UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

Freddy David Moposita Molina

Avaliação Molecular de Nódulos de Tireoide

Porto Alegre
2024

Freddy David Moposita Molina

Avaliação Molecular de Nódulos de Tireoide

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Suñé Mattevi
Coorientadora: Profa. Dra. Lenara Golbert

Porto Alegre
2024

Catalogação na Publicação

Moposita Molina, Freddy David
Avaliação Molecular de Nódulos de Tireoide / Freddy David Moposita Molina. -- 2024.
66 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2024.

Orientador(a): Vanessa Suñé Mattevi ; coorientador(a): Lenara Golbert.

1. Nódulos tireoidianos. 2. Diagnosticando mutações. 3. Nódulos indeterminados. 4. Câncer de tireoide. 5. Diagnóstico Molecular. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi executado com recursos do Edital Universal – CNPq e do Programa de fomento para a realização de projetos de pesquisa na UFCSPA. O aluno Freddy David Moposita Molina recebeu bolsa da CAPES.

AGRADECIMENTOS

Quero dedicar especialmente esta mestria a Lizbeth, minha esposa, por estar aqui, apoiando-me neste novo objetivo. Obrigado por tudo.

A meus pais Nelson Moposita e Lorena Molina, por me oferecerem sempre os conselhos nos momentos mais difíceis da minha vida e permitirem que eu alcançasse as metas que desde criança eles vinham me ensinando.

À professora Vanessa, meu mais sincero agradecimento pela acolhida e pela disponibilidade incansável em me ajudar em todos os momentos, não só me ajudou com meus estudos, além cuidou do meu bem-estar.

À professora Lenara, obrigada por estar ali contribuindo com seu conhecimento, pela paciência que teve nos momentos mais complicados do meu mestrado.

Às técnicas do Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA, Grasiela e Marília, por todos os ensinamentos ao longo da parte experimental deste trabalho, pelas boas conversas no laboratório e porque sempre estiveram atentas para que eu esteja bem.

Aos funcionários, servidores, docentes e discentes do PPG Biociências e da UFCSPA pelo suporte e pelo aprendizado mútuo.

Graças a Deus e obrigado a todos por tornarem isso possível

RESUMO

Apesar de sua alta prevalência e natureza benigna na maioria dos casos, a investigação dos nódulos da tireoide ainda apresenta potenciais armadilhas diagnósticas, especialmente em casos com citologia indeterminada. Este estudo visa verificar a prevalência de mutações nos genes *BRAF, RAS* e rearranjos *RET/PTC* em pacientes submetidos à punção aspirativa por agulha fina por ultrassonografia (PAAF-US) para nódulos tireoidianos. A extração de DNA e RNA total foi realizada com Trizol, seguida da avaliação da proporção de células epiteliais tireoidianas através da expressão do gene de citoqueratina 7. As mutações pontuais foram detectadas por análise de DNA utilizando sequenciamento de Sanger. Para os rearranjos, se desenharam primers para flanquear o ponto de fusão, e os produtos de PCR das fusões gênicas se visualizaram através de eletroforese em gel de agarose. Os resultados positivos foram confirmados por sequenciamento de Sanger dos produtos de PCR. Um total de 231 nódulos tireoidianos em 220 pacientes foram avaliados, sendo 86.8% do sexo feminino e com uma idade média de 55.6±13.9 anos. A distribuição citológica foi a seguinte: 4.8% (n = 11) não diagnósticos (Bethesda I); 61.0% (n=141) benignos (Bethesda II); 13.9% (n=32) atipias de significado indeterminado (AUS) (Bethesda III); 12.1% (n=28) neoplasia folicular (FN) (Bethesda IV); 4.3% (n=10) suspeitos de malignidade (Bethesda V); e 3.9% (n=9) malignos (Bethesda VI). Para a análise molecular, foram incluídas amostras que continham quantidade suficiente de ácidos nucleicos e uma proporção de células epiteliais superior a 10%. Portanto, foram obtidos DNA e RNA de qualidade de 200 amostras. As mutações *BRAF, RAS* e rearranjos *RET/PTC* foram identificadas em 14% das 200 amostras. A frequência das mutações *BRAF-like* foi de 5.5%, detectadas em 9 dos 17 nódulos malignos (52.9%) e em um nódulo benigno (0.7%). Quatorze mutações do tipo *RAS-like* foram identificadas em nódulos benignos (57.1% *HRAS*, 21.5% *NRAS* e 21.5% *KRAS*) e apenas uma estava presente em um nódulo maligno (5.9%). Quando consideramos os nódulos com citologia indeterminada (Bethesda III e IV, n = 53), 9 mutações foram detectadas, 6 associadas à histologia benigna (todas *RAS-like*), 1 com histologia maligna (*BRAF-like*) e 2 ainda não operados, portanto, sem diagnóstico histopatológico. Esta pesquisa conclui que a presença da mutação BRAF *V600E* pode ser útil para apoiar o diagnóstico de câncer de tireoide, devido ao seu alto valor preditivo positivo, uma vez que 89% dos nódulos com mutação BRAF *V600E* eram

malignos. Além disso, critérios clínicos devem ser estabelecidos para determinar quais nódulos com mutações do tipo *RAS-like* requerem acompanhamento mais próximo, particularmente aqueles com citologia indeterminada.

