de sobrevivência, como mutações com perda de função em genes de reparo do DNA, aquisição de capacidade de sintetizar proteínas que bloqueiam o ataque a elas direcionado pelo sistema imunológico e a ocorrência de interações gênicas atípicas, como fusões de genes que induzem a síntese de proteínas anômalas que redirecionam o comportamento do tumor primário e/ou metastático (20-23).

Em oncologia, sabe-se que, em alguns tipos de tumores, o tecido metastático desenvolve mutações independentes do tumor primário, as quais atribuem às metastases as vantagens anteriormente descritas e as diferenciam do tumor primário em seu comportamento biológico, como seu padrão de agressividade e refratariedade à terapêutica (24, 25).

Esse conhecimento tem fomentado o desenvolvimento e o uso de painéis moleculares para análise genética dos tecidos tumorais pareados (primário e metastático) e o emprego da medicina de precisão, com abordagem terapêutica direcionada às características genéticas do tumor (26).

Até o momento, pouco se sabe sobre o perfil molecular pareado do tumor primário e suas metastases no CDT, assim como o padrão de tendência a compartilhar ou não as mesmas anormalidades genéticas. Poucos estudos abordaram esta questão, empregando metodologias diferentes de análise molecular e chegando a conclusões também diversas (27-31). Assim, este é um campo ainda bastante aberto a estudos e ao seu melhor entendimento.

1.1 PATOGÊNESE DO CÂNCER DE TIREOIDE

A unidade funcional da tireoide é o folículo tireoidiano. O câncer de tireoide pode ter origem em células do epitélio folicular da tireoide ou em células neuroendócrinas dispersas entre os folículos (células C ou parafoliculares) (32), conforme ilustrado na Figura 1.

Dentre os cânceres originários das células foliculares, pode-se citar o carcinoma diferenciado de tireoide (CDT), que corresponde a cerca de 85-88% dos casos; o carcinoma insular ou pobremente diferenciado (CTPD), responsável por aproximadamente 6% dos casos; e o carcinoma anaplásico de tireoide (CAT),

representado por cerca de 1% dos casos. O carcinoma medular de tireoide (CMT), originado das células parafoliculares, corresponde aproximadamente a menos de 5% dos casos, podendo ser esporádico ou familiar (33-35).

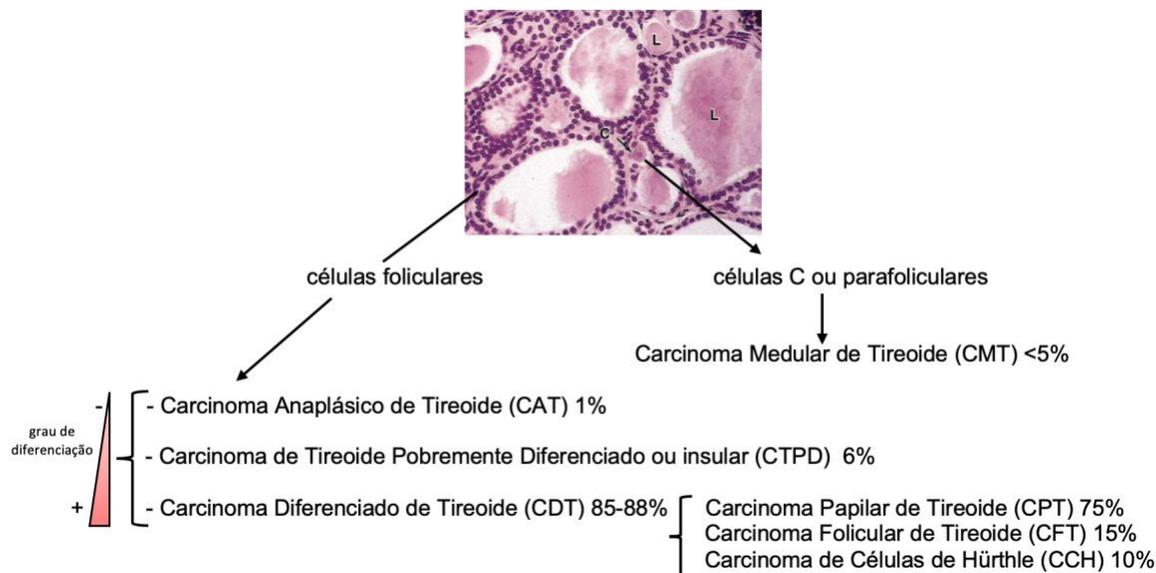


Figura 1. Tipos e subtipos histológicos do carcinoma de tireoide. C: células parafoliculares; L: lúmen do folículo. Retirada de *Mescher A (ed), Junqueira's basic histology: text & atlas* (32).

O CDT, por sua vez, pode ser subdividido em três tipos: carcinoma papilar de tireoide (CPT), carcinoma folicular de tireoide (CFT) e carcinoma de células de Hürthle (CCH). De acordo com a 4ª. edição da classificação de tumores da tireoide da Organização Mundial da Saúde (OMS), o CPT é um tumor epitelial maligno que demonstra diferenciação de células foliculares e uma série de aspectos nucleares distintos, destacando-se núcleos em vidro fosco com nucléolos evidentes, fendas nucleares e inclusões intranucleares (35, 36).

São reconhecidas diversas variantes do CPT, sendo as mais comuns a variante clássica e a variante folicular. Algumas variantes de CPT estão associadas a maior agressividade tumoral e prognóstico mais reservado, a saber, variante de células altas, variante esclerosante difusa, variante colunar, variante *hobnail* e a variante trabecular sólida. Há, ainda variantes mais raras, cujo comportamento biológico e significado clínico ainda são desconhecidos, por exemplo, variante oncocítica e variante de células claras.

O critério histológico para o diagnóstico das variantes do CPT considera uma proporção tumoral de 100% para a variante folicular, maior ou igual a 30% para as variantes células altas, células colunares e *hobnail*, e acima de 50% para as demais variantes (35, 36).

O CFT consiste em um tumor epitelial de células foliculares, sem os aspectos nucleares de CPT, cujo critério de malignidade baseia-se na presença de invasão linfocascular e/ou capsular. O CFT é subdividido em minimamente invasivo, angioinvasivo encapsulado e amplamente invasivo (35, 36).

O CCH, também chamado carcinoma oncocítico ou de células oxifílicas, até recentemente era considerado como uma variante do carcinoma folicular de tireoide. Na 4ª. edição da classificação de tumores da tireoide OMS, passou a ser considerado uma entidade separada, tendo em vista seu comportamento biológico e características clínicas peculiares (35, 36).

1.1.1 Conceitos em genética molecular do câncer de tireoide

As pesquisas genéticas em câncer evoluíram consideravelmente a partir do conhecimento de diversos fenômenos biológicos, sendo o grande desencadeador a descoberta da dupla hélice de DNA, por Watson & Crick em 1953 (37). Desde então, o desenvolvimento da biologia molecular ganhou impulso, especialmente após a publicação dos resultados do Projeto Genoma, que teve início em outubro de 1990 e foi concluído em abril de 2003. Somou-se a esses marcos, o contínuo refinamento das técnicas de biologia molecular.

Alguns conceitos são essenciais à compreensão da tumorigênese:

- (a) Mutações *driver*: são aquelas que criam um alelo vantajoso para a célula que o carrega, resultando em uma expansão clonal das células portadoras da mutação em questão. Em outras palavras, as mutações *driver* são aquelas que provêm alguma vantagem para o crescimento da lesão e direcionam o destino do tumor. (38).
- (b) Mutações *passenger* (ou *bystander mutations*): aquelas que não conferem nenhuma vantagem seletiva às células que as carregam, mas cuja presença em uma população de células está aumentada porque se encontram no mesmo

genoma que outros alelos mutantes, os quais sem dúvida conferem vantagem. Em suma, são as demais mutações não *driver* (38, 39).

Ambos os tipos de mutações podem envolver os genes (mutações gênicas) ou os cromossomos (mutações cromossômicas), cujas características estão descritas na Tabela 1.

- (c) Fusões gênicas: importantes eventos *driver* que ocorrem em diferentes tipos de câncer e resultam em proteínas com expressão, função e localização subcelular alteradas. No caso de receptores resultantes dessas fusões, comumente ocorre dimerização independente de ligante, o que os torna constitutivamente ativos (40). As proteínas resultantes desse processo representam importantes alvos no desenvolvimento de novas terapias (20). Neste espectro há as fusões oncogênicas, as quais são geradas por rearranjos cromossômicos, balanceados ou não, tais como translocações, inserções, inversões e deleções de segmentos cromossômicos. Adicionalmente, há as fusões de transcritos, as quais podem se formar em nível transcricional via trans- ou cis-*splicing* (41).
- (d) Variação do número de cópias (*copy number variations*, CNV): são regiões do genoma que variam no número de cópias íntegras. Compreendem tanto amplificações quanto deleções da sequência de DNA (42).

1.1.2 – Mecanismos de carcinogênese tireoidiana

Parte das diversas etapas do intrincado mecanismo molecular de tumorigênese tireoidiana vem sendo esclarecida nas últimas décadas, mas ainda há importantes hiatos ao conhecimento completo das suas bases moleculares (43).

Sabe-se que sua gênese decorre de uma complexa interação e acúmulo de modificações genéticas e potenciais eventos epigenéticos sobre genes que participam da regulação da proliferação, diferenciação, maturação, comunicação e sinalização das células tireoidianas, mas os detalhes dos mecanismos envolvidos nesse processo ainda estão sendo elucidados (44, 45).

TIPO DE MUTAÇÃO	DEFINIÇÃO	EFEITO NA PROTEÍNA		
GÊNICAS	Mutação de ponto silenciosa	Mudança de nucleotídeos na sequência de DNA, mas sem mudança na sequência de aminoácidos.	Função preservada.	
	Substituição	Mutação de ponto <i>missense</i>	Mudança de nucleotídeos na sequência de DNA, resultando em um aminoácido diferente na sequência proteica.	Potencial alteração na estrutura secundária e terciária (proteína anômala) e comprometimento da função.
		Mutação de ponto <i>nonsense</i>	Mudança na sequência de DNA que resulta em um códon de parada precoce.	Proteína anômala e comprometimento da função.
	Deleção	Remoção de uma ou mais bases do DNA. A remoção de um número de bases que não seja múltiplo de três altera completamente a mensagem do gene (<i>frameshift</i> – mudança da matriz de leitura).	Proteína anômala e comprometimento da função.	
	Inserção	Adição de uma ou mais bases de DNA. A adição de um número de bases que não seja múltiplo de três altera completamente a mensagem do gene (<i>frameshift</i> – mudança da matriz de leitura). Quando é inserida uma sequência igual a outra, ocorre uma duplicação.	Proteína anômala e comprometimento da função.	
CROMOSSÔMICAS	Estruturais	<u>Deleção</u> : parte do DNA não é duplicado ou é perdido na divisão celular. <u>Duplicação</u> : uma ou mais regiões do DNA são produzidas em duplicata. <u>Inversão</u> : parte do cromossomo se destaca e se reinsere em orientação incorreta. <u>Translocação</u> : parte do cromossomo é acrescentado a outro cromossomo não homólogo.	Alteração na estrutura cromossômica leva à síntese de proteínas anômalas e comprometimento da função.	
		Numéricas	<u>Euploidias</u> : alteração completa do genoma, incompatível com a vida. <u>Aneuploidias</u> : alteração no número de cromossomos. Costuma ocorrer com um único par de cromossomos.	Alteração no número de cromossomos leva à síntese de proteínas anômalas e comprometimento da função.

Tabela 1. Características das mutações gênicas e cromossômicas no ser humano. Adaptada das referências (37, 46, 47).

Desses eventos epigenéticos derivam vários distúrbios moleculares com potencial efeito na desorganização da fisiologia tireoidiana e predisposição ao desenvolvimento de tumores, como metilação aberrante do DNA de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, alterações na acetilação de histonas de células tireoidianas e desregulação dos RNAs não codificantes de cadeia longa (lncRNA – *long noncoding RNA*) e dos microRNAs (45, 48).

Por se tratar de um capítulo específico e longo, o detalhamento dos mecanismos conhecidos e propostos dos eventos epigenéticos na tumorigênese tireoidiana não será descrito aqui.

A seguir descreve-se, sumariamente, alguns dos aspectos genético-moleculares conhecidos da patogênese do CDT importantes para contextualizarmos a realização deste estudo.

A figura 2 ilustra os principais mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese do CDT que serão discutidos nesta seção de “Mecanismos da Carcinogênese Tireoidiana”.

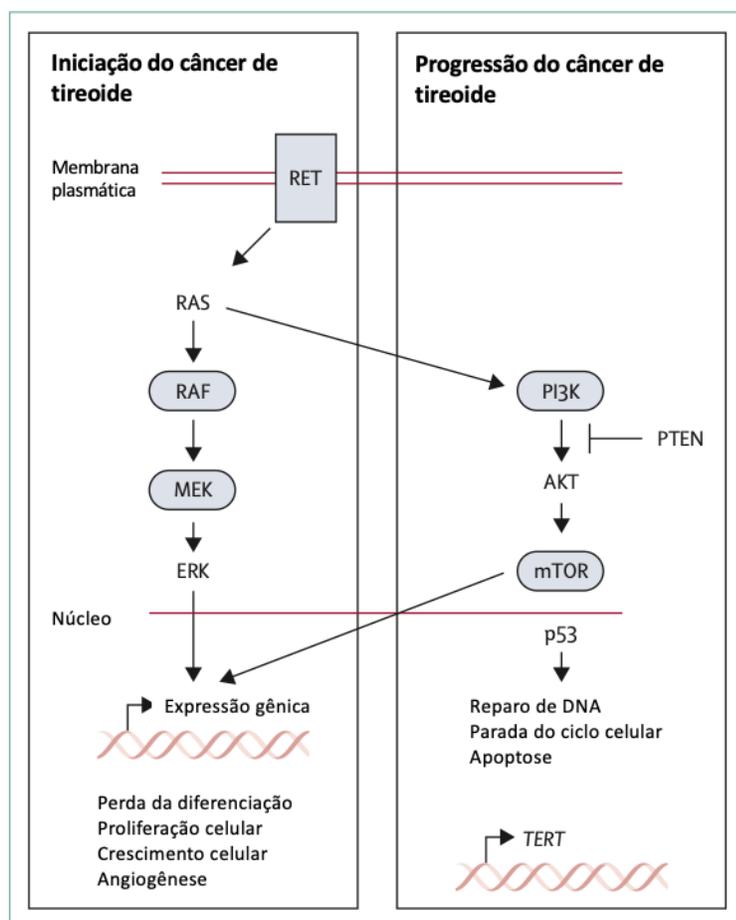


Figura 2. Principais vias de sinalização molecular envolvidas no CDT.

Adaptado de de Cabanillas ME et al. (11)

A iniciação e a progressão do câncer de tireoide envolvem a ativação das vias da MAP quinase (*Mitogen activating protein kinase*) e da PI3 quinase-mTOR (*phosphatidylinositol-3-kinase – mammalian target of rapamycin*). A alteração genética mais prevalente no CDT é uma mutação de ponto no gene *BRAF* (*B-RAF proto-oncogene serine/threonine kinase*), *T1799A*, resultando na proteína mutante BRAF V600E, que se torna constitutivamente ativa. Essa mutação está presente em cerca de 60% dos CPT e associada a desfechos clínicos mais reservados, com maior agressividade tumoral e maior risco de recorrência (18, 49-51).

Em segundo lugar na prevalência estão as mutações no gene *RAS* (*RAT Sarcoma virus*), em suas três isoformas, *NRAS* (*Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), *HRAS* (*Harvey RAT Sarcoma viral oncogene homolog*) e *KRAS* (*Kirsten RAT Sarcoma viral oncogene homolog*), as quais respondem por cerca de 15% dos casos de CPT. Destas, as mutações no *NRAS* são as mais prevalentes no câncer de tireoide (8,5%), acometendo os códons 12 e 61 (18, 49, 50). Normalmente, a proteína quinase RAS é ativada ao se ligar ao GTP (guanosina trifosfato) e rapidamente desativada quando este é hidrolisado pela GTPase. Quando mutada, a proteína RAS permanece ativada devido à perda da atividade GTPase, o que induz à ativação constitutiva da via da MAP quinase, embora de forma menos robusta do que ocorre nas mutações BRAF (49). Translocações gênicas resultando em rearranjos oncogênicos ocorrem em cerca de 12% dos casos, sendo o principal exemplo o rearranjo ou fusão *RET-PTC* (6,3%) (*RET proto-oncogene; RET/papillary thyroid carcinoma oncogene*), seguido de fusão dos genes *BRAF*, *THADA* (*THyroid ADenoma-Associated gene*), *NTRK* (*Neurothrophic Tyrosine Receptor Kinase*) e *ALK* (*Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase*) com diferentes genes parceiros. O mecanismo oncogênico das fusões proteicas baseia-se na dimerização ligante-independente de receptores, mantendo os receptores constitutivamente ativos (40, 50).

Eventos que ativam a via da MAP quinase são importantes na iniciação do câncer ao promover a proliferação e crescimento celular, angiogênese e perda da diferenciação celular. Por outro lado, eventos que acometem a via da PI3 quinase – mTOR causam lesão do DNA, parada do ciclo celular e apoptose, estando mais relacionados à progressão tumoral (18, 49), como ilustrado na Figura 2.

A ativação aberrante de ambas as vias leva à alteração de uma das principais funções da célula folicular, a captação de iodo, que é habitualmente transportado para o interior da célula através do co-transportador sódio-iodeto ou NIS (*Na-I Symporter*), localizado na membrana basal. À medida que o tumor progride, o acúmulo de alterações genéticas nas vias da MAP quinase e da PI3 quinase-mTOR causa perda progressiva da avidéz ao iodo radioativo (49).

Um outro mecanismo que pode estar envolvido na patogênese de alguns tumores refere-se a aspectos do gene *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*), o qual codifica a subunidade catalítica da telomerase, que é uma transcriptase responsável pela manutenção da integridade cromossômica através do alongamento do telômero e tem papel permissivo no controle da proliferação celular contínua (52). Os telômeros localizam-se na porção final dos cromossomos e servem para prevenir a fusão das extremidades distais dos mesmos. A cada ciclo de crescimento e divisão celular, os telômeros encurtam, até que ocorra apoptose celular. Portanto, seu encurtamento está associado à senescência celular (53). A regeneração dos telômeros ocorre por ação da enzima telomerase, que é habitualmente expressa em células germinativas e células-tronco, mas comumente está reprimida em células somáticas após o nascimento (53, 54). A reativação do *TERT* nas células cancerígenas evita o encurtamento do telômero, permitindo proliferação celular ilimitada (54). Mutações ativadoras na região promotora do *TERT* são descritas em mais de 50 tipos de tumores, incluindo os de tireóide (55, 56). Duas mutações recorrentes localizadas a 124 e 146 pares de base (pb) a montante do sítio de início de tradução ATG são referidas como *TERT* c.-124C>T (p.C228T) e *TERT* c.-146C>T (p.C250T). Ambas as mutações estimulam a atividade transcricional do promotor do *TERT* ao gerar novos sítios de ligação para fatores de transcrição da família ETS (*E-twenty-six*) (57). Outro mecanismo de reativação do *TERT* é a amplificação do gene *TERT* (58, 59). Uma nova mutação de ponto na posição -332 (C>T) foi descrita em tumores de tireoide, bem como novos sítios de duplicação nas posições -104 e -83 da região promotora do *TERT* (60).

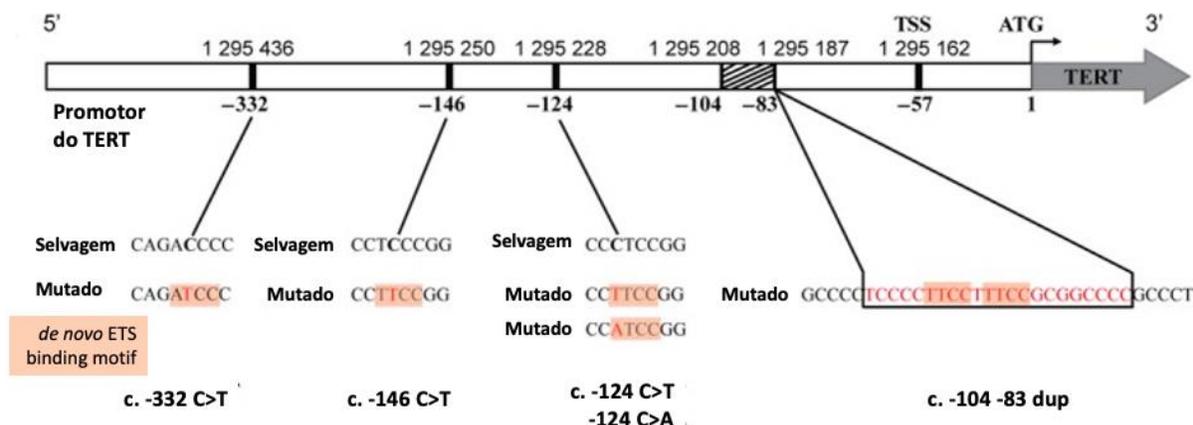


Figura 3. Representação esquemática das mutações da região promotora do *TERT* identificadas em tumores de tireoide. Adaptado de Panebianco et al, 2019 (60)

Dentro do contexto da patogênese molecular do CDT, um aspecto interessante a ressaltar são os resultados do Projeto Atlas Genômico do Câncer, com repercussão no melhor entendimento da tumorigênese do CDT. Neste Projeto foram analisados 496 CPT, permitindo a distinção do CPT em subtipos moleculares, com diferenças básicas em seus perfis genômicos, epigenômicos e proteômicos, e concordantes com suas diferenças histológicas, o CFT com mutações RAS e o CPT direcionados por BRAFV600E (50). Esses dados são ferramentas potenciais na busca da terapia alvo direcionada a casos especiais de pacientes com CDT avançado e refratários ao iodo radioativo e podem representar uma tendência no manejo diagnóstico e terapêutico desse grupo de pacientes.

1.1.3 – Refratariedade do CDT ao iodo radioativo

A maioria dos pacientes com CDT tem bom prognóstico após tratamento adequado (11). Este deve incluir a remoção cirúrgica do tumor, seja através de lobectomia ou de tireoidectomia total, e a terapia com iodo radioativo em casos selecionados (12, 13). Pacientes com metástases linfonodais (acima de cinco linfonodos patológicos) têm um risco de recorrência de 15-20%, estando este risco aumentado para grandes metástases linfonodais (maiores que 3 cm de diâmetro) ou na presença de extensão extranodal (12, 13, 61). Estima-se que 6-20% dos indivíduos com CDT desenvolvam metástases à distância, as quais poderão impactar a sobrevida desses

indivíduos, especialmente quando as lesões se tornam não responsivas ao iodo radioativo (15-17).

A refratariedade do CDT ao iodo radioativo é sugerida a partir de critérios definidos por alguns grupos, mas não são consensuais: (a) o tecido maligno/metastático não concentra iodo radioativo à pesquisa de corpo inteiro (PCI) diagnóstica; (b) o tecido maligno não concentra iodo radioativo à PCI pós-dose; (c) o tecido tumoral perde a habilidade de concentrar iodo radioativo após evidência prévia de doença ávida ao iodo radioativo; (d) o iodo radioativo concentra-se em algumas lesões mas não em outras; (e) a doença metastática progride apesar de significativa concentração de iodo radioativo; (f) uso de dose cumulativa de iodo radioativo acima de 600 mCi (12, 62).

Como a definição de refratariedade ao iodo radioativo no CDT ainda é motivo de controvérsias, um grupo de endocrinologistas e médicos nucleares da Europa e dos Estados Unidos se reuniu em 2018 para tentar estabelecer um consenso na definição dos princípios que devem nortear a terapia com iodo radioativo em câncer de tireoide (63). Essa questão é de extrema importância por uma série de motivos, entre eles reconhecer quando o paciente com doença metastática agressiva ainda poderá se beneficiar do tratamento com iodo radioativo e quando deve-se deixar de utilizar este recurso terapêutico.

De fato, o manejo do paciente com CDT refratário ao iodo é um desafio clínico. Ao contrário de outros tipos de câncer, indivíduos com CDT metastático podem permanecer estáveis ou progredir lentamente, podendo ser acompanhados clinicamente (12). No entanto, alguns indivíduos apresentarão progressão da doença e podem necessitar de terapia sistêmica (11, 18).

Em oncologia clínica, para avaliar a resposta ao tratamento ou a progressão da doença, utilizam-se critérios de avaliação da resposta em tumores sólidos, conhecidos por RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumours*), atualmente na versão 1.1 (64). De acordo com estes critérios, considera-se progressão um aumento de pelo menos 20% na soma dos diâmetros de lesões alvo, definidas como lesões mensuráveis nos órgãos acometidos por metástases. Além do aumento percentual, a soma das lesões alvo deve demonstrar também um aumento absoluto de pelo menos 5 mm. Outro critério de progressão é o aparecimento de uma ou mais novas lesões (64).

1.1.4 – Pareamento molecular entre tumor primário e tumor metastático

Recentemente, com o advento de painéis moleculares abrangentes e novas drogas alvo-molecular específicas para determinadas anormalidades moleculares, a medicina de precisão (*Precision Medicine*) vem ganhando grande impulso em âmbito mundial. Esta já é uma realidade para muitos tipos de câncer, nos quais a melhor opção terapêutica é escolhida baseada em aspectos genéticos e moleculares do tumor (26). Uma variedade de técnicas tem sido utilizada para comparar lesões primárias e metastáticas em diferentes tipos de malignidades sólidas (65-68).

Em câncer de células renais, Becerra *et al*, usando sequenciamento de nova geração (*next-generation sequencing* -NGS) observaram discordância em pares de tumores primários e metastáticos (67). Em outro estudo, Schrijver *et al* compararam câncer de mama primário com metástases cutâneas e/ou cerebrais e encontraram alterações genéticas somáticas distintas entre os sítios, as quais poderiam impactar a decisão terapêutica (68).

Entretanto, no CDT pouco se conhece sobre o perfil molecular pareado do tumor primário e de suas metástases, e se eles guardam as mesmas anormalidades genéticas.

Alguns poucos estudos abordaram esta questão, utilizando diferentes técnicas, e chegaram a diferentes conclusões (27-31). Melo *et al* avaliaram mutações do promotor do *TERT*, *BRAF* e *NRAS* por sequenciamento de Sanger em 27 pares de tumor primário e metástases à distância, encontrando baixa concordância entre os pares (28). Sohn *et al* usaram um painel de NGS com 50 genes e observaram grande concordância nas anormalidades genéticas de 17 pares de espécimes tumorais primários e metastáticos (29). Masoodi *et al* utilizaram a técnica de sequenciamento de exoma completo (*whole-exome sequencing* – WES) para comparar 14 trios de tecido tireoidiano normal, tumor primário e metástases à distância. Os autores encontraram grande heterogeneidade entre os espécimes primário e metastático, atribuída principalmente às mutações *passenger*, que não atribuíam vantagens de sobrevivência ao tecido metastático (30). Song *et al* avaliaram 15 pares de tumor primário e metástases à distância com um painel de NGS de 50 genes e observaram alto grau de concordância entre os espécimes (31).

