

Análise molecular e genética complementar na investigação dos nódulos de tireoide: uma revisão integrativa da literatura

Complementary molecular and genetic analysis in the investigation of thyroid nodules: an integrative review of the literature

Priantti, JN¹; Rodrigues, NMV¹; Cavalcante, M¹; Jezini, DL²; Heckmann, MIO³

Priantti, JN; Rodrigues, NMV; Cavalcante, M; Jezini, DL; Heckmann, MIO. Análise molecular e genética complementar na investigação dos nódulos de tireoide: uma revisão integrativa da literatura. *Complementary molecular and genetic analysis in the investigation of thyroid nodules: an integrative review of the literature*. Rev HUGV (Manaus). 2023 dez-jan; v22. <https://doi.org/10.60104/revhugv11036>

RESUMO

A medida que a tecnologia avança, a medicina genômica se apresenta como promissora na investigação e manejo dos nódulos da tireoide. As novas técnicas desenvolvidas melhoram sobremaneira o diagnóstico, direcionam desfechos, norteiam condutas e fornecem subsídios para o prognóstico mais acurado. Os marcadores moleculares empregados no diagnóstico diferencial do câncer da tireoide são destaques na prática clínica, fazendo com que os procedimentos invasivos sejam cada vez menos necessários, com consequente redução no impacto negativo na condução dos pacientes. OBJETIVOS: Por meio de revisão integrativa da literatura, foram levantados os marcadores moleculares de nódulos de tireoide descritos na população geral. MATERIAIS E MÉTODOS: Foram selecionados estudos publicados entre 2010 e 2021 das bases de dados *PubMed*, *Scopus*, portais CAPES e BVS que obedeciam aos critérios de inclusão (artigos originais, estudos observacionais, revisões sistemáticas e de literatura, e guidelines de manejo clínico), nos idiomas de inglês e português, que se enquadraram ao tema de marcadores de moleculares de tireoide envolvidos no diagnóstico, conduta e prognóstico dos nódulos de tireoide. RESULTADOS: Diferenças significativas, relacionadas a estratificação de risco, foram identificadas nos painéis genéticos comercialmente disponíveis. Os marcadores moleculares quando analisados de maneira individual, apresentam importantes variações estatísticas de performance; dos que mais fortemente se relacionam com malignidade, as mutações BRAF e do promotor TERT podem ser capazes de direcionar a abordagem de pacientes portadores de nódulos da tireoide, seja do ponto de vista do diagnóstico, da conduta e do prognóstico de forma individualizada. CONCLUSÃO: Apesar de marcadores individuais funcionarem como preditores de malignidade, definindo padrões de agressividade tumoral, a necessidade da validação de painéis voltados à população brasileira precisa ser aprimorado.

Palavras-chave: marcadores moleculares, nódulos de tireoide, análise molecular.

ABSTRACT

*With the advancement of technology, genomic medicine holds promise in investigating and managing thyroid nodules. The newly developed techniques significantly improve diagnosis, direct outcomes, guide management, and provide support for a more accurate prognosis. Molecular markers used in the differential diagnosis of thyroid cancer are emphasized in clinical practice, leading to a reduction in the necessity of invasive procedures and minimizing negative impacts on patient management. OBJECTIVES: An integrative review of the literature identified molecular markers of thyroid nodules described in the general population. MATERIALS AND METHODS: Studies published between 2010 and 2021 were selected from the *PubMed*, *Scopus*, *CAPES*, and *BVS* portals databases that met the inclusion criteria (original articles, observational studies, systematic reviews, reviews of the literature, and clinical management guidelines), written in English and Brazilian Portuguese, that fit the theme of thyroid molecular markers involved in the diagnosis, management, and prognosis of thyroid nodules. RESULTS: Upon individual analysis, molecular markers show significant statistical variations in performance. Among the markers most strongly associated with malignancy, BRAF mutations and TERT promoter mutations have the potential to guide the approach to patients with thyroid nodules in terms of diagnosis, management, and prognosis on an individual basis. CONCLUSION: Although individual markers serve as predictors of malignancy, defining patterns of tumor aggressiveness, the validation of panels tailored to the Brazilian population needs to be improved.*

Keywords: molecular markers; thyroid nodules; genetic testing.

¹ Graduando(a) de Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas (FM-UFAM)

² Médica Endocrinologista. Doutora em Biotecnologia com ênfase em Saúde. Docente na Universidade Federal do Amazonas, Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV)

³ Doutora em Genética, Mestre em Biologia Experimental, Docente da Universidade Federal do Amazonas (ICB-UFAM)

INTRODUÇÃO

O câncer de tireoide (CT) é a neoplasia endócrina mais comum em todo o mundo, representando 3% de todos os cânceres diagnosticados anualmente¹. No Brasil, o número de casos novos de câncer de tireoide estimados, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 2.310 casos novos em homens e de 11.950 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 2,17 casos novos a cada 100 mil homens e 11,15 para cada 100 mil mulheres².

A incidência de CT vem aumentando progressivamente³⁻⁶, sendo o quinto tumor mais frequente nas mulheres da região Sudeste e Nordeste, apesar do aumento significativo de novos casos, os dados mundiais de mortalidade mantêm-se estáveis, provavelmente em decorrência do diagnóstico precoce e dos avanços na detecção de pequenos tumores em estágios iniciais⁷⁻¹¹.

CT apresentam curso clínico variado, podendo ser indolente, geralmente, com baixas taxas de mortalidade, ou tumores mais agressivos, com rápida progressão¹².

O CT é classificado de acordo com sua histologia e acometimento celular, os tipos histológicos mais frequentes do CT são os carcinomas diferenciados. Entre eles, estão o papilífero, o folicular e o de células de Hürthle. E menos frequentes os carcinomas pouco diferenciados e os indiferenciados^{1,13}.

O carcinoma papilífero de tireoide (CPT) é a neoplasia endócrina responsável por 80-85% de todos os cânceres de tireoide e 1% de todas as neoplasias malignas humanas^{14,15}. Em estágios iniciais de desenvolvimento, esta neoplasia pode ter menos que 1,0 cm de diâmetro e, então, ser definida como um microcarcinoma papilífero de tireoide (MCPT)¹⁶. Em ambos os casos, há uma alta taxa de metástases linfonodais, o que pode causar alto risco de recidiva e diminuição da qualidade de vida do paciente¹⁷. O segundo tipo com maior número de casos consiste no CT folicular, estando associado a um pior prognóstico¹⁸, contudo, no geral, os carcinomas diferenciados de tireoide apresentam bom prognóstico quando tratados adequadamente¹⁹.

Os nódulos de tireoide podem ser encontrados por palpação entre 1 a 7% da população, cerca de 65 a 80% destes nódulos são benignos e entre 5 a 15% malignos. A avaliação inicial de um nódulo de tireoide inclui, além do exame de ultrassonografia (USG), a Punção Aspirativa por Agulha Fina (PAAF) complementar na investigação de nódulos de tireoide, por incluir achados citológicos característicos que auxiliam na distinção de lesões benignas e malignas; sendo um procedimento seguro, de alta sensibilidade e acurácia, principalmente para estabelecer o diagnóstico precoce de CT; mas é indicada conforme o tamanho característico do nódulo, sendo mundialmente utilizada^{2,20}.

Para a classificação citológica, a PAAF utiliza o Sistema Bethesda para Notificação de Citopatologia da Tireoide que classifica as lesões em seis tipos: B I, não diagnóstico; B II, benigno; B III, atipia de significado indeterminado/lesão folicular de significado indeterminado; B IV, neoplasia folicular/suspeito de neoplasia folicular; B

V, suspeito de malignidade; e B VI, malignas. Porém, distinguir os nódulos tireoidianos malignos dos benignos ainda constitui um grande desafio, por uma vez que a análise histológica pós-cirúrgica reclassifica de 70 a 80% dos casos como benignos. A diferenciação molecular entre lesões benignas e malignas no diagnóstico pré-operatório demonstra-se de fundamental importância, em vista que poderá reduzir o elevado índice de cirurgias desnecessárias. Indiscutivelmente, a avaliação citológica de nódulos de tireoide puncionados por PAAF reduz a necessidade de intervenção cirúrgica, mas, mesmo assim, de 15 a 30% dos nódulos puncionados por PAAF na avaliação citológica são classificados como indeterminados (classes III, IV de Bethesda), e, conseqüentemente, esses casos são encaminhados para cirurgia dado elevado risco de malignidade^{21,22}.