Palavras-chave: Nódulos de tireoide, mutações, câncer de tireoide, nódulos indeterminados, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Despite its high prevalence and benign nature in most cases, the investigation of thyroid nodules still presents potential diagnostic pitfalls, especially in cases with indeterminate cytology. This study aims to verify the prevalence of mutations in the *BRAF, RAS* genes, and *RET/PTC* rearrangements in patients undergoing fine-needle aspiration biopsy guided by ultrasound (FNAB-US) for thyroid nodules. DNA and total RNA extraction was performed using Trizol, followed by the assessment of thyroid epithelial cell proportion through the expression of the cytokeratin 7 gene. Point mutations were detected by DNA analysis using Sanger sequencing. For rearrangements, primers were designed to flank the fusion point, and PCR products of gene fusions were visualized through agarose gel electrophoresis. Positive results were confirmed by Sanger sequencing of the PCR products. A total of 231 thyroid nodules in 220 patients were evaluated, with 86.8% being female, with a mean age of 55.6 ± 13.9 years. The cytological distribution was as follows: 4.8% (n = 11) non-diagnostic (Bethesda I); 61.0% (n=141) benign (Bethesda II); 13.9% (n=32) atypia of undetermined significance (AUS) (Bethesda III); 12.1% (n=28) follicular neoplasia (FN) (Bethesda IV); 4.3% (n=10) suspicious for malignancy (Bethesda V); and 3.9% (n=9) malignant (Bethesda VI). For molecular analysis, samples containing sufficient nucleic acids and a proportion of epithelial cells greater than 10% were included. Therefore, quality DNA and RNA were obtained from 200 samples. *BRAF, RAS* mutations, and *RET/PTC* rearrangements were identified in 14% of the 200 samples. The frequency of *BRAF-like* mutations was 5.5%, detected in 9 of the 17 malignant nodules (52.9%) and in one benign nodule (0.7%). Fourteen *RAS-like* mutations were identified in benign nodules (57.1% *HRAS*, 21.5% *NRAS*, and 21.5% *KRAS*), with only one present in a malignant nodule (5.9%). When considering nodules with indeterminate cytology (Bethesda III and IV, n = 53), 9 mutations were detected: 6 associated with benign histology (all *RAS-like*), 1 with malignant histology (*BRAF-like*), and 2 that were still unoperated, thus lacking histopathological diagnosis. This research concludes that the presence of the BRAF *V600E* mutation may be useful in supporting the diagnosis of thyroid cancer due to its high positive predictive value, as 89% of nodules with the BRAF *V600E* mutation were malignant. Furthermore, clinical criteria should be established to determine which nodules

with *RAS-like* mutations require closer monitoring, particularly those with indeterminate cytology.

Keywords: Thyroid nodules, mutations, thyroid cancer, indeterminate nodules, molecular diagnosis

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Classificação da OMS dos Neoplasmas da Tireoide, 5ª Edição.....14

Tabela 2. Sistema de classificação citopatológico Bethesda.....17

Figure 1. Oncogenes *RET/PTC*.....22

ARTIGO

Table 1. *Primers list for PCR*.....41

Table 2. *Demographic and clinical-pathological characteristics of patients with thyroid nodules*…….42

Table 3. *Probability of cancer in thyroid nodules depending on the results of cytological and molecular analysis* 43

Figure 1. *Classification of thyroid nodules based on cytological analysis*.....44

Figure 2. *Correlation between cytology, molecular findings, and histological diagnosis* .45

Figure 3. *Performance of molecular testing in specific categories of indeterminate FNA cytology*.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR: *American College of Radiology*
AUS: Lesão de significado incerto
BRAF: Oncogene do sarcoma viral murino homólogo B
CAT: Câncer anaplásico de tireoide
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
CDT: Câncer diferenciado de tireoide
CFT: Câncer folicular de tireoide
CMT: Câncer medular de tireoide
CPT: Câncer papilar de tireoide
CT: Câncer da tireoide
CTPD: Câncer da tireoide pouco diferenciado
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNT: Doença nodular da tireoide
dT: Desoxitimidina
EU: European Thyroid Association
FN: Neoplasia folicular
GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
KRT7: Citoqueratina-7
MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno
NCOA4: Coativador do receptor nuclear 4
NT: Nódulo de tireoide
OMS: Organização Mundial da Saúde
PAAF: Punção aspirativa por agulha fina
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PI3K: Fosfatidilinositol-3 quinase
qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RAS: Gene Sarcoma de rato
RET/PTC: Reorganizado durante a transfecção / Carcinoma papilífero da tireoide
RNA: Ácido ribonucleico
RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa

TIRADS: *Thyroid Imaging Reporting and Data Systems*

TK: Tirosina-quinase

TSH: Hormônio estimulante da tireoide

US: Ultrassonografia

VPN: Valor preditivo negativo

VPP: Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....13
1.1. Carcinoma Diferenciado da Tireoide……13
1.2. Avaliação da Doença Nodular de Tireoide……...15
1.3. Citologia Indeterminada……18
1.4.Eventos moleculares associados à tumorigênese da tireoide..... 18
1.5. Avaliação Molecular dos Nódulos da Tireoide 22
2. OBJETIVOS..... 25
3. ARTIGO CIENTÍFICO..... 26
4. DISCUSSÃO..... 47
5. CONCLUSÕES..... 50
6. REFERÊNCIAS..... 51
7. ANEXO I – Registro do Projeto de Pesquisa.....56
8. ANEXO II – Currículo Lattes…….62

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Diferenciado da Tireoide

O câncer de tireoide (CT) constitui um grupo de neoplasias que se origina de células epiteliais foliculares ou células C parafoliculares desta glândula. Os CTs derivados de células foliculares são classificados em CT papilar (CPT, correspondendo a cerca de 80-85% dos casos), CT folicular (CFT, cerca de 10-15% dos tumores), CT pouco diferenciado (CTPD, < 2% dos casos) e câncer anaplásico de tireoide (CAT, < 2% dos casos). CPT e CFT são carcinomas diferenciados de tireoide que representam mais de 85% de todos os tipos histológicos. Por outro lado, o CT medular (CMT), derivado de células C parafoliculares é pouco comum (menos de 5% dos casos) (Laha et al., 2020).

Os carcinomas diferenciados de tireoide (CDTs) mantêm algumas funções normais dessas células, como a capacidade de captar iodo, que é utilizada no tratamento com iodo radioativo. Histologicamente, os CDTs são caracterizados por padrões variados, incluindo papilífero e folicular, com a presença de estruturas como papilas, microfolículos e células com núcleos características, como os núcleos em 'olho de vidro'. Esses aspectos histológicos ajudam a distinguir os diferentes subtipos de CDT e a orientar o tratamento adequado. O carcinoma papilar de tireoide, na maioria dos casos, tem um bom prognóstico. Porém, entre 10% a 15% dos pacientes têm doença recorrente, e 5% desenvolverão metástases à distância (geralmente em pulmões e ossos). A classificação das variantes do CPT de acordo com a análise das características morfológicas e patológicas em relação ao diagnóstico clínico dos pacientes inclui: a variante clássica do CPT (50-60% dos casos de CPT), a variante de célula altas do CPT (5-15% de todos os casos de CPT) e a variante folicular do CPT (24-33% dos casos de CPT), entre outras menos prevalentes.