Desta forma, essa área de pesquisa é um campo aberto para investigações e interpretações do impacto clínico dos achados.

1.1.5 Oncologia e Imunologia

Em seguida à perda dos mecanismos de controle e regulação da proliferação celular de um determinado tecido e desenvolvimento de células tumorais, o organismo desenvolve reações imunológicas dirigidas contra as células cancerígenas, com o objetivo de eliminá-las. Esse processo reentrante é conhecido como ciclo câncer-imunidade (69) e é ilustrado na Figura 4.

O ciclo cancer-imunologia é dinâmico e composto por componentes estimulatórios e inibitórios da resposta imunológica contra o tumor, em suas várias etapas, como ilustrado na Figura 5 (69).

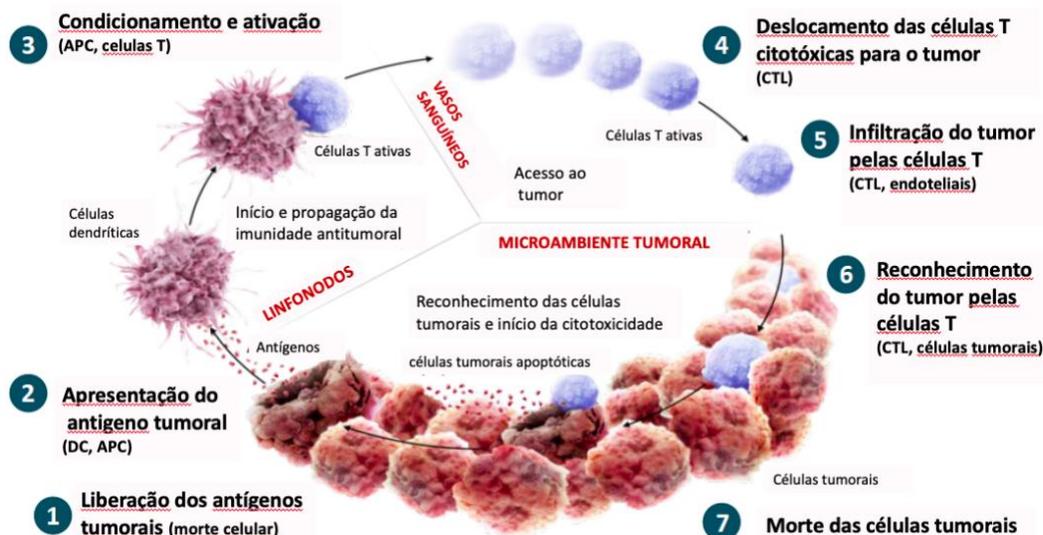


Figura 4. Ciclo câncer-imunidade

DC: células dendríticas; APC: células apresentadoras de antígeno; CTL: linfócitos T citotóxicos. Adaptado de Chen DS, Mellman I. (69)

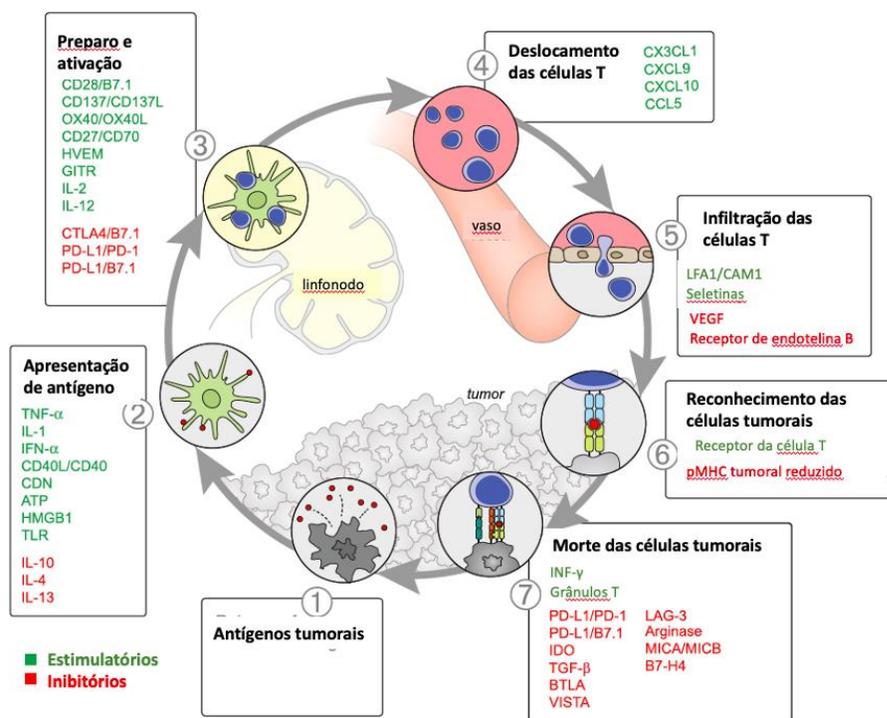


Figura 5. Fatores estimulatórios e inibitórios do ciclo câncer-imunidade. Adaptado de Chen DS, Mellman I.(69)

Esses conceitos envolvendo câncer e imunologia são as bases para se entender a imunoterapia oncológica, uma modalidade terapêutica revolucionária para diversos tipos de câncer, considerada o quarto pilar de tratamento, ao lado da cirurgia, da quimioterapia e da radioterapia (70). Dentre as modalidades existentes de imunoterapia, o uso de inibidores do *checkpoint* imunológico ganhou maior interesse geral, com taxas de resposta em diferentes tipos de cânceres que variam de 20 a 30% (70, 71).

O conceito básico da imunoterapia reside nessa interface da oncologia com a imunologia.

Na fisiologia, os *checkpoints* imunológicos correspondem a mecanismos de controle do sistema imunológico que mantêm a auto-tolerância das células do organismo e atuam impedindo uma resposta autoimune contra suas células próprias. Os componentes desse mecanismo incluem ligantes expressos na membrana de células apresentadoras de antígeno, como as células dendríticas, e receptores expressos por linfócitos T. Dentre as mais importantes moléculas que participam desse processo

inibitório, cruciais à manutenção da auto-tolerância imunológica, estão o CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), PD-1 (*programmed cell death 1*), PD-L1 (*programmed cell death 1 ligand*) e PD-L2 (*programmed cell death 2 ligand*) (72).

O CTLA-4 é um receptor da família dos receptores relacionados às imunoglobulinas, expresso nas células T regulatórias e células T ativadas. Ao se ligar às moléculas CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) presentes nas células apresentadoras de antígeno, esse receptor transmite um sinal inibitório às células T, bloqueando sua resposta citotóxica. É considerado a molécula líder do *checkpoint* imunológico por frear as células T autorreativas no estágio inicial de sua ativação, geralmente nos linfonodos (73).

O PD-1 é uma glicoproteína de superfície celular geralmente expressa pelos linfócitos T e pelas células da linhagem macrófagica. A ligação da PD-1 a um de seus ligantes, PD-L1 ou PD-L2, inibe a resposta imunológica citotóxica das células T, com consequente tolerância imunológica das células que expressam PD-L1 ou PD-L2 (74).

Na patogênese oncológica, o sistema imunológico do indivíduo desencadeia processos de formação e ativação de células citotóxicas do tipo *natural killer* (células NK) e de anticorpos contra antígenos tumorais para controlar o processo neoplásico (75). As células tumorais expressam neoantígenos que são capturados por células apresentadoras de antígenos, particularmente macrófagos e células dendríticas. Estas expressam moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC) classes I e II em sua superfície e apresentam as partículas tumorais digeridas aos linfócitos T, levando-os a migrar para o leito tumoral e iniciar uma resposta imune específica contra o tecido neoplásico (69, 75).

Entretanto, um dos traços característicos das células tumorais é sua habilidade em escapar do reconhecimento e destruição pelo sistema imune, seja por *downregulation* da expressão de antígenos tumorais ou por *upregulation* de moléculas transmembrana inibitórias do sistema imune, além da utilização de outros mecanismos (76).

Entre esses mecanismos de escape imunológico, as células tumorais podem desenvolver *checkpoints* imunológicos, aumentar a tolerância ao tumor e evitar sua erradicação pelo sistema imunológico (77, 78), como ilustrado na Figura 6.

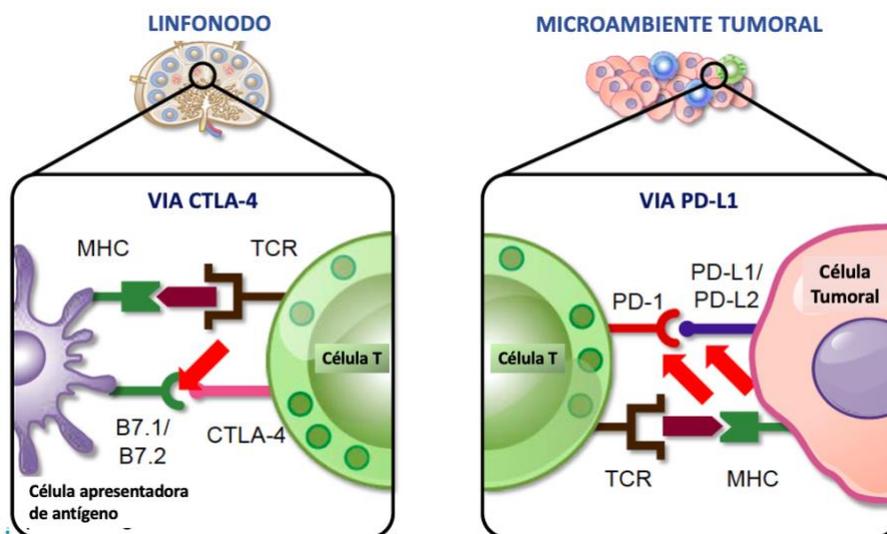


Figura 6. Checkpoints imunológicos. Mecanismos mediados pela via CTLA-4, envolvendo as células T e os ligantes B7-1 e B7-2 das células apresentadoras de antígeno; e pela via PD-L1, envolvendo as células tumorais e as células T.

MHC – complexo maior de histocompatibilidade; TCR: receptor de células T.

(Adaptado de Pardoll, D. (78)

O PD-L1 é descrito como constitutivamente expresso em células tumorais, decorrente da sinalização oncogênica ou da expressão dinâmica do interferon gama (IFN γ) em microambientes tumorais. Estudos sugerem que pacientes cujos tumores expressam fortemente PD-L1 à imunohistoquímica (IHQ) teriam melhores desfechos clínicos com a imunoterapia anti-tumoral, mas a observação de haver também respostas robustas em pacientes com baixa expressão de PD-L1 demonstra que outros biomarcadores devam participar do processo de resposta terapêutica e merecem ser analisados (79, 80). A análise da expressão de PD-L1 nos tecidos é feita através de IHQ, sendo importante diferenciar a coloração de membrana citoplásmica. Apenas o PD-L1 presente na membrana das células tumorais é teoricamente ativo em inibir células imunes PD-1 positivas, mas ainda há controvérsias na literatura (81). A experiência de diversos estudos clínicos randomizados considera positiva uma expressão de PD-L1 > 1%, enquanto um limiar > 50% é considerado fortemente positivo (80, 82).

Poucos estudos avaliaram a expressão de PD-L1 em câncer de tireoide. Ahn *et al.* analisaram 407 cânceres primários de tireoide e encontraram uma expressão de 6,1% em CPT, 7,6% em CFT e 22,2% em CAT. No total, PD-L1 tumoral foi positivo em 27 dos

407 casos (6,6%) utilizando um limiar de 1%. Não foi observada associação significativa entre expressão de PD-L1 e variáveis clínicopatológicas, progressão da doença, presença de mutação no gene *BRAF* ou no promotor do *TERT* (83).

Além da expressão de PD-L1 e de PD-1, o teste de instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability* – MSI) e a carga de mutação tumoral (*tumor mutation burden* - TMB) são emergentes biomarcadores de resposta à imunoterapia anti-tumoral (80, 84). Microssatélites são porções da sequência de DNA onde um único nucleotídeo ou grupos de dois ou mais nucleotídeos se repetem no genoma. Há cerca de 500 mil microssatélites no genoma humano, estando comumente localizados em íntrons (85). A instabilidade de microssatélites é um fenótipo molecular do tumor resultante de hipermutabilidade genômica. O ganho ou perda de nucleotídeos se manifesta como novos alelos de tamanhos variados. Em um estudo que classificou e caracterizou a MSI em 18 tipos de cânceres, o câncer de tireóide apresentou o menor número de sítios instáveis (86). Por outro lado, a carga de mutação tumoral se refere ao número total de mutações presentes em um espécime tumoral. Acredita-se que tumores com alta TMB apresentem mais neoantígenos e sejam potencialmente maiores alvos de ativação das células imunes (87).

A partir do conceito de imuno-oncologia, anticorpos inibidores do CTLA-4 (ipilimumab), do PD-1 (pembrolizumab e nivolumab) e do PD-L1 (atezolizumab, avelumab e durvalumab) foram desenvolvidos e vêm sendo utilizados na terapia contra diversos tipos de cânceres, com impressionantes taxas de resposta (81, 88, 89). Em relação ao bloqueio CTLA-4, o bloqueio PD-1/PD-L1 parece ter maior eficácia. Pode-se, ainda, utilizar uma combinação de imunoterapias para melhorar a efetividade do tratamento (71). A expressão de PD-L1 varia grandemente entre os tecidos tumorais, portanto permanece uma questão crucial determinar quais pacientes podem se beneficiar da imunoterapia.

1.1.6 Ferramentas laboratoriais para a análise molecular dos tumores e de avaliação da predisposição das mutações à tumorigênese

Para reconhecer e caracterizar os diversos aspectos do panorama genético, da expressão de proteínas biomarcadores das células tumorais, há uma série de exames

laboratoriais disponíveis comercialmente e em ambiente de pesquisa, sumariamente apresentados a seguir.

-Sequenciamento de Nova Geração (NGS – *next-generation sequencing*)

O NGS é uma técnica de sequenciamento automatizado, paralelo e de alto rendimento que descreve a sequência de milhões de pequenos fragmentos de bases dos ácidos nucleicos, permitindo a análise do DNA, RNA, sítios de *splice*, quantificação do mRNA, de padrões de metilação e de interações proteína-DNA. Posteriormente, análises de bioinformática unem esses fragmentos.

Explicando resumidamente o sequenciamento de uma molécula de DNA, esta é inicialmente fragmentada, as duas fitas são separadas e através de uma reação química controlada adiciona-se as bases complementares de DNA à fita simples para criar uma fita dupla. Um sinal químico ou fluorescente é emitido à medida que cada base é adicionada e este é captado pelo sensor do equipamento. O resultado é um arquivo contendo a posição exata de cada nucleotídeo da fita do DNA em análise e a partir dele é possível avaliar se há mudanças na sequência das bases na fita em estudo (90).

Como exemplificado no Anexo D, o laudo do NGS positivo mostra o gene ou o painel de genes estudados, a posição na molécula em que se encontra a mutação, as bases trocadas, a consequência da mutação na síntese da cadeia proteica.

É importante enfatizar que deve haver cautela na interpretação dos resultados do exame de NGS, devido à possibilidade de resultados falsos positivos e falsos negativos decorrentes da quantidade de variantes comuns do genoma que podem representar simplesmente mutações sem sentido ou polimorfismos, sem implicação clínica.

-Expressão do PD-L1:

A determinação da expressão proteica de PD-L1 é realizada por técnica de imunohistoquímica (Figura 7).

Nesse exame, os tecidos do tumor são fixados em formalina, com parafina, e cortados. Em seguida são submetidos à coloração imunohistoquímica, que é realizada com o uso de anticorpo monoclonal anti-PD-L1 humano. A visualização do sinal é obtida com um kit específico para detecção de imunohistoquímica e analisada por microscopia.

A coloração PD-L1 positiva é definida a partir da detecção de coloração linear circunferencial, completa e/ou parcial, na membrana plasmática, em qualquer intensidade que seja diferente do fundo do tecido e da coloração citoplasmática difusa (91).

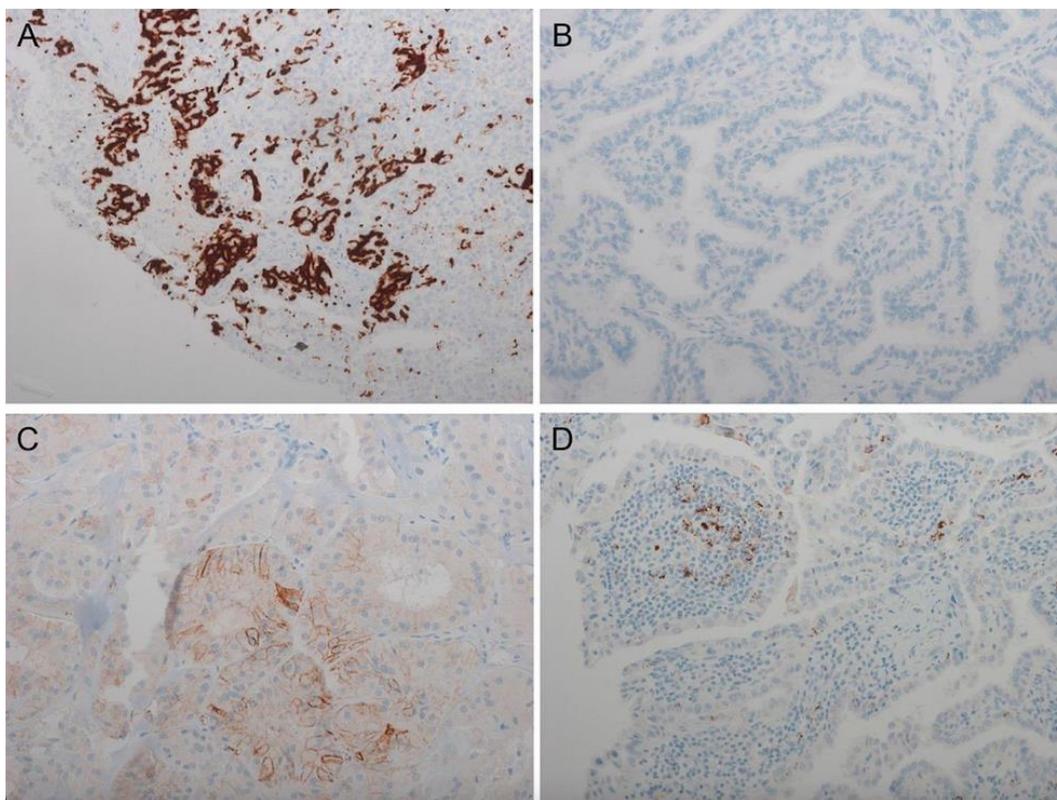


Figura 7. Microscopia com imunohistoquímica para PD-L1.

(A) Epitélio escamoso tonsilar utilizado como controle positivo para a coloração PD-L1 (em marrom). (B-D) Coloração PD-L1 em cânceres papilares da tireoide. (B) Coloração PD-L1-negativa. (C) Coloração PD-L1 positiva em células tumorais com intensidade 2+ e 1+ e (D) Coloração PD-L1 positiva em linfócitos intratumorais.

Fonte: Ahn S et al. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(2):97-106) (83).

-Biomarcadores (assinatura genômica)

A assinatura genômica de um tumor pode ser estudada a partir da análise de sua carga da mutação tumoral (*tumor mutation burden* -TMB) e do estado de instabilidade de microssatélites (*microsatellite instability* -MSI), a qual mostra o seu potencial de predisposição à tumorigênese. Essas análises têm sido consideradas promissoras

biomarcadores para identificação da assinatura genômica de tumores e de sua imunogenicidade, com aplicação em imunoterapia oncológica.

A TMB corresponde a uma técnica de análise de previsão do número de mutações transportadas pelas células tumorais, presentes nas regiões codificadoras do exoma tumoral. Essas mutações levam a célula tumoral a sintetizar proteínas alteradas, que podem ser reconhecidas e ativar o sistema imunológico contra o tumor, sendo, portanto, uma medida da imunogenicidade de um tumor. A quantificação do TMB pode ser feita a partir do NGS, utilizando-se um painel de genes. Ao medir a TMB, a célula neoplásica passa a ter reconhecida sua impressão digital única de suas proteínas selvagens (normais) e mutantes. Para seu cálculo leva-se em conta apenas as mutações somáticas e ele é feito a partir da relação entre o número total de mutações encontradas e o tamanho da região decodificadora analisada. O resultado é apresentado sob a forma de mutações por megabase (mutações/Mb) (92). Tumores com alta TMB produzem vários antígenos, os quais estimulam as células T e organizam uma resposta anti-tumoral. Esse aspecto confere ao TMB importante implicação no desenvolvimento de terapias utilizando *checkpoints* imunológicos.

A MSI é uma forma de medida da instabilidade genômica e que resulta no acúmulo de inserções ou deleções em microssatélites durante a replicação do DNA, fazendo com que a molécula se encurte ou se alongue em relação à molécula original. Os microssatélites são regiões de 10 a 60 pares de base do DNA com repetições de um a seis nucleotídeos. A instabilidade (presença de diferentes comprimentos nas sequências de microssatélites) decorre da disfunção das proteínas do sistema de reparo do DNA (*DNA mismatch repair* -MMR), o que confere ao DNA alta predisposição a mutações. A MSI pode ser avaliada a partir de várias metodologias, como NGS, PCR multiplex fluorescente e imunohistoquímica (93). No NGS a MSI pode ser detectada a partir da análise de mudanças nas seqüências de microsateélites ou da ausência de proteínas MMR.

-PCR digital (dPCR – *digital polymerase chain reaction*)

A dPCR é um sistema de análise mais recente que a RT-PCR (PCR em tempo real), com maior robustez de análise, sensibilidade e capacidade de detecção de eventos

genéticos mais raros, como mutação em um único nucleotídeo da molécula de DNA ou de RNA, além de fusões gênicas e variantes do número de cópias. A quantificação do DNA ou RNA é absoluta, sem necessidade de padrões de calibração, o que faz a metodologia mais rápida, precisa e reprodutível.

Nesse sistema digital, a amostra é inicialmente preparada de modo semelhante à RT-PCR, com extração do DNA ou RNA pelas técnicas habituais. Entretanto, em seguida a amostra é separada em milhares de partições (gotas), que podem ser obtidas por emulsão óleo-água (dPCR baseada em emulsão) ou por chips com microcanais (dPCR baseada em microfluídica). Cada partição contém idealmente nenhuma, ou no máximo algumas moléculas-molde. Em cada partição acontece uma reação individual de PCR, com amplificação da molécula-alvo (DNA ou RNA). Na etapa seguinte são adicionadas sondas fluorescentes para identificar a sequência do DNA/RNA-alvo amplificado. As partições que contém a sequência alvo detectadas por fluorescência são classificadas como positivas e as sem fluorescência, negativas. A quantificação é feita a partir da relação entre amostras positivas e negativas para a sequência alvo (94, 95).

Concluindo, esse referencial teórico aqui apresentado delinea os avanços e limites do conhecimento científico sobre determinados aspectos moleculares da tumorigênese tireoidiana, dos eventos envolvidos em sua metastatização e do impacto do padrão molecular potencialmente envolvido na resposta às opções terapêuticas.

Assim, entendemos que os estudos em câncer de tireoide, sejam clínicos, em ciência básica ou translacionais, trazem um grande potencial de subsidiar ferramentas para uma assistência médica mais qualificada aos pacientes, à formulação de políticas de saúde pública nessa área e ao desenvolvimento de tecnologias diagnósticas e terapêuticas voltadas a esse grupo de pacientes, em especial àqueles que apresentam CDT avançados, metastáticos e não responsivos apenas à excisão cirúrgica e ao iodo radioativo.

Nesse contexto nós nos sentimos impulsionados a contribuir com dados nessa área, mesmo que preliminares, que possam ajudar a responder uma das questões nesse campo de estudo: *“há diferença no perfil molecular entre os tecidos do tumor primário e metastático em pacientes com CDT?”*

2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

O estudo sobre pareamento molecular dos tumores primários e metastáticos do CDT tem o potencial de fornecer subsídios para melhor conhecimento da patogênese envolvida no processo de metastatização tumoral, na escolha do espécime mais adequado para sequenciamento molecular e, quando acessível e indicado, influenciar na decisão da terapia alvo-específica mais apropriada a cada caso.

Tendo em vista o crescente desenvolvimento de drogas alvo-específicas na oncologia clínica e o conseqüente uso de sequenciamento genético para caracterizar o perfil tumoral, entendemos ser importante contribuir com dados clínicos e genéticos sobre a estratégia de estudar o pareamento molecular das lesões primárias e metastáticas, em especial para pacientes com CDT e metástases refratárias ao iodo radioativo.

No Brasil, mesmo a medicina de precisão ainda não sendo uma realidade em grande parte dos serviços públicos ou acessível à parte da população, os dados resultantes deste estudo poderão motivar a criação de registros locais, regionais e até um registro nacional de indivíduos com CDT avançado, incorporação de novas tecnologias diagnósticas (como o desenvolvimento de painéis moleculares) e terapêuticas nos centros de assistência e pesquisa e estimular o seguimento otimizado e mais qualificado a esse grupo de pacientes.

Para responder à pergunta que norteou este estudo (*“há diferença no perfil molecular entre os tecidos do tumor primário e metastático em pacientes com CDT?”*), a pesquisadora Cristiane Jeyce Gomes Lima, aluna de Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, consolidou seu *Research Fellowship* no *MedStar Health Research Institute*, o órgão de pesquisa do sistema médico acadêmico multihospitalar MedStar, que é o responsável pela condução de estudos pré-clínicos, estudos clínicos intramurais, estudos clínicos fase I e II, estudos clínicos multicêntricos fase III, bem como pela avaliação da aplicabilidade clínica de novos avanços terapêuticos em diversas áreas da Medicina.

Dentre os hospitais da rede MedStar, o MedStar Washington Hospital Center - MWHC (Washington, DC – Estados Unidos – <https://www.medstarwashington.org>) foi a

instituição na qual a pesquisa foi realizada com pacientes que lá estavam em seguimento. Ao longo deste período, a pesquisadora esteve sob a orientação do Dr. Kenneth Burman Chefe do Departamento de Endocrinologia do MWHC e Diretor do Programa de Treinamento Integrado da *MedStar Georgetown University*.

O MWHC é um hospital privado, sem fins lucrativos, o qual além de prover assistência médica em níveis primário, secundário e terciário, é reconhecido pela liderança na atuação no ensino e pesquisa em Ciências Médicas e no seguimento de pacientes com os casos mais complexos da região de Washington, nas várias áreas da Medicina. É também um dos hospitais de ensino da *Georgetown University School of Medicine* (<https://som.georgetown.edu/#>), fundada em 1851. O outro hospital de ensino associado é o *MedStar Georgetown University Hospital*, (<https://www.medstargeorgetown.org/>), com o qual partilha pesquisas científicas e assistência médica.

O Departamento de Endocrinologia do MWHC é respeitado nacional e internacionalmente pela qualidade da assistência médica e das pesquisas científicas desenvolvidas. Durante o período no MWHC, a pesquisadora construiu contatos com outras instituições, cujos profissionais e instalações (laboratórios de pesquisa) também tiveram participação neste estudo, como o National Institute of Health (NIH, Bethesda, MD - <https://www.nih.gov/>) e o *Uniformed Services University of the Health Sciences* (USUHS, Bethesda, MD, <https://www.usuhs.edu/bio>), uma instituição militar de saúde do Governo Federal dos Estados Unidos.