Sheng *et al.* compararam a eficiência do teste genético da mutação BRAF V600E e as categorias de Bethesda na distinção entre nódulos tireoidianos benignos e malignos, encontrando diferenças significativas na idade, diâmetro do nódulo e VPP (valor preditivo positivo) da mutação BRAF V600E entre as seis categorias do sistema. A combinação do teste de mutação BRAF V600E e sistema Bethesda demonstrou aumento no VPN (valor preditivo negativo), sensibilidade e acurácia, enquanto o método BRAF V600E mostrou superioridade ao sistema Bethesda no que diz respeito ao VPP e especificidade. Outros estudos relataram essa correlação do BRAF V600E com características clínicas e patológicas de CPT mais agressivos, como metástases distantes ou nodais, tumor de maior tamanho e estágio avançado²³.

Deste modo, a evolução dos testes moleculares para nódulos de tireoide permitiu a descoberta de vários marcadores moleculares diagnósticos e prognósticos de CT que podem ser aplicados a amostras de PAAF de tireoide²³, oferecendo oportunidades sem precedentes para pesquisas e desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para este câncer^{14,24,25}, evitando, assim, cirurgias desnecessárias e auxiliando em novas opções de prognóstico e tratamento²⁶.

A considerar que embora os testes moleculares não possam diagnosticar todos os casos, uma expressiva parcela pode ser classificada pelo diagnóstico molecular, e, diante destes resultados, a OMS já prepara uma nova classificação que integra tais achados à prática clínica²⁷⁻³¹.

Apesar da acentuada melhora no diagnóstico, apenas uma minoria dos pacientes teve acesso a um teste genético^{32,33}. No Brasil, este cenário é restrito a hospitais de referência, a maioria privados. Embora o teste molecular ainda não faça parte do Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde da ANS (Agência Nacional de Saúde Suplementar), por meio da Resolução Normativa CNHM n.º 042/2020 da AMB, um teste molecular usando miRNA está no rol de procedimentos oferecidos pelos planos de saúde privados³⁴.

Vários outros testes moleculares por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) estão disponíveis para uso clínico, a maioria baseada em marcadores moleculares estudados em populações europeias e norte-americanas, podendo não corresponder à população brasileira, com o risco do emprego destes testes ocasionar impacto financeiro desnecessário no manejo clínico dos pacientes com nódulos de tireoide^{14,35}. Entretanto, o custo-benefício do NGS varia inversamente com a prevalência subjacente de malignidade na população

testada, mesmo assim, prevalecendo uma boa relação custo-benefício que esta metodologia poderia trazer ao estudo de câncer se for disponibilizada para a população^{36,37}.

No Brasil, Santos *et al.* avaliaram o impacto financeiro do uso desta tecnologia em uma operadora privada de saúde no Brasil. O estudo acompanhou pacientes com nódulos de tireoide de citologia indeterminada que seriam submetidos à cirurgia. Estes pacientes foram submetidos aos testes moleculares mir-THYpe (miRNA) antes da cirurgia. Os resultados dos testes genéticos permitiram reduzir em 53,6% as cirurgias totais e 73,4% de cirurgias potencialmente desnecessárias. A economia calculada no estudo prospectivo foi em cerca de R\$ 10.000 por paciente, considerando os indivíduos que foram ou não submetidos a procedimentos cirúrgicos, ou de acompanhamento³⁸.

Com esse intuito, nas últimas décadas, vários grupos se dedicaram a caracterizar o perfil molecular dos nódulos tireoidianos, em especial dos carcinomas diferenciados de tireoide (CDTs). Essas informações foram trazidas para a prática clínica e diferentes testes moleculares vêm sendo desenvolvidos e comercializados. Portanto, a questão principal é a necessidade de avaliar se um nódulo é maligno ou não, e para se chegar ao objetivo é preciso de um teste diagnóstico que se aplique à população brasileira, o qual forneça resultados confiáveis, com boa sensibilidade e especificidade para decidir sobre a abordagem cirúrgica.

METODOLOGIA

Revisão de literatura

O presente estudo trata-se de revisão integrativa da literatura sobre marcadores moleculares de nódulos de tireoide na população geral. A pergunta norteadora desta revisão foi “Quais as informações disponíveis na literatura na área da saúde acerca de marcadores moleculares envolvidos nos fatores de diagnóstico, conduta e prognóstico dos nódulos de tireoide?”. Foi realizada busca na literatura para artigos publicados entre 2010 e 2021 nas seguintes bases de dados: *PubMed*, *Scopus*, portais CAPES e BVS. Com utilização dos seguintes descritores: “Análise molecular”, “marcadores moleculares”, “diagnóstico molecular”, “risco de malignidade”, “medicina genômica” em conjunto como descritor “nódulos de tireoide” e as suas respectivas traduções para o inglês: “*Genetic testing*”, “*Molecular Markers*”, “*Diagnosis Markers*”, “*Risk for malignancy*”, “*Genomic Medicine*” e “*Thyroid Nodules*”.

Os critérios de inclusão foram artigos originais, estudos observacionais, revisões sistemáticas e de literatura, *guidelines* de manejo clínico, publicados entre 2010 e 2021, nos idiomas de inglês e português, que se enquadraram ao tema de marcadores de moleculares de tireoide envolvidos no diagnóstico, conduta e prognóstico dos nódulos de tireoide. Foram excluídos outros tipos de estudo, como relato de caso; também não foram considerados artigos cujo conteúdo não fosse relacionado a nódulos de tireoide; assim como artigos que não passaram por revisão de pares ou *pré-prints*.

A obtenção e sistematização de dados foi feita por meio de leitura exploratória dos estudos, seguida de coleta

de dados dos artigos pertinentes, com o preenchimento de tabela e pacote *Office Access*, sendo retirada dos artigos as seguintes informações: ano de publicação; periódico; autores; delineamento do estudo; amostra; objetivos; marcadores moleculares encontrados; população do estudo, composição étnica; principais resultados do estudo, divididos quanto a diagnóstico, conduta e prognóstico; e conclusões.

Após a coleta de dados, foi feita a leitura integrativa da tabela e delineados os achados mais significativos, por leitura analítica e conforme a recorrência do achado entre os artigos analisados. A tabulação buscou identificar quais marcadores apresentam relevância em cada um dos eixos de interesse: diagnóstico, prognóstico e conduta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 31 artigos para a análise e coleta de dados, sendo incluídos estudos observacionais, revisões da literatura e estudos clínicos.

Os artigos incluídos coletados conforme a sua relevância para o diagnóstico, prognóstico e conduta se encontram listados na **tabela 01**.

Testes Genéticos aplicados ao diagnóstico molecular de nódulos da tireoide

Nas últimas 2 décadas, poucas áreas da ciência obtiveram tantos avanços como nos campos relacionados às ciências genômicas, com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), estando no início de uma revolução nas pesquisas de câncer, com reflexo direto na investigação molecular do câncer de tireoide.

Atualmente, a compreensão das bases moleculares do câncer de tireoide expandiu-se, de tal modo, que existem diversos drivers de genes conhecidos para a maioria dos cânceres de tireoide. No CPT, a mutação BRAF V600E é a mutação mais prevalente (60%), seguida por RAS (H/K/N-RAS) (15%) e pelos rearranjos cromossômicos que permitem a ativação constitutiva dos genes RET, NTRK ou ALK³⁹.

Nos estudos de Nikiforov *et al.* foram analisadas 437 citologias de 371 pacientes, com aplicação de testes moleculares (BRAF, RET/PTC1, RET/PTC3, RAS e PAX8-PPAR γ), estes estudos revelaram a presença de 21 casos de mutação (12 BRAF, 3 RET/PTC1, 2 RET/PTC3, 3 HRAS, 1 NRAS), permitindo a reclassificação do diagnóstico da citologia aspirativa para malignidade em 9 casos, demonstrando que a combinação da citologia com um conjunto de marcadores moleculares permite a melhoria significativa na exatidão do diagnóstico, bem como uma melhor predição de malignidade em nódulos com citologia indeterminada⁴⁰.