O carcinoma folicular (CFT) é o segundo tipo mais comum de câncer de tireoide. Geralmente, apresenta um comportamento mais agressivo do que o CPT, com tendência à disseminação hematogênica para pulmões, ossos, fígado e outros, resultando em um prognóstico ligeiramente inferior ao do CPT (Laha et al., 2020; Grimm, 2022).

A nova classificação da OMS para as neoplasias da tireoide de 2022 introduz uma estrutura baseada na origem celular, nas características patológicas, na classificação molecular e no comportamento biológico (Tabela 1). Reconhecem-se novas categorias e subtipos morfológicos de neoplasias benignas, de baixo risco e malignas, com termos revisados e um sistema de classificação para carcinomas medulares.

Tabela 1. Classificação da OMS dos Neoplasias da Tireoide, 5ª Edição

Anormalidades do desenvolvimento
1. Cisto do ducto tireoglosso
2. Outras anormalidades congênitas da tireoide
Neoplasmas derivados de células foliculares
1. Tumores benignos
a. Doença nodular folicular da tireoide
b. Adenoma folicular
c. Adenoma folicular com arquitetura papilar
d. Adenoma oncocítico da tiroide
2. Neoplasmas de baixo risco
a. Neoplasma tireoidiano folicular não invasivo com características nucleares semelhantes às do carcinoma papilar
b. Tumores tireoidianos de potencial maligno incerto
c. Tumor trabecular hialinizante
3. Neoplasmas malignos
a. Carcinoma folicular da tireoide
b. Carcinoma papilar encapsulado folicular invasivo
c. Carcinoma papilar da tiroide
d. Carcinoma oncocítico da tiroide
e. Carcinomas derivados de folículos de alto grau
i. Carcinoma diferenciado de alto grau da tiroide
f. Carcinoma tireoidiano anaplásico derivado de células foliculares
Carcinoma derivado de células C da tiroide
1. Carcinoma medular da tireoide
Carcinomas mistos derivados de células foliculares e células C
Carcinomas do tipo glândula salivar da tiroide
1. Carcinoma mucoepidermoide da tiroide
2. Carcinoma secretório do tipo glândula salivar
Tumores tireoidianos de histogênese incerta
1. Carcinoma mucoepidermoide esclerosante com eosinofilia
2. Carcinoma tireoidiano cribriforme-morular
Tumores tímicos na tiroide
1. Família do timoma
2. Tumor epitelial fusiforme com elementos semelhantes ao timo
3. Família do carcinoma tímico
Neoplasmas embrionários da tireoide
1. Tireoblastoma

Adaptado de: Baloch et al., 2022.

Além disso, incluem-se tumores de origem incerta e neoplasias embrionárias, bem como uma categorização separada para neoplasias mesenquimais, estromais, hematolinfoides, de células germinativas e malignidades metastáticas. Esta classificação permite uma compreensão mais precisa e detalhada das neoplasias da tireoide, melhorando o diagnóstico e a planificação do tratamento (Baloch et al., 2022). O foco desta dissertação serão as neoplasias originárias das células foliculares da tireoide, excluindo-se os carcinomas medulares de tireoide (CMT) e outras origens.

O tratamento padrão para a maioria dos pacientes com carcinomas de tireoide é a ressecção cirúrgica. Geralmente, pacientes com CDT de baixo risco, podem ser tratados apenas com cirurgia, enquanto pacientes de alto risco necessitam de supressão da tireotrofina (TSH) e radioiodoterapia. Após o tratamento inicial, a recorrência da doença é maior nos primeiros 5 a 8 anos, embora também possa ocorrer após décadas. A taxa de sobrevida em longo prazo em pacientes com CDT é de cerca de 90%, enquanto pacientes com tipos pouco diferenciados de CT apresentam uma taxa de sobrevida em longo prazo inferior a 10% devido à sua resistência às opções de tratamento padrão. Deve-se notar que o câncer anaplásico de tireoide está relacionado a maioria das mortes devido ao seu alto grau de malignidade (Laha et al., 2020; Grimm, 2022).

O diagnóstico diferencial entre adenomas e carcinomas de tireoide é complexo em amostras indeterminadas devido à sobreposição em suas características histológicas e citológicas, pois ambos podem apresentar uma arquitectura folicular semelhante. A distinção baseia-se em critérios histopatológicos, especialmente a presença de estruturas invasivas. As neoplasias de baixo risco apresentam um comportamento incerto, o que significa que, apesar de terem características histológicas benignas, seu potencial de malignidade pode ser imprevisível. Estes achados se refletem na dificuldade da citologia em diferenciar entre adenomas e carcinomas, onde as células podem parecer semelhantes. Marcadores moleculares como as mutações nos genes *RAS, BRAF* e *RET/PTC,* que são mais comuns em carcinomas, podem auxiliar na diferenciação de lesões benignas e malignas (Censi et al., 2019; Baloch et al., 2022).

1.2 Avaliação da Doença Nodular de Tireoide

A doença nodular da tireoide (DNT) é a causa mais frequente de atendimentos na área de endocrinologia. De fato, os nódulos tireoidianos são bastante comuns na população em geral, com uma prevalência que varia entre 4% e 7% em adultos por meio de palpação e até 67% quando se utiliza ultrassonografia de alta resolução, sendo em mulheres e idosos a prevalência mais elevada. A maioria dos pacientes com câncer de tireoides se apresenta como nódulos de tireoide, mas é importante ressaltar que a maioria dos nódulos tireoidianos são benignos. A incidência do câncer de tireoide tem aumentado em todo o mundo nas últimas três décadas, onde aproximadamente 5 a 15% dos nódulos tireoidianos são malignos (Recio et al., 2020; Tamhane et al., 2016). No Brasil, a incidência de câncer de tireoide é de 25.601 mil casos novos/ano e corresponde ao 3º tipo de carcinoma mais frequente nas mulheres (GLOBOCAN, 2022; INCA 2021).

O diagnóstico de um nódulo de tireoide (NT) geralmente começa com a obtenção da história médica do paciente, seguida pela palpação do nódulo. O uso de testes bioquímicos, como a medição do hormônio estimulante da tireoide (TSH), também auxilia no diagnóstico inicial. A investigação segue com a ultrassonografia para avaliar a presença e características dos nódulos e linfonodos cervicais. Atualmente, a ultrassonografia é uma ferramenta confiável e de baixo custo para a avaliação de NT, para diferenciar quais nódulos serão puncionados para posterior avaliação citológica (Haugen, 2015; Tamhane et al., 2016).