Desta forma, a realização deste estudo foi o resultado de importantes parcerias acadêmicas, assistenciais e institucionais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar e parear o perfil molecular dos tumores primário e metastático de carcinoma diferenciado de tireoide (CDT) refratário ao iodo radioativo de indivíduos em seguimento no *MedStar Washington Hospital Center* e no *MedStar Georgetown University Hospital* (Washington, DC – Estados Unidos).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Analisar, correlacionar e descrever os dados clínicos, histológicos e moleculares dos tecidos tumorais primário e metastático de indivíduos com CDT refratário ao iodo radioativo.
- 3.2.2 Reconhecer as mutações *driver* nos tecidos tumorais primário e metastático estudados.
- 3.2.3 Estudar o perfil de imunogenicidade dos tumores através da expressão da proteína PD-L1, da carga de mutação tumoral e do teste de instabilidade de microssatélites nas amostras das lesões primárias e metastáticas dos pacientes.
- 3.2.4 Explorar, com o auxílio de bioinformática, potenciais associações funcionais entre as proteínas codificadas pelos genes mutados detectados nas lesões tumorais primárias e metastáticas do grupo estudado com as proteínas fisiologicamente mais expressas na tireoide.

4 MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de construção de uma coorte com 12 indivíduos com diagnóstico pregresso de CDT e metástases refratárias ao iodo radioativo, selecionados a partir de uma amostragem de conveniência e em seguimento no *MedStar Washington Hospital Center* ou no *MedStar Georgetown University Hospital* (Washington, DC – Estados Unidos).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CEP) – *Institutional Review Board* (IRB) do *MedStar Health Research Institute* (MHRI) (Anexos A e B).

Todos os participantes que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a Autorização para Pesquisa, os quais se encontram nos Apêndices A e B, respectivamente.

Este estudo apresentou duas fases de execução.

A primeira fase foi caracterizada por estudo retrospectivo baseado na revisão de prontuários médicos eletrônicos de indivíduos em seguimento no *MedStar Washington Hospital Center* ou no *MedStar Georgetown University Hospital* para identificar indivíduos que atendessem aos critérios de inclusão. A pesquisa, coleta e armazenamento de informações foi feita de acordo com regulações do *Health Insurance Portability and Accountability Act* (HIPAA).

A segunda fase do estudo apresentou caráter transversal, na qual os indivíduos identificados com CDT refratário ao iodo radioativo foram convidados e concordaram em doar espécimes do tumor primário e de um sítio metastático para estudo molecular. Refratariedade ao iodo radioativo foi definida como ausência de captação do radiofármaco em sítios metastáticos conhecidos ou na constatação da progressão de lesões previamente ávidas ao mesmo, de acordo com critérios RECIST 1.1 (64). Esta fase contemplou também os estudos genéticos e as análises de associação entre as variáveis clínicas e moleculares dos indivíduos e das lesões tumorais.

4.2 SUJEITOS DA PESQUISA

Os critérios de inclusão definidos para o estudo foram (a) indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos e diagnóstico confirmado de CDT após tireoidectomia total ou quase total; (b) evidência de metástase loco-regional ou à distância através de exames de imagem (tomografia computadorizada [TC], ressonância magnética [RM], tomografia por emissão de pósitrons [PET-CT]); (c) disponibilidade dos espécimes do tumor primário e de um ou mais sítios metastáticos para estudo molecular; (d) ausência de captação à pesquisa de corpo inteiro (PCI) pós-dose; (e) indivíduos em acompanhamento ativo e regular no momento do estudo, com pelo menos uma consulta de seguimento após iodo radioativo terapia, com dosagem de tireoglobulina sérica (Tg), PCI ou exames de imagem (TC, RM, PET-CT).

Foram excluídas as mulheres grávidas ou lactantes por envolverem outro tipo de submissão ao CEP e pela baixa probabilidade de encontrarmos indivíduos nestas situações que poderiam ser incluídas.

Foram selecionados os 12 primeiros pacientes sequencialmente acessados pela base de dados do hospital e que contemplassem os critérios de inclusão e aceitassem participar. Esse número seguiu um critério de restrição orçamentária, uma vez que análise genética de cada espécime custou aproximadamente U\$3,200.00, como mostrado no Apêndice C, e foi custeada pelo *Catherine Heron and Al Schneider Fellowship in Thyroid Cancer*.

Inicialmente, foram identificados 51 indivíduos com CDT que apresentaram refratariedade ao tratamento com iodo radioativo durante seguimento no *MedStar Washington Hospital Center* ou no *MedStar Georgetown University Hospital*. Dentre estes indivíduos, 14 haviam falecido, o que impossibilitava sua inclusão no estudo.

Entre os 37 demais, 23 não cumpriam os critérios de inclusão (espécime cirúrgico havia sido descartado após dez anos da tireoidectomia, que é um procedimento de rotina naqueles serviços) e uma paciente não aceitou participar. Um paciente consentiu com o estudo, mas não tivemos acesso às suas amostras tumorais por questões administrativas. Desta forma, atingiu-se o número de 12 participantes.

4.3 METODOLOGIA DAS ANÁLISES LABORATORIAIS

Os testes genético-moleculares foram realizados por colaboradores em dois laboratórios, conforme detalhado a seguir.

O Laboratório *Caris® Life Sciences* (Phoenix, Arizona - Estados Unidos, <https://www.carislifesciences.com/>) realizou sequenciamento de nova geração, expressão da proteína PD-L1 e de outros biomarcadores. O *Caris® Life Sciences* é uma instituição com certificado CLIA (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*), semelhante à certificação ISO 9001, usada no Brasil. As amostras tumorais de cada paciente (lâminas não coradas ou blocos de parafina) foram enviadas por correio em um kit de transporte fornecido pelo laboratório.

A pesquisa de mutações do promotor do *TERT* foi realizada por PCR digital em gotas, em colaboração com pesquisadores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da *Uniformed Services University of the Health Sciences* (USUHS, Bethesda, Maryland - Estados Unidos, <https://www.usuhs.edu/bio>), uma instituição militar de saúde do Governo Federal dos Estados Unidos, de acesso restrito. Essa etapa não estava prevista inicialmente, mas se tornou possível porque alguns indivíduos que participaram deste estudo também estavam participando de outro estudo na USUHS, já havendo pelo menos uma amostra tumoral de alguns indivíduos naquele serviço. Além disso, a possibilidade de uso de amostra tumoral para outros estudos em câncer de tireoide estava contemplada na Autorização para Pesquisa (Apêndice B).

4.3.1 – Exames moleculares

a) Sequenciamento de nova geração - (NGS)

Utilizou-se um painel comercial de 592 genes da *Caris® Life Sciences* para realização de NGS dos tumores primário e metastático de cada paciente. Este painel genético incluiu os principais genes *driver*, como *BRAF*, *PTEN*, *RAS*, *RET* e *TERT* (Anexo C).

O DNA foi isolado a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina, utilizando-se a plataforma NextSeq (*Illumina Inc.*, San Diego, CA, USA). Todas as variantes foram detectadas com mais de 99% de confiança baseada na frequência

alélica e na cobertura de amplicons, com cobertura média de *deep-sequencing* > 500 e com sensibilidade analítica de 5%. As variantes detectadas foram mapeadas para o genoma referência (hg19) e ferramentas bem estabelecidas de bioinformática foram incorporadas para realizar a chamada de variantes, as quais foram categorizadas como “patogênicas”, “presumidamente patogênicas”, “variantes de significado indeterminado”, “presumidamente benignas” ou “benignas”, de acordo com os padrões do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (96).

O procedimento para o sequenciamento de RNA foi realizado a partir de RNA isolado das amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina, utilizando-se a plataforma NextSeq (*Illumina Inc.*, San Diego, CA, USA), com cobertura transcriptômica completa.

b) Expressão da proteína PD-L1

A determinação de expressão proteica de PD-L1 nas amostras pareadas de tumor foi feita por imunohistoquímica (IHQ) em lâminas fixadas e coradas. Os procedimentos seguiram os padrões e requerimentos do *College of American Pathologists* (97).

Os tecidos tumorais foram cortados em lâminas com espessura de 4 µm e secos a 60°C por 30 minutos. A coloração imuno-histoquímica anti-PD-L1 foi realizada com anticorpo monoclonal anti-humano PD-L1 de coelho, 1:25, clone SP142, *Spring Bioscience*, Pleasanton, CA, EUA) em um imunossustentador automático BenchMark (Ventana, Tucson, AZ, USA). A recuperação do antígeno foi realizada durante 92 min com tampão CC1, e o anticorpo foi incubado durante 120 min a 37°C. A visualização do sinal foi obtida com o kit de detecção de imunohistoquímica.

Utilizou-se um escore de intensidade (0: ausência de coloração; 1+: coloração fraca; 2+: coloração moderada; 3+: coloração forte) e um escore de proporção para determinar a porcentagem de células com coloração positiva (0-100%). As condições para um resultado positivo incluíram intensidade ≥ 2+ e ≥ 5% de células coradas. Os resultados de imunohistoquímica foram avaliados por um patologista certificado.

c) Biomarcadores (assinatura genômica)

O painel utilizado também fornece informações sobre alguns biomarcadores e a imunogenicidade do tumor, como o teste de instabilidade de microssatélites (MSI –

microsatelites instability test) e carga de mutação tumoral (TMB – *tumoral mutations burden*).

A TMB foi calculada com base no número de mutações somáticas não-sinônimas identificadas por NGS, excluído-se polimorfismos conhecidos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs). A TMB é descrita como mutações por megabase (Mb). TMB baixa foi definida como menos de sete mutações/Mb, TMB intermediária quando houve entre sete e 16 mutações/Mb e TMB alta quando houve mais de 17 mutações/Mb, conforme a plataforma utilizada pelo laboratório *Caris® Life Sciences* (84). Esses limiares podem variar de acordo com a plataforma utilizada.

A MSI foi determinada utilizando-se os resultados de NGS e o número total de *loci* de microssatélites mutados por megabase. Foram classificadas como estáveis as linhagens que apresentavam menos de 46 *loci* de microssatélites mutados/Mb e instáveis aquelas com 46 ou mais *loci* de microssatélites mutados/Mb. Este método foi validado previamente e não requer pareamento com amostras normais (84).

d) Reação de polimerase em cadeia digital - dPCR

As anormalidades no promotor do *TERT* foram testadas em amostras selecionadas através de dPCR com o seguinte protocolo:

d.1- Extração de DNA

Amostras tumorais fixadas em formalina e embebidas em parafina foram desparafinizadas e reidratadas com etanol a 100%. As amostras foram digeridas com proteinase K, incubadas at 55 °C por uma hora com agitação leve e subsequentemente a 90°C por mais uma hora. A extração de DNA e RNA foi feita com *King Fisher Duo Thermo Fisher* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. DNA e RNA eluídos foram armazenados a -80 °C. A quantificação do DNA e RNA foi feita no *NanoDrop* (*Thermo Scientific, Inc.*, Waltham, MA, USA).

d.2- Detecção de mutações do promotor do *TERT* por dPCR

A análise de PCR digital 3D foi realizada no *QuantStudio™ 3D Digital PCR System* (*Thermo Scientific, Inc.*, Waltham, MA, USA) utilizando-se *primers* e sondas para detecção de *TERTC228T* e *TERTC250T* (*Thermo Fisher Scientific*). A mistura final de

reação de 14,5 μL continha 8,7 μL *QuantStudio™ 3D Digital PCR Master Mix*, 0,43 μL de mistura *primer/sonda*, 10 ng de DNA. A mistura foi colocada no chip do *QuantStudio™ 3D Digital PCR*. Para mutações do promotor do *TERT*, os *chips* foram submetidos às seguintes condições: um ciclo a 50 °C por 2 min; um ciclo a 95 °C por 10 min; 54 ciclos a 55 °C por 1 min e 95 °C por 15 s; um ciclo a 60 °C por 1 min. Dados de fluorescência final foram coletados no *QuantStudio™ 3D Digital PCR* e analisados utilizando o *software QuantStudio 3D AnalysisSuite* (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

O *QuantStudio™ 3D Digital PCR System* está ilustrado na Figura 8.



Figura 8. Plataforma para realização de PCR digital. a. *QuantStudio™ 3D Digital PCR System*. b. Chip com microcanais

Fonte: Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA – Estados Unidos) (98)

4.3.2. Predição do impacto da substituição de aminoácidos

A análise de variantes menos conhecidas foi realizada com o uso do programa computacional *PolyPhen-2* (*Poymorphism Phenotyping v2* - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (Boston, Massachussets, Estados Unidos), uma ferramenta de bioinformática que prediz os possíveis impactos da substituição de aminoácidos na estrutura e função de proteínas humanas (99).

Para uma dada substituição de aminoácidos na proteína, o *PolyPhen-2* extrai diversos aspectos da sequência e estrutura no sítio de substituição e os alimenta em um

classificador probabilístico (Naïve Bayes). O mapeamento da substituição de aminoácidos para uma estrutura 3D conhecida revela se a substituição é capaz de destruir o centro hidrofóbico da proteína, interações eletrostáticas ou outros aspectos importantes da estrutura proteica. Se a estrutura espacial da proteína pesquisada não é conhecida, pode-se utilizar proteínas homólogas com estrutura conhecida.

De acordo com a predição, a substituição de aminoácidos pode ser considerada benigna, possivelmente danosa ou provavelmente danosa. Na impossibilidade de fazer a predição por falta de informações, a análise é dada como desconhecida.

A página inicial de análise do PolyPhen-2 é ilustrada na Figura 9.

Query Data	
Protein or SNP identifier	<input type="text"/>
Protein sequence in FASTA format	<input type="text"/>
Position	<input type="text"/>
Substitution	AA ₁ A R N D C E Q G H I L K M F P S T W Y V
	AA ₂ A R N D C E Q G H I L K M F P S T W Y V
Query description	<input type="text"/>

Display advanced query options

Figura 9. Página inicial de análise no PolyPhen-2.

Fonte: *Polymorphism Phenotyping v2* - <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (100)

4.3.3. Análise de associações funcionais entre genes e proteínas

Para explorar o papel das mutações *driver* no contexto da fisiologia tireoidiana, uma rede de associações funcionais proteína-proteína foi construída utilizando-se um banco de dados público de interações entre proteínas chamado *STRING* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* - <https://string-db.org/>), versão 11.0 (101).

A unidade básica de interação no *STRING* é a associação funcional, ou seja, a ligação entre duas proteínas contribuindo conjuntamente para uma função biológica

específica. Para que duas proteínas estejam associadas, elas não necessitam interagir fisicamente; basta que pelo menos parte de suas funções na célula se sobreponham ou se complementem de modo específico o suficiente para qualificá-las como componentes de uma via funcional (101). As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais) que têm origem em predição computacional, no conhecimento transferido entre organismos e em informações agregadas de outras bases de dados.

No *STRING*, as interações são derivadas de cinco principais canais, ilustrados na Figura 10.

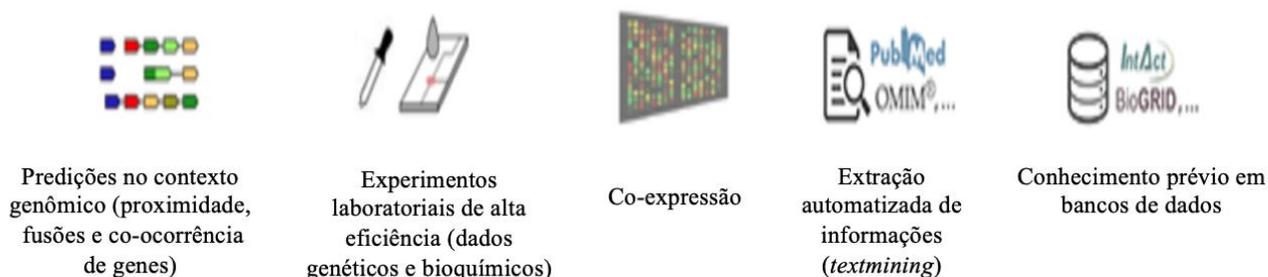


Figura 10. Canais de interação do *STRING*

Fonte: *STRING*, versão 11.0. (102)

Os usuários podem desabilitar os canais individualmente ou em combinações.

Ao fazer a pesquisa, pode-se selecionar uma ou múltiplas proteínas, selecionar o organismo de interesse (ex, *Homo sapiens*) e explorar a rede resultante, fazendo ajustes básicos ou avançados, de acordo com sua preferência.

Um exemplo de pesquisa no *STRING* é mostrado na Figura 11, utilizando-se o gene *BRAF*.

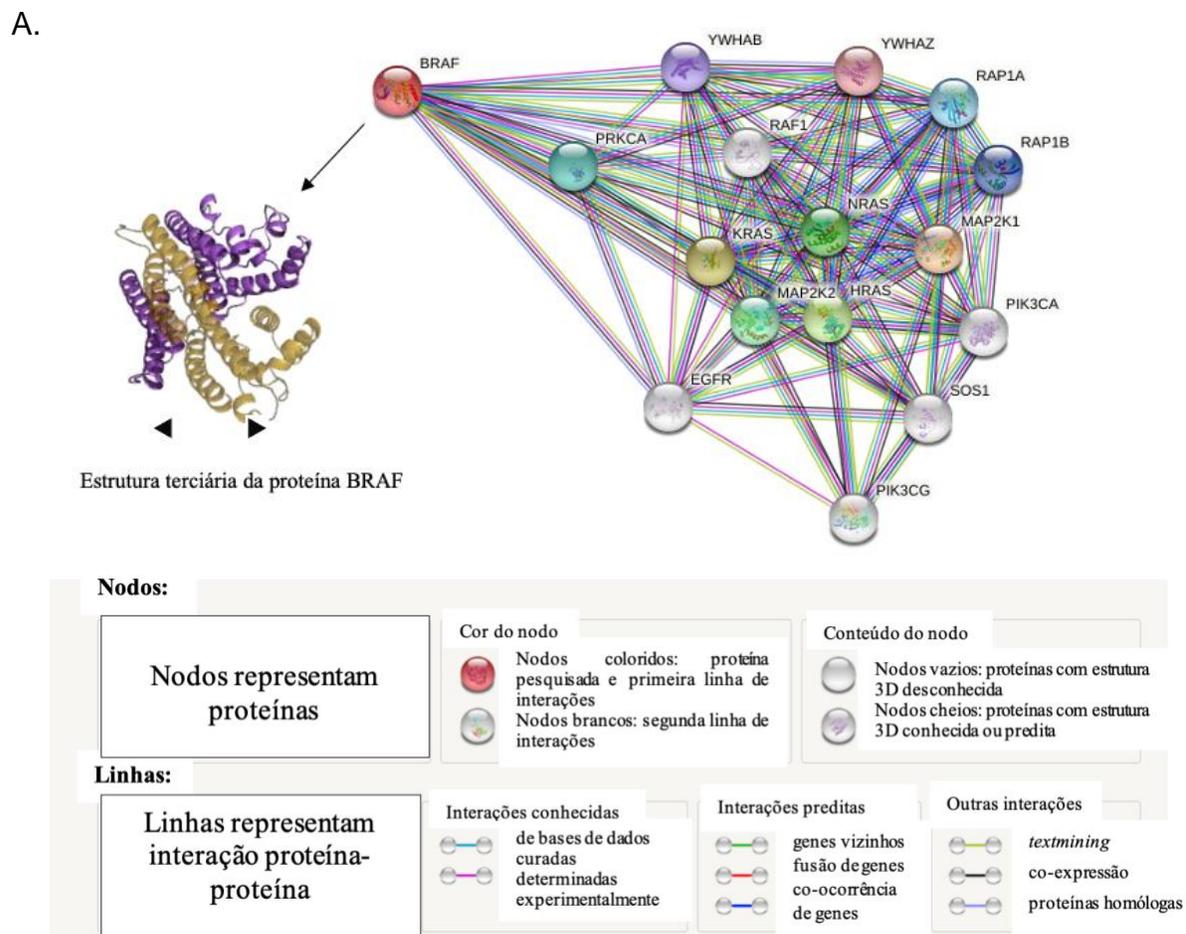


Figura 11. Exemplo de pesquisa no *STRING* para a proteína BRAF.

A. Interações da proteína BRAF com outras proteínas e estrutura terciária da proteína.

B. Legenda da figura, conforme apresentado no *STRING*.

Genes mutados identificados nessa coorte tiveram suas respectivas proteínas avaliadas do ponto de vista de interação funcional com outras proteínas codificadas por genes cuja expressão é aumentada na tireoide, segundo o Atlas de Proteínas Humanas, um banco de dados que permite livre acesso às informações para exploração do proteoma humano (103).

A análise das associações funcionais objetivou identificar proteínas que se conectam em rede, integrando funções moleculares tecido-específicas a genes causadores de câncer, e provendo informações sobre potenciais mecanismos subjacentes específicos do câncer de tireoide.

Essa análise foi realizada com o suporte do Dr. Matthew McCoy, PhD, bioinformata do Centro de Inovação para Informática Biomédica (*Innovation Center for Biomedical Informatics*) da Universidade de Georgetown.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis categóricas (idade dos indivíduos, volume do tumor primário e dose cumulativa de iodo radioativo) apresentaram distribuição normal pelo Teste de Komogorov-Smirnov – KS (Tabela 2) e assim são apresentadas em média e desvio-padrão.

Tabela 2. Distribuição das variáveis clínicas dos pacientes estudados

Variável	KS	P	Interpretação
Idade (anos)	0,1212	0,9853	Distribuição Normal
Dose cumulativa de Iodo	0,2366	0,4445	Distribuição Normal
Tamanho do tumor (em cm)	0,2271	0,4957	Distribuição Normal

A análise estatística foi realizada com o suporte do programa computacional Excel (Microsoft 365, versão 16.45, 2021).

Para análise estatística, um valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

As características demográficas desta coorte e a distribuição dos achados histopatológicos dos tumores estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características demográficas e histopatológicas dos sujeitos do estudo.

Variável	N = 12
Sexo	
Masculino	10
Feminino	2
Idade ao diagnóstico (em anos)	
Média ± DP	61 ± 15,9
Mediana	61
Variação	25 - 82
Volume do tumor primário (Média ± DP), em cm	3,9 ± 2,3
Histologia (N)	
CPT - clássico	6
CPT – variante follicular	2
CPT – variante colunar	1
CFT	1
CCH	2
Tumores com extensão extratiroideiana (N)	8
Sujeitos com metástases ao diagnóstico (N)	9
Dose de iodo radioativo acumulada (Média ± DP), em mCi	304,5 ± 179,7
Distribuição das metástases (N)	
LN cervicais (Centrais / Laterais)	11 (8 / 7)*
LN mediastinais	3
Pulmões	10
Ossos	5
Atípica (fígado)	1

CPT: carcinoma papilar de tireoide; CFT: carcinoma folicular de tireoide; CCH: carcinoma de células de Hürthle; LN: linfonodos; DP: desvio-padrão; N = número da amostra.

*6 pacientes apresentavam metástases em LN cervicais centrais e laterais; 3, apenas em LN cervicais centrais; 1, apenas em LN cervical lateral.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ACHADOS MOLECULARES

a) NGS

A análise do panorama genético de todos os sítios pareados compreendeu os genes *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53*, *ATM*, *MUTYH*, *POLE* e *NTRK*, incluindo fusões nos genes *BRAF* e *NTRK* (Tabela 4).

Tabela 4. Panorama molecular e biomarcador dos tumores analisados.

	Primário	Metástases
Mutações de ponto		
<i>BRAF</i> c. 1799T>A (p.V600E)	5	5
<i>BRAF</i> c. 1624C>T (p.H542Y)	1	1
<i>NRAS</i> c. 182A>G (p.Q61R)	1	1
<i>TP53</i> Q192X	0	1
<i>ATM</i> c. 8840C>A (p.T2947N)	1	1
<i>ATM</i> c. 6764T>C (p.L2255P)	0	1
<i>MUTYH</i> c. 1178G>A (p.G393D)	1	2
<i>NTRK3</i> c. 1891G>A (p.A631T)	1	0
<i>POLE</i> c. 2953T>C (p.F985L)	1	0
Fusões de genes		
<i>BRAF-CEP152</i>	1	1
<i>NTRK1-TPR</i>	1	1
Imunohistoquímica (IHQ)		
Expressão positiva de PD-L1	3/12	1/12
Carga de mutação tumoral (TMB)	4 -10/Mb	3 -10/Mb
Instabilidade de microssatélites (MSI)	Estável	Estável

TMB: *tumor mutation burden*; Mb: Megabase; MSI: *microsatellite instability*

Legenda de aminoácidos: D: ácido aspártico; E: ácido glutâmico; F: fenilalanina; G: glicina; H: histidina; L: leucina; N: asparagina; P: prolina; Q: glutamina; R arginina; T: treonina; V: valina; Y: tirosina

Os achados clínicos e genéticos individualizados dos pacientes estudados, de imunohistoquímica e biomarcadores dos sítios primário e metastático são apresentados na Tabela 5 e na Figura 12.

Um indivíduo (sujeito #2) apresentou mutação concomitante nos genes *BRAF* *c.1624C>T* (H542Y) e *NRAS c.182A>G* (Q61R). Mutações *driver* foram consistentes entre os sítios, mas em três indivíduos outras variantes foram identificadas, seja no tumor metastático (sujeitos #3 e #6) ou no tumor primário (sujeito #10). Dois sujeitos apresentam fusões em ambos os sítios pesquisados: *BRAF-CEP152* (sujeito #11) e *NTRK1-TPR* (sujeito #12). A comparação entre os sítios não foi possível em três casos (sujeitos #4, 7 e 9) por razões técnicas (baixa qualidade ou quantidade de DNA para análise).