Neste cenário, pesquisadores de diversos países criaram o *Cancer Genome Atlas* - TCGA - consórcio genômico internacional estabelecido para determinar as mutações, alterações genômicas, transcricômicas e epigenômicas mais frequentes em diferentes tipos de tumores humanos. Estes pesquisadores compilaram seus

estudos a partir da análise de 496 amostras de CPT, estabelecendo um perfil genômico do câncer responsável por 80% de todos os casos de câncer de tireoide⁴¹. O TCGA estabeleceu um painel de 7 ou 8 genes (BRAF V600E, BRAF K601E, RET/PTC 1 e 3, NRAS códon 61, HRAS códon 61 e KRAS códon 12-13 e PAX8/PPAR γ) capazes de identificar entre 60 a 70% dos cânceres de tireoide⁴². Com praticamente toda base genética dos CPT descrita, se reduziu a fração de casos de CPT com driver oncogênico desconhecido de 25% para 3,5%, oferecendo, assim, um alto potencial para o diagnóstico molecular e permitindo entender o papel prognóstico de todas essas mutações³⁵.

Tabela 1. Artigos incluídos.

Artigo	Ano	Tipo de estudo
Mungan <i>et al.</i> ³	2017	Artigo original/ estudo transversal
Xiang <i>et al.</i> ¹⁵	2020	Artigo original/ estudo transversal
Muzza <i>et al.</i> ²²	2020	Revisão
Sheng <i>et al.</i> ²³	2021	Artigo original/ estudo clínico experimental
Fagin <i>et al.</i> ³⁹	2016	Revisão
Nikiforov <i>et al.</i> ⁴⁰	2009	Artigo original/estudo retrospectivo
Eszlinger <i>et al.</i> ⁴²	2014	Revisão
Lopes ⁴³	2010	Artigo original/ dissertação de mestrado
Parangi <i>et al.</i> ⁴⁶	2014	Revisão
Raue <i>et al.</i> ⁴⁷	2016	Revisão
Xing <i>et al.</i> ⁴⁸	2013	Revisão
Bhatia <i>et al.</i> ⁴⁹	2015	Revisão
Ciampi <i>et al.</i> ⁵⁰	2019	Coorte retrospectivo
Santana ⁵¹	2020	Artigo original / Dissertação de Doutorado
Pereira ⁵²	2015	Artigo original / Dissertação de Mestrado
Silva ⁵³	2012	Artigo original / estudo retrospectivo
Bertelli <i>et al.</i> ⁵⁴	2013	Artigo original / estudo retrospectivo
Romei <i>et al.</i> ⁵⁶	2010	Artigo original / estudo retrospectivo
Machens <i>et al.</i> ⁵⁷	2013	Artigo original / estudo retrospectivo
Romei <i>et al.</i> ⁵⁸	2015	Artigo original / estudo retrospectivo
Opsahl <i>et al.</i> ⁶⁰	2016	Coorte retrospectivo
Mathiesen <i>et al.</i> ⁶¹	2017	Coorte retrospectivo
Cunha <i>et al.</i> ⁶²	2017	Artigo original
Maciel <i>et al.</i> ⁶⁴	2017	Artigo original/ estudo retrospectivo
Zafon <i>et al.</i> ⁶⁵	2017	Revisão
Lupo <i>et al.</i> ⁶⁶	2020	Artigo original/ estudo multicêntrico
Krane <i>et al.</i> ⁶⁷	2020	Revisão
Zhang <i>et al.</i> ⁶⁸	2016	Revisão
Eszlinger <i>et al.</i> ⁶⁹	2017	Artigo original
Bellevicine <i>et al.</i> ⁷¹	2020	Estudo prospectivo multicêntrico
Ferris <i>et al.</i> ⁷²	2015	Revisão

Fonte: elaborado pelos autores.

Os resultados demonstram que alguns grupos diferentes de alterações moleculares conduzem ao CPT. A maioria foi causado por mutações em BRAF (V600E) ou RAS, ambos desregulando a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). Drivers oncogênicos (alterações genéticas e epigenéticas identificadas como condutoras da gênese tumoral) foram identificados em 96,5% das amostras de tumor, um novo gene driver EIF1AX prejudica a via MAPK e é mutuamente exclusivo das mutações BRAF e RAS. A classificação dos CPT pode ser potencialmente refinada dada a semelhança de um tumor com tumores impulsionados por BRAF (V600E) versus tumores impulsionados por RAS. Os tumores dirigidos por BRAF (V600E) e tumores dirigidos por RAS mostraram perfis moleculares distintos que afetam diferencialmente a sinalização a jusante: tumores dirigidos por BRAF (V600E) demonstram alta sinalização por MAPK, enquanto tumores dirigidos por RAS demonstram baixa sinalização por MAPK. Um sistema de pontuação de diferenciação da tireoide ajuda a determinar se os tumores são movidos por BRAF (V600E) ou RAS. A expressão gênica heterogênea para o subtipo BRAF (V600E) sugere que a estratificação adicional do subtipo pode levar a um melhor valor prognóstico⁴³.

Os carcinomas foliculares podem apresentar mutações do gene RAS e rearranjos do PAX8-PPAR γ (gene box pareado 8 e o Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama e o receptor nuclear PPAR γ) também detectadas em adenomas foliculares e variantes foliculares do carcinoma papilífero (37,5%). O RET/PTC1, rearranjo RET/PTC mais frequente, está relacionado com casos de CPT com histologia clássica, ao passo que o rearranjo gênico RET/PTC3 se associa frequentemente com a variante sólida, sobretudo em casos de exposição à radiação, como no contexto pós- Chernobyl, mas também com a variante de células altas. As mutações do gene RAS estão associadas a uma histologia tumoral, sendo frequente em 25-100% dos casos de variante folicular do CPT⁴³.

Para detecção de malignidade, um dos principais marcadores é o BRAF, um ativador da sinalização da cascata de MAPK que atua via sinalização extracelular para regular a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular⁴⁴. Ele tem uma baixa sensibilidade (17%) associado a uma alta especificidade (98%), ou seja, quando positivado é relacionado a malignidade, porém se negativo ainda há chance de malignidade. Possui também VPP de 80% e VPN de 69%, com flutuação de valor conforme a variante⁴⁵. Ele prediz quase 100% de probabilidade de malignidade quando positivo, direcionando o tratamento para a tireoidectomia, mesmo se a PAAF for indeterminada^{46,47}. Quanto ao prognóstico, está associado com metástase linfonodal, extensão extratireoidiana e estágios mais avançados, além de recorrência com *odds ratio* de 3-5 para o CPT⁸. O marcador RET/RET-PTC é associado aos maus prognósticos de carcinomas medulares e papilíferos, sendo mais comum em pessoas submetidas à radiação. Mutações no gene RET estão presentes em apenas 20-40% dos

carcinomas papilíferos, e, se positivo com PAAF indeterminada ou suspeita de carcinoma, é indicativo de tireoidectomia^{46, 47, 49}.

Outros marcadores importantes são as mutações no gene promotor TERT que estão relacionadas com maior agressividade do câncer de tireoide, demonstrando-se com maior especificidade e valor preditivo positivo, sendo preditores de malignidade, de grau de indiferenciação e existência de metástase quando associados a mutações BRAF, RAS e RET/PTC. Desta forma, a sua importância diagnóstica e na conduta pode ser fundamental para indicação cirúrgica^{45-47, 49}.

Ciampi *et al.* estudaram o carcinoma medular da tireoide esporádico (CMTe), um tumor raro, porém muito agressivo. Analisadas por NGS, alterações nos genes RET e RAS estavam presentes em cerca de 50%-80% dos casos, de modo que este parâmetro pode ser considerado um novo marcador molecular de pior prognóstico em CMTe com mutação no gene RET. Por fim, com um resultado inferior ao esperado, a percentagem em casos de CMTe, ainda órfãos de um driver genético reconhecido, foi refinado com essa metodologia, demonstrando ser possível reduzir o número de casos RET ou RAS negativos e confirmar o papel das mutações RET e RAS em casos de CT⁵⁰.

Inúmeros estudos determinaram a distribuição das frequências destas mutações em diversas populações do mundo inteiro, assim vejamos alguns exemplos realizados em pacientes brasileiros.