1.2.1 Sistemas de Classificação Ultrassonográfica

Para melhorar a discriminação dos nódulos que devem ser investigados por punção aspirativa por agulha fina guiada por US (PAAF-US), foram desenvolvidos sistemas de estratificação de risco chamados *Thyroid Imaging Reporting and Data Systems* (TIRADS). Entre esses sistemas estão o ACR-TIRADS (Colégio Americano de Radiologia) e o EU-TIRADS (Associação Europeia de Tireoide), que apresentam alta sensibilidade e valor preditivo negativo no diagnóstico de carcinomas de tireoide e são de fácil aplicação clínica (Kim et al., 2014; Tessler et al., 2017; Eidt et al., 2023).

1.2.2 Punção Aspirativa de Agulha Fina e Avaliação Citológica

Uma vez detectada a presença do nódulo e preenchido os critérios já citados, é necessário realizar a punção aspirativa por agulha fina (PAAF). A PAAF fornece um diagnóstico da doença tireoidiana benigna ou maligna na maioria dos estudos. Da mesma forma, estabelece a seleção de casos para tratamento cirúrgico (Haugen et al., 2015). Porém, entre 5 e 10% das amostras de PAAF são inadequadas ou insatisfatórias para o diagnóstico citológico. Um estudo recente realizado em nosso grupo, a taxa de amostras insatisfatórias para o diagnóstico citológico é mais baixa, com 3,2% (Eidt et al., 2023). Quando é realizado o diagnóstico citológico de forma eficiente, tem-se uma confiabilidade entre 70 e 80% dos casos, o que significa a possibilidade de maior rapidez no início do tratamento, além de evitar procedimentos cirúrgicos desnecessários e suas complicações. No entanto, nos 20-30% dos casos restantes, que apresentam resultados indeterminados, o diagnóstico pode não ser preciso ou confiável, o que pode levar a um tratamento tardio (Ana et al., 2016).

1.2.3. Avaliação citológica – Sistema Bethesda.

O sistema de classificação citopatológico tireoidiano, denominado como Bethesda, estabelece as seguintes categorias: (I) não diagnósticas, (II) benignas, (III) atipia de significado indeterminado (AUS), (IV) neoplasia folicular (FN), (V) suspeito de malignidade e (VI) maligno.

Tabela 2. Sistema de classificação citopatológico Bethesda

Categoria Bethesda	Risco de câncer
Não diagnósticas (I)	5-20%
Benignas (II)	2-7%
AUS (III)	13-30%
FN(IV)	23-34%
Suspeito de malignidade (V)	67-84%
Maligno (VI)	>97%

Adaptado de: Ali et al., 2023.

É importante destacar que esses números são apenas uma guia geral e que a prevalência real do câncer de tireoide pode variar dependendo da população estudada e outros fatores (Ali et al., 2023).

1.3. Citologia Indeterminada

Apesar da análise citológica ser uma ferramenta fundamental para o diagnóstico e manejo dos NT, como já mencionado, 20 - 30% de punções resultam em citologia indeterminada (Ana et al., 2016). Os nódulos indeterminados de acordo com o sistema Bethesda classificam-se nas seguintes categorias: Bethesda III, lesão de significado incerto (AUS), Bethesda IV, neoplasia folicular (FN) e Bethesda V, suspeita de malignidade. Deve-se atentar à grande variabilidade de risco de malignidade em nódulos retirados cirurgicamente nos casos com citologia indeterminada (Bethesda III, IV e V) (Ali et al., 2023). Isso pode ser decorrente de uma variabilidade entre citologistas, do grau de experiência do analista e excesso do uso da categoria III, bem como de fatores ambientais (Baloch et al., 2008). Por esse motivo, é importante conhecer a prevalência da malignidade local.

Um estudo realizado pela Divisão de Endocrinologia da Santa Casa de Porto Alegre entre 2019 e 2021, encontrou que 13% dos nódulos foram classificados como Bethesda III e 3,8% como Bethesda IV, com uma taxa de malignidade de 14,3% na categoria IV (Eidt et al., 2023). Ao analisar esses dados, quando os testes não estabelecem um diagnóstico preciso para pacientes com citologia indeterminada, a maioria destes é encaminhada para cirurgia, fazendo uso do diagnóstico histológico (padrão-ouro). No entanto, apenas 10-40% desses nódulos (Bethesda III e IV) são malignos ao exame anatomopatológico, sendo que a cirurgia seria recomendada apenas para as categorias V e VI (Ana et al., 2016; Burman et al., 2015).

Frente a isso, um diagnóstico mais eficaz na avaliação pré-operatória contribuiria para diferenciar entre nódulos benignos e malignos e evitar cirurgias desnecessárias em pacientes com lesões de baixo risco.

1.4. Eventos moleculares associados à tumorigênese da tireoide

O avanço da tecnologia no conhecimento dos novos genes descritos na patogênese do câncer de tireoide tem sido notório. Esse avanço tem proporcionado novas metodologias para o diagnóstico e tratamento do CT. A regulação de vários processos celulares e alterações genéticas em moléculas intermediárias de vias de sinalização, como a

proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) /AKT, são importantes para o entendimento desse tipo de carcinoma. A MAPK é uma via de sinalização frequentemente ativada no CT através de mutações nos genes *BRAF* e *RAS* e rearranjos *RET/PTC* (Hsiao; Nikiforov, 2014).

O estudo realizado pelo grupo do "*The Cancer Genome Atlas*" em 2014 (Agrawal et al., 2014) teve um impacto significativo na compreensão das alterações moleculares presentes no câncer de tireoide, representando uma mudança de paradigma. Nesse estudo, dois perfis moleculares distintos foram identificados no CDT, um chamado *BRAF-V600E-like* e o outro *RAS-like*. O estudo identificou novas alterações genéticas em genes como *EIF1AX*, *PPM1D* e *CHEK2*, que, junto com as mutações conhecidas em *BRAF, RAS* e as fusões de *RET* e *NTRK1*, permitem uma caracterização mais precisa dos subtipos moleculares de carcinoma papilar de tireoide (PTC) (Tabela 1), melhorando assim o diagnóstico baseado no perfil molecular do tumor. Além disso, a análise permitiu identificar subgrupos moleculares com diferentes perfis de sinalização e diferenciação, o que está associado a diversos desfechos clínicos. Por exemplo, *BRAF* V600E está relacionado a variantes mais agressivas, enquanto *RAS* está associado a variantes foliculares, facilitando uma estratificação de risco mais precisa e melhorando a tomada de decisões sobre o tratamento e o prognóstico (Agrawal et al., 2014).