Tabela 5. Detalhamento das características clínicas e genéticas dos sujeitos do estudo

Código CARIS	Idade ao diagnóstico (anos)	Sexo	Histopatologia	Tamanho do tumor (cm)	Topografia das Metástases	Dose cumulativa de iodo (mCi)	NGS – tumor primário Expressão de PD-L1	NGS – metástases Expressão de PD-L1
MWHC_DTC_01	76	M	CPT	3	LNC / LNL LNM	385	<i>BRAF</i> V600E PD-L1 10% positivo	<i>BRAF</i> V600E PD-L1 negativo
MWHC_DTC_02	64	M	CPT-VF	6,5	LNC Osso	200	<i>BRAF</i> H542Y; <i>NRAS</i> Q61R PD-L1 negativo	<i>BRAF</i> H542Y; <i>NRAS</i> Q61R PD-L1 negativo
MWHC_DTC_03	56	M	CPT	4,2	LNL	365,6	<i>BRAF</i> V600E PD-L1 negativo	<i>BRAF</i> V600E; <i>TP53</i> Q192X PD-L1 negativo
MWHC_DTC_04	82	M	CPT	4	LNC / LNL Pulmão	239	<i>BRAF</i> V600E PD-L1 negativo	Quantidade insuficiente
MWHC_DTC_05	58	F	CCH	1	LNC Osso	803	<i>HRAS</i> Q61R PD-L1 negativo	<i>HRAS</i> Q61R; PD-L1 negativo
MWHC_DTC_06	46	M	CPT	4	LNC	141	<i>BRAF</i> V600E; <i>ATM</i> T2947N PD-L1 negativo	<i>BRAF</i> V600E; <i>ATM</i> T2947N; <i>ATM</i> L2255P PD-L1 negativo
MWHC_DTC_07	57	M	CPT	3,9	LNC / LNL Pulmão	362	Qualidade insuficiente PD-L1 5% positivo	<i>BRAF</i> V600E; <i>MUTYH</i> G393D PD-L1 negativo
MWHC_DTC_08	65	M	CPT-C	3,5	LNC / LNL LNM	328	<i>BRAF</i> V600E PD-L1 negativo	<i>BRAF</i> V600E; PD-L1 negativo
MWHC_DTC_09	78	F	CFT	1,5	LNC Osso	193,4	<i>NRAS</i> Q61R; <i>POLE</i> F985L PD-L1 negativo	Quantidade insuficiente
MWHC_DTC_10	52	M	CCH	7	Pulmão	165,2	<i>MUTYH</i> G393D; <i>NTRK3</i> A631T PD-L1 80% positivo	<i>MUTYH</i> G393D PD-L1 95% positivo
MWHC_DTC_11	73	M	CPT-VF	1,8	LNC / LNL LNM	167	Fusão <i>BRAF-CEP152</i> PD-L1 negativo	Fusão <i>BRAF-CEP152</i> PD-L1 negativo
MWHC_DTC_12	25	M	CPT	8,5	LNC / LNL Pulmão	305	Fusão <i>NTRK1-TPR</i> PD-L1 negativo	Fusão <i>NTRK1-TPR</i> PD-L1 negativo

NGS: *Next-generation sequencing*; CPT: carcinoma papilar de tireoide; CPT-VF: carcinoma papilar de tireoide variante folicular; LNC: linfonodos cervicais centrais; LNL: linfonodos cervicais laterais; LNM: linfonodos mediastinais.

CPT-C: carcinoma papilar de tireoide variante colunar; CFT: carcinoma folicular de tireoide; CCH: carcinoma de células de Hürthle

	# Sujeito	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Tumor primário	CPT	CPT-VF	CPT	CPT	CCH	CPT	CPT	CPT-C	CFT	CCH	CPT-VF	CPT
T u m o r e s p r i m á r i o s	TNM	T3N1bM1	T4aN1aM1	T3N1bM1	T3bN1bM1	T3N1aM1	T3N0Mx	T2N1bM1	T3N1bMx	T1bN0M1	T3N0Mx	T3N1bM1	T4N1M1
	Mutações de ponto							*					
	BRAF	V600E	H542Y	V600E	V600E		V600E		V600E				
	NRAS		Q61R							Q61R			
	HRAS					Q61R							
	ATM						T2947N						
	MUTYH										G393D		
	NTRK3										A631T		
	TP53												
	POLE									F985L			
	Fusões								*				
	BRAF											BRAF-CEP152	
	NTRK												NTRK1-TPR
	IHQ												
	PD-L1	10%	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	5%	negativa	negativa	80%	negativa
TMB (mutações/Mb)	6	10	indeterminado	6	indeterminado	5	*	*	5	8	4	6	9
MSI	estável	estável	indeterminado	estável	indeterminado	estável	*	*	estável	estável	estável	estável	estável
S í t i o s m e t a s t á t i c o s	Sítio metastático	LN mediast	Osso	LN cervical	Pulmões	Osso	LN cervical	Pulmões	LN mediast	Osso	Pulmões	LN mediast	Pulmões
	Intervalo entre tireoidectomia & biópsia	0	12 dias	3 anos	- 6.7 meses	11.5 meses	2.9 anos	1.5 anos	8.8 anos	- 22 dias	2.7 anos	- 21 dias	- 2.6 meses
	RIT entre tireoidectomia e biópsia	não	não	sim	não	não	sim	sim	sim	não	sim	não	não
	Mutações de ponto				*					*			
	BRAF	V600E	H542Y	V600E			V600E	V600E	V600E				
	NRAS		Q61R										
	HRAS					Q61R							
	ATM						T2947N L2255P						
	MUTYH							G393D			G393D		
	NTRK3												
	TP53			Q192X	*					*			
	Fusões												
	BRAF											BRAF-CEP152	
	NTRK												NTRK1-TPR
	IHQ												
PD-L1	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	negativa	95%	negativa	negativa
TMB (mutações/Mb)	6	10	8	*	4	6	indeterminado	5	*	*	3	5	9
MSI	estável	estável	estável	*	duvidoso	estável	indeterminado	estável	*	*	estável	estável	estável

Figura 12. Comparação entre os perfis genéticos, imunohistoquímica e biomarcadores dos sítios primário e metastático. Cada coluna representa um sujeito de estudo. A parte superior da figura corresponde ao tumor primário e a parte inferior aos sítios metastáticos. CPT: carcinoma papilar de tireoide; CPT-VF: carcinoma papilar de tireoide variante folicular; CPT-C: carcinoma papilar de tireoide variante colunar; CFT: carcinoma folicular de tireoide; CCH: carcinoma de células de Hürthle. IHQ: imunohistoquímica; TMB: *tumor mutation burden*; Mb: megabase; MSI: *microsatellite instability*; RIT: radioiodoterapia. LN: linfonodo.

* indica qualidade ou quantidade insuficientes para análise

A classificação TNM utilizada corresponde à oitava edição (2017) (104).

b) Expressão de PD-L1

No tumor primário, a expressão de PD-L1 foi positiva em 2 indivíduos com PTC (5% e 10% de expressão) e em 1 indivíduo com HTC (80% de expressão). No que se refere às metástases, apenas o tumor do último indivíduo permaneceu positivo, com 95% de expressão (Tabela 5 e Figura 5).

c) Biomarcadores (assinatura genômica)

Todos os espécimes apresentaram estabilidade para o teste de instabilidade de microssatélites.

A carga de mutação tumoral, que variou entre 3 e 10 mutações/MB, foi considerada baixa a intermediária em todos os espécimes.

d) PCR digital

Mutações da região promotora do *TERT* c.-124C>T (C228T) e *TERT* c.-146C>T (C250T) foram testadas em amostras dos tecidos tumorais metastáticos dos sujeitos # 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11 e 12.

Mutação no *TERT* c.-146C>T (C250T) não foi detectada em nenhum dos casos examinados. Mutação na região promotora do *TERT* c.-124C>T (C228T) foi detectada apenas no sujeito # 2.

Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da PCR digital para o promotor do *TERT*.

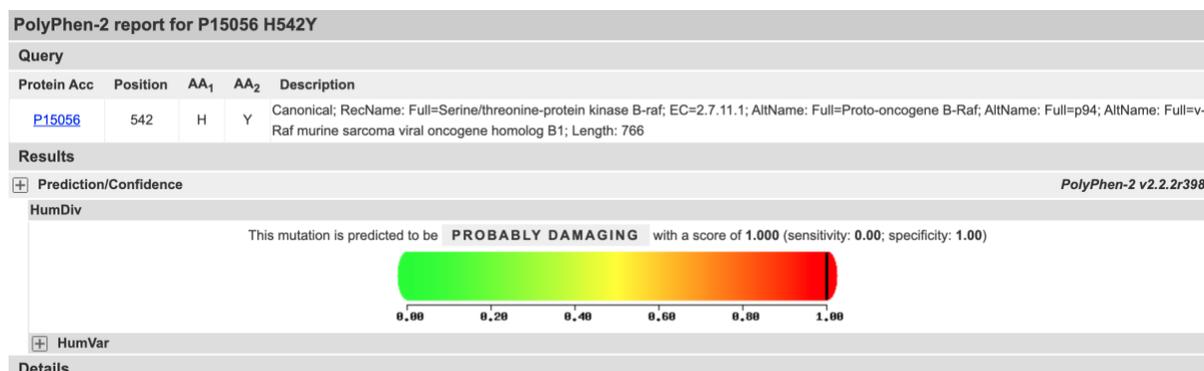
# Sujeito e sítio metastático pesquisado	Promotor do <i>TERT</i>	
	c.-124C>T C228T	c.-146C>T C250T
#1 - tireoide	ND	ND
#2 - osso	C228T	ND
#4 - tireoide	ND	ND
#6 - tireoide	ND	ND
#8 - LN mediastinal	ND	ND
#9 - tireoide	ND	ND
#11 - tireoide	ND	ND
#12 - tireoide	ND	ND

LN: linfonodo; ND: não detectado

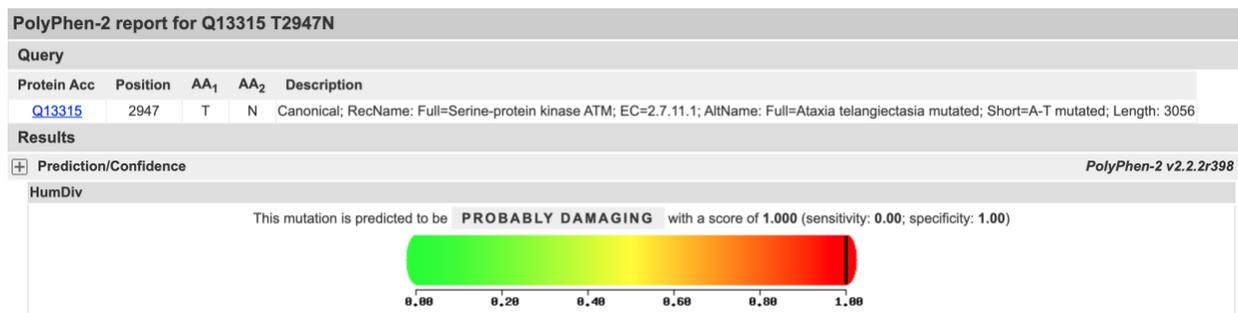
5.3. PREDIÇÃO DO IMPACTO DA SUBSTITUIÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Os resultados para as variantes BRAF p.H542T, ATM p.T2947N, ATM p.L2255P, MUTYH p.G393D, NTRK3 p.A631T e POLE p.F985L são apresentados na Figura 13.

BRAF p.H542T: provavelmente danosa



ATM p.T2947N: provavelmente danosa



ATM p.L2255P: provavelmente danosa

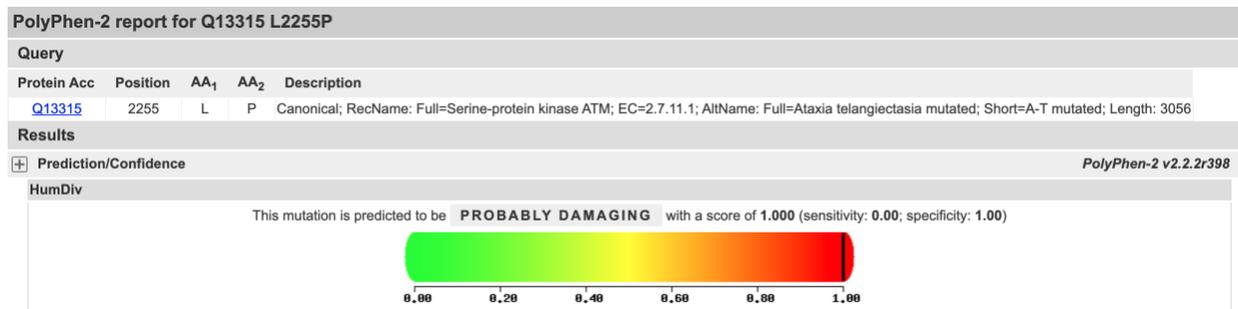
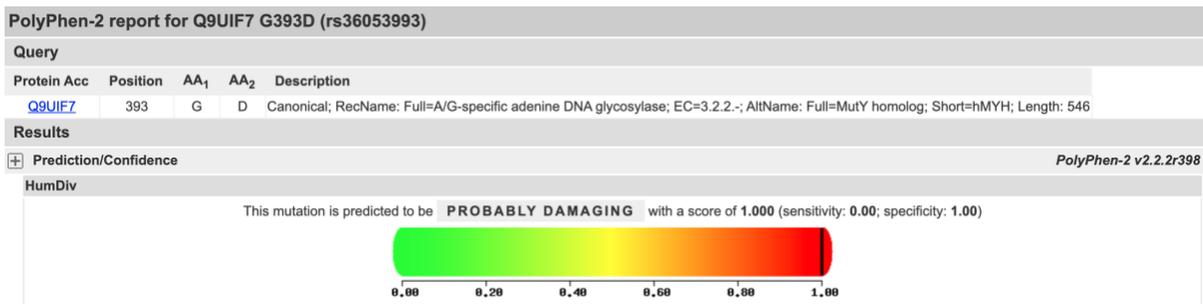
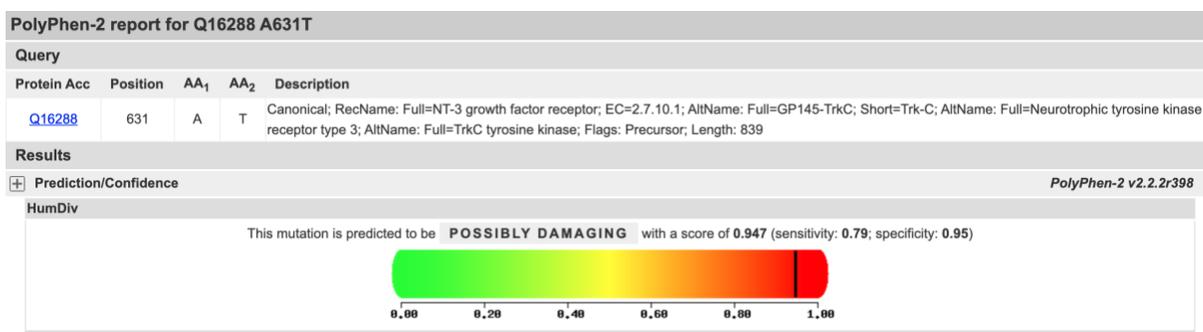


Figura 13. Resultados da predição do impacto da substituição de aminoácidos pelo *PolyPhen-2* (continua)

MUTYH p.G393D: provavelmente danosa



NTRK3 p.A631T: possivelmente danosa



POLE p.F985L: possivelmente danosa

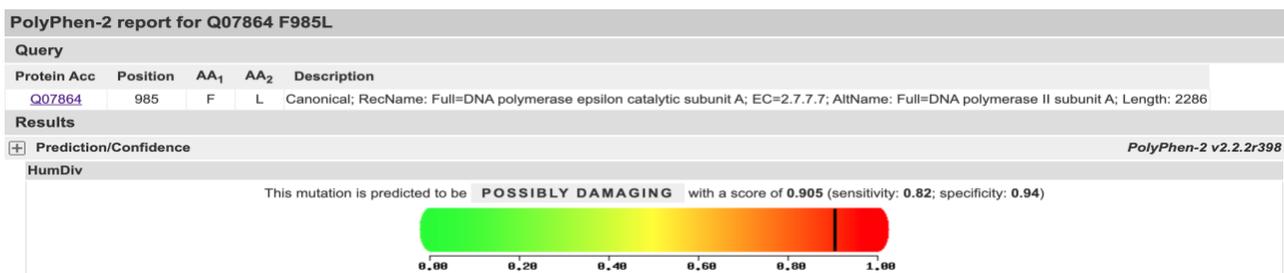


Figura 13. Resultados da predição do impacto da substituição de aminoácidos pelo PolyPhen-2 (continuação)

5.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS FUNCIONAIS

A análise de bioinformática revelou várias associações funcionais interessantes entre os grupos de genes alterados nessa coorte e genes comumente expressos na tireoide, apresentados na Figura 14.

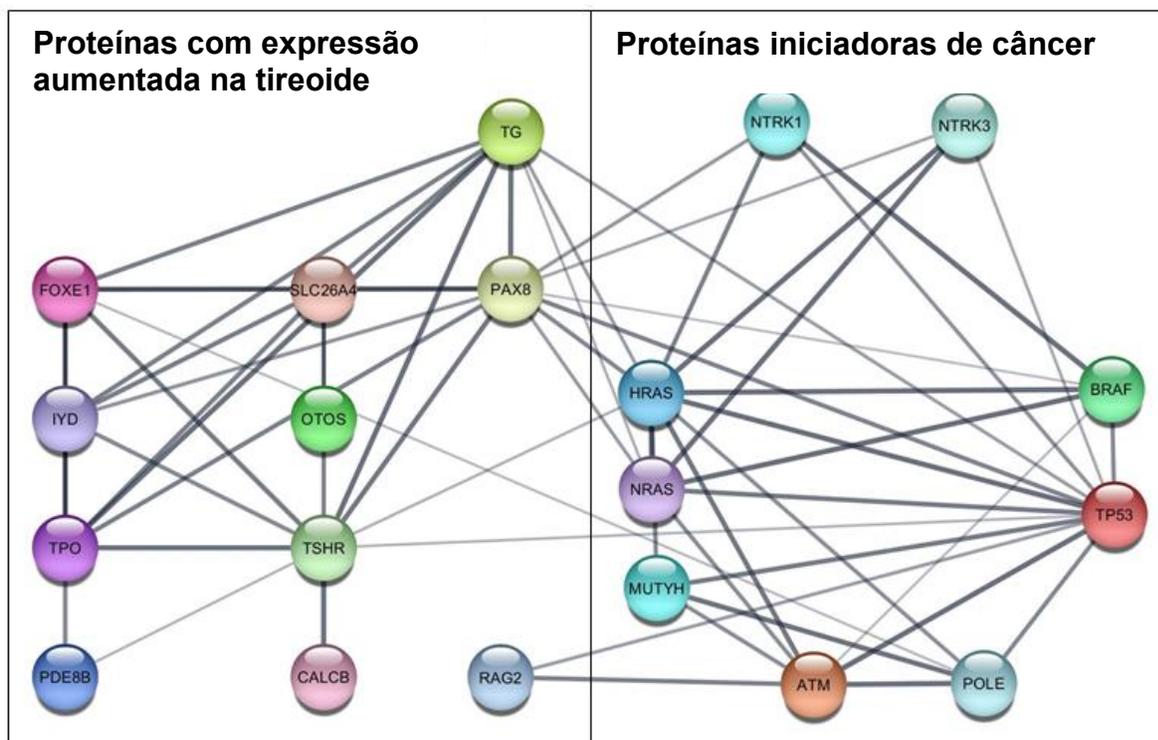


Figura 14. Associações funcionais entre as proteínas comumente expressas na tireoide e as proteínas relacionadas ao desenvolvimento de câncer, identificadas nesta coorte.

ATM: ATM serine/threonine kinase; BRAF: B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase; CALCB: Calcitonin Related Polypeptide Beta; FOXE1: Forkhead Box E1; HRAS: HRas Proto-Oncogene, GTPase; IYD: Iodotyrosine Deiodinase; MUTYH: MutY DNA Glycosylase; NRAS: NRAS Proto-Oncogene, GTPase; NTR: Nerve Growth Factor Receptor; NTRK1: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1; NTRK3: Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3; OTOS: Otospiralin; PAX8: Paired Box 8; PDE8B: Phosphodiesterase 8B; POLE: DNA Polymerase Epsilon, Catalytic Subunit; RAG2: Recombination Activating 2; SLC26A4: Solute Carrier Family 26 Member 4; TG: Thyroglobulin; TP53: Tumor Protein P53; TPO: Thyroid Peroxidase; TSHR: Thyroid Stimulating Hormone Receptor.

Nessa figura os nodos representam as proteínas, as linhas indicam as associações funcionais entre as proteínas indicadas pelo *STRING*.

Alternativamente ao uso linha coloridas, pode-se expressar a força das evidências que suportam as associações de acordo com a espessura das linhas. Desta forma, na Figura 14, observamos forte associação da proteína BRAF com as proteínas HRAS, NRAS e NTRK1 e uma fraca associação direta com PAX8. De forma semelhante, observa-se forte associação da proteína TP53 com HRAS, NRAS, MUTYH e ATM, e uma associação moderada com PAX8, a qual, por sua vez, está fortemente associada às proteínas SLC26A4 e FOXE1.

6 DISCUSSÃO

Os dados deste estudo com indivíduos com CDT avançado refratário ao radioiodo nos permitiram conhecer aspectos das semelhanças e diferenças no perfil molecular entre o tumor primário e o sítio de metástase em um mesmo paciente. Embora o perfil mutacional como um todo tenha sido semelhante neste grupo de pacientes, as diferenças encontradas em alguns indivíduos fornecem dados interessantes sobre mecanismos fisiopatológicos envolvidos na evolução clínica desses pacientes. Em um aspecto mais amplo, esses dados podem representar bases para potenciais implicações terapêuticas no contexto da medicina de precisão.

Ainda que o câncer de tireoide seja mais frequente no sexo feminino, observamos que dez dos 12 indivíduos dessa coorte foram do sexo masculino. Esta observação é consistente com dados da literatura, os quais sugerem que homens acometidos por câncer de tireoide são mais propensos a serem diagnosticados com doença mais avançada, com subtipos histológicos mais agressivos e com mais idade (19). A média de idade de diagnóstico observada entre os pacientes do presente estudo foi de $61 \pm 15,9$ anos, variando de 25-82 anos, também em consonância com os dados da literatura.

Concordante com publicações prévias (50, 105), a mutação de ponto no gene *BRAF* foi a anormalidade genética mais observada nesta coorte, presente em sete dos 12 indivíduos. O principal *hotspot* da mutação de ponto neste gene leva à substituição de uma timina por uma adenina na posição 1799 (c.1799T>A), resultando na substituição de uma valina por um ácido glutâmico na proteína BRAF (p.V600E), o que, por sua vez, causa ativação constitutiva da proteína quinase BRAF e ativação oncogênica da via da MAP-quinase (49, 106). Desde sua descrição inicial em 2003 (107, 108), um grande número de estudos tem descrito o valor prognóstico da mutação BRAF V600E no CPT. Está bem caracterizada sua associação com desfechos clínicos mais reservados, incluindo maior risco de recorrência da doença de forma menos responsiva ao iodo radioativo, bem como com a presença de achados histopatológicos de maior agressividade, tais como extensão extratireoidiana (ETE) e metástases linfonodais (109, 110). Em um estudo retrospectivo multicêntrico incluindo 1.849 pacientes, a presença de mutação BRAF V600E esteve significativamente associada ao aumento da mortalidade

doença-específica em pacientes com CPT (106, 111). Nossos achados são consistentes com esses estudos, uma vez que os indivíduos portadores de mutação *BRAF* c.1799T>A (p.V600E) apresentavam doença recorrente, refratária ao radioiodo, em sua maioria com metástases linfonodais. Em cinco dos sete casos com mutação *BRAF*, houve concordância quanto à presença desta mutação entre os espécimes tumorais primários e metastáticos.

Dentre os indivíduos com mutação de ponto *BRAF*, apenas em um caso observou-se uma mutação *BRAF* não V600E. Trata-se do sujeito #2, cujos tumores primário e metastático (osso) apresentam uma mutação *BRAF* c.1624C>T, que resulta na substituição de uma histidina por uma tirosina na proteína BRAF (p.H542Y). De acordo com a base de dados OncoKB (112), mantida pelo *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSK), esta é uma variante de significado biológico incerto (*Variant of Unknown Significance*, VUS). No Catálogo de Mutações Somáticas em Câncer (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* - COSMIC v92) (113, 114), a variante *BRAF* c.1624C>T (p.H542Y), está descrita em câncer de colon e em melanoma, ao passo que não há relatos desta mutação na base de dados TCGA (115, 116). Além deste achado, ambos os espécimes tumorais deste indivíduo também apresentaram uma mutação *NRAS* c.182A>G, que consiste na substituição de uma adenina por uma guanina na posição 182 do gene e resulta na substituição de uma glutamina por uma arginina no códon 61 da proteína quinase NRAS (p.Q61R).

Mutações do gene *RAS* são comumente observadas em neoplasias foliculares, estando presentes em 20-25% dos adenomas foliculares, 30-45% dos casos de CPT variante folicular (como é o caso do indivíduo em questão), 30-45% dos CFT, 20-40% dos CTPD e CAT (106).

Em oncogênese tireoidiana, mutações *BRAF* e *RAS* são as principais formas de ativação da via da MAP quinase, sendo que estas mutações agem de forma mutuamente exclusiva (49, 50).

É possível que a mutação *BRAF* c.1624C>T (p.H542Y) observada no indivíduo #2 seja uma variante constitutiva deste paciente ou uma mutação *passenger*. A análise de tecido não tumoral seria útil na distinção entre estas possibilidades, mas isto não pôde ser realizado. Alternativamente, utilizamos o programa computacional *PolyPhen-2* para

realizar a predição do efeito desta mutação na proteína e encontramos uma alta probabilidade de que a referida mutação seja danosa (especificidade 100%). Vale ressaltar que este indivíduo, natural da Etiópia, apresentava um tumor de comportamento bastante agressivo localmente, com invasão local que necessitou laringectomia, bem como com metástases ósseas, pulmonares e hepáticas. Este foi o primeiro paciente desta coorte a evoluir para óbito devido a falência respiratória aguda em decorrência das metástases pulmonares.

Intrigados pela discrepância entre o quadro clínico deste sujeito e as mutações encontradas de forma concordante entre os sítios, prosseguimos à investigação de mutações na região promotora do gene *TERT*, sabidamente relacionado a casos de maior agressividade quando associado a mutações do gene *BRAF* (56, 57). De fato, foi identificada, no espécime óssea, uma mutação na região promotora do gene *TERT* c.-124C>T, resultando na substituição de uma cisteína por uma treonina no códon 228 (p.C228T). Não foi observada mutação no promotor do *TERT* em nenhum dos demais casos testados. O dueto de mutação genética envolvendo *RAS* e o promotor do *TERT* já foi descrito em câncer de tireoide e tem sido associado a um quadro clínico de agressividade tumoral, incluindo maior recorrência tumoral e mortalidade (106, 117). Sohn et al, em um estudo comparativo de tumores primários e suas respectivas lesões metastáticas, encontraram alta concordância quanto à combinação dessas mutações, bem como uma associação com desfechos clínicos mais reservados (29). Esses dados corroboram os achados clínicos do sujeito #2, mas não foi possível avaliar a presença da mutação do promotor do *TERT* no tumor primário.

A mutação no gene *RAS* também foi detectada em dois outros sujeitos de estudo. O sujeito #5 revelou uma mutação de ponto *HRAS* c.182A>G (p.Q61R) em ambos os sítios examinados. O sujeito #9 apresentou uma mutação de ponto *NRAS* c.182A>G (p.Q61R) no tumor primário associada a uma mutação de ponto no gene *POLE* c.2953T>C (p.F985L). Esta mutação foi previamente identificada em CCH (105) e em formas fatais de carcinoma de tireoide não anaplásico (118). Na análise pelo *PolyPhen-2*, a variante *POLE* p.F985L foi considerada possivelmente danosa. Infelizmente, a comparação com o espécime da metástase óssea não foi possível devido à quantidade insuficiente de material para análise.