Santana⁵¹ por meio de sequenciamento de larga escala estudou casos raros de tumores foliculares ou de células de Hürthle em pacientes brasileiros, constatando que diversas mutações em genes de vias com aumento da expressão: Wnt/ β -catenina, MPAK e PI3K- AKT-mTOR, sendo os genes APC e FAT1 mais frequentemente mutados e este último envolvido em diversas funções celulares, inclusive controle da atividade mitocondrial. Corroborando assim com a literatura, não foi observada nestas amostras mutações raras no gene BRAF e a mesma frequência do RAS relatada em carcinomas papilíferos, mas inferior a dos carcinomas foliculares. Mutações comumente associadas a pior prognóstico em carcinomas diferenciados de tireoide, como as C228T e C259T da região promotora do gene TERT e mutações do gene TP53, não foram encontradas e não houve associação entre o perfil mutacional e as características clínicas e histológicas.

Pereira⁵² estudou, por meio de sequenciamento direto, o exon 15 do gene BRAF, e estabeleceu a prevalência da mutação BRAFV600E em 135 pacientes com CPT tratados em um hospital de Salvador – Brasil, buscando associar a presença da mutação com aspectos clínico-patológicos conhecidos do CPT e risco de recorrência segundo protocolos do Consenso Brasileiro e da *American Thyroid Association*. Os resultados obtidos revelaram que a prevalência da mutação BRAFV600E foi semelhante à apresentada em outros estudos. A mutação BRAFV600E esteve positivamente associada com idade avançada ($40,96 \pm 13,69$ vs $29,73 \pm 10,18$; $P = 0,008$) e negativamente com presença de tireoidite de Hashimoto

(TH) (25% vs 66,7%; $P = 0,008$).

Silva *et al.*⁵³ realizou a análise molecular da mutação V600E do gene BRAF por meio de PCR e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) em amostras parafinadas de pacientes diagnosticados pela citologia com carcinomas papilíferos de tireoide tratados em um hospital Goiânia - Brasil. As análises mostraram que a presença da mutação V600E do gene BRAF em 74 casos (63,8%) estava associada às metástases linfonodais ($p=0,0385$) e à hiperexpressão da proteína BRAF ($p=0,0063$).

Bertelli *et al.*⁵⁴ estudaram por reação de RT-PCR a frequência da mutação V600E do gene BRAF em pacientes brasileiros com mais de 65 anos submetidos à tireoidectomia, correlacionando sua presença ou ausência com as diferentes lesões histológicas, com as variantes e com fatores prognósticos do carcinoma papilífero. Detectou-se a presença da mutação BRAF V600E em 47 pacientes (55,3%). Entre os 17 carcinomas papilíferos estudados, sete apresentavam a mutação (41,2%). Verificou-se a associação estatística entre a presença desta mutação e a variante clássica do carcinoma papilífero, além de tendência de associação com doença extratireoidiana. Concluindo que a mutação BRAF nos pacientes idosos é exclusiva para o carcinoma papilífero e tem frequência expressiva. Além disso, está relacionada à variante clássica e, possivelmente, à doença extratireoidiana.

Uma pesquisa multicêntrica envolvendo 18 centros de referência no Brasil, a maioria localizados na região sudeste, avaliaram pacientes acometidos pela neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (MEN2). Foram assistidos 554 pacientes com CMT de 176 famílias encaminhados para cirurgia que passaram pelo diagnóstico molecular para comparar o tipo e a prevalência de mutações RET com os dados obtidos de outros países. Classificadas pelo número de famílias afetadas, as mutações mais frequentes, ocorreram no códon 634, exon 11 (76 famílias), seguido pelo códon 918, exon 16 (34 famílias: 26 com M918T e 8 com M918V) e códon 804, exon 14 (22 famílias: 15 com V804M e 7 com V804L). Quando comparado com estudos europeus, os resultados demonstraram-se heterogêneos. Enquanto as mutações nos códons C618, C620, C630, E768 e S891 são mais frequentes em populações europeias, no Brasil é menos documentada, enquanto a G533C e M918V são mais encontradas nos brasileiros. Vários estudos demonstraram que o perfil de mutação do RET pode variar conforme a área geográfica⁵⁵⁻⁶³. Esses resultados refletem a ancestralidade brasileira, predominantemente miscigenada, composta por ancestrais europeus, ameríndios e africanos⁶⁴.

Nesse sentido, a medicina de precisão admite que cada tumor possui uma assinatura molecular única, que com a ancestralidade, fatores fenotípicos e genotípicos do paciente, devem ser consideradas na adoção de abordagens terapêuticas. Por isso, o uso de metodologias combinadas (técnicas de imagem, características citológicas, testes moleculares (DNA e RNA), modelos estatísticos computacionais) possibilitam definir com maior precisão o diagnóstico do paciente e orientar a prática médica⁶⁵.

Atualmente há muitos testes comerciais disponíveis, os quais analisam uma gama variada de marcadores genéticos, o que comparado à classificação mais atualizada de Bethesda, de 2017, inclui nódulos de tireoide de atipia de significado indeterminado ou lesão folicular de significado indeterminado (AUS/FLUS) e neoplasia folicular ou suspeito para neoplasia folicular (SN/SFN) ²¹.

Dentre os testes utilizando os NGS disponíveis, cuja função visa a distinção de lesões benignas e malignas, apesar de valores preditivos positivos e negativos serem ainda elevados, não demonstrando efetividade na redução de cirurgias; para evitar exames citológicos e cirurgias desnecessárias, é preciso a validação na população brasileira ³⁵.

O *ThyroSeq* é um teste molecular que usa a tecnologia de NGS e pode analisar um painel muito amplo de mutações, rearranjos e genes (TERT, TP53, BRAF V600E, NTRK3, fusão RET, RAS, BRAF K601E, PTEN, IDH2, DICER 1, PPARG-THADA e os RAS-like (KRAS, HRAS e NRAS). Hoje, já se encontra na sua terceira versão (*ThyroSeq@v3*) e avalia mutações oncogênicas em 112 genes (12.135 variantes), mais de 120 fusões gênicas, alterações em número de cópias em 10 regiões cromossômicas e análise de expressão em 19 genes. Apesar da alta sensibilidade e especificidade encontrada nesse teste no estudo original, bem como em estudos de validações, muitas das mutações descritas ainda se encontram sem correlação com a sua funcionalidade clínica ³⁵.

Outro teste disponível no mercado é o *ThyGeNEXT* em união ao *ThyraMIR*. Nos estudos de validação deste teste, foram analisadas as variantes de DNA de BRAF, ALK, GNAS, HRAS, KRAS, NRAS, PIK3K, PTEN, RET, e TERT promoter, enquanto as fusões e os miRNAs foram relacionados aos genes BRAF, ALK, NTRK, PPARG, RET, THADA, NKX2.1, PAX8, TBP e USP33, todos relacionados ao teste *ThyGeNEXT*. Em relação ao *ThyraMIR*, notam-se alguns dos microRNAs analisados: miR-31-5p, miR-29b-1-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, miR-551b-3p. O teste *ThyGeNEXT* sozinho tem valor preditivo positivo e valor preditivo negativo interessantes. Com o acréscimo das mutações TERT e ALK, esse painel consegue prever as características de agressividade dos tumores, tendo, assim, papel prognóstico. No entanto, não há estudos de validação independente para ratificar esses dados iniciais em populações brasileiras ^{22, 35, 66, 67}.

O *The Afirma Gene Expression Classifier* analisa a expressão de mRNA de 167 genes, demonstrando resultado benigno ou suspeito. Do ponto de vista diagnóstico e importância para mudança no manejo, tem utilidade restrita a uma faixa de prevalência de malignidade em torno de 12,15% a 21-25%, tendo em vista os altos valores preditivos negativos (VPN) (enfoque para AUS/FLUS e SN/SFN; VPN alto para exclusão de malignidade) e baixos valores preditivos positivos (VPP). Em relação ao enfoque de conduta, o teste indica que, se o resultado for classificado como indeterminado, numa faixa

de malignidade que varia de 12% a 25%, (AUS/FLUS; FN/SFN), o paciente não precisará de cirurgia, fora dessa faixa, o teste não consegue indicar alterações na conduta ⁶⁸. Apesar disso, outros estudos demonstram que o número de citologias indeterminadas aumentou e o número de cirurgias não foi reduzido. Assim sendo, estes testes necessitam de melhor avaliação quanto à sua aplicabilidade ²².