1.4.1. BRAF

A proteína BRAF (serina-treonina quinase) é crucial na via de sinalização MAPK, pois em conjunto com outras proteínas regula o crescimento e proliferação celular. Na maioria dos casos, entre 98 e 99%, as mutações pontuais ativadoras de *BRAF* envolvem o códon 600 e resultam na mutação V600E, embora outras mutações *BRAF* possam ocorrer como inserções ou deleções (1-2% dos casos) (Hsiao: Nikiforov, 2014). A mutação *BRAF* V600E é uma alteração genética encontrada no braço longo do cromossomo 7, onde ocorre a substituição da timina por adenina na posição 1799 do éxon 15 (T1799A), resultando na substituição de um aminoácido valina por um ácido glutâmico na posição 600 (Kimura et al., 2003; Romitti et al., 2013).

Estudos indicam que a mutação *BRAF* no câncer de tireoide pode desempenhar um papel importante como marcador molecular de prognóstico, pois está associada à agressividade tumoral. Embora a mutação *BRAF* tenha sido relacionada à agressividade tumoral, alguns autores argumentam que existem limitações que devem ser consideradas. Nem todos os pacientes com câncer de tireoide que apresentam a mutação *BRAF* desenvolvem formas agressivas da doença. De fato, alguns estudos sugerem que essa mutação pode estar presente em nódulos que não mostram um comportamento clínico agressivo (Ali et al., 2023; Scheffel et al., 2020). Apesar desses argumentos, na maioria das pesquisas a frequência da mutação *BRAF* no carcinoma papilar de tireoide (PTC) é alta, especialmente em certas variantes. Em estudos genéticos, foi encontrado que aproximadamente 45-60% dos casos de PTC apresentam a mutação *BRAF* V600E. Essa mutação está particularmente associada a variantes mais agressivas do PTC, como a variante de células altas (Agrawal et al., 2014).

1.4.2. RAS

Membros da família de genes *RAS (HRAS, NRAS* e *KRAS*) codificam proteínas G intracelulares que estão envolvidas na ativação de vias de sinalização como o MAPK e PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3 quinase). Mutações pontuais nos genes *RAS* ocorrem tipicamente nos códons 12, 13 e 61, e aproximadamente 36% do carcinoma folicular (CFT), 55% do carcinoma pouco diferenciado (CTPD) e 52% do carcinoma anaplásico (CAT) apresentam mutações em *RAS* (Howell: Hodak, 2013). É provável que as mutações em *RAS*, ocorridas em estágios avançados, contribuam para a perda de diferenciação celular no câncer de tireoide, favorecendo a progressão para carcinoma folicular e carcinoma pouco diferenciado, o que aumenta o risco de metástases à distância e compromete a sobrevida dos pacientes (Jang et al., 2014). Entretanto, as mutações no *RAS* são detectadas também em doenças benignas da tireoide. Verificou-se que as mutações *RAS* estão presentes em aproximadamente 20-40% dos adenomas foliculares e em um percentual similar nos casos de bócio nodular (Agrawal et al., 2014). As mutações no gene *RAS* apresentam um valor preditivo positivo (PPV) baixo, que varia entre 10% e 37%, em grande parte devido à alta taxa de falsos positivos. Além disso, essas mutações costumam estar associadas a lesões de baixo risco, o que contribui para a dificuldade de distinguir

entre nódulos benignos e malignos exclusivamente com base na presença de mutações *RAS* (Agrawal et al., 2014; Guan et al., 2020; Marcadis et al., 2019).

1.4.3. RET

RET é um proto-oncogene (localizado em 10q11.2) que codifica uma proteína transmembrana do tipo tirosina quinase. Os rearranjos são derivados da fusão da sequência de seu domínio tirosina quinase (RET-TKD) com sequências gênicas heterogêneas, resultando em proteínas quiméricas (Ferrari, 2018). Nas fusões gênicas de *RET,* o ponto de quebra mais comum está localizado no íntron 11 do gene *RET*. As fusões de RET mais frequentes no PTC são *RET/PTC1*, resultante da fusão do domínio *RET* com CCDC6, e *RET/PTC3*, resultante da fusão do gene *RET* com o coativador do receptor nuclear 4 (NCOA4). Uma inversão paracêntrica do cromossomo 10q (isto é, não inclui o centrômero) é o mecanismo das fusões *CCDC6-RET* e *NCOA4-RET* (Figura 1). As fusões gênicas medeiam a ativação constitutiva da quinase RET, que pode levar à oncogênese, pois essa proteína está envolvida na regulação do crescimento, diferenciação celular e morte celular programada (Salvatore et al., 2021; Ko et al., 2017). Os rearranjos *RET/PTC* ativam a via de sinalização MAPK de maneira semelhante às mutações *BRAF*, por isso são consideradas mutações *BRAF-like*.

Rearranjos *RET/PTC* ocorrem em 10-20% dos pacientes com PTC, que é o subtipo mais comum de câncer de tireoide, e sua incidência está diminuindo (Jung et al. 2013). As fusões de *RET* em PTC têm sido relacionadas com a exposição à radiação ionizante e também conferindo maior frequência em crianças e adolescentes (Salvatore et al., 2021).