Dois padrões de fusão gênica foram detectados nesta coorte, de modo concordante entre os sítios: *CEP152-BRAF* (sujeito #11) e *NTRK1-TPR* (sujeito #12). Dentre todas as quinases, as fusões *BRAF* são as mais comumente observadas em diversos tipos de tumores, incluindo câncer de próstata, melanoma, câncer de tireoide induzido por radiação e gliomas pediátricos de baixo grau. Contudo, o espectro total das fusões *BRAF* em câncer humano permanece incompleta (20, 26).

No presente estudo, identificamos uma fusão *BRAF* com um novo parceiro, *CEP152*. Para investigar o efeito oncogênico desta nova fusão, uma proposta seria a confirmação da fusão por sequenciamento de Sanger e a realização de estudos funcionais *in vitro*. Os experimentos poderiam incluir a geração de uma linhagem celular expressando os transcritos da fusão, a análise da expressão gênica em células controle e em células contendo a fusão (sequenciamento de RNA), a análise da ativação da sinalização celular nas células que expressam a proteína quimérica, a análise do crescimento e do potencial metastático dessas células *in vitro* e em modelos animais, a análise da resposta ao tratamento com inibidores *BRAF* *in vitro* e *in vivo*. A proposta dos pesquisadores envolvidos neste estudo é de continuar essa investigação para entender seu significado e implicação.

Adicionalmente, relatamos a ocorrência de uma fusão *NTRK1* com um parceiro conhecido, *TPR*. Este parceiro contém um domínio de dimerização espiralado (*coiled coil domain*) que potencialmente ativa o domínio TRK quinase a jusante (119). Tipicamente, as fusões *NTRK* ocorrem através de rearranjos intra ou intercromossômicos que levam à formação de genes híbridos nos quais a sequência 3' do gene *NTRK*, incluindo o domínio quinase, é justaposta à sequência 5' de um gene diferente. O produto da fusão é uma oncoproteína quimérica caracterizada pela ativação constitutiva, ligante-independente, da TRK quinase (119). Fusões *TRK* estão relacionadas à patogênese do fibrosarcoma congênito, do carcinoma secretor de mama e do câncer de tireoide, nos quais foram relatadas em apenas 1% dos CPT avançados (20, 105). Contudo, as fusões *NTRK* têm atraído especial interesse da comunidade científica devido à possibilidade de terapia alvo. O larotrectinibe, um inibidor altamente seletivo das três proteínas TRK, foi aprovado pelo FDA em 2018 para tumores sólidos contendo fusões nesses genes (120). Drilon *et al* avaliaram 55 pacientes com tumores positivos para fusões *NTRK*, cinco dos quais com

diagnóstico de câncer de tireoide (9%). A atividade antitumoral mostrou-se duradoura, potente e rápida, com bom perfil de segurança (120). O sujeito #12, no qual a fusão *NTRK1* foi detectada é o mais jovem desta coorte, tendo sido diagnosticado aos 25 anos com metástases pulmonares de CPT que não apresentaram captação alguma após a dose terapêutica de iodo. O paciente não tem história de exposição a radiação ionizante. Ele permanece em acompanhamento clínico e, caso haja progressão da doença, poderá se beneficiar da terapia alvo com larotrectinibe.

O sujeito #10 apresentou, tanto no tumor primário quanto no tumor metastático, uma mutação de ponto no gene *MUTYH* c.1178G>A, que resultou na substituição de uma glicina por um ácido aspártico no códon 393 (p.G393D). De acordo com a base de dados COSMIC v92 (113, 114), essa mutação já foi descrita em dez casos de carcinoma avançado de tireoide (105). Na análise pelo *PolyPhen-2*, a variante *MUTYH* p.G393D foi considerada provavelmente danosa. Adicionalmente, esse sujeito apresentou uma mutação de ponto no gene *NTRK3* c.1891G>A (p.A631T). Mutações nesse gene já foram descritas em carcinoma anaplásico de tireoide (105). Ao ser analisada pelo *PolyPhen-2*, esta variante foi considerada possivelmente danosa. Entretanto, a mutação *NTRK3* não foi evidenciada no tumor metastático, apenas no tumor primário. É notável, ainda, a elevada expressão de PD-L1 em ambos os tumores desse sujeito, de 80% no tumor primário e 95% na biópsia da metástase pulmonar. Dentre os demais sujeitos do estudo, apenas dois apresentaram expressão de PD-L1, mas bem menos intensa e apenas nos tumores primários (sujeitos #1 e #7). O sujeito #10 apresentava metástases pulmonares que se encontravam estáveis até o fechamento de dados deste estudo, mas a elevada expressão de PD-L1 nos seus tumores abre a possibilidade de uso de imunoterapia em caso de progressão da doença.

O panorama imunológico do carcinoma papilar de tireoide é do subtipo inflamatório, com baixa a moderada proliferação de células tumorais e baixos níveis de alterações no número de cópias somáticas, de modo que o carcinoma diferenciado de tireoide é considerado pouco imunogênico (83, 121). Nossos resultados corroboram este conceito, evidenciado pelo padrão de estabilidade de microssatélites, pela baixa a intermediária carga de mutação tumoral e pela baixa expressão de PD-L1 na maioria das amostras. Esse perfil de baixa imunogenicidade confere ao CDT um padrão

potencialmente pouco responsivo à terapia de *checkpoint* imunológico, exceto em situações nas quais a lesão tumoral apresente características de maior imunogenicidade, como a apresentada pelo sujeito #10.

Dentre os 12 sujeitos, apenas três apresentaram diversidade genética entre os tumores primários e metastáticos. O sujeito #10 apresentou uma mutação de ponto *NTRK3* apenas no tumor primário, conforme descrito acima. O sujeito #3 apresentou uma mutação de mudança na matriz de leitura (*frameshift*) no gene *TP53* Q192X e o sujeito #6 apresentou uma segunda mutação de ponto no gene *ATM* c.6764T>C (p. L2255P), além da variante *ATM* c.8840C>A (p.T2947N), presente em ambos os sítios. Ambos esses genes estão relacionados ao reparo de DNA e sabe-se que uma das marcas características das células cancerígenas é sua capacidade de evadir a ação de supressores tumorais (122).

O *TP53* é o protótipo do gene supressor tumoral, sendo o gene mais frequentemente mutado em câncer (26, 123). Ele recebe informações sobre o grau de lesão ao genoma, níveis de nucleotídeos, sinais promotores de crescimento celular e alterações em outros sistemas operacionais intracelulares, podendo suspender a progressão do ciclo celular até que essas condições estejam normalizadas. Caso o desarranjo metabólico ou a lesão ao genoma sejam muito graves, o *TP53* emite sinais que levam à apoptose celular (122, 123). De acordo com a base de dados OncoKB (112), a mutação *TP53* Q192X, identificada no tumor metastático do sujeito #3, é possivelmente oncogênica, levando a uma perda de função da proteína TP53, o que é vantajoso para a progressão tumoral. Nos bancos de dados COSMIC (113, 114) e OncoKB (112), não há relatos dessa mutação em câncer de tireoide.

De modo semelhante, o gene *ATM* participa de vias sinalizadoras de resposta à lesão de DNA, tais como quebra da dupla fita e recombinação homóloga, agindo como um *checkpoint* do ciclo celular após situações de estresse (124). Mutações germinativas e somáticas no *ATM* são descritas em 10-20% dos cânceres colorretal, gástrico e adenocarcinoma pulmonar, dentre outros tipos de câncer. Deficiência do *ATM* pode ocorrer também devido a hipermetilação de sua região promotora (124). Em câncer de tireoide, mutações do *ATM* foram descritas em 4% de casos de CPT avançado (105). De acordo com o banco de dados OncoKB (112), a mutação *ATM* c.8840C>A (p.T2947N) é

provavelmente oncogênica, levando a perda de função do gene. A ocorrência de uma segunda mutação *ATM* c. 6764T>C (p. L2255P) observada apenas no tumor metastático do sujeito #6, embora de significado desconhecido, potencialmente vem a comprometer ainda mais a função do gene. A análise pelo *PolyPhen-2* indica que ambas essas variantes do gene *ATM* sejam provavelmente danosas para a proteína.

Conforme demonstrado na Figura 12, cinco indivíduos desta coorte foram submetidos à radioiodoterapia no intervalo entre a tireoidectomia e a biópsia da lesão metastática, três dos quais apresentaram discrepância no perfil genético entre os pares tumorais (#3, #6 e #10). Uma possibilidade é de que o surgimento de novas mutações nos indivíduos #3 e #6 possa ter sofrido alguma influência, ao menos em parte, da radioiodoterapia (125). No indivíduo #10, uma das mutações presentes no tumor primário (*NTRK3* A631T) estava ausente no tumor metastático, o que pode sugerir que o clone tumoral que continha essa mutação não tenha sido representado na amostra do tumor metastático. Nos outros dois indivíduos, não foi possível realizar a comparação entre os sítios por insuficiência de material para análise. Os demais sete indivíduos da coorte, tiveram as lesões metastáticas removidas ou durante a tireoidectomia (sujeito #1), alguns dias depois (sujeito #2) ou antes da tireoidectomia total (sujeitos #4, #5, #9, #11 e #12).

Ao compararmos os resultados de nosso estudo com estudos semelhantes que avaliaram o perfil genético pareado de tumor tireoidiano primário e metástases à distância (29-31), observamos algumas diferenças metodológicas que podem ter levado a diferentes conclusões. Sohn *et al* avaliaram 17 pacientes com CDT (dez pacientes com CPT e 7 pacientes com CFT) utilizando um painel de NGS composto por 50 genes. Esses autores encontraram alta concordância entre as anormalidades genéticas dos espécimes tumorais primários e metastáticos, sendo mutações *BRAF* mais prevalentes nos casos de CPT e mutações *RAS* em associação com mutações do promotor do *TERT* em casos de CFT (29). Masoodi *et al* utilizaram WES (*whole-exome sequencing*) para comparar 14 trios de tecido tireoidiano normal, tumor primário e metástases à distância. Os autores identificaram mutações *driver* nos genes *BRAF*, *NRAS* e *HRAS* concordantes entre os sítios analisados, porém encontraram grande heterogeneidade no que se refere às mutações *passenger* e à presença de variantes deletérias afetando genes sinalizadores de repressão transcricional e de metilação do DNA, restritas às lesões

metastáticas (30). Song *et al* avaliaram 15 pares de tumor primário e metástases à distância com um painel de NGS de 50 genes, identificando mutações do promotor do *TERT* com maior prevalência, seguidas de mutações do *BRAF* e do *RAS*, com alto grau de concordância entre os espécimes (31). Em comparação com esses estudos, nossa população é mais heterogênea, que pode refletir, ao menos em parte, a prática clínica em um hospital terciário. Ademais, a diversidade genética que identificamos é notável, em virtude da abrangência do painel molecular que utilizamos, apesar do pequeno número amostral. Nossos dados enfatizam a importância da identificação do perfil molecular de lesões metastáticas refratárias ao iodo radioativo, pois a detecção de uma anormalidade passível de terapia alvo terá grande peso na decisão terapêutica.

O estudo de associações funcionais entre genes iniciadores de câncer e genes que codificam proteínas comumente expressas na tireoide pode ser potencialmente útil para a geração de novas hipóteses sobre mecanismos oncogênicos inerentes ao câncer de tireoide, bem como para a exploração de novas armas terapêuticas para pacientes com CDT refratário ao iodo radioativo.

A análise de bioinformática realizada com a ferramenta *STRING* para as proteínas codificadas por genes alterados encontrados no presente estudo sugere como tais proteínas podem estar inter-relacionadas de forma a interferir, direta ou indiretamente, com a biologia de várias proteínas essenciais às diversas etapas da fisiologia da tireoide.

A principal função da célula folicular tireoidiana envolve a utilização iodeto para a síntese de hormônio tireoidiano. Esse processo requer a ação coordenada de diversas proteínas, como as ilustradas na Figura 14, destacando-se a PAX8, que é uma proteína nuclear envolvida na regulação da expressão de genes tireoide-específicos, incluindo genes que codificam a tireoglobulina (TG), a tireoperoxidase (TPO) e o cotransportador sódio-iodeto (*Na-I symporter*, NIS)(126, 127). A ativação aberrante da via da MAP-quinase altera de forma crucial várias etapas envolvidas no manejo do iodeto pela célula tireoidiana (49). Numerosos estudos relataram associação da mutação *BRAF V600E* com redução ou ausência da expressão de genes relacionados ao manejo do iodeto: *NIS*, *TSHR*, *TPO*, *TG*, *SLC26A4* (que codifica a pendrina, proteína responsável pelo transporte do iodeto na membrana apical das células foliculares para o lúmen dos folículos) (49).

Esse aspecto da interação proteína-proteína é bem visualizado na Figura 14, a qual ilustra, a partir de dados de estudos em ciência básica, como as proteínas BRAF, HRAS, NRAS, TP53, ATM parecem se conectar em rede e interferir com a proteína PAX8, a qual, por sua vez, também está interligada em rede com as proteínas TG, SLC26A4, IYD, TPO, TSHR, FOXE1, sendo este último um fator de transcrição chave no desenvolvimento e função da tireoide.

Depreende-se das associações descritas na Figura 14, que há conexões de proteínas menos conhecidas no contexto do câncer de tireoide, como NTRK, MUTYH e POLE, com proteínas-chave da via da MAP-quinase, como as proteínas RAS.

A partir dessa análise, observa-se uma interessante interação entre as proteínas codificadas pelo gene *TP53* e aquelas codificadas pelos genes *PAX8* e *RAG2*. É descrito que o gene *PAX-8* está menos expresso na presença de mutações do *TP53* em células foliculares da tireoide (128). Ao gene *RAG2* é atribuída participação na mediação da clivagem do DNA durante a recombinação somática de linfócitos, conhecida por recombinação V(D)J (*variable, diversity, joining*). Estudos funcionais que investigaram mecanismos de reparo de DNA mostram que a expressão do *RAG2* é regulada por peptídeos derivados do *TP53* (129, 130).

Adicionalmente, associações funcionais entre *RAG2* e *ATM* foram descritas em alguns estudos, e estão envolvidas de forma cooperativa no reparo de quebras nas fitas duplas de DNA (131).

Nesse contexto, a análise de bioinformática focada em associações gene-gene e/ou proteína-proteína abre um novo campo de estudo em câncer de tireoide. Entendemos ser importante continuarmos com essa investigação sobre as relações funcionais, em especial entre *RAG2* e *PAX8* com genes associados à carcinogênese tireoidiana.

Esse tipo de estudo com maior detalhamento na compreensão desta rede de interações pode prover dados para melhor entendimento de novos aspectos da patogênese dos tumores de tireoide e embasar potenciais e inovadoras intervenções terapêuticas aos pacientes com CDT metastático e refratário ao iodo radioativo.

Limitações do estudo

Na fase inicial desta pesquisa, a maior dificuldade foi a identificação dos casos de CDT avançado e refratário ao radioiodo. Esta é uma dificuldade recorrente em pesquisas clínicas em câncer de tireoide, uma vez que há apenas um código internacional de doença (CID-10) para todos os tipos de carcinoma de tireoide: C73. Para contornar este obstáculo, foi utilizada a base de dados do serviço de Medicina Nuclear do *MedStar Washington Hospital Center* e indicações dos médicos assistentes desse serviço durante as discussões de caso - *Thyroid Conferences* do *MedStar Washington Hospital Center*. Desta forma, para melhor sistematizar a identificação e acompanhamento longitudinal dos indivíduos com CDT avançado, propôs-se a organização de uma coorte de seguimento com os dados clínicos, bioquímicos, imagenológicos e genéticos, incluindo o pareamento molecular dos tumores primário e metastático.

Após a identificação de possíveis candidatos ao estudo, deparamo-nos com a dificuldade em obter amostras de tecidos tumorais, especialmente porque muitos pacientes identificados haviam sido submetidos à tireoidectomia há mais de dez anos e, com frequência, em outros serviços. Nos Estados Unidos, é um procedimento de rotina os espécimes cirúrgicos e de biópsia serem descartados após dez anos. Assim, muitos pacientes em acompanhamento regular e com biópsias recentes de sítios metastáticos não mais dispunham do espécime cirúrgico do tumor primário para comparação. Por outro lado, alguns pacientes dispunham do espécime do tumor primário, mas não havia sido realizada biópsia em lesões que se tornaram refratárias ao iodo radioativo, pois esse procedimento nem sempre é necessário ou acessível no seguimento clínico.

Nossos resultados apresentam também limitação devido ao tamanho da amostra, apesar de estudos prévios semelhantes terem sido realizados com um número amostral que variou de 14 a 17 pares tumorais avaliados (29-31). Por limitação orçamentária, só foi possível analisamos um sítio metastático de cada paciente, além de não ter sido possível analisar amostras de tecido não tumoral.

Adicionalmente a esses pontos, por se tratar de uma amostragem de conveniência, os espécimes dos pacientes foram obtidos em diferentes momentos do seguimento clínico. Em alguns, ambas amostras dos tecidos do tumor primário e

metastático foram obtidas antes da radioiodoterapia, enquanto em outros a obtenção do tecido do tumor metastático foi feita após a radioterapia.

Um outro aspecto limitante da análise é o fato de não ter sido possível o pareamento molecular entre os tumores primários e metastáticos em três pacientes, por insuficiência de material. De acordo com os resultados que seriam observados nesses pacientes, a proporção de semelhança ou diferença gênica entre os tecidos poderia ser diferente, com impacto na interpretação da magnitude dessa questão.

Entretanto, apesar dessas limitações, as quais refletem, ao menos em parte, a prática clínica no mundo real, nossos dados trazem informações originais e que contribuem com o conhecimento nesse campo de estudo e potencial impacto na assistência a pacientes com câncer diferenciado de tireoide refratário ao iodo radioativo.

7 CONCLUSÃO

Os dados deste estudo sobre a caracterização molecular pareada dos tumores primário e metastático em pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide refratário ao iodo radioativo mostram que:

-As anormalidades genéticas identificadas nessa coorte envolveram os genes *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53*, *ATM*, *MUTYH*, *POLE*, *NTRK* e a região promotora do *TERT*.

-Houve alta concordância entre os pares teciduais, no que se refere aos conhecidos genes *driver* em oncogênese tireoidiana (*BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53* e *TERT*).

-As mutações diferentes entre a lesão primária da tireoide e o sítio metastático foram encontradas em três indivíduos.

-*BRAF V600E* foi a mutação pontual mais frequentemente descrita entre os espécimes emparelhados.

-O indivíduo com o tumor mais agressivo apresentava mutação de ponto *BRAF* não *V600E* (p.H542Y), não descrita previamente em CDT, além de mutação no *NRAS* (p.Q61R) em tecidos primário e metastático (ósseo) e mutação do promotor do *TERT* (p.C228T) no tecido metastático.

-Encontrou-se uma nova fusão gênica, *CEP152-BRAF*, ainda não descrita em bancos de dados e na literatura médica sobre CDT metastático, a qual será incluída no panorama das fusões *BRAF* em tumores sólidos.

-Os dados da expressão da proteína PD-L1, do TMB e do MSI nas amostras tumorais pareadas neste grupo de pacientes reforçam o conceito de baixa imunogenicidade atribuída ao CDT, na maioria dos casos.

Em relação à análise de bioinformática para exploração de associações funcionais entre proteínas codificadas por genes relacionados à carcinogênese tireoidiana identificados neste estudo e proteínas fisiologicamente mais expressas na tireoide, descrevemos uma conexão em rede das proteínas *BRAF*, *HRAS*, *NRAS*, *TP53*, *ATM* com proteínas essenciais à fisiologia da tireoide, em especial com a proteína *PAX8*, e desta com as proteínas *TG*, *SLC26A4*, *IYD*, *TPO*, *TSHR*, *FOXO1*.

Nessa análise exploratória, observou-se também uma forte associação da proteína BRAF com as proteínas HRAS, NRAS e NTRK1; da proteína TP53 com as proteínas HRAS, NRAS, MUTYH e ATM; e conexões entre as proteínas NTRK, MUTYH e POLE com proteínas-chave da via da MAP-quinase, como as proteínas RAS.

Esses resultados provêm novas ferramentas para um conhecimento mais aprofundado no estudo da patogênese do câncer diferenciado de tireoide e do processo de metastatização.

REFERÊNCIAS

1. Deng Y, Li H, Wang M, Li N, Tian T, Wu Y, et al. Global Burden of Thyroid Cancer From 1990 to 2017. *JAMA Netw Open*. 2020;3(6):e208759.
2. Kitahara CM, Sosa JA. The changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(11):646-53.
3. Kitahara CM, Sosa JA. Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol*. 2020;16(11):617-8.
4. Kitahara CM, Pfeiffer RM, Sosa JA, Shiels MS. Impact of Overweight and Obesity on US Papillary Thyroid Cancer Incidence Trends (1995-2015). *J Natl Cancer Inst*. 2020;112(8):810-7.
5. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2020* Atlanta: American Cancer Society; 2020 [
6. Incidência de câncer no Brasil . Estimativa 2020 [Internet]. Instituto Nacional do Câncer. 2020.
7. Paulson VA, Rudzinski ER, Hawkins DS. Thyroid Cancer in the Pediatric Population. *Genes (Basel)*. 2019;10(9).
8. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2016; based on November 2018 SEER data submission. National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA. 2019.
9. ASCO Thyroid Cancer: Statistics. [Available from: <https://www.cancer.net/cancer-types/thyroid-cancer/statistics>]. Último acesso em 18 de março de 2021.
10. Chen AY, Davies L. Children and thyroid cancer: Interpreting troubling trends. *Cancer*. 2019;125(14):2359-61.
11. Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet*. 2016;388(10061):2783-95.
12. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1-133.
13. Patel KN, Yip L, Lubitz CC, Grubbs EG, Miller BS, Shen W, et al. The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for the Definitive Surgical Management of Thyroid Disease in Adults. *Ann Surg*. 2020;271(3):e21-e93.
14. Bauer AJ. Molecular Genetics of Thyroid Cancer in Children and Adolescents. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(2):389-403.
15. Dinneen SF, Valimaki MJ, Bergstralh EJ, Goellner JR, Gorman CA, Hay ID. Distant metastases in papillary thyroid carcinoma: 100 cases observed at one institution during 5 decades. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(7):2041-5.
16. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):2892-9.
17. Nixon IJ, Witcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, et al. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 2012;22(9):884-9.
18. Fagin JA, Wells SA, Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(23):2307.
19. Nilubol N, Zhang L, Kebebew E. Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid*. 2013;23(6):695-702.
20. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun*. 2014;5:4846.

21. Wang WC, Zhang XF, Peng J, Li XF, Wang AL, Bie YQ, et al. Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6304701.
22. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):28.
23. Shen S, Vagner S, Robert C. Persistent Cancer Cells: The Deadly Survivors. *Cell*. 2020;183(4):860-74.
24. Chen X, Bu Q, Yan X, Li Y, Yu Q, Zheng H, et al. Genomic Mutations of Primary and Metastatic Lung Adenocarcinoma in Chinese Patients. *J Oncol*. 2020;2020:6615575.
25. Ross C, Szczepanek K, Lee M, Yang H, Qiu T, Sanford JD, et al. The genomic landscape of metastasis in treatment-naïve breast cancer models. *PLoS Genet*. 2020;16(5):e1008743.
26. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med*. 2017;23(6):703-13.
27. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res*. 2009;69(11):4885-93.
28. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(6):1898-907.
29. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(5):672-82.
30. Masoodi T, Siraj AK, Siraj S, Azam S, Qadri Z, Albalawy WN, et al. Whole-Exome Sequencing of Matched Primary and Metastatic Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2020;30(1):42-56.
31. Song E, Song DE, Ahn J, Kim TY, Kim WB, Shong YK, et al. Genetic profile of advanced thyroid cancers in relation to distant metastasis. *Endocr Relat Cancer*. 2020;27(5):285-93.
32. Junqueira LC, Mescher AL. *Endocrine glands. Junqueira's basic histology: text & atlas/Anthony L Mescher. Fourteenth ed: New York [etc.]: McGraw-Hill Medical; 2016. p. 429-32.*
33. Lloyd R, Osamura R, Klöppel G, Rosai J. *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th edn IARC Press. Lyon; 2017.*
34. Cabanillas ME, Ryder M, Jimenez C. Targeted Therapy for Advanced Thyroid Cancer: Kinase Inhibitors and Beyond. *Endocr Rev*. 2019;40(6):1573-604.
35. Bai Y, Kakudo K, Jung CK. Updates in the Pathologic Classification of Thyroid Neoplasms: A Review of the World Health Organization Classification. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2020;35(4):696-715.
36. Lloyd R, Osamura R, Klöppel G, Rosai J. Tumours of the thyroid gland. In: Lloyd R, Osamura R, Klöppel G, Rosai J, editors. *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, 4th edn IARC Press. Fourth ed: Lyon; 2017.*
37. Weinberg RA. The biology and genetics of cells and organisms. *The biology of cancer*. 2nd ed. New York, NY: Garland science; 2013. p. 1-29.
38. Weinberg RA. *The biology of cancer: Garland Science; 2013.*
39. Pon JR, Marra MA. Driver and passenger mutations in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:25-50.
40. Weinberg RA. Growth factors, receptors, and cancer. *The biology of cancer*. 2nd ed. New York, NY: Garland science; 2013. p. 131-74.
41. Yakushina VD, Lerner LV, Lavrov AV. Gene Fusions in Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2018;28(2):158-67.
42. Lauer S, Gresham D. An evolving view of copy number variants. *Curr Genet*. 2019;65(6):1287-95.
43. Luzón-Toro B, Fernández RM, Villalba-Benito L, Torroglosa A, Antiñolo G, Borrego S. Influencers on Thyroid Cancer Onset: Molecular Genetic Basis. *Genes (Basel)*. 2019;10(11).
44. Catalano MG, Fortunati N, Boccuzzi G. Epigenetics modifications and therapeutic prospects in human thyroid cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:40.