O *Mir-THYpe*® é um teste brasileiro que foi desenvolvido e validado pela *startup* ONKOS Diagnósticos Moleculares, em parceria com o Hospital do Câncer de Barretos. É o único exame genético para classificação molecular de nódulo de tireoide indeterminado que foi desenvolvido e validado utilizando 100% de amostras de pacientes brasileiros. Nesse teste, o material genético (miRNAs) é extraído a partir das lâminas da PAAF. O teste mede a expressão de 11 miRNAs (seis normalizadores e cinco discriminadores) e identifica um padrão na expressão dessas moléculas. Por meio da utilização de um algoritmo de inteligência artificial, o padrão de expressão dos miRNAs da amostra é comparado com o padrão de expressão de outras amostras sabidamente benignas ou malignas; com isso, o teste gera um resultado sugerindo amostra “positiva” para malignidade ³⁸. No entanto, apesar de ser um teste promissor, os resultados do estudo multicêntrico ainda não foram publicados, e faltam os dados de validações independentes, para que se permita avaliar a aplicabilidade do teste na população brasileira ³⁵.

Apesar dos avanços, como ainda existem lacunas a serem esclarecidas, novos estudos são necessários no entendimento das bases genéticas, para disponibilizar tratamentos mais eficazes, por permitir ao médico acesso às informações mais específicas sobre o potencial risco e prognóstico do CT, possibilitando adequação de conduta personalizada.

Recomendações internacionais para o uso de testes genéticos aplicados ao diagnóstico molecular de nódulos da tireoide

Atualmente, nos casos de nódulos tireoidianos malignos classificados na citologia como indeterminado, diversas diretrizes nacionais e internacionais ressaltam os avanços diagnósticos, recomendando a complementação com testes moleculares, uma vez que ampliam a acurácia do exame citológico, e conseqüentemente, reduzem intervenções cirúrgicas. Alguns destes testes, que incluem painéis com 07 genes, já estão sendo aplicados em diversas regiões do mundo, impactando na estratificação de risco pré-operatório por demonstrar que as PAAFs positivas para mutação estão relacionadas ao risco de malignidade em qualquer classificação diagnóstica ^{29, 69-71}.

A *American Thyroid Association* (ATA) revisou em 2015 suas diretrizes para o manejo de nódulos da tireoide incluindo recomendações sobre avaliação inicial, critérios clínicos e ultrassonográficos para biópsia aspirativa por agulha fina (PAAF), interpretação dos resultados da biópsia e a inclusão de diagnóstico molecular na tomada de decisão. A utilidade específica desses novos testes moleculares está se tornando amplamente apreciada,

especialmente na tomada de decisão perioperatória em relação à necessidade de cirurgia e à extensão da ressecção inicial^{72, 73}.

Tabela 2. Sistema Bethesda 2018: risco de malignidade e conduta clínica recomendada.

Categoria de diagnóstico	Risco de malignidade (%)	Recomendação
Sem diagnóstico ou insatisfatório	5-10 b	Repetir a PAAF com orientação de ultrassom
Benigno	0-3 c	Acompanhamento clínico e ultrassonográfico
Atipia de significância indeterminada ou lesão folicular de significância indeterminada	~10-30 d	Repetir a PAAF, teste molecular e lobectomia
Neoplasia folicular ou suspeita de neoplasia foliculare	25-40 f	Teste molecular ou lobectomia
Suspeita de malignidade	50-75	Tireoidectomia quase total ou lobectomia g . h
Maligno	90-99	Tireoidectomia quase total ou lobectomia g . h

Fonte: Adaptado de *The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*, 2ª edição.

- a. O gerenciamento pode depender de outros fatores (por exemplo, clínico, ultrassonográfico) além da interpretação de PAAF;
- b. O risco de malignidade varia com o tipo/estrutura do nódulo, ou seja, sólido vs. complexo vs. ≥50% cístico. Aspirados de nódulos sólidos sem diagnósticos estão associados a um risco maior de malignidade em comparação com aqueles que apresentam alteração ≥50% cística e características ultrassonográficas de baixo risco;
- c. Estimativas obtidas de estudos que mostram correlação entre nódulo biopsiado e acompanhamento patológico pós cirurgia;
- d. Estimativas obtidas de dados histopatológicos de estudos de coortes (incluindo repetição de PAAFs atípicos) e meta-análise da literatura pós-2007;
- e. Inclui casos de neoplasia folicular com características oncocíticas (neoplasia de células de Hürthle);
- f. Estimativas obtidas de dados histopatológicos de estudos de coortes e meta-análise da literatura pós-2007;
- g. Alguns estudos recomendaram análise molecular para avaliar o tipo de procedimento cirúrgico (lobectomia vs. tireoidectomia total)
- h. No caso de "suspeita de tumor metastático" ou uma interpretação "maligna" indicando tumor metastático em vez de uma malignidade primária da tireoide, a cirurgia pode não ser indicada.

Em 2016, a segunda edição do “*The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology*”, elaborada durante o Congresso Internacional de Citologia, em Yokohama, Japão, por citopatologistas, patologistas e cirurgiões endocrinológicos os quais revisaram as diretrizes para o manejo de pacientes com nódulos da tireoide, recomendaram o diagnóstico molecular como importante aliado para complementar a avaliação do risco de malignidade antes de prosseguir diretamente com a cirurgia²¹.

Recentemente, a *European Society for Medical Oncology* (ESMO) com base nos critérios propostos pela *World Health Organization* (WHO) atualizou as suas diretrizes enfatizando uma abordagem multidisciplinar minimamente invasiva e recomendou que nos casos dos nódulos puncionados por PAAF, com a avaliação citológica, deve ser realizada a avaliação dos marcadores moleculares associados à malignidade apresentados na **tabela 2**^{4, 29, 70}.

No Brasil, o Consenso Brasileiro sobre Nódulos e Câncer Diferenciado de Tireoide, da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), desde 2007 recomendou o diagnóstico molecular complementar; na revisão de 2013, apresentou atualizações do diagnóstico molecular, com a inclusão de mutações em genes específicas (como BRAF V600E e RAS) ou rearranjos gênicos (como RET/PTC e PAX8/PPARγ), as quais definem malignidade. Infelizmente, o uso de painel com os marcadores BRAF, RAS, rearranjos RET/PTC e PAX8/PPARγ na prática clínica ainda deixa de identificar 36% dos casos de malignidade (sensibilidade de 64%), requerendo o estudo e a implantação de outros marcadores, bem como os microRNAs, os quais vêm demonstrando bons resultados em pesquisas preliminares⁷⁴.

Com o avançar do conhecimento, a ESMO criou a Escala para Ação Clínica de Alvos Moleculares (ESCAT), que visa melhorar o entendimento a respeito da aplicação dos marcadores moleculares, auxiliar na decisão médica oportuna e ampliar a eficácia do tratamento. Esta implementação, por meio de relatórios de sequenciamento, quadros de tumores e comunicação científica ampla, permite discussões e disponibiliza novas opções terapêuticas⁷⁰.

Portanto, para conseguirmos individualizar o tratamento, conforme sugerido nos *guidelines*, necessitamos com urgência de estudos ampliados sobre as mutações desconhecidas. Caso os painéis moleculares permaneçam sem estas descrições, o desempenho da análise fica deficitário, e os custos elevados; além de comprometer a aplicabilidade na prática clínica. Assim, os testes ou painéis moleculares empregados no diagnóstico e prognóstico do CT, que apresentam maior sensibilidade e especificidade, reduzirão sensivelmente os custos do sistema de saúde³⁵.

Do ponto de vista prognóstico, com a medicina de precisão e a disponibilidade destes bancos de *big data*, geraram-se muitos dados *in silico*. Sabemos que os testes ampliaram o número de alterações moleculares conhecidas, melhorando, assim, os seus desempenhos.