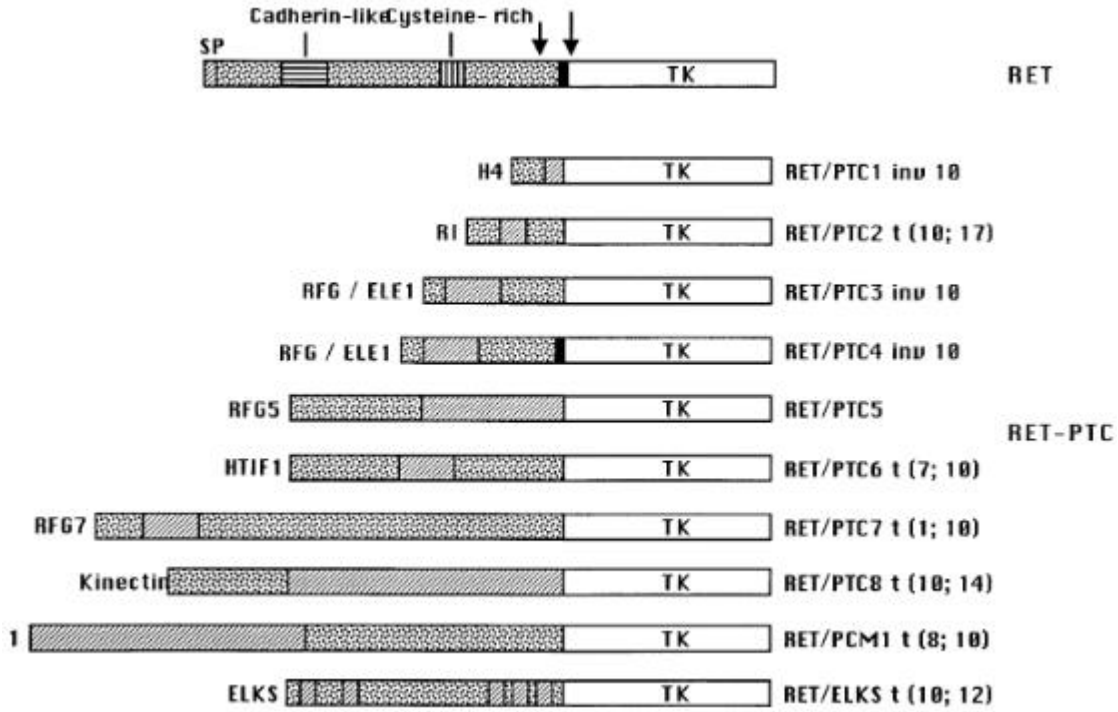


FIGURA 1. Oncogenes *RET/PTC*, encontrados em carcinomas papilíferos de tireoide, são genes quiméricos gerados pela fusão do domínio codificador da tirosina-quinase RET (TK) com diferentes genes heterólogos. As setas indicam pontos de ruptura no câncer papilar de tireoide. Aberrações cromossômicas que levam à formação de rearranjos *RET* são indicadas. SP, peptídeo sinal (Adaptado de: Santoro et al., 2002).

1.5. Avaliação Molecular dos Nódulos da Tireoide

Nas últimas décadas, alguns testes moleculares têm sido desenvolvidos com alta expectativa pela possibilidade de estabelecer maior confiabilidade para o diagnóstico do nódulo, tanto para benigno como maligno, especialmente nos nódulos de citologia indeterminada. O avanço das ferramentas moleculares, têm possibilitado a detecção de genes envolvidos na tumorigênese tireoidiana que podem predizer alterações genéticas e que substancialmente indicam pior prognóstico e metástase linfonodal, as quais podem elucidar a necessidade do encaminhamento do paciente para a cirurgia e a extensão desta (Tamhane; Gharib, 2016; Nikiforov et al., 2011). As mutações mais comuns relacionadas no câncer de tireoide (aproximadamente 70%) são: mutações pontuais nos genes *BRAF*

V600E, *NRAS* códon 61, *HRAS* códon 61 e *KRAS* códons 12/13; rearranjos *RET/PTC1*, *RET/PTC3* e *PAX8/PPAR* (Nikiforov et al., 2011; Tolaba et al., 2022).

O projeto de sequenciamento do Atlas do Genoma do Câncer (Agrawal et al., 2014) expandiu substancialmente o conhecimento do genoma e suas alterações genéticas em mais de 90%. Atualmente, já são utilizados alguns testes moleculares para o diagnóstico de NT, principalmente nos Estados Unidos. Um dos primeiros testes "*rule out*" utilizados foi o painel "*Affirma*", que é um classificador de expressão gênica. Porém, seu valor preditivo para a presença de malignidade é baixo, o que levou a sua substituição por outros painéis como *ThyroSeq v2* e *ThyGenX/ThyraMir*, que apresentam valor preditivo positivo superior, enquanto o valor preditivo negativo permanece similar (Smith; Ferris, 2016; Jug et al., 2020). Um estudo publicado na revista Thyroid em 2020 revelou que a versão 3.0 do painel molecular ThyroSeq apresenta um alto desempenho na detecção de mutações em nódulos tireoidianos com citologia indeterminada, com uma sensibilidade de 92,3% e uma especificidade de 95,5%. Além disso, foi encontrado que o painel molecular tem um valor preditivo positivo (VPP) de 87,5% e um valor preditivo negativo (VPN) de 95,5%, respectivamente, em ambientes clínicos reais (Li et al., 2020).

A análise das amostras é realizada apenas através do envio para os Estados Unidos, com um custo estimado de aproximadamente U$ 1.500 a 3.000 por teste (Ahmadi et al., 2024). A maioria dos estudos realizados refere-se especificamente à população norte-americana, enfraquecendo os dados para a população da América Latina e especificamente para a população do Brasil, onde se tem inúmeras etnias, importante enquanto à variabilidade genética e validação clínica.

Um estudo desenvolvido na América Latina (Chile) apresentou um sistema multiplex de qPCR que, com base na análise da expressão de 10 genes, conseguiu classificar com precisão os nódulos indeterminados, oferecendo uma metodologia mais acessível em termos de custo (Gonzalez et al., 2017). Santos e colaboradores também propõem o uso do teste mir-THY baseado em micro-RNAs (mirRNA) como uma ferramenta complementar na prática clínica, ajudando a tomar decisões mais informadas sobre nódulos tireóideos indeterminados, com o objetivo de reduzir cirurgias e custos desnecessários (Santos et al., 2022), porém sem estudos robustos e/ou independentes de validação dos resultados.

Apesar de muitos desses testes já estarem no mercado para uso clínico, a realidade é difícil para os laboratórios de diagnóstico molecular, pois os mesmos, além de caros, não permitem acesso a informações e patentes da tecnologia, impossibilitando a reprodução dos testes *in house*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Verificar a prevalência das principais mutações dos genes *BRAF* (V600E), *NRAS* e *HRAS* códon 61, *KRAS* códons 12/13, e rearranjos *RET/PTC1* e *RET/PTC3*, em pacientes com doença nodular da tireoide provenientes do Rio Grande do Sul, submetidos à ultrassonografia e PAAF.