45. Ahmed AA, Essa MEA. Potential of epigenetic events in human thyroid cancer. *Cancer Genet.* 2019;239:13-21.
46. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med.* 2002;347(19):1512-20.
47. Feero WG, Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine--an updated primer. *N Engl J Med.* 2010;362(21):2001-11.
48. Asa SL, Ezzat S. The epigenetic landscape of differentiated thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;469:3-10.
49. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(3):184-99.
50. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014;159(3):676-90.
51. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(10):569-80.
52. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol.* 2012;41(5):1561-9.
53. Weinberg RA. *Eternal life: cell immortalization and tumorigenesis. The biology of cancer.* 2nd ed. New York, NY: Garland science; 2013. p. 391-437.
54. Shay JW, Wright WE. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3819-25.
55. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhaes A, Costa BM, Mancini A, Song JS, et al. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res.* 2016;14(4):315-23.
56. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, et al. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):603-10.
57. Liu R, Xing M. TERT promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2016;23(3):R143-55.
58. Xie H, Liu T, Wang N, Björnhagen V, Höög A, Larsson C, et al. TERT promoter mutations and gene amplification: promoting TERT expression in Merkel cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(20):10048-57.
59. Paulsson JO, Mu N, Shabo I, Wang N, Zedenius J, Larsson C, et al. TERT aberrancies: a screening tool for malignancy in follicular thyroid tumours. *Endocr Relat Cancer.* 2018;25(7):723-33.
60. Panebianco F, Nikitski AV, Nikiforova MN, Nikiforov YE. Spectrum of TERT promoter mutations and mechanisms of activation in thyroid cancer. *Cancer Med.* 2019;8(13):5831-9.
61. Randolph GW, Duh QY, Heller KS, LiVolsi VA, Mandel SJ, Steward DL, et al. The prognostic significance of nodal metastases from papillary thyroid carcinoma can be stratified based on the size and number of metastatic lymph nodes, as well as the presence of extranodal extension. *Thyroid.* 2012;22(11):1144-52.
62. Van Nostrand D. Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Time to Update the Classifications. *Thyroid.* 2018;28(9):1083-93.
63. Tuttle RM, Ahuja S, Avram AM, Bernet VJ, Bourguet P, Daniels GH, et al. Controversies, Consensus, and Collaboration in the Use of (131)I Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: A Joint Statement from the American Thyroid Association, the European Association of Nuclear Medicine, the Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, and the European Thyroid Association. *Thyroid.* 2019;29(4):461-70.
64. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-47.
65. Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M, et al. Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PLoS One.* 2010;5(5):e10770.
66. Hedberg ML, Goh G, Chiosea SI, Bauman JE, Freilino ML, Zeng Y, et al. Genetic landscape of metastatic and recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2016;126(4):1606.

67. Becerra MF, Reznik E, Redzematovic A, Tennenbaum DM, Kashan M, Ghanaat M, et al. Comparative Genomic Profiling of Matched Primary and Metastatic Tumors in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus*. 2018;4(6):986-94.
68. Schrijver W, Selenica P, Lee JY, Ng CKY, Burke KA, Piscuoglio S, et al. Mutation Profiling of Key Cancer Genes in Primary Breast Cancers and Their Distant Metastases. *Cancer Res*. 2018;78(12):3112-21.
69. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39(1):1-10.
70. Emens LA, Ascierto PA, Darcy PK, Demaria S, Eggermont AMM, Redmond WL, et al. Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *Eur J Cancer*. 2017;81:116-29.
71. Antonelli A, Ferrari SM, Fallahi P. Current and future immunotherapies for thyroid cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2018;18(2):149-59.
72. Liotti F, Prevede N, Vecchio G, Melillo RM. Recent advances in understanding immune phenotypes of thyroid carcinomas: prognostication and emerging therapies. *F1000Res*. 2019;8.
73. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
74. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
75. Weinberg RA. Crowd control: tumor immunology and immunotherapy. *The biology of cancer*. 2nd ed. New York, NY: Garland science; 2013. p. 723-96.
76. Maccalli C, Rasul KI, Elawad M, Ferrone S. The role of cancer stem cells in the modulation of anti-tumor immune responses. *Semin Cancer Biol*. 2018;53:189-200.
77. Khosravi N, Mokhtarzadeh A, Baghbanzadeh A, Hajiasgharzadeh K, Shahgoli VK, Hemmat N, et al. Immune checkpoints in tumor microenvironment and their relevance to the development of cancer stem cells. *Life Sci*. 2020;256:118005.
78. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.
79. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(4):847-56.
80. Walk EE, Yohe SL, Beckman A, Schade A, Zutter MM, Pfeifer J, et al. The Cancer Immunotherapy Biomarker Testing Landscape. *Arch Pathol Lab Med*. 2020;144(6):706-24.
81. Ulisse S, Tuccilli C, Sorrenti S, Antonelli A, Fallahi P, D'Armiento E, et al. PD-1 Ligand Expression in Epithelial Thyroid Cancers: Potential Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(6).
82. Incorvaia L, Fanale D, Badalamenti G, Barraco N, Bono M, Corsini LR, et al. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) as a Predictive Biomarker for Pembrolizumab Therapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC). *Adv Ther*. 2019;36(10):2600-17.
83. Ahn S, Kim TH, Kim SW, Ki CS, Jang HW, Kim JS, et al. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(2):97-106.
84. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med*. 2018;7(3):746-56.
85. de la Chapelle A, Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3380-7.
86. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med*. 2016;22(11):1342-50.
87. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):34.

88. Abril-Rodriguez G, Ribas A. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell*. 2017;31(6):848-859.
89. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*. 2016;7:550.
90. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59.
91. Phillips T, Simmons P, Inzunza HD, Cogswell J, Novotny J, Jr., Taylor C, et al. Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23(8):541-9.
92. Meléndez B, Van Campenhout C, Rorive S, Remmelink M, Salmon I, D'Haene N. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Translational Lung Cancer Research*. 2018;7(6):661-7.
93. Li K, Luo H, Huang L, Luo H, Zhu X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*. 2020;20:16.
94. Yi-Qiang F, Mei W, Feng G, Zhuang J, Gang T, ZHANG Y-J. Recent development of droplet microfluidics in digital polymerase chain reaction. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2016;44(8):1300-7.
95. Kanagal-Shamanna R. Digital PCR: Principles and Applications. *Methods Mol Biol*. 2016;1392:43-50.
96. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
97. College of American Pathologists [Available from: www.cap.org]. Último acesso em 18 de março de 2021.
98. Thermo Fisher Scientific Inc Waltham, MA – Estados Unidos [Available from: https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/quantstudio-qpcr-product-portfolio.html?gclid=EAlalQobChMIsqKBvJqN7wIVFICRCh2ovwVaEAAYASAAEgIQo_D_BwE&cid=gsd_pcr_sbu_r01_co_cp1163_pjt1418_gsd00000_Ose_gaw_bt_awa_10033082&s_kwcid=ALl3652!3!73642306332!b!!g!!quantstudio&ef_id=EAlalQobChMIsqKBvJqN7wIVFICRCh2ovwVaEAAYASAAEgIQo_D_BwE:G:s&s_kwcid=ALl3652!3!73642306332!b!!g!!quantstudio]. Último acesso em 18 de março de 2021.
99. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
100. Polymorphism Phenotyping v2 [Available from: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>].
101. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-D13. Último acesso em 18 de março de 2021.
102. STRING [Available from: <https://string-db.org/cgi/input?sessionId=bfV3wj6c3dkf>]. Último acesso em 18 de março de 2021.
103. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419.
104. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons; 2017.
105. Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, Hartmaier R, Deaver KE, Davis S, et al. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res*. 2018;24(13):3059-68.
106. Xing M. Genetic-guided Risk Assessment and Management of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2019;48(1):109-24.

107. 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(7):1454-7.
108. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene.* 2003;22(41):6455-7.
109. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6373-9.
110. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Shong YK, Kim TY, Viola D, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(1):42-50.
111. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *Jama.* 2013;309(14):1493-501.
112. Chakravarty D, Gao J, Phillips S, Kundra R, Zhang H, Wang J, et al. OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base. *JCO Precision Oncology.* 2017(1):1-16.
113. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-D7.
114. UK: Sanger Institute - cancer.sanger.ac.uk. Último acesso em 18 de março de 2021.
115. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.
116. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):pl1.
117. Song YS, Lim JA, Choi H, Won JK, Moon JH, Cho SW, et al. Prognostic effects of TERT promoter mutations are enhanced by coexistence with BRAF or RAS mutations and strengthen the risk prediction by the ATA or TNM staging system in differentiated thyroid cancer patients. *Cancer.* 2016;122(9):1370-9.
118. Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, et al. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of MED12 and RBM10 as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res.* 2017;23(19):5970-80.
119. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(12):731-47.
120. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731-9.
121. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity.* 2018;48(4):812-30 e14.
122. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
123. Weinberg RA. p53 and apoptosis: master guardian and executor. *The biology of cancer.* 2nd ed. New York, NY: Garland science; 2013. p. 331-90.
124. Jin MH, Oh DY. ATM in DNA repair in cancer. *Pharmacol Ther.* 2019;203:107391.
125. Suzuki K, Saenko V, Yamashita S, Mitsutake N. Radiation-Induced Thyroid Cancers: Overview of Molecular Signatures. *Cancers (Basel).* 2019;11(9).
126. Christophe D. The control of thyroid-specific gene expression: what exactly have we learned as yet? *Mol Cell Endocrinol.* 2004;223(1-2):1-4.
127. Al-Suhaimi EA, Al-Khater K. Functions of stem cells of thyroid glands in health and disease. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(2):187-95.
128. Casamassimi A, Miano MG, Porcellini A, De Vita G, de Nigris F, Zannini M, et al. p53 genes mutated in the DNA binding site or at a specific COOH-terminal site exert divergent effects on thyroid cell growth and differentiation. *Cancer Res.* 1998;58(13):2888-94.
129. Bain G, Romanow WJ, Albers K, Havran WL, Murre C. Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins. *J Exp Med.* 1999;189(2):289-300.

130. Nicolas N, Moshous D, Cavazzana-Calvo M, Papadopoulo D, de Chasseval R, Le Deist F, et al. A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J Exp Med.* 1998;188(4):627-34.

131. Meek K, Xu Y, Bailie C, Yu K, Neal JA. The ATM Kinase Restrains Joining of Both VDJ Signal and Coding Ends. *J Immunol.* 2016;197(8):3165-74.

ANEXO A –**APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – INICIAL**

**MedStar Health
Research Institute**

6525 Belcrest Road
Suite 700
Hyattsville, MD 20782
301-560-7300 PHONE
301-560-7348 FAX
MedStarResearch.org

**Approval Notice
Initial Review**

28-Jun-2017

MedStar Washington Hospital Center
110 Irving Street, NW, Suite 2A-72
Washington, DC 20010

Protocol Number: **2017-144**

PI Name: **Kenneth Burman MD**

Protocol Title: **Clinical, Pathological and Molecular Profiling of Radioiodine-Avid versus
Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer**

Dear Kenneth Burman MD,

The above-referenced **Initial Review** submission was reviewed by **IRB # 3 Washington** in accordance with expedited review procedures on **10-Jun-2017**.

The IRB has approved the submission. You can begin research activities. **The approval is valid from 10-Jun-2017 through 09-Jun-2018**. Any modifications to the IRB-approved protocol and other supporting documents must be reviewed and approved by the IRB prior to implementation.

If the study will continue beyond **09-Jun-2018**, please submit a continuation request form forty-five (45) days prior to **09-Jun-2018** to allow the IRB sufficient time to review and approve the request.

If you have any questions, please contact me at 301-560-7339.

Thank you,

Crystal Bland
Office of Research Integrity

Enclosure: IRB Stamped HIPAA Waiver

Knowledge and Compassion
Focused on You

ANEXO B –
APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA -
CONTINUIDADE



APPROVAL

June 12, 2019

Kenneth Burman
kenneth.d.burman@medstar.net

Dear Kenneth Burman:

On 6/12/2019, the IRB reviewed the following submission:

Type of Review:	MODCR
Title:	Clinical, Pathological and Molecular Profiling of Radioiodine-Avid versus Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer
Investigator:	Kenneth Burman
IRB ID:	MODCR00000561
Review Type:	Non-Committee
Review Level:	Expedited
Review Category:	(3) Noninvasive biological specimens
Funding:	Name: Self-Funded
Documents Reviewed:	Category: IRB Protocol: <ul style="list-style-type: none"> • Current protocol Category: Consent Form: <ul style="list-style-type: none"> • IC form_clean_06.10.2019 Category: Any Other Study Related Documents: <ul style="list-style-type: none"> • HIPAA authorization_clean_06.10.2019

The IRB has approved the submission. **The approval is valid from 6/6/2019 through 6/5/2020.** Any modifications to the IRB-approved protocol and other supporting documents must be reviewed and approved by the IRB prior to implementation.

If the study will continue beyond 6/5/2020, please submit a continuation request form at least thirty (30) days prior to 6/5/2020 to allow the IRB sufficient time to review and approve the request.

In conducting this protocol, you are required to follow the requirements listed in the Investigator Manual (HRP-103), which can be found by navigating to the IRB Library within the IRB system.

Sincerely,

Amy Harchelroad

ANEXO C –

LISTA DE GENES PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

Next-Generation Sequencing Gene List

Next-Generation Sequencing – Genomic Stability Testing (DNA)									
MSI					TML				
Next-Generation Sequencing – Point Mutations and Indels (DNA)									
AB11	BRD4	CRLF2	FOXO4	HOX11	KLF4	MUC1	PAK3	RHOH	TAL2
ABL1	BTG1	DOB2	FSTL3	HOX13	KLF2	MUTYH	RAT2	RNF213	TBL1XR1
ACKR3	BTX	DOF3	GATA1	HOX11	LASP1	MYCL(MYCL1)	RAK3	RPL10	TCEA1
AKT1	C15orf55	DNM2	GATA2	HOX13	LMO1	NBN	PDE4DIP	SEPT5	TCL1A
AMER1 (FAM123B)	CBLC	DNMT3A	GNA11	HRA5	LMO2	NDRG1	PHF6	SEPT6	TERF
AR	CD79B	EFA2	GPC3	IKBKE	MAFB	NKX2-1	PHOX2B	SFPQ	TFE3
ARAF	CDH1	ELF4	HEY1	INBBA	MAX	NONO	PIK3G5	SLC45A3	TFPT
ATP2B3	CDK12	ELN	HIST1H3B	INS2	MECOM	NOTCH1	PLAG1	SMARCA4	THRAP3
ATRX	CDKN2B	ERCC1	HIST1H4I	JUN	MED12	NRAS	PMS1	SOCS1	TLX3
BCL11B	CDKN2C	ETV4	HLF	KAT5A (MYST3)	NKX1	NUMA1	POU5F1	SOX2	TMPRSS2
BCL2	CEBPA	FAM64C	HMG20A	KAT5B	NLIT1	NUTM2B	PPP2R1A	SPOP	LIBR5
BCL2L2	CHCHD7	FAMCF	HNF1A	KCNJ5	MN1	OLIG2	PRF1	SRC	VHL
BCOR	CHOT3	FEV	HOKA1	KDM5C	MPL	OMD	PRKDC	SSX1	WAS
BCORL1	COL1A1	FOXL2	HOKA13	KDMAA	MSH	P2RY8	RAD21	STAG2	ZBTB16
BRD3	CDK6C	FOXO3	HOKA9	KDSR	MITF1	PAFAH1B2	BECOL4	TAL1	ZRSR2
Next-Generation Sequencing – Point Mutations, Indels and Copy Number Variations (DNA)									
ABL2	BRC2	COPB1	ESR1	FUS	KIT	MYB	FEI1	RUNX1	TFG
ACSL3	BRP1	CREB1	ETV1	GAT3	KLHL6	MYC	PICALM	RUNX1T1	TFRC
ACSL6	BUB1B	CREB3L1	ETV5	GATA3	KMT2A (MLL)	MYCN	PIK3CA	SBS2	TGFB2
AF1	C11orf30 (EMSY)	CREB3L2	ETV6	GED4 (C17orf39)	KMT2C (MLL3)	MYD88	PIK3R1	SDC4	TLX1
AF3	C2orf44	CREBBP	EWSR1	GMP5	KMT2D (MLL2)	MYH11	PIK3R2	SDHAF2	TNFRAP3
AF4	CACHA1D	CRKL	EXT1	GNA13	KRAS	MYH9	PIM1	SDHB	TNFRSF14
AKAP9	CALR	CRIC1	EXT2	GNAQ	KTNN1	NACA	PML	SDHC	TNFRSF17
AKT2	CAMTA1	CRIC3	EZH2	GNAS	LCK	NCO1P5D	PMS2	SDHD	TOP1
AKT3	CAMT1	CSF1R	EZR	GOLGA5	LCP1	NCOA1	POLE	SEPT9	TFS3
ALDH2	CARD11	CSF3R	FANCA	GOPC	LGR5	NCOA2	POT1	SET	TPM3
ALK	CARS	CTCF	FANCC	GPHN	LHFP	NCOA4	POU2AF1	SETBP1	TPM4
APC	CASC5	CTLA4	FANCD2	GPR124	LIFR	NF1	PPARG	SETD2	TPR
ARFRP1	CASP8	CTNNA1	FANCE	GRIN2A	LPP	NF2	PRCC	SFB1	TRAF7
ARHGAP26	CBFA2T3	CTNNA1	FANCG	GSK3B	LRIG3	NFE2L2	PRDM1	SH2B3	TRIM26
ARHGAP12	CBFB	CYLD	FANCL	H3F3A	LRF1B	NFB	PRDM16	SH3GL1	TRIM27
ARID1A	CBL	CYP26	FAS	H3F3B	LYL1	NFKB2	PRKAR1A	SLC34A2	TRIM3
ARID2	CBLB	DAXC	FBXO11	HEPPL1	MAF	NFKB1A	PRRX1	SMAA2	TRIP11
ARNT	CCDG5	DOR2	FBXW7	HGF	MALT1	NRN	PSP1	SMAA4	TRRAP
ASPSR1	CCNB1IP1	DOCK10	FCRL4	HIP1	MAML2	NOTCH2	PIC1	SMARCB1	TSCI
ASXL1	COND1	DOCK5	FGF10	HMG1	MAP2K1	NPM1	PTEN	SMARCE1	TSC2
ATF1	COND2	DOCK6	FGF14	HMG2	MAP2K2	NRAA3	PTFN1	SMD	TSHR
ATC	COND3	DEK	FGF19	HNR1PA2B1	MAP2K4	NSD1	PTPRC	SND29	TTL
ATM	CDNE1	DICER1	FGF23	HOOA3	MAP3K1	NTSC2	RABEP1	SOX10	U2AF1
ATP11A1	CD224 (FDL1)	DOT1L	FGF3	HSP90AA1	NCL1	NTRK1	RAC1	SPECC1	USP6
ATR	CD74	EBF1	FGF4	HSP90AB1	NCOA2	NTRK2	RAD50	SPEN	VEGFA
AURKA	CD79A	ECT2L	FGF6	IDH1	MDM4	NTRK3	RAD51	SRGAP3	VEGFB
AURKB	CD73	EGFR	FGFR1	IDH2	MDM2	NUP214	RAD51B	SRSF2	VTT1A
AXIN1	CDH11	ELK4	FGFR10P	IGF1R	NF2B	NUP98	RAF1	SRSF3	WHSC1
AXL	CDK4	ELL	FGFR2	IKZF1	NEW1	NUP98	RALGDS	SSI1	WHSC1L1
BAP1	CDK6	EML4	FGFR3	IL2	MET (cMET)	NUTM1	RAHBP17	SSI1L1	WF1
BAR1	CDK8	EP300	FGFR4	IL21R	MTF	PALB2	RAP1GDS1	STAT3	WIF3
BCL10	CDKN1B	EPHA3	FH	IL6ST	MLF1	PAX3	RARA	STAT4	WRN
BCL11A	CDKN2A	EPHA5	FHIT	IL7R	NLH1	PAX5	RB1	STAT5B	WT1
BCL2L1	CDK7	EPHB1	FIP1L1	IRF4	NLIT1	PAX7	RBM15	STIL	WWTR1
BCL3	CHEK1	EP515	FLOX	ITK	NLIT10	PBRM1	REL	STK11	XPA
BCL6	CHEK2	ERBB2 (HER2)	FU1	JAK1	NLIT3	PRK1	RET	SUJF1	XPC
BCL7A	CHIC2	ERBB3 (HER3)	FU1	JAK2	NLIT4	PCMI	BICTOR	SUZ12	XPO1
BCL9	CHN1	ERBB4 (HER4)	FU3	JAK3	NLIT6	PCSK7	RMD2	SYK	YWHAE
BCR	CIC	ERIC1	FU4	JAZF1	NRX1	PDCD1 (PD1)	RNF43	TAF15	ZMYM2
BRC3	CITR	ERCC2	FNBP1	KDMAA	NRE11A	PDCD1LG2 (PDL2)	ROSI	TCF12	ZNF217
BLM	CLP1	ERCC3	FOXA1	NDR (VEGFR2)	MSH2	PDGFB	RPL22	TCF3	ZNF331
BMP1A	CITC	ERCC4	FOXO1	NEAP1	MSH6	PDGFRA	RPL5	TCF7L2	ZNF384
BRAF	CITCL1	ERCC5	FOXPI	NAA1549	MSI	PDGFRB	RPN1	TET1	ZNF521
BRC1	CNBP	ERG	FUBP1	NF5B	MTOR	PDK1	RPTOR	TET2	ZNF703
	CNTRL							TREB	
Next-Generation Sequencing – Gene Fusions (RNA)								Variant Transcripts (RNA)	
AKT3	EGFR	ESR1	MAST1	NOTCH2	PDGFRA	RAF1	TRE3	EGFR vII	MET Exon 14 skipping
ALK	EWSR1	ETV1	MAST2	NRG1	PDGFRB	RELA	TREB		
ARHGAP26	FGFR	ETV4	MET	HTRK1	PIK3CA	RET	THADA		
AXL	FGFR1	ETV5	MSMB	HTRK2	RKN1	ROSI	TMPRSS2		
BRAF	FGFR2	ETV6	MUSK	HTRK3	PRRG	RSPO2			
BRD3	FGFR3	INSR	MYB	HUMBL	PRNCA	RSPO3			
BRD4	ERG	MAML2	NOTCH1	NUTM1	PRNCA	TERF			

ANEXO D

EXEMPLO DE LAUDO DE SEQUENCIAMENTO GENÉTICO



Patient

Name: BURMAN, MWHC DTC 12
Date of Birth: 04/16/2019
Sex: Male
Case Number: TN19-113236
Diagnosis: Papillary carcinoma of thyroid

Specimen Information

Primary Tumor Site: Thyroid, NOS
Specimen Site: Thyroid, NOS
Specimen ID: WS19-02545-B4
Specimen Collected: 20-Feb-2019
Completion of Testing: 05-May-2019

Ordered By

Kenneth D. Burman, MD
MedStar - Washington Hospital Center
 110 Irving Street NW
 Washington, DC 20010 USA
 (202) 877-2300

High Impact Results

BIOMARKER	METHOD	RESULT	THERAPY ASSOCIATION	BIOMARKER LEVEL*
NTRK1	RNA-Seq	Fusion Detected	BENEFIT larotrectinib	Level 1
BRAF	NGS	Mutation Not Detected	LACK OF BENEFIT vemurafenib	Level 2

* Biomarker reporting classification: Level 1 - highest level of clinical evidence and/or biomarker association included on the drug label; Level 2 - strong evidence of clinical significance and is endorsed by standard clinical guidelines; Level 3 - potential clinical significance (3A - evidence exists in patient's tumor type, 3B - evidence exists in another tumor type)

Important Note

This patient has a potential NQ-MATCH Trial-eligible result. Please see Clinical Trial see page 6

A TPR-NTRK1 gene fusion was detected in this tumor. This fusion has been previously reported in several different tumors (Greco 1997 Genes Chromosomes Cancer 19:112; Agaram 2016 Am J Surg Pathol 40:1407).

Additional Results

CANCER TYPE RELEVANT BIOMARKERS		
Biomarker	Method	Result
MSI	FA	Stable
	NGS	Indeterminate
NTRK2	RNA-Seq	Fusion Not Detected
NTRK3	RNA-Seq	Fusion Not Detected
Tumor Mutational Burden		Intermediate 9 Mutations/Mb
NRAS	NGS	Mutation Not Detected

CANCER TYPE RELEVANT BIOMARKERS (cont.)		
Biomarker	Method	Result
RET	NGS	Mutation Not Detected
	RNA-Seq	Fusion Not Detected
OTHER FINDINGS (for use in clinical decisions)		
Biomarker	Method	Result
PD-L1	SP142 IHC	Negative 0
BRAF	RNA-Seq	Fusion Not Detected

The selection of any, all, or none of the matched therapies resides solely with the discretion of the treating physician. Decisions on patient care and treatment must be based on the independent medical judgment of the treating physician, taking into consideration all available information concerning the patient's condition, the FDA prescribing information for any therapeutic, and in accordance with the applicable standard of care. Whether or not a particular patient will benefit from a selected therapy is based on many factors and can vary significantly. All trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

4610 South 44th Place, Suite 100 - Phoenix, AZ 85040 - (888) 979-8669 - Fax: (866) 479-4925

CLIA 03D1019490 - CAP 7195577 - ISO 15189:2012 - Zoran Gatalica, MD, DSc, Medical Director - ©2019 Caris Life Sciences. All rights reserved.

Biomarker Results

This summary includes biomarkers most commonly associated with cancer. Complete details of all biomarkers tested can be found in the Appendix.

GENOMIC SIGNATURES		
Biomarker	Method	Result
Microsatellite Instability (MSI)	FA	Stable
Microsatellite Instability (MSI)	NGS	Indeterminate
Tumor Mutational Burden (TMB)	NGS	<p>Result: Intermediate</p>

GENES TESTED WITH MUTATIONS/ALTERATIONS						
Gene	Method	Variant Interpretation	Protein Alteration	Exon	DNA Alteration	Variant Frequency*
NTRK1	RNA-Seq	Fusion Detected	NTRK1-TPR	10	-	-

Unclassified alterations for DNA sequencing can be found in the Appendix. Unclassified alterations for RNA Whole Transcriptome Sequencing are available on request. Formal nucleotide nomenclature and gene reference sequences can be found in the Appendix of this report.

Other Findings

IMMUNOHISTOCHEMISTRY (IHC)			
Biomarker	Result	Biomarker	Result
PD-L1 (SP142)	Negative [0]		

GENES TESTED WITH INDETERMINATE* RESULTS BY NGS									
ARID1A	ASXL1	ATRX	DNMT3A	FANCE	FLT3	KDM5C	PTCH1	TERT	

* Genes in this table were ruled indeterminate due to low coverage for some or all exons. Please see Appendix for a complete list of indeterminate genes.

Additional results continued on the next page >

PATIENT: BURMAN, MWHC DTC 12 (16-APR-2019) **TN19-113240** **PHYSICIAN:** KENNETH D. BURMAN, MD

APÊNDICE A –

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

IRB number: <u>2017-144</u>	Clinical Site IC Version: 1
Project Title: Clinical, Pathological and Molecular Profiling of Radioiodine Avid versus Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer	
Principal Investigator: Dr. Kenneth Burman	Institution: MWHC

MedStar Health Research Institute Informed Consent for Clinical Research

INTRODUCTION

We invite you to take part in a research study called “Clinical, Pathological and Molecular Profiling of Radioiodine Avid versus Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer”. You were selected as a possible participant in this study because you have radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer and available tumor tissues for analysis. Please take your time to read this form, ask any questions you may have and make your decision. We encourage you to discuss your decision with your family, friends and your doctors.

WHAT IS THE PURPOSE OF THIS STUDY?

This study is being done to study the natural history of thyroid cancer and its causes and treatments. We want to compare the molecular profile of the primary thyroid tumor and its metastatic sites. We also want to correlate the molecular profile of the metastases with response to different therapies.

WHAT ELSE SHOULD I KNOW ABOUT THIS RESEARCH STUDY?

It is important that you read and understand several points that apply to all who take part in our studies:

- Taking part in the study is entirely voluntary and refusal to participate will not affect any rights or benefits you normally have;
- We will only analyze your tumor tissues with your previous authorization. You have the right to withdraw access to these tissues at any time;
- You may or may not benefit from taking part in the study, but knowledge may be gained from your participation that may help others; and
- You may stop being in the study at any time without any penalty or losing any of the benefits you would have normally received.