Entretanto, conforme listado anteriormente, apesar de estar presente nos testes comercializados, apenas uma minoria dos pacientes teve acesso a um teste genético e ainda não ocorreu a validação e muito menos a aplicação na prática clínica em populações da região norte brasileira.

Tabela 3. Classificação da OMS para diferenciação de carcinomas da tireoide derivados-foliculares: parâmetros morfológicos e marcadores moleculares.

Tipo de tumor	Morfologia	Marcadores Moleculares
Carcinoma papilífero	NIFTP	Encapsulados, núcleo claro, sem papilas RAS, BRAF K601E
	Clássico	papilas e núcleo claro BRAF V600E, RET/PTC fus, NTRK fus, ALK fus, 1q amp
	Variante folicular	folículos e núcleo claro BRAF K601E, RAS, PAX8/PPAR γ , EIF1AX, THADA fus, 22q del
	Variante s: células altas, solidas, hobnail e tall	Estrutura especial e recursos celulares BRAF V600E, 1q amp, TERT promotor, TP53, PIK3CA, CTNNB1
Carcinoma folicular	Invasão capsular (MI), invasão vascular >4 vasos sanguíneos (angioinvasivos), invasão extratireoidiana (WI)	RAS, PAX8/PPAR γ , PTEN, PIK3CA, TSHR, TERT promotor, CNA
Carcinoma de células de Hürthle	Invasão capsular (MI), invasão vascular >4 vasos sanguíneos (WI)	RAS, EIF1AX, PTEN, TP53, CNA, mtDNA
Carcinoma mal diferenciado	Invasão, mitoses >3, necrose, núcleo convoluto	RAS, TERT promotor, TP53, PIK3CA, PTEN, CTNNB1, AKT1, EIF1AX, ALK fus, histona metiltransferases, SWI/SNF complexo de remodelação da cromatina

Fonte: Adaptado de Filetti, et. al, *Annals of Oncology* 30: 1856–1883, 2019 doi:10.1093/annonc/mdz400 Published online 24 September 2019. * amp, amplificação; CNA, alteração do número de cópia; del, deleção; fus, fusão; MI, minimamente invasivo; NIFTP, neoplasia folicular não invasiva da tireoide com características nucleares semelhantes a papilares; SWI/SNF, switch/sacarose não fermentável; OMS, Organização Mundial da Saúde; WI, amplamente invasivo.

CONCLUSÃO

Nesta revisão integrativa da literatura, os marcadores individuais observados como de maior relevância foram o promotor TERT e a mutação BRAF. O TERT é relacionado à maior agressividade e invasão do tumor, além de especificidade e VPP altos para diagnosticar lesões malignas, no entanto, a sua positividade ainda não define a conduta cirúrgica^{45-47, 49}. O BRAF, principalmente na variante BRAF V600E, prevê a malignidade quando positivado, tendo indicação de tireoidectomia mesmo com PAAFs indeterminadas em alguns estudos, e, no prognóstico, tem relação com metástase nodal, extensão extratireoidiana e recorrência⁴⁶⁻⁴⁸. O RET/RET-PTC é associado aos prognósticos ruins de carcinomas medulares e papilíferos, com a positividade dele como um indicativo para tireoidectomia total nos casos de PAAFs suspeitas para malignidade^{46, 47, 49}. Dentro das variantes dele, RET/PTC1 relacionou-se a casos de CPT com histologia clássica e o RET/PTC3 à variante sólida⁴³.

As mutações do gene RAS e rearranjos do PAX8-PPAR γ foram detectadas em carcinomas e adenomas foliculares, assim como variantes foliculares do carcinoma papilífero⁴³. As alterações RET e RAS ainda eram presentes em 50-80% dos casos de CMTe, podendo ser considerado marcador de pior prognóstico⁵⁰.

Em relação aos testes disponíveis, notou-se que a função principal é distinguir lesões benignas e malignas, a fim de reduzir a quantidade de citologias e cirurgias desnecessárias dos nódulos indeterminados. Porém, testes como The Afirma Gene Expression Classifier e o ThyGeNEXT em união ao ThyraMIR, apesar de valores preditivos positivos e negativos altos, ainda não conseguiram se mostrar efetivos para a diminuição de cirurgias. Ademais, nesta revisão, somente o *Mir-THYpe*® foi validado na população brasileira, com excelente custo-efetividade na redução do número de cirurgias e PAAFs desnecessárias, principalmente nos pacientes com perfil de miRNA benigno do nódulo tireoidiano³⁸; no entanto, não avaliaram as mutações somáticas como a BRAF V600E, que é bastante recorrente em todos os outros testes.

Contudo, o presente trabalho documenta a necessidade do desenvolvimento e validação de painéis genéticos específicos para a população brasileira, com ensaios clínicos randomizados alinhados ao levantamento de custo efetividade, na medida em que a maioria dos testes válidos foram estudados em populações europeias ou da América do Norte. Além disso, a implementação de um método de aprimoramento do diagnóstico do CT direciona melhor o tratamento, reduzindo gastos desnecessários com cirurgias em nódulos benignos, principalmente os classificados como indeterminados no Sistema Bethesda, o que iria proporcionar também melhor distribuição de recursos no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS).

Finalmente, estes achados cada vez mais se justificam, na medida que a prevalência do CPT aumenta entre os principais cânceres da população brasileira feminina, cujo driver oncogênico desconhecido dessa

variante é de apenas 3,5%^{35, 75}, testes de marcadores direcionados, mas que não deixem de albergar a complexidade dos drivers oncogênicos das outras variantes e miRNAs, possibilitem melhorar a especificidade, sensibilidade, VPN e VPP, o que poderá proporcionar melhor acurácia diagnóstica e do prognóstico da doença, evitando procedimentos cirúrgicos sem a certeza de malignidade.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Amazonas pelo fomento a pesquisa; aos pesquisadores envolvidos na pesquisa e ao grupo de pesquisa que sempre apoiou o projeto contribuindo para o resultado alcançado.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424; <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
2. Schilithz AOC, Lima FCS, Oliveira JFP, Santos MO, Rebelo MS. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf> [Last accessed: 3/27/2022].
3. Mungan S, Ersoz S, Saygin I, Sagnak Z, Cobanoglu U. Nuclear morphometric findings in undetermined cytology: A possible clue for prediction of BRAF mutation in papillary thyroid carcinomas. *Endocr Res* 2017;42(2):138–144; <https://doi.org/10.1080/07435800.2016.1255895>.
4. Filetti S, Durante C, Hartl D, Lebolux S, Locati LD, Newbold K, *et al.* Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 2019;30(12):1856–1883; <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz400>.
5. Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019;48(1):23–35; <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.10.002>.
6. Li M, Maso LD, Vaccarella S. Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8(6):468–470; [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30115-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30115-7).
7. Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *J Cancer Epidemiol* 2013;2013:1–10; <https://doi.org/10.1155/2013/965212>.
8. Guimarães RM, Muzi CD, Parreira VG, Santos RD, Sampaio JRC. Evolution of thyroid cancer mortality in adults in Brazil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2013;57(7):538–544; <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000700007>.
9. Scheffel RS, Zanella AB, Antunes D, Dora JM, Maia AL. Low Recurrence Rates in a Cohort of Differentiated Thyroid Carcinoma Patients: A Referral Center Experience. *Thyroid* 2015;25(8):883–889; <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0077>.
10. Santos LMS, Sales DF, Brito VS, Feitosa CA. Evolução temporal da mortalidade por câncer de tireoide no Brasil no período de 2000 a 2012. *Revista Brasileira de Análises Clínicas - RBAC n.d.*;48(2). Available from: <https://www.rbac.org.br/artigos/evolucao-temporal-da-mortalidade-por-cancer-de-tireoide-no-brasil-no-periodo-de-2000-a-2012-48n-2/> [Last accessed: 10/10/2022]
11. Vaccarella S, Dal Maso L, Laversanne M, Bray F, Plummer M, Franceschi S. The Impact of Diagnostic Changes on the Rise in Thyroid Cancer Incidence: A Population-Based Study in Selected High-Resource Countries. *Thyroid* 2015;25(10):1127–1136; <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0116>.
12. Cabanillas ME, McFadden DG, Durante C. Thyroid cancer. *The Lancet*, 2016;388(10061):2783–2795; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30172-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30172-6).
13. Releases e Notas | INCA - Instituto Nacional de Câncer. n.d. Available from: <https://www.inca.gov.br/imprensa/inca-promove-campanha-de-prevencao-ao-cancer-de-cabeca-e-pescoco> [Last accessed: 3/27/2022].
14. Nikiforov YE, Seethala RR, Tallini G, Baloch ZW, Basolo F, Thompson LD, *et al.* Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *JAMA Oncol* 2016;2(8):1023; <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0386>.
15. Xiang Z, Zhong C, Chang A, Ling J, Zhao H, Zhou W, *et al.* Immune-related key gene CLDN10 correlates with lymph node metastasis but predicts favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Aging* 2020;12(3):2825–2839; <https://doi.org/10.18632/aging.102780>.
16. Aldahmani KM, Malik AA, Aziz F, Beshyah SA. Characteristics and management of papillary thyroid microcarcinoma in the United Arab Emirates: Experience from a large tertiary hospital. *Saudi J Med Sci* 2022; 10 (1) : 42 ; https://doi.org/10.4103/sjms.sjms_393_21.
17. Medas F, Canu GL, Cappellacci F, Bof F, Lai ML, Erdas E, *et al.* Predictive Factors of Lymph Node Metastasis in Patients With Papillary Microcarcinoma of the Thyroid: Retrospective Analysis on 293 Cases. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:551; <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00551>.
18. Naoum GE, Morkos M, Kim B, Arafat W. Novel targeted therapies and immunotherapy for advanced thyroid cancers. *Mol Cancer* 2018;17(1):51; <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0786-0>.
19. Huang J, Harris EJ, Lorch JH. Treatment of Aggressive Thyroid Cancer. *Surg Pathol Clin* 2019;12 (4) : 943–950; <https://doi.org/10.1016/j.path.2019.08.004>.
20. Langer JE, Baloch ZW, McGrath C, Loevner LA, Mandel SJ. Thyroid Nodule Fine-Needle Aspiration. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 2012; 33 (2) :158–165; <https://doi.org/10.1053/j.sult.2011.12.002>.
21. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* 2017 ; 27 (11) :1341–1346; <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0500>.
22. Muzza M, Colombo C, Pogliaghi G, Karapanou O, Fugazzola L. Molecular markers for the classification of cytologically indeterminate thyroid nodules. *J Endocrinol Invest* 2020;43(6):703–716; <https://doi.org/10.1007/s40618-019-01164-w>.