2.2. Específicos

- Estabelecer e padronizar as metodologias para obtenção de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e de análise molecular do painel de genes *BRAF* (V600E), *NRAS* e *HRAS* códon 61, *KRAS* códons 12/13, e rearranjos *RET/PTC1* e *RET/PTC3* a partir de amostras de células coletadas por PAAF guiada por ultrassonografia de nódulos da glândula tireoide
- Determinar a prevalência das mutações no painel de genes em indivíduos encaminhados a PAAF com citologia indeterminada.
- Comparar a sensibilidade e especificidade dos dados moleculares com o diagnóstico pré-operatório em nódulos de tireoide com citologia indeterminada.
- Comparar os dados do painel de mutações com os achados histopatológicos das amostras obtidas após a cirurgia para avaliar a concordância e a precisão diagnóstica entre os resultados moleculares e histológicos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo em preparação para submissão à Revisão científica *Plos One* (https://journals.plos.org/plosone/)
Instruções para elaboração do artigo disponíveis em: (https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines)

Prevalence and Diagnostic Reliability of *BRAF, RAS* Mutations, and *RET/PTC* Rearrangements in a Latin American Public Health Service Population with Thyroid Nodular Disease

Freddy David Moposita Molina[1], Grasiela Agnes[2], Marília Zandoná[2], Rogério Izquerdo[3], Fábio Bilhar Alves[4], Laura Berton Eidt[5], Virgilio Zanella[6], Luiz Felipe Osowski[6], Sofia O. Belardinelli[2], Amanda Cometti[2], Erika Laurini de Souza Meyer[5, 7], Lenara Golbert[5, 7], Vanessa Suñé Mattevi[1,2,8*]

[1] Graduate Program in Biosciences, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Brazil
[2] Molecular Biology Laboratory, UFCSPA, Brazil
[3] Radiology Unit, Santa Casa de Porto Alegre, Brazil
[4] Endocrine Unit, Hospital Nossa Senhora da Conceição, Grupo Hospitalar Conceição, Brazil
[5] Endocrine Unit, Santa Casa de Porto Alegre, Brazil
[6] Head and Neck Unit, Santa Casa de Porto Alegre, Brazil
[7] Department of Internal Medicine, UFCSPA, Brazil
[8] Department of Basic Health Sciences, UFCSPA, Brazil

*Corresponding author:
E-mail: vmattevi@ufcspa.edu.br (VSM)

Abstract

Despite their high prevalence and generally benign nature in most cases, the investigation of thyroid nodules still presents potential diagnostic pitfalls, especially in cases with indeterminate cytology results. The performance of molecular markers of thyroid cancer may vary across centers and populations. This study aimed to verify the prevalence of mutations in the *BRAF,* and *RAS* genes, and *RET/PTC* rearrangements in patients undergoing fine-needle aspiration biopsy (FNAB) for thyroid nodules evaluation in a real-world public health service population. Point mutations were detected by Sanger DNA sequencing and rearrangements by RT-PCR. A total of 231 thyroid nodules in 220 patients were evaluated, being 86.8% females and a mean age of 55.6±13.9 years. For molecular analysis, high-quality DNA and RNA were obtained from 200 samples. Mutations or rearrangements in target genes were identified in 14% of the 200 samples evaluated. The frequency of the *BRAF*-like mutations was 5.5%, detected in 9 out of 17 malignant nodules (52.9%) and one in a benign nodule (0.7%). Fourteen *RAS*-like mutations were identified in benign nodules (57.1% *HRAS*, 21.5% *NRAS* and 21.5% *KRAS*) and only one was present in a malignant nodule (5.9%). Considering only nodules with indeterminate cytology (Bethesda III and IV, n = 53), 9 mutations were detected, 6 in benign histology (all *RAS*-like), 1 in malignant histology (*BRAF*-like), and 2 still unoperated, therefore without a histopathological diagnosis. This research concludes that the presence of the *BRAF* V600E mutation could be useful in supporting the diagnosis of thyroid cancer, due to its high positive predictive value, since 89% of nodules with *BRAF* V600E mutation were malignant. Additionally, clinical criteria should be established to determine which nodules with *RAS*-like mutations require closer follow-up, particularly those with indeterminate cytology.

Introduction

Thyroid cancer is the most common endocrine malignancy, with an estimated 43,800 new cases diagnosed in the United States in 2022, making it the seventh most frequent carcinoma among women [1], presenting typically as a thyroid nodule. Over 60% of the population develops at least one thyroid nodule as they age [2]. However, only 5% to 15% of these nodules contain malignant thyroid neoplasms. Traditionally, the diagnosis of thyroid nodules has relied on ultrasound and cytological evaluation. Nevertheless, these methods have limitations, especially in nodules with indeterminate cytology, where the risk of malignancy can vary significantly [2,3].

About 25% of thyroid nodules aspirated thorough ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (US-FNAB) are classified as atypia of undetermined significance (AUS) (Bethesda III) and follicular neoplasm (FN) (Bethesda IV), where cancer cannot be ruled out with certainty [4-7]. Within these categories, the prevalence shows significant variability among studies, with a risk of malignancy ranging from 13-30% for AUS and 23-34% for FN [5,8]. Surgery not only involves a high economic cost, but it also carries risks of morbidity, such as damage to nearby structures and the requirement of thyroid hormone replacement therapy throughout life [9-11]. Additionally, it is essential to note that approximately 75% of nodules initially classified as indeterminate are found to be benign after histopathological evaluation [5,9,12].

Molecular analyses have allowed the identification of genetic mutations and expression patterns that improve diagnostic accuracy. Among the most relevant molecular markers are *BRAF* V600E mutation and *RET/PTC*1 and *RET/PTC*3 rearrangements, which have been widely studied and validated in different studies [13-16]. In these cases, the presence of specific mutations may guide toward more aggressive management or, on the contrary, avoid unnecessary surgeries in patients with low-risk lesions [17,18]. Nevertheless, the most common mutations in indeterminate nodules are mutations in the *RAS* genes (*NRAS* and *HRAS* codon 61, *KRAS* codons 12/13). These are considered weaker driver mutations associated with a lower positive predictive value (PPV). Recent studies have shown that the PPV of *RAS* mutations varies between 10% and 37% [19-21].
Thyroid cancer is a multifactorial phenotype, and Latin American and African populations have been significantly underrepresented in existing studies of complex diseases [22].

Their inclusion is of paramount importance for the complete comprehension of complex phenotypes, because it is known that global differences in the prevalence and distribution of complex diseases and their risk factors are the result of a combination of demographic, environmental, and genetic factors. The prevalence of molecular alterations for indeterminate nodules is poorly described in Latin America [23].