The nature of the study, the benefits, risks, discomforts and other information about the study are discussed further below. If any new information is learned, at any time during the research, which might affect your participation in the study, we will tell you. We urge you to ask any questions you have about this study with the staff members who explain it to you and with your own advisors prior to agreeing to participate.

WHO IS IN CHARGE OF THIS STUDY?

The investigator is Dr. Kenneth Burman. The research is being sponsored by the investigator.

WHO CANNOT PARTICIPATE IN THIS STUDY?

You cannot be in this study if any of the following apply to you:

- If you have medullary thyroid cancer
- If we do not have detailed information about your previous treatments of thyroid cancer.
- If there is no tumor tissue available for molecular analysis.

HOW MANY PEOPLE WILL TAKE PART IN THE STUDY?

About 20 people will take part in this study; all of them will be recruited at this site.

WHAT HAPPENS IF I AGREE TO BE IN THE STUDY?

If you agree to be in this study, you will have the following tests and procedures:

- Analysis of tumor tissues: We will perform molecular analysis of both the primary tumor (thyroid) and one metastatic tumor. For this purpose, we will use a commercial panel of 592 genes from Caris® Life Sciences to perform Next Generation Sequencing (NGS) of paired tumors.

The procedures/treatments in this study that are considered experimental/investigational are:

- The following procedures are part of the research study and would not normally be done as part of your routine care: The molecular analysis of the tumors from patients with differentiated thyroid cancer who do not respond anymore to radioiodine, so called radioiodine-refractory.
- The following procedures would normally be done as part of your routine care whether or not you are enrolled in the study: none

HOW LONG WILL I BE IN THE STUDY?

We think you will be in the study for a long-term follow-up. After the molecular analysis of the tumors, the results will be shared with your treating physician, who will communicate them to you as part of your usual care. The results will be added to your medical records and will be analyzed within one (1) month. The data collected from your chart are going to be kept in a secure network and are going to be password-protected and encrypted, for as long as this study is active.

The investigator may decide to take you off this study if it is believed to be in your best interest, you fail to follow instructions, new information becomes known about the safety of the study, or for other reasons the investigator or sponsor believes are important.

You can stop participating at any time. However, if you decide to stop participating in the study, we encourage you to talk to the investigator and your regular doctor first so they can help you decide what other options may be best for your medical care once you are off study.

If you suddenly withdraw from the study, we may not be able to use any of the information gathered from your participation.

WHAT ARE THE RISKS AND SIDE EFFECTS OF THIS STUDY?

If you decide to participate in this study, you should know there may be risks. You should discuss these with the investigator and/or your regular doctor and you are encouraged to speak with your family and friends about any potential risks before making a decision.

As part of this study, you will be asked to participate in genetic testing of genes related to the development and progression of thyroid cancer.

RISKS OF GENETIC TESTING

This research includes genetic testing. Even without your name or other identifiers, your genetic information is unique to you. The researchers believe the chance that someone will identify you is very small, but the risk may change in the future as people come up with new ways of tracing information.

There can be a risk in knowing genetic information. New health information about inherited traits that might affect you or your blood relatives could be found during a research study. Even though your genes are unique, you share some of the same genes with your blood relatives. Although we are not able to know all of the risks from taking part in research on inherited traits, we believe that the risks to you and your family are very low, because your samples will be coded. Research results will not be returned to you or your doctor.

Very rarely health or genetic information could be misused by employers, insurance companies, and others. For example, it could make it harder for you to get or keep a job or insurance, or life insurance companies may charge a higher rate based on this information. We believe the chance these things will happen is very small, but we cannot make guarantees.

A federal law (Genetic Information Non-Discrimination Act, GINA) helps reduce the risk from health insurance or employment discrimination. The law does not include other types of misuse by life insurance or long-term care insurance. If you want to learn more about GINA, you can find information about it on the internet or ask the study staff.

ARE THERE ANY BENEFITS TO TAKING PART IN THE STUDY?

This study is not designed to provide direct benefits to any participants. You may or may not get any direct benefit from being in this study. We cannot promise that you will experience any benefits from participating in this study. We hope the information learned from this study will benefit others in the future.

The main benefit of this study is the comparison of the molecular profile of the original tumor and its metastases. The results of the molecular testing can be potentially used to choose the best available treatment for your type of tumor.

WHAT OTHER OPTIONS ARE THERE?

Instead of being in this study, you have these options:

- You always have the option to not be in this study and continue your usual medical care.

WHAT ABOUT CONFIDENTIALITY?

Your personal health information (PHI) will be kept private to the extent allowed by law. Study records identifying you will be kept confidential and will not be made publicly available. You will not be identified by name in any publications resulting from this study. You will be asked to sign a separate form that will give permission to the investigator, representatives from government agencies, including the Food and Drug Administration (FDA), institutional review boards, the sponsor and/or the sponsor's representative(s), and certain other people, agencies or entities, to look at and review the records related to this study including your personal health information and the information discovered during this study. This separate form explains in greater detail who will have access to your records, what type of information will be reviewed and for what purposes, how long your permission for others to review and release your records will last, and how you may withdraw your permission if necessary. If you do not wish to sign this permission form you will not be allowed to participate in this study.

WILL I BE PAID FOR PARTICIPATING IN THIS STUDY?

You will not be paid for being in this study.

Materials and information obtained from you in this research may be used for commercial or non-commercial purposes. It is the policy of MedStar Washington Hospital Center, MedStar Health Research Institute, MedStar Health, Inc. and its affiliated entities not to provide financial compensation to you should this occur.

WHAT ARE THE COSTS?

You do not have to pay anything to be in this study. However, if taking part in this study leads to procedures or care not included in the study, it may lead to added costs for you or your insurance company. You will not be charged for study-specific molecular tests that are part of this research study.

However, you, or your insurance company, will be charged for any other portion of your care that is considered standard of care. You may be responsible for any co-payments and deductibles that are standard for your insurance coverage. This may include: the blood draw and any other lab tests that are not a part of this research study.

WHAT IF I'M INJURED OR BECOME ILL DURING THE STUDY?

We will make every effort to prevent injuries or illness from occurring while you are in the study. In the case of an injury, illness, or other harm occurring to you during, or resulting from, the study, you should seek medical treatment. You should also contact the study doctor as soon as possible. You or your insurance company will be charged for any continuing medical care and/or hospitalization that are not a part of the study.

No funds have been set aside, by MedStar Washington Hospital Center, the MedStar Health Research Institute, MedStar Health, or its affiliated entities to repay you in case of injury, illness, or other harm occurring during, or resulting from the study, and their current policies do not provide for payments for lost wages, cost of pain and suffering, or additional expenses. By agreeing to this you do not give up your rights to seek compensation in the courts.

WHAT CONSULTATIVE OR FINANCIAL INTERESTS ARE INVOLVED IN THIS STUDY?

For your information, the principal investigator of this study, Dr. Kenneth Burman, do not have a reportable financial interest in this study.

WHAT ARE MY RIGHTS AS A PARTICIPANT?

- You have the right to be told about the nature and purpose of the study;
- You have the right to be given an explanation of exactly what will be done in the study and given a description of potential risks, discomforts, or benefits that can reasonably be expected;
- You have the right to be informed of any appropriate alternatives to the study, including, if appropriate, any drugs or devices that might help you, along with their potential risks, discomforts and benefits;
- You have the right to ask any questions you may have about the study;
- You have the right to decide whether or not to be in the study without anyone misleading or deceiving you; and
- You have the right to receive a copy of this consent form.

By signing this form, you will not give up any legal rights you may have as a research participant. You may choose not to take part in or leave the study at any time. If you choose to not take part in or to leave the study, your regular care will not be affected, and you will not lose any of the benefits you would have received normally. We will tell you about new information that may affect your health, welfare, or willingness to be in this study.

WHO DO I CALL IF I HAVE QUESTIONS OR PROBLEMS?

For questions about the study or a research-related injury, contact the investigator, Dr. Kenneth Burman at 202-877-6563. If you are having a medical emergency, you should call 911 or go directly to the nearest emergency room.

Address: MedStar Health Research Institute
6525 Belcrest Rd.
Suite 700
Hyattsville, MD 20782

Telephone: (301) 560-2912
Toll Free: (800) 793-7175
Fax: (301) 560-7336

THIS SPACE INTENTIONALLY LEFT BLANK

SIGNATURES

STATEMENT OF CONSENT

I have been informed about this study's purpose, procedures, possible benefits and risks, and I have received a copy of this consent. I have been given the opportunity to ask questions before I sign, and I have been told that I can ask other questions at any time. I voluntarily agree to be in this study. I am free to stop being in the study at any time without need to justify my decision and if I stop being in the study, I understand it will not in any way affect my future treatment or medical management. I agree to cooperate with Dr. Kenneth Burman and the research staff and to tell them immediately if I experience any unexpected or unusual symptoms.

Participants signature _____
Date of Signature

Printed Name of Participant _____

Signature of Legally Authorized Representative (if appropriate) _____
Date of Signature

Printed Name of Legally Authorized Representative: _____

Relationship of Legally Authorized Representative to Participant: _____

PERSON EXPLAINING CONSENT

I have explained the purpose, the procedures, the possible benefits and risks that are involved in this research study. Any questions that have been raised have been answered to the individual's satisfaction.

Signature of Person Obtaining Consent _____
Date of Signature

Printed Name of Individual Obtaining Consent: _____

STATEMENT OF PRINCIPAL INVESTIGATOR (or designee)

As the Principal Investigator (or designee) for this research study, I attest that I have reviewed the consent documentation and confirm requirements for obtaining informed consent have been met.

Principal Investigator's Signature _____
Date of Signature

If not the principal investigator, a sub-investigator who has delegation of authority or who may adjudicate adverse events should sign for the PI; must be signed within 5 business days of consenting the participant.

APÊNDICE B – AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA

Study Name: [Clinical, Pathological and Molecular Profiling of Radioiodine Avid versus Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer]

RESEARCH AUTHORIZATION TO USE AND DISCLOSE HEALTH INFORMATION

Who may have and use my health information?

I agree to allow [Dr. Kenneth Burman, Dr. Cristiane Gomes Lima] and staff at MedStar Health and Georgetown University Medical Center involved in the research study (together called “Researchers”), as well as (when applicable) the other people or companies listed below, to receive, use, have and disclose my personal health information (as permitted below) for the reason(s) described in the Informed Consent Form used for this study (identified above) and as needed to conduct the research.

- The study Sponsor ([N/A]), including others working with the Sponsor (together called the “Sponsor”);
- Laboratories and other individuals and organizations that look at my health information in connection with this study;
- Members and staff of the Institutional Review Board(s), Ethics Committee(s), Data Safety Monitoring Boards (DSMB) and all other review boards or persons who watch over how the research is performed and/or monitor the safety and success of the research, including the Institution(s) that approve(s) this study;
- The Patient Advocate or Research Ombudsman (people who watch out for my best interest);
- The United States Food and Drug Administration (FDA), any other Federal or State Agencies that watch over the safety of the study and how the study is managed or run, and/or governmental agencies in other countries which fill similar oversight roles;
- Others: [N/A]

Who may give (release or disclose) my health information?

I wish to allow [MedStar Washington Hospital Center], all my doctors and my other health care providers, and others who generate or use my health information, to give my health information in my medical or other records to the Researchers, Sponsor(s) and others listed above, for the research purposes described in the Informed Consent Form used in this study and as otherwise described below.

What health information may be used and for what purpose(s)? (Check all that apply)

All my personal information in my medical records or other health care related records requested by the Researchers for this study

Also for future research involving [Thyroid cancer] ____ (initials)

Also for the optional portion of the study [Describe any optional parts of the study that the participant can agree to] ____ (initials)

All my personal information made or collected during the research described in the Informed Consent Form for this study

Also for future research involving [Thyroid Cancer] ____ (initials)

Also for the optional portion of the study [Describe any optional parts of the study that the participant can agree to] ____ (initials)

Only the following information for this study:

Also for future research involving [Specify the diseases and/or types of research that the PHI may be used to study] ____ (initials)

Also for the optional portion of the study [Describe any optional parts of the study that the participant can agree to] ____ (initials)

*Note: if any of the above records contain any information about HIV/AIDS status, cancer diagnosis, drug/alcohol abuse, sexually transmitted disease, or includes records or information from another healthcare provider, I agree that I am hereby authorizing the release and use of this information.

What could happen if I agree to this use or disclosure of my health information?

- There is the possibility that Federal privacy laws (laws that protect the privacy to my personal health information) may no longer protect it from being given to another person, class of persons, and/or company.

- Once information that could be used to identify me has been removed and my information is no longer identifiable (connected to my identity), the information that remains is no longer protected by this Authorization (agreement) and may be used and given by the Researchers and Sponsor to others, including for other research reasons.
- The Researchers and Sponsor have agreed that no publication or presentation of the research will reveal my identity without my separate specific written permission and authorization (agreement) (even if I revoke (take back) this Authorization (agreement)).

What rights do I have?

- While my health care and benefits relating to healthcare outside the study will not be affected if I do not sign this form, I understand I have the right to refuse to sign this Authorization (agreement), but that I will not be able to participate in the research referred to in this form.
- I may change my mind and cancel this agreement at any time. To cancel this agreement, I must write to: [Dr. Kenneth D. Burman at kenneth.d.burman@medstar.net]. However, if I cancel this agreement, I may no longer be allowed to participate in the research and may no longer receive research-related treatment. Also, even if I cancel this agreement, the information already obtained may remain a part of the research as necessary to preserve the integrity of the research study.
- I will be given a copy of this agreement after I have signed it.

When does this Authorization expire?

This Authorization has no expiration date but shall expire when no longer needed by the entities listed above for the purposes listed above.

By signing below, I represent and warrant that I have authority to sign this document and authorize the use or disclosure of PHI and that there are no restrictions that would prevent me from authorizing the use or disclosure of this PHI.

Signature of Participant (or Participant's Personal Representative)

Date

Printed Name of Participant (and if applicable print name of Representative's authority to sign for Participant, (parent, Participant's Personal Representative, guardian, power of attorney for healthcare, etc.))

APÊNDICE C –

PLANILHA DE ORÇAMENTO

Código CARIS	Sequenciamento	Correio	
MWHC_DTC_01	\$3,175.00	\$100.00	
MWHC_DTC_02	\$2,175.00	\$100.00	
MWHC_DTC_03	\$3,175.00	\$100.00	
MWHC_DTC_04	\$175.00	\$100.00	
MWHC_DTC_05	\$6,350.00	\$100.00	
MWHC_DTC_06	\$6,350.00	\$100.00	
MWHC_DTC_07	\$2,350.00	\$100.00	
MWHC_DTC_08	\$3,175.00	\$100.00	
MWHC_DTC_09	\$3,350.00	\$100.00	
MWHC_DTC_10	\$2,175.00	\$100.00	
MWHC_DTC_11	\$6,350.00	\$100.00	
MWHC_DTC_12	\$6,350.00	\$100.00	
TOTAL	\$45,150.00	\$1,200.00	\$46,350.00

Obs: Valores em dólares americanos.

APÊNDICE D- ARTIGO PUBLICADO



Do Molecular Profiles of Primary Versus Metastatic Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer Differ?

Cristiane J. Gomes-Lima^{1,2,3}, Leila Shobab², Di Wu^{1,2}, Dorina Ylli^{1,2}, Athanasios Bikas⁴, Matthew McCoy⁵, Rebecca Feldman⁶, Wen Lee⁴, Sarika N. Rao⁷, Kirk Jensen⁸, Vasily Vasko⁸, Luiz Claudio Castro⁹, Jacqueline Jonklaas¹⁰, Leonard Wartofsky^{1,2} and Kenneth D. Burman^{2*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Bernadette Biondi,
University of Naples Federico II, Italy

Reviewed by:

Marco Centanni,
Sapienza University of Rome, Italy

Yevgeniya Kushchayeva,
University of South Florida,
United States

Barbara Maria Jarzab,
Maria Skłodowska-Curie National
Research Institute of Oncology,
Gliwice Branch, Poland

*Correspondence:

Kenneth D. Burman
kenneth.d.burman@medstar.net

Specialty section:

This article was submitted to
Thyroid Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 29 October 2020

Accepted: 18 January 2021

Published: 25 February 2021

Citation:

Gomes-Lima CJ, Shobab L, Wu D, Ylli D, Bikas A, McCoy M, Feldman R, Lee W, Rao SN, Jensen K, Vasko V, Castro LC, Jonklaas J, Wartofsky L and Burman KD (2021) Do Molecular Profiles of Primary Versus Metastatic Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer Differ? *Front. Endocrinol.* 12:623182. doi: 10.3389/fendo.2021.623182

¹ Department of Internal Medicine, MedStar Clinical Research Center, MedStar Health Research Institute (MHRI), Washington, DC, United States, ² Section of Endocrinology, MedStar Washington Hospital Center, Washington, DC, United States, ³ University of Brasilia School of Health Sciences, Postgraduate Program, Brasilia, Brazil, ⁴ Department of Internal Medicine, MedStar Georgetown University Hospital, Washington, DC, United States, ⁵ Innovation Center for Biomedical Informatics, Georgetown University Medical Center, Washington, DC, United States, ⁶ Caris Life Sciences, Medical Affairs, Phoenix, AZ, United States, ⁷ Division of Endocrinology, Mayo Clinic, Jacksonville, FL, United States, ⁸ Department of Pediatrics, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, MD, United States, ⁹ Department of Pediatrics, University of Brasilia School of Medicine, Brasilia, Brazil, ¹⁰ Department of Medicine, Georgetown University, Washington, DC, United States

Management of metastatic radioiodine refractory differentiated thyroid cancer (DTC) can be a therapeutic challenge. Generally, little is known about the paired molecular profile of the primary tumor and the metastases and whether they harbor the same genetic abnormalities. The present study compared the molecular profile of paired tumor specimens (primary tumor/metastatic sites) from patients with radioiodine refractory DTC in order to gain insight into a possible basis for resistance to radioiodine. Twelve patients with radioiodine refractory metastases were studied; median age at diagnosis of 61 years (range, 25–82). Nine patients had papillary TC (PTC), one had follicular TC (FTC), and two had Hürthle cell TC (HTC). Distant metastases were present in the lungs (n = 10), bones (n = 4), and liver (n = 1). The molecular profiling of paired tumors was performed with a panel of 592 genes for Next Generation Sequencing, RNA-sequencing, and immunohistochemistry. Digital microfluidic PCR was used to investigate *TERT* promoter mutations. The genetic landscape of all paired sites comprised *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53*, *ATM*, *MUTYH*, *POLE*, and *NTRK* genes, including *BRAF* and *NTRK* fusions. *BRAF* V600E was the most common point mutation in the paired specimens (5/12). *TERT* promoter mutation C228T was detected in one case. PD-L1 expression at metastatic sites was highly positive (95%) for one patient with HTC. All specimens were stable for microsatellite instability testing, and the tumor mutation burden was low to intermediate. Therefore, the molecular profile of DTC primary and metastatic lesions can show heterogeneity, which may help explain some altered responses to therapeutic intervention.

Keywords: differentiated thyroid cancer, metastases, radioiodine refractory, molecular profile, next generation sequencing

INTRODUCTION

Thyroid cancer is the fifth most frequent cause of malignancies among women with over 52,000 new cases of thyroid cancer estimated in 2020 among men and women in the US (1). Differentiated thyroid cancer (DTC) represents around 90% of all cases, and includes papillary thyroid cancer (PTC), follicular thyroid cancer (FTC), and Hürthle cell thyroid cancer (HTC) (2). Most cases have a good prognosis after appropriate treatment that involves surgical removal of the tumor and radioiodine (RAI) therapy in selected cases, especially in the presence of distant metastases (3). However, it is estimated that 6–20% of patients will develop distant metastasis that may impact the long-term outcomes of these individuals, particularly when the lesions become unresponsive to radioiodine (4–6).

The definition of RAI refractory DTC remains controversial. Several classifications have been proposed, including (a) malignant/metastatic tissue that does not concentrate RAI on a diagnostic radioiodine scan; (b) malignant tissue that does not concentrate RAI on a post-¹³¹I therapy scan; (c) tumor tissue that has lost the ability to concentrate RAI after previous evidence of radioiodine-avidity; (d) RAI that is concentrated in some lesions but not in others; (e) metastatic disease that progresses despite significant concentration of RAI; (f) after cumulative dosage of >600 mCi of ¹³¹I therapy (2, 7).

Management of metastatic radioiodine refractory DTC can be a therapeutic challenge. In contrast to metastatic disease in other non-thyroidal cancers, patients found to have metastatic DTC often have a slow progression of their disease, and management may consist of watchful waiting (3). Yet there is a proportion of these patients who will eventually have progression of their metastatic disease and will be candidates for targeted therapies (2, 8).

In recent years, with the advent of more comprehensive molecular panels and novel drugs targeting specific molecular abnormalities, application of precision medicine has provided a significant impact on the management of metastatic disease. This approach to management has become a reality for many types of advanced cancers, in which the best treatment option is chosen based on genetic features of the tumor (9). Effective treatment should consider the molecular nature of both the primary tumor and metastases, and a variety of techniques have been used to compare primary and metastatic tissues in different types of solid malignancies (10–15).

For thyroid cancer, however, little is known about the paired molecular profile of the primary tumor and its metastases, and if they harbor the same genetic abnormalities.

Only a few studies have addressed this question, employing different approaches and reaching diverse conclusions (16–19).

Absence of RAI avidity constitutes a major impediment to the delivery of effective therapy in patients with DTC. In this pilot study of patients with radioiodine refractory DTC, we used a comprehensive molecular panel available in clinical practice to compare the molecular profile of paired tumor specimens (primary tumor/metastatic sites). Moreover, we sought to investigate how genetic abnormalities found in our cohort interact with genes demonstrating enriched expression in the thyroid.

MATERIAL AND METHODS

Patient Selection

We performed a cross-sectional study including 12 patients with radioiodine (RAI) refractory metastases, selected from convenience sampling. Radioiodine refractoriness was defined as (a) disease having no RAI uptake at known sites of metastases on a post-¹³¹I therapy scan, or (b) tumor tissue that has lost the ability to concentrate RAI after previous evidence of radioiodine-avidity, or (c) metastatic disease that progresses despite significant concentration of RAI. We identified patients in current follow-up at MedStar Washington Hospital Center and MedStar Georgetown University Hospital whose tissues from the primary tumor and from one or more metastatic sites were available for molecular study. All specimens examined in this study were formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples.

Next-Generation Sequencing

We used a pan-cancer panel of 592 genes from Caris[®] Life Sciences to perform Next Generation Sequencing (NGS) of paired tumors—primary thyroid tumor and distant metastases—from each patient. This genetic panel includes the major thyroid cancer driver genes such as *BRAF*, *PTEN*, *RAS* and *RET*. The full list of genes is illustrated in the Supplementary Material (**Figure S1**). Caris[®] Life Sciences is a CLIA-certified lab.

Extraction of DNA and RNA from FFPE samples was performed using Qiagen extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Assessment of quality and quantity of nucleic acids prior to sequencing library was done with Agilent 4200 TapeStation System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

NGS was performed on genomic DNA isolated from FFPE tumor samples using the NextSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). All variants were detected with >99% confidence based on allele frequency and amplicon coverage sequencing depth of coverage of >500 and with an analytic sensitivity of 5%. Variants detected were mapped to reference genome (hg19) and well-established bioinformatics tools were incorporated to perform variant calling functions. Genetic variants were categorized as “pathogenic”, “presumed pathogenic”, “variant of unknown significance”, “presumed benign” or “benign”, according to American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards.

RNA sequencing was performed on RNA isolated from FFPE tumor samples using the NextSeq platform (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) with whole transcriptome coverage.

Tumor mutation burden (TMB) was calculated based on the number of non-synonymous somatic mutations identified by NGS while excluding any known single nucleotide polymorphisms (SNPs). TMB is reported as mutations per megabase (Mb) sequenced.

Microsatellite instability (MSI) status was determined using NGS results. This method has been validated and does not require matched normal samples (20).

PD-L1 Expression—Immunohistochemistry

The level of protein expression of PD-L1 in the paired tumor samples was determined with immunohistochemistry (IHC), performed on FFPE sections on glass slides using automated

staining techniques. The procedures met the standards and requirements of the College of American Pathologists.

The primary antibody against PD-L1 was SP142 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). An intensity score (0: no staining; 1+: weak staining; 2+: moderate staining; 3+: strong staining) and a proportion score to determine the percentage of cells staining positive (0–100%) were used. Conditions for a positive result included intensity $\geq 2+$ and $\geq 5\%$ of cells stained. Immunohistochemical results were evaluated by a board-certified pathologist.

Microfluidic Digital PCR

Since Caris[®] Life Sciences NGS panel used in this study could not detect *TERT* promoter abnormalities, we investigated mutations of *TERT* promoter in selected samples using microfluidic digital PCR, according to the following protocol:

a. DNA Extraction

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples were deparaffinized with xylene and rehydrated through ethanol (100%). The samples were digested with Proteinase K, incubated at 55°C for 1 h with mild agitation and subsequently at 90°C for an additional hour. Extraction of DNA and RNA from FFPE cancer samples was performed using King Fisher Duo Thermo Fisher (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instruction. The extracted DNA and RNA elute was stored at –80°C. DNA and RNA quantification was performed by NanoDrop (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

b. Detection of *TERT* mutations using microfluidic digital PCR:

3D Digital PCR analysis was performed on QuantStudio[™] 3D Digital PCR System (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) using primers and probes for detection of *TERTC228T* and *TERTC250T* (Thermo Fisher Scientific). The final 14.5 μ l of reaction mixture contained 8.7 μ l QuantStudio[™] 3D Digital PCR Master Mix, 0.43 μ l of primer/probe mix, 10 ng of DNA. The mixture was loaded into the QuantStudio[™] 3D Digital PCR Chip. For *TERT* promoter mutations, chips were run with the following conditions: one cycle at 50°C for 2 min; one cycle at 95°C for 10 min; 54 cycles at 55°C for 1 min, and 95°C for 15 s; one cycle at 60°C for 1 min. End point fluorescence data were collected on the QuantStudio[™] 3D Digital PCR instrument and analyzed using the QuantStudio 3D AnalysisSuite software (Thermo Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

The study was approved by Medstar Health Review Board.

Bioinformatic Analysis

In order to explore the role of cancer driving mutations in the context of thyroid physiology, a functional association network was built using STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (21). Mutated genes identified in this cohort were combined with genes with enriched expression in the thyroid as reported by the Human Protein Atlas (22). The functional associations identified genes which connect a network associated with tissue specific molecular functions to

cancer driving genes and provide clues to underlying mechanisms specific to thyroid cancer.