23. Sheng D, Yu X, Li H, Zhang M, Chen J. BRAF V600E mutation and the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology of fine-needle aspiration biopsy for distinguishing benign from malignant thyroid nodules. *Medicine* 2021;100(37):e27167; <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000027167>.
24. Xia S, Chen Y, Zhan W, Zhou W. Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Versus Fine-Needle Capillary Sampling in Evaluation of Lymph Node Metastasis of Thyroid Cancer. *Front Oncol* 2021;11:642142; <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.642142>.
25. Chen JV, Morgan TA, Liu C, Khanafshar E, Choi HH. Cervical Lymph Node Features Predictive of Suboptimal Adequacy During Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration in Thyroid Cancer Patients. *Journal of Ultrasound in Medicine* 2022;41(1):135–145; <https://doi.org/10.1002/jum.15688>.
26. Chen JV, Morgan TA, Liu C, Khanafshar E, Choi HH. Comparison of Core Needle Biopsy and Repeat Fine-Needle Aspiration in Avoiding Diagnostic Surgery for Thyroid Nodules Initially Diagnosed as Atypia/Follicular Lesion of Undetermined Significance. *Korean J Radiol* 2022;23(2):280; <https://doi.org/10.3348/kjr.2021.0619>.
27. Mete O. Special Issue On the 2022 WHO Classification of Endocrine and Neuroendocrine Tumors: a New Primer for Endocrine Pathology Practice. *Endocr Pathol* 2022;33(1):1–2; <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09712-6>.
28. Alexander EK, Doherty GM, Barletta JA. Management of thyroid nodules. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022;10(7):540–548; [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00139-5).
29. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol* 2022;33(1):27–63; <https://doi.org/10.1007/s12022-022-09707-3>.
30. Wong KS, Barletta JA. The new endocrine WHO classification: What does this mean for thyroid cytology? *Cancer Cytopathol* 2022;130(9):658–662; <https://doi.org/10.1002/cncy.22634>.
31. Cree IA. From Counting Mitoses to Ki67 Assessment: Technical Pitfalls in the New WHO Classification of Endocrine and Neuroendocrine Tumors. *Endocr Pathol* 2022;33(1):3–5; <https://doi.org/10.1007/s12022-021-09701-1>.
32. Liu Z, Zhu L, Roberts R, Tong W. Toward Clinical Implementation of Next-Generation Sequencing-Based Genetic Testing in Rare Diseases: Where Are We? *Trends in Genetics* 2019;35(11):852–867; <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.08.006>.
33. Turro E, Astle WJ, Megy K, Gräf S, Greene D, Shamardina O, et al. Whole-genome sequencing of patients with rare diseases in a national health system. *Nature* 2020;583(7814):96–102; <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2434-2>.
34. ANS - Legislação. Resolução Normativa - rn nº 465/2021 Available from: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-normativa-rn-n-465-de-24-de-fevereiro-de-2021-306209339> [Last accessed: 10/17/2022].
35. Volpi E. Câncer da tireoide – Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento e perspectivas. 1. Europa Press Comunicação Brasil: São Paulo; n.d. Available from: https://rosaliapadovani.com.br/wp-content/uploads/2022/03/Tireoide_Livro.pdf [Last accessed: 10/13/2022]
36. Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Biol Proced Online* 2013;15(1):4; <https://doi.org/10.1186/1480-9222-15-4>.
37. Ku CS, Cooper DN, Iacopetta B, Roukos DH. Integrating next-generation sequencing into the diagnostic testing of inherited cancer predisposition. *Clin Genet* 2013;83(1):2–6; <https://doi.org/10.1111/cge.12028>.
38. Santos MT, Silveira CS, Santos D, Rodrigues BM, Santos R, Verruck L, Junges C, et al. Redução de custos e de cirurgias em uma operadora de saúde brasileira com o uso de um teste molecular para nódulos de tireoide de citologia indeterminada: uma análise retrospectiva e prospectiva de mundo real. In: Goiânia - GO: XX Encontro Brasileiro de TIREOIDE – Brazilian Archives of Endocrinology and metabolism. Available from: https://ebt2022.com.br/wp-content/uploads/2022/06/1654532724_25590_Supl._661_EBT_2022_2-2.pdf
39. Fagin JA, Wells SA. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. Longo DL, ed. *New England Journal of Medicine* 2016;375(11):1054–1067; <https://doi.org/10.1056/NEJMra1501993>.
40. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular Testing for Mutations in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2092–2098; <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0247>.
41. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* 2014;159(3):676–690; <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>.
42. Eszlinger M, Hegedüs L, Paschke R. Ruling in or ruling out thyroid malignancy by molecular diagnostics of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28(4):545–557; <https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.01.011>.
43. Lopes JPRCP. Mutação do gene BRAF na história natural do carcinoma papilar da tireoide: implicações diagnósticas e prognósticas. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade do Porto n.d. Available from: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/53431/2/Mutaes%20do%20Gene%20na%20BRAF%20na%20Historia%20Natural%20do%20Carcinoma%20Papilar%20da%20Tiride%20%20Implicaes%20Diagnosticas%20e%20Prognsticas.pdf> [Last accessed: 10/13/2022]
44. Ritterhouse LL, Barletta JA. BRAF V600E mutation-specific antibody: A review. *Semin Diagn Pathol* 2015;32(5):400–408; <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2015.02.010>.
45. Censi S, Cavedon E, Bertazza L, Galuppini F, Watutantrige-Fernando S, De Lazzari P, et al. Frequency and Significance of Ras, Tert Promoter, and Braf Mutations in Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: A Monocentric Case Series at a Tertiary-Level Endocrinology Unit. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:273; <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00273>.
46. Parangi S, Suh H. The Role of Genetic Markers in the Evaluation and Management of Thyroid Nodules. *Surgical Clinics of North America* 2014;94(3):515–528; <https://doi.org/10.1016/j.suc.2014.03.001>.
47. Raue F, Frank-Raue K. Thyroid Cancer: Risk-Stratified Management and Individualized Therapy. *Clinical Cancer Research* 2016;22(20):5012–5021; <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0484>.
48. Xing M, Haugen BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *The Lancet* 2013;381(9871):1058–1069; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60109-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60109-9).