RESULTS

Demographics and Clinical Aspects

A total of 12 patients (10 males) were included in this study. The median age at the time of diagnosis was 61 years (range, 25–82). Mean primary tumor size was 3.9 ± 2.2 cm SD; extra-thyroidal extension was present in 8/12 patients. Nine patients had papillary thyroid cancer (PTC), among which six were classic variant, one was follicular variant and one was columnar variant; one patient had follicular thyroid cancer (FTC) and two had Hürthle cell thyroid cancer (HTC). Distant metastases were present in the lungs ($n = 10$), bones ($n = 5$), and liver ($n = 1$). Biopsy from metastatic sites were taken at different points, according to clinical indication. Subjects # 4, 9, 11, and 12 were diagnosed with distant metastases and had the biopsy of the metastatic lesion before the thyroidectomy. According to the definition of RAI-refractoriness, three patients had no RAI uptake at known sites of metastases on a post-¹³¹I therapy scan (subjects # 4, 11, 12), four patients had lesions that have lost the ability to concentrate RAI after previous evidence of radioiodine-avidity (subjects # 3, 7, 8, 9), and five patients had metastatic disease that has progressed despite significant concentration of RAI (subjects # 1, 2, 5, 6, 10). The baseline features of this cohort are described on **Table 1**.

Next-Generation Sequencing

The genetic landscape of all paired sites comprised *BRAF*, *NRAS*, *HRAS*, *TP53*, *ATM*, *MUTYH*, *POLE* and *NTRK* genes, including

TABLE 1 | Baseline characteristics.

	N = 12
Gender	
Male	10
Female	2
Age at diagnosis	
Mean	61
SD	15.9
Median	61
Range	25–82
Thyroid tumor (cm)	3.9 ± 2.2
Histology	
PTC - classic	6
PTC - follicular variant	2
PTC - columnar variant	1
FTC	1
HTC	2
Extrathyroidal extension	8
Metastases at diagnosis	9
Distribution of metastasis	
Neck LN	11
Mediastinal LN	3
Lung	10
Bone	5
Atypical (liver)	1

PTC, papillary thyroid cancer; FTC, follicular thyroid cancer; HTC, Hürthle cell thyroid cancer; LN, lymph node.

BRAF and *NTRK* fusions (Figure 1 and Table 2). Out of 12 patients, five presented with *BRAF* V600E mutation in both the primary and metastatic tumors. One patient had concomitant *BRAF* H542Y and *NRAS* Q61R mutations. Driver mutations were consistent between the sites, but in three patients other single nucleotide variants were also present, either solely in the metastatic tumor (subjects #3 and #6) or in the primary tumor (subject #10). Two patients showed gene fusions in both sites: *BRAF-CEP152* (#11) and *NTRK1-TPR* (#12). Comparison between the sites was not possible in three patients due to technical reasons, which was lack of quality or quantity of DNA for analysis.

Nine specimens were stable for microsatellite instability testing (MSI) in primary tumors, and eight in the metastatic specimens (Figure 1 and Table 2).

Tumor mutation burden (TMB) ranged from four to 10 mutations/megabase in primary tumors, and from three to 10 mutations/megabase in metastatic specimens. This aspect could not be determined in three cases from primary and metastatic sites (Figure 1 and Table 2).

PD-L1 Expression—Immunohistochemistry

In the primary tumor, PD-L1 expression was positive in two patients with PTC (5 and 10%) and in one patient with HTC (80%), while in the metastatic tumor only the latter patient remained positive (95%) (Figure 1 and Table 2).

TABLE 2 | Genetic landscape and immunohistochemistry.

	Primary	Metastases
Point mutations		
<i>BRAF</i> V600E	5	5
<i>BRAF</i> H542Y	1	1
<i>NRAS</i> Q61R	1	1
<i>TP53</i> Q192X	0	1
<i>ATM</i> T2947N	1	1
<i>ATM</i> L2255P	0	1
<i>MUTYH</i> G393D	1	2
<i>NTRK3</i> A631T	1	0
Gene fusions		
<i>BRAF-CEP152</i>	1	1
<i>NTRK1-TPR</i>	1	1
Immunohistochemistry (IHC)		
Positive PD-L1 expression	3/12	1/12
Tumor Mutational Burden (TMB)		
	4 -10/Mb	3 -10/Mb
Microsatellite Instability (MSI)		
	Stable	Stable

Mb, Megabase.

Microfluidic Digital PCR

TERT228 and *TERT250* were tested in tissue samples from subjects # 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, and 12 due to limited availability of specimens (Table 3).

TERT promoter mutation C228T was detected in subject # 2.

TERT250 mutation was not detected in any of the examined cases.

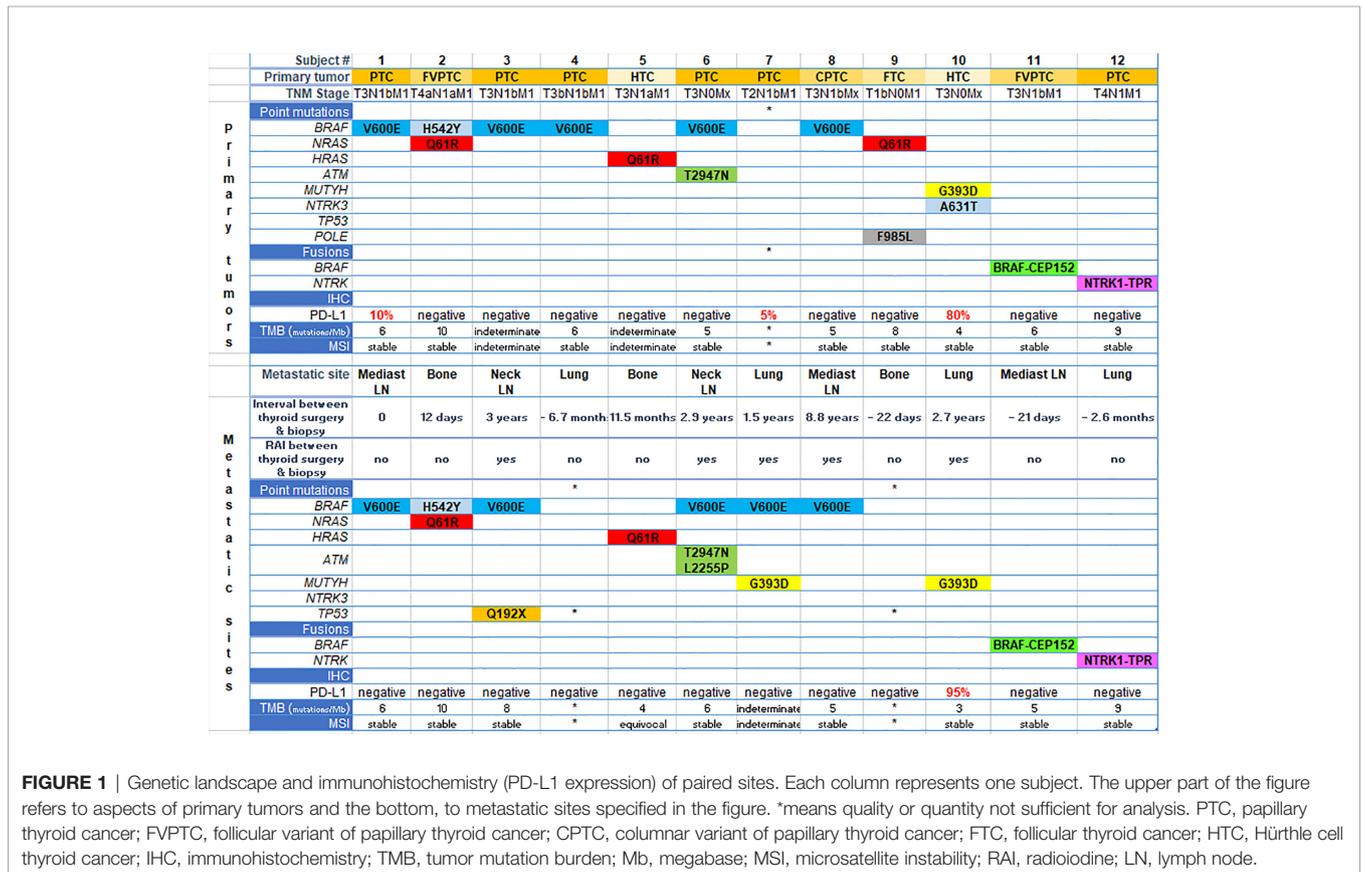


FIGURE 1 | Genetic landscape and immunohistochemistry (PD-L1 expression) of paired sites. Each column represents one subject. The upper part of the figure refers to aspects of primary tumors and the bottom, to metastatic sites specified in the figure. *means quality or quantity not sufficient for analysis. PTC, papillary thyroid cancer; FVPTC, follicular variant of papillary thyroid cancer; CPTC, columnar variant of papillary thyroid cancer; FTC, follicular thyroid cancer; HTC, Hürthle cell thyroid cancer; IHC, immunohistochemistry; TMB, tumor mutation burden; Mb, megabase; MSI, microsatellite instability; RAI, radioiodine; LN, lymph node.

TABLE 3 | Results from microfluidic digital PCR.

Subject # and site tested	<i>TERT</i> promoter	
	C228	C250
#1—thyroid	ND	ND
#2—bone	C228T	ND
#4—thyroid	ND	ND
#6—thyroid	ND	ND
#8—mediastinal LN	ND	ND
#9—thyroid	ND	ND
#11—thyroid	ND	ND
#12—thyroid	ND	ND

LN, lymph node; ND, not detected.

Bioinformatics Analysis

The bioinformatics analysis revealed several interesting functional associations between the cancer and thyroid gene sets (**Figure 2**). The edges that link the proteins identified through the molecular profiling to these thyroid specific genes represent the results of several bioinformatic functional analysis workflows. The links between these two gene sets largely represent the results of text mining associations, where the two genes are explicitly mentioned in the same peer reviewed publication. There was also some supporting evidence of interactions between homologs in other species. The analysis revealed several key associations between highly expressed genes in the thyroid and those that drive thyroid cancer. Of particular note are PAX8, a transcription factor that modulates expression of the sodium iodide symporter, and RAG2, which mediates

DNA cleavage during V(D)J recombination, and their associations with TP53.

DISCUSSION

This study highlights the differences and similarities between the molecular nature of the primary tumor and a metastatic site in patients with RAI refractory DTC. Although the overall mutational status was similar, some differences were identified that could have therapeutic impact in the context of precision medicine.

In spite of the higher incidence of thyroid cancer in women, in this cohort of advanced thyroid cancer, 10/12 subjects were men. This is consistent with data showing that men with DTC are more likely to present with more advanced disease, aggressive histological subtypes, and older age (23).

Consistently with previously published data (24, 25), *BRAF* point mutation was the most common genetic abnormality observed in this cohort, present in seven out of 12 patients (58%). Among these patients, only one had a non-V600 *BRAF* mutation. This patient (subject #2) presented a *BRAF* H542Y mutation concomitant with an *NRAS* Q61R mutation in both the primary and the metastatic tumor in bone lesion. According to COSMIC v91 (26, 27), this missense mutation has been described in colon cancer and melanoma, while the TCGA database does not report it (28, 29). *BRAF* and *RAS* mutations are known to be mutually exclusive, but simultaneous mutations have been described in colorectal cancer (30). The overall impact

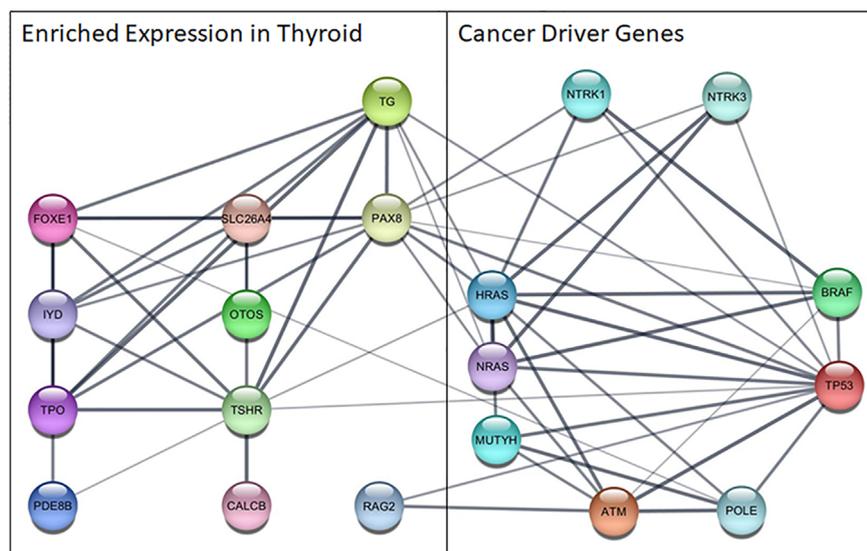


FIGURE 2 | Functional network among cancer driver genes identified in this cohort and genes highly expressed in the thyroid. Nodes represent proteins, edges show functional associations and line thickness corresponds to the strength of the supporting evidence. ATM, ATM serine/threonine kinase; BRAF, B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase; CALCB, Calcitonin Related Polypeptide Beta; FOXE1, Forkhead Box E1; HRAS, HRas Proto-Oncogene, GTPase; IYD, Iodotyrosine Deiodinase; MUTYH, MutY DNA Glycosylase; NRAS, NRAS Proto-Oncogene, GTPase; NTR, Nerve Growth Factor Receptor; NTRK1, Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1; NTRK3, Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 3; OTOS, Otospiralin; PAX8, Paired Box 8; PDE8B, Phosphodiesterase 8B; POLE, DNA Polymerase Epsilon, Catalytic Subunit; RAG2, Recombination Activating 2; SLC26A4, Solute Carrier Family 26 Member 4; TG, Thyroglobulin; TP53, Tumor Protein P53; TPO, Thyroid Peroxidase; TSHR, Thyroid Stimulating Hormone Receptor.

of simultaneous *BRAF* and *RAS* mutations remains unclear in the setting of thyroid cancer. However, it is believed that *BRAF* non-V600 mutations are less responsive to the RAF inhibitors, vemurafenib and dabrafenib, which could narrow the therapeutic options for these tumors (31). Moreover, this subject also presented with a *TERT* promoter mutation C228T in the bone specimen which is in accordance with the clinical picture of an aggressive tumor with local and distant metastases. The current version of Caris[®] Life Sciences tumor profiling employs whole exome sequencing instead of next-generation sequencing, which allows the detection of *TERT* promoter mutations.

Among all kinases, *BRAF* fusions are the most commonly observed across several tumor types, including prostate cancer, melanoma, radiation-induced thyroid cancer, and pediatric low-grade gliomas. However, the full spectrum of *BRAF* fusions in human cancer remains incomplete (9, 32). In this cohort we describe a novel *BRAF* fusion: *BRAF-CEP152*.

Additionally, we report the occurrence of *NTRK1* fusion with a known partner, *TPR*. This partner harbors a dimerization domain that potentially activates the downstream TRK kinase domain (33). *TRK* fusions have been implicated in the pathogenesis of congenital fibrosarcoma, secretory breast carcinoma, and papillary thyroid cancer (32). These rare fusions have been reported in only 1% of advanced PTCs (25), yet they are targetable. Larotrectinib, a highly selective inhibitor of the three TRK proteins, is FDA-approved for solid tumors harboring fusion in these genes (34).

Six out of 12 patients (50%) showed the same genetic abnormalities between the primary and the metastatic tumor. In three cases the comparison was not possible due to insufficient quality or quantity of DNA or RNA for analysis, which highlights the importance of tissue sampling in the current era of molecular studies. Two patients had new point mutations in the metastatic tumor: subject # 3 had a *TP53* mutation and subject #6 had a second hit on *ATM* gene. These are both DNA repair genes that, once mutated, could provide survival advantage to the tumor. On the other hand, one subject (#10) had a *NTRK3* missense mutation in the primary tumor that was not seen in the metastatic lesion. This could imply that the mutation was not providing any advantage to the tumor and was selected out. These patients had been previously treated with at least one dose of radioiodine in the interval between thyroidectomy and the biopsy of the metastatic tumor. None of them have received external radiation in this interval.

The immune landscape of papillary thyroid cancer is characterized as an inflammatory subtype, with low to moderate tumor cell proliferation and lower levels of somatic copy number alterations than other subtypes (35). PTCs are tumors with low mutational burden due to low neoantigen expression, which leads to poor immunogenicity (36). A comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer found that only 6.6% of cases expressed PD-L1 at 1% threshold, with higher positivity in follicular and anaplastic carcinomas (37). In our cohort, two patients with PTC expressed PD-L1 in the primary tumor but not in the metastatic sites, a mediastinal lymph node and a lung nodule. In addition, one patient with Hürthle cell thyroid cancer (HTC) had very high PD-L1 expression in both the thyroid tumor and in the specimen from lung biopsy. This finding may have direct

therapeutic applications. Our samples also showed an overall low mutational burden (≤ 10 mutations/megabase) in matched specimens.

Previous studies have addressed genetic abnormalities in primary thyroid cancer and matched metastases. Sohn et al. used a next-generation sequencing panel of 50 genes and found highly concordant genetic abnormalities between primary and metastatic specimens from 17 DTC patients, including 10 patients with PTC and seven patients with FTC (17). In another study, Masoodi et al. used whole-exome sequencing to compare 14 trios of matched distant metastasis, primary PTC tumors and normal samples. Those authors found striking heterogeneity between the primary PTC tumors and metastatic specimens, attributed mainly to passenger mutations (19). In comparison to those studies, our study population is more heterogeneous and reflects real life practice in a tertiary hospital. Additionally, the genetic diversity that we found is also noteworthy, despite the small sample size. Our data emphasizes the importance of identifying the molecular profile of radioiodine refractory metastatic lesions in the era of precision medicine. The identification of a targetable mutation or fusion will definitely influence the therapeutic decision.

The disrupted biological process that results in tumor growth and metastasis occurs within the context of gene expression patterns of the diseased tissue, and may result in uniquely targetable interactions that drive subtypes of cancer in a particular tissue. The functional associations identified between highly expressed genes in the thyroid and those found to drive cancer in patients with metastatic thyroid cancer are helpful in generating novel hypotheses about cancer driving mechanisms unique to thyroid cancer. *RAG2* is regulated by *TP53* derived peptides in functional experiments investigating DNA repair mechanisms (38, 39), and lower expression of *PAX8* resulted from mutated *TP53* in thyroid epithelial cells (40). Additionally, functional associations between *RAG2* and *ATM* were found to cooperatively facilitate repair of double-strand breaks (41) and multiple functional interactions were found between *PAX8* and the cancer genes in homologs from other species in the Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID) (42). Further investigation into the functional relationships of *RAG2* and *PAX8* with cancer associated genes, especially those that are not typically expressed in the thyroid, is needed to fully understand and potentially disrupt these disease pathways using innovative therapeutic interventions.

Limitations in the interpretation of our data include the relatively small sample size and the analysis of only one metastatic lesion in each patient. Additionally, specimens were taken at different times during the patients' follow-up, with RAI therapy administered between the collection of some samples. Nevertheless, the data and conclusions drawn provide new and useful information and reflect real life practice.

CONCLUSION

In this study, we demonstrate that molecular abnormalities in the primary tumor and metastatic sites of DTC can show heterogeneity. Driver mutations remained essentially the same but new mutations were observed in some cases. A better understanding of the genetic

and biologic aspects of metastatic DTC is expected to contribute to the development of more effective targeted therapies.

AUTHOR'S NOTE

The content of this manuscript has been presented in part at the 89th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Chicago, IL, 2019 as a Highlighted Oral Presentation (43).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/692614>

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Medstar Health Review Board. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

REFERENCES

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2020. Atlanta: American Cancer Society (2020).
2. Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *Lancet* (2016) 388 (10061):2783–95. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30172-6
3. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* (2016) 26(1):1–133. doi: 10.1089/thy.2015.0020
4. Dinneen SF, Valimaki MJ, Bergstralh EJ, Goellner JR, Gorman CA, Hay ID. Distant metastases in papillary thyroid carcinoma: 100 cases observed at one institution during 5 decades. *J Clin Endocrinol Metab* (1995) 80(7):2041–5. doi: 10.1210/jcem.80.7.7608252
5. Durante C, Haddy N, Baudin E, Lebouilleux S, Hartl D, Travaglini JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91(8):2892–9. doi: 10.1210/jc.2005-2838
6. Nixon IJ, Whitcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, et al. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* (2012) 22(9):884–9. doi: 10.1089/thy.2011.0535
7. Van Nostrand D. Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Time to Update the Classifications. *Thyroid* (2018) 28(9):1083–93. doi: 10.1089/thy.2018.0048
8. Fagin JA, Wells SA Jr. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med* (2016) 375(23):2307. doi: 10.1056/NEJMc1613118
9. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* (2017) 23(6):703–13. doi: 10.1038/nm.4333
10. Kabbarah O, Nogueira C, Feng B, Nazarian RM, Bosenberg M, Wu M, et al. Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PLoS One* (2010) 5(5):e10770. doi: 10.1371/journal.pone.0010770

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: CG-L, LS, and KB. Methodology: CG-L, LS, DW, DY, RF, AB, VV, and KJ. Resources: VV and KJ. Pathology review: WL. Bioinformatic analysis: MM. Writing—original draft preparation: CG-L, LC, and KB. Writing—review and editing: LS, DW, DY, MM, SR, LC, VV, JJ, LW, and KB. Supervision: CG-L, LW, and KB. Project administration: CG-L, DY, and KB. Funding acquisition: LW and KB. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by The Catherine Heron and Al Schneider Fellowship in Thyroid Cancer.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2021.623182/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | – Caris® Life Sciences NGS gene list.

11. Ouyang L, Lee J, Park CK, Mao M, Shi Y, Gong Z, et al. Whole-genome sequencing of matched primary and metastatic hepatocellular carcinomas. *BMC Med Genomics* (2014) 7:2. doi: 10.1186/1755-8794-7-2
12. Guo BL, Ouyang FS, Ouyang LZ, Liu ZW, Lin SJ, Meng W, et al. Development and validation of an ultrasound-based nomogram to improve the diagnostic accuracy for malignant thyroid nodules. *Eur Radiol* (2019) 29(3):1518–26. doi: 10.1007/s00330-018-5715-5
13. Kim EY, Cho EN, Park HS, Kim A, Hong JY, Lim S, et al. Genetic heterogeneity of actionable genes between primary and metastatic tumor in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer* (2016) 16:27. doi: 10.1186/s12885-016-2049-z
14. Becerra MF, Reznik E, Redzematovic A, Tennenbaum DM, Kashan M, Ghanaat M, et al. Comparative Genomic Profiling of Matched Primary and Metastatic Tumors in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus* (2018) 4(6):986–94. doi: 10.1016/j.juro.2017.02.1176
15. Schrijver W, Selenica P, Lee JY, Ng CKY, Burke KA, Piscuoglio S, et al. Mutation Profiling of Key Cancer Genes in Primary Breast Cancers and Their Distant Metastases. *Cancer Res* (2018) 78(12):3112–21. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2310
16. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* (2009) 69(11):4885–93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0727
17. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* (2016) 26(5):672–82. doi: 10.1089/thy.2015.0527
18. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF, and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab* (2017) 102(6):1898–907. doi: 10.1210/jc.2016-2785
19. Masoodi T, Siraj AK, Siraj S, Azam S, Qadri Z, Albalawy WN, et al. Whole-Exome Sequencing of Matched Primary and Metastatic Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid* (2020) 30(1):42–56. doi: 10.1089/thy.2019.0052
20. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared

- with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* (2018) 7(3):746–56. doi: 10.1002/cam4.1372
21. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(D1):D607–D13. doi: 10.1093/nar/gky1131
 22. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics Tissue-Based Map. *Hum Proteome Sci* (2015) 347(6220):1260419. doi: 10.1126/science.1260419
 23. Nilubol N, Zhang L, Kebebew E. Multivariate analysis of the relationship between male sex, disease-specific survival, and features of tumor aggressiveness in thyroid cancer of follicular cell origin. *Thyroid* (2013) 23(6):695–702. doi: 10.1089/thy.2012.0269
 24. Cancer Genome Atlas Research N. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* (2014) 159(3):676–90. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.050
 25. Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, Hartmaier R, Deaver KE, Davis S, et al. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res* (2018) 24(13):3059–68. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0373
 26. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(D1):D941–D7. doi: 10.1093/nar/gky1015
 27. cancer.sanger.ac.uk. cancer.sanger.ac.uk UK: Sanger Institute.
 28. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery* (2012) 2(5):401–4. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095
 29. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* (2013) 6(269):p11. doi: 10.1126/scisignal.2004088
 30. Midthun L, Shaheen S, Deisch J, Senthil M, Tsai J, Hsueh CT, et al. and BRAF mutations in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* (2019) 10(3):577–81. doi: 10.21037/jgo.2019.01.10
 31. Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* (2018) 37(24):3183–99. doi: 10.1038/s41388-018-0171-x
 32. Stransky N, Cerami E, Schalm S, Kim JL, Lengauer C. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun* (2014) 5:4846. doi: 10.1038/ncomms5846
 33. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2018) 15(12):731–47. doi: 10.1038/s41571-018-0113-0
 34. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* (2018) 378(8):731–9. doi: 10.1056/NEJMoa1714448
 35. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. *Cancer Immun* (2018) 48(4):812–30.e14. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.023
 36. Liotti F, Prevete N, Vecchio G, Melillo RM. Recent advances in understanding immune phenotypes of thyroid carcinomas: prognostication and emerging therapies. *F1000Res* (2019) 8. doi: 10.12688/f1000research.16677.1
 37. Ahn S, Kim TH, Kim SW, Ki CS, Jang HW, Kim JS, et al. Comprehensive screening for PD-L1 expression in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* (2017) 24(2):97–106. doi: 10.1530/ERC-16-0421
 38. Bain G, Romanow WJ, Albers K, Havran WL, Murre C. Positive and negative regulation of V(D)J recombination by the E2A proteins. *J Exp Med* (1999) 189(2):289–300. doi: 10.1084/jem.189.2.289
 39. Nicolas N, Moshous D, Cavazzana-Calvo M, Papadopoulou D, de Chasseval R, Le Deist F, et al. A human severe combined immunodeficiency (SCID) condition with increased sensitivity to ionizing radiations and impaired V(D)J rearrangements defines a new DNA recombination/repair deficiency. *J Exp Med* (1998) 188(4):627–34. doi: 10.1084/jem.188.4.627
 40. Casamassimi A, Miano MG, Porcellini A, De Vita G, de Nigris F, Zannini M, et al. p53 genes mutated in the DNA binding site or at a specific COOH-terminal site exert divergent effects on thyroid cell growth and differentiation. *Cancer Res* (1998) 58(13):2888–94.
 41. Meek K, Xu Y, Bailie C, Yu K, Neal JA. The ATM Kinase Restrains Joining of Both VDJ Signal and Coding Ends. *J Immunol* (2016) 197(8):3165–74. doi: 10.4049/jimmunol.1600597
 42. Oughtred R, Stark C, Breitkreutz BJ, Rust J, Boucher L, Chang C, et al. The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(D1):D529–d41. doi: 10.1093/nar/gky1079
 43. Gomes-Lima C, Shobab L, Wu D, Ylli D, Wartofsky L, Burman K, et al. eds. Do Molecular Profiles of Primary versus Metastatic Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer Differ? In: *89th Annual Meeting of the American Thyroid Association*. Chicago, IL.

Conflict of Interest: RF is employed by Caris Life Sciences.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Gomes-Lima, Shobab, Wu, Ylli, Bikas, McCoy, Feldman, Lee, Rao, Jensen, Vasko, Castro, Jonklaas, Wartofsky and Burman. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.