49. Bhatia P, Abd Elmageed ZY, Friedlander P, Aslam R, Kandil E. The utility of molecular markers in pre-operative assessment of thyroid nodules. *Future Oncology* 2015;11(16):2343–2350; <https://doi.org/10.2217/fon.15.135>.
50. Ciampi R, Romei C, Ramone T, Prete A, Tacito A, Cappagli V, et al. Genetic Landscape of Somatic Mutations in a Large Cohort of Sporadic Medullary Thyroid Carcinomas Studied by Next- Generation Targeted Sequencing. *iScience* 2019;20:324–336; <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.09.030>.
51. Santana NO. Perfil clínico e molecular dos carcinomas de células de Hürthle da tireoide. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo: São Paulo; 2020; <https://doi.org/10.11606/T.5.2020.tde-31012020-105058>.
52. Pereira DP. Análise da mutação BRAFV600E em carcinoma papilífero de tireoide. In: Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia Salvador; n.d. Available from: https://ppgorgsistem.ufba.br/sites/ppgorgsistem.ufba.br/files/dissertacao_danielle_2015_versaofinal.pdf [Last accessed: 10/13/2022]
53. Silva RC. Análise da mutação V600E do gene BRAF e detecção imuno-histoquímica da proteína BRAF em carcinomas papilíferos de tireoide. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Humanas) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GOIÂNIA, 2012. Available from: <http://tede2.pucgoias.edu.br:8080/handle/tede/2345> [Last accessed: 10/13/2022]
54. Bertelli AA, Gonçalves AJ, Menezes MB, Melo MR, Tincani S, Massarollo LC. Mutação BRAF em pacientes idosos submetidos à tireoidectomia. *Rev Col Bras Cir* 2013;40(2):110–116; <https://doi.org/10.1590/S0100-69912013000200005>.
55. Niccoli-Sire P, Murat A, Rohmer V, Franc S, Chabrier G, Baldet L, et al. Familial Medullary Thyroid Carcinoma with Noncysteine RET Mutations: Phenotype-Genotype Relationship in a Large Series of Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(8):3746–3753; <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7767>.
56. Romei C, Mariotti S, Fugazzola L, Taccaliti A, Pacini F, Opocher G, et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 syndromes (MEN 2): results from the ItAMEN network analysis on the prevalence of different genotypes and phenotypes. *Eur J Endocrinol* 2010;163(2):301–308; <https://doi.org/10.1530/EJE-10-0333>.
57. Machens A, Lorenz K, Sekulla C, Höppner W, Frank-Raue K, Raue F, et al. Molecular epidemiology of multiple endocrine neoplasia 2: implications for RET screening in the new millennium. *Eur J Endocrinol* 2013;168(3):307–314; <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0919>.
58. Romei C, Mariotti S, Fugazzola L, Taccaliti A, Pacini F, Opocher G, et al. Twenty years of lesson learning: how does the RET genetic screening test impact the clinical management of medullary thyroid cancer? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015;82(6):892–899; <https://doi.org/10.1111/cen.12686>.
59. Martins-Costa MC, Cunha LL, Lindsey SC, Camacho CP, Dotto RP, Furuzawa GK, et al. M918V RET mutation causes familial medullary thyroid carcinoma: study of 8 affected kindreds. *Endocr Relat Cancer* 2016;23(12):909–920; <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0141>.
60. Opsahl EM, Brauckhoff M, Schlichting E, Helset K, Svartberg J, Brauckhoff K, et al. A Nationwide Study of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A in Norway: Predictive and Prognostic Factors for the Clinical Course of Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid* 2016;26(9):1225–1238; <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0673>.
61. Mathiesen JS, Kroustrup JP, Vestergaard P, Stochholm K, Poulsen PL, Rasmussen ÅK, et al. Distribution of RET Mutations in Multiple Endocrine Neoplasia 2 in Denmark 1994–2014: A Nationwide Study. *Thyroid* 2017;27(2):215–223; <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0411>.
62. Cunha LL, Lindsey SC, França MI, Sarika L, Papathoma A, Kunii IS, et al. Evidence for the founder effect of RET533 as the common Greek and Brazilian ancestor spreading multiple endocrine neoplasia 2A. *Eur J Endocrinol* 2017;176(5):515–519; <https://doi.org/10.1530/EJE-16-1021>.
63. Machens A, Lorenz K, Weber F, Dralle H. Geographic epidemiology of medullary thyroid cancer families: unearthing European ancestral heritage. *Endocr Relat Cancer* 2018;25(4):L27–L30; <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0514>.
64. Maciel RMB, Camacho CP, Assumpção LVM. Genotype and phenotype landscape of MEN2 in 554 medullary thyroid cancer patients: the BrasMEN study. *Endocr Connect* n.d.;v. 8, n. 3:289–298; <https://doi.org/10.1530/EC-18-0506>.
65. Zafon C, Díez JJ, Galofré JC, Cooper DS. Nodular Thyroid Disease and Thyroid Cancer in the Era of Precision Medicine. *Eur Thyroid J* 2017;6(2):65–74; <https://doi.org/10.1159/000457793>.
66. Lupo MA, Walts AE, Sistrunk JW, Giordano TJ, Sadow PM, Massoll N, et al. Multiplatform molecular test performance in indeterminate thyroid nodules. *Diagn Cytopathol* 2020;48(12):1254–1264; <https://doi.org/10.1002/dc.24564>.
67. Krane JF, Cibas ES, Endo M, Marqusee E, Hu MI, Nasr CE, et al. The Afirma Xpression Atlas for thyroid nodules and thyroid cancer metastases: Insights to inform clinical decision-making from a fine-needle aspiration sample. *Cancer Cytopathol* 2020;128(7):452–459; <https://doi.org/10.1002/cncy.22300>.
68. Zhang M, Lin O. Molecular Testing of Thyroid Nodules: A Review of Current Available Tests for Fine-Needle Aspiration Specimens. *Arch Pathol Lab Med* 2016;140(12):1338–1344; <https://doi.org/10.5858/arpa.2016-0100-RA>.
69. Eszlinger M, Böhme K, Ullmann M, Görke F, Siebolts U, Neumann A, et al. Evaluation of a Two-Year Routine Application of Molecular Testing of Thyroid Fine-Needle Aspirations Using a Seven-Gene Panel in a Primary Referral Setting in Germany. *Thyroid* 2017;27(3):402–411; <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0445>.
70. Filetti S, Durante C, Hartl DM, Leboulleux S, Locati LD, Newbold K, et al. ESMO Clinical Practice Guideline update on the use of systemic therapy in advanced thyroid cancer. *Annals of Oncology* 2022;33(7):674–684; <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.04.009>.
71. Belvicine C, Migliatico I, Sgariglia R, Nacchio M, Vigliar E, Pisapia P, et al. Evaluation of BRAF, RAS, RET/PTC, and PAX8/PPARG alterations in different Bethesda diagnostic categories: A multicentric prospective study on the validity of the 7-gene panel test in 1172 thyroid FNAs deriving from different hospitals in South Italy. *Cancer Cytopathol* 2020;128(2):107–118; <https://doi.org/10.1002/cncy.22217>.
72. Ferris RL, Baloch Z, Bernet V, Chen A, Fahey TJ, Ganly I, et al. American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making. *Thyroid* 2015;25(7):760–768; <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0502>.
73. 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; <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>.

74. Rosário PW, Ward LS, Carvalho GA, Graf H, Maciel RM, Maciel LM, *et al.* Thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: update on the Brazilian consensus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2013;57(4):240–264; <https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000400002>.

75. Borges AKM, Ferreira JD, Koifman S, Koifman RJ. Câncer de tireoide no Brasil: estudo descritivo dos casos informados pelos registros hospitalares de câncer, 2000-2016*. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 2020;29(4); <https://doi.org/10.5123/S1679-49742020000400012>.

Submetido em: 20.10.2022

Aceito em: 23.06.2023