In this context, the present study focuses on determining the prevalence of the main mutations in the *BRAF* and *RAS* genes and the *RET/PTC*1 and *RET/PTC*3 rearrangements in patients with thyroid nodular disease in a South Brazilian public health system setting to evaluate their diagnostic utility in real-world contexts.

Materials and Methods

Patients

Consecutive adult patients, aged ≥ 18 years, with one or more thyroid nodule(s) who underwent FNA under ultrasonographic guidance (FNA-US) or patients with indeterminate cytology who were scheduled for diagnostic surgery between 2019 and 2024 in the Endocrinology Division of Santa Casa de Porto Alegre and Hospital Nossa Senhora da Conceição, two tertiary public hospitals in the South of Brazil, were prospectively evaluated. All patients underwent a complete clinical evaluation and thyroid ultrasonography. Patients with known thyroid cancer were excluded. This study followed the principles of Helsinki's declaration and was approved by the local ethics committees, with all participants providing written informed consent (CAAE ISCMPA: 53201915.0.0000.5345 and HNSC: 29368320.0.3002.5530).

US Examination

Thyroid Ultrasound Conventional B-mode and Doppler images of the neck and thyroid gland were obtained by ultrasound machine using a high-frequency probe (12 MHz). All US examinations from Santa Casa were performed by the same radiologist (RI) and the same endocrinologist at HNSC (FAB), both with more than 15 years of experience in thyroid ultrasound. The number, size, and features of the thyroid nodules were recorded,

and each nodule was classified according to the ACR-TIRADS ultrasound risk-stratification system. The presence of cervical lymphadenopathy was also evaluated.

Thyroid FNA, sample collection, cytology and histology

FNA-US was performed with a disposable needle (21G) connected to a 10 ml disposable syringe. All patients submitted to FNA-US for one or more nodules ≥1 cm according to the ACR-TIRADS and/or other clinical indication criteria were included for this study.

In most cases, two to three FNA passes were made. Most of the aspirated sample from the first two passes was used to prepare direct cytological smears, while the residual material from the new layer and the needle wash from both passes were placed in a tube containing 500 µl of nucleic acid preservative solution.

Pathologists experienced in thyroid cytopathology interpreted aspiration specimens, and results were reported according to the six categories of the 2023 Bethesda System for Reporting Cytopathology: I) non-diagnostic; II) benign; III) atypia of undetermined significance (AUS); IV) follicular neoplasm (FN); V) suspicious for malignancy; and VI) malignant [5].

FNA thyroid samples from indeterminate nodules (Bethesda III and IV) scheduled for surgery were collected at Santa Casa de Porto Alegre during surgery by the head and neck surgeons. Surgery was indicated by the assistant team in Bethesda III (in accordance with clinical judgment) and IV nodules. Bethesda II nodules were also indicated for surgery when there were associated compressive symptoms and/or thyroid autonomy. Surgical pathology specimens obtained from thyroidectomy were reviewed and interpreted by a staff pathologist, according to the World Health Organization Guidelines [18]. Histopathology for each nodule was recorded. The reference standard used for this study was cytology and/or histopathology: for benign nodules, Bethesda II and, for malignant nodules, Bethesda VI; the histopathological diagnosis results of indeterminate thyroid nodules obtained through surgery were also used when available.

Molecular Analysis

Nucleic Acid Isolation

FNA samples and surgical biopsies were analyzed at the Molecular Biology Laboratory of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA). Total DNA and RNA were extracted using the Trizol protocol (TRI-pure isolation, Roche), as described by Kizys (2012) [24]. The concentration and quality of the extracted nucleic acids were assessed using the BioSpecNano spectrophotometer (Shimadzu, Japan) to ensure optimal downstream applications.

Assessment of sample adequacy for molecular testing

RNA samples were evaluated to determine the proportion of thyroid epithelial cells in samples to ensure that a minimum amount (10%) of these cells were present. To this end, the expression of the cytokeratin 7 (*KRT7*) gene was evaluated, which is specific to certain epithelial cell types, including thyroid epithelial cells. *GAPDH* gene expression was used as a constitutive control. The retrotranscription of total RNA to complementary DNA (cDNA) was performed according to the manufacturer's protocol (random hexamers plus oligonucleotides dT and reverse transcriptase enzyme) (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts).

Gene amplification was accomplished via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with the detection of the amplified products with hydrolysis probes (TaqMan) in a StepOne Plus Real-Time System (Life Technologies, Waltham, Massachusetts). A sample was deemed representative of thyroid tissue if the Ct value difference between the *GAPDH* and *KRT7* genes was less than 3.5 (Ct*KRT7* - Ct*GAPDH* < 3.5), thereby indicating that a minimum of 10% of the cells within the sample were of thyroid origin [3].

Mutation Research

Point mutations *BRAF* V600E, codon 61 of *NRAS*, codon 61 of *HRAS*, and codons 12 and 13 of *KRAS* were detected by DNA analysis using amplification by PCR with primers described in Table 1 and Sanger sequencing with Big Dye reagent in a SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts) [3]. For *RET/PTC1* and *RET/PTC3* rearrangements, primers were designed to flank the fusion point (Table 1), and the PCR products of the gene fusions were observed through agarose gel

electrophoresis stained with ethidium bromide. Positive results were confirmed by Sanger sequencing of the PCR products.

Statistical analysis

Clinical, laboratory, ultrasonography, and cytological data are reported as mean ± standard deviation (SD) values, as median with range (for asymmetrical continuous variables), or as absolute numbers and percentages (categorical variables). Data were compared between benign and malignant nodules using the Mann-Whitney U-test or chi-squared test, as appropriate.

Cytology and histopathological examination served as the reference standard for determining malignancy. In instances of Bethesda II cytology, follicular adenomas (FA), follicular nodular thyroid disease (TFND), and lymphocytic thyroiditis (LT), a negative molecular test result was deemed as a true negative, whereas a positive result was regarded as a false positive. Conversely, if the histopathological diagnosis revealed carcinoma, a negative molecular test result was categorized as a false negative.

Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated. The data obtained were analyzed using the statistical software SPSS version 20.0 (IBM, Armonk, NY).

Results

Clinical, ultrasonographic and cytology evaluation

During the study period, 220 patients submitted to FNA-US were included. Of these, 86.8% were women; the mean age was 55.6±13.9 years (Table 2). Two or more thyroid nodules were found in 70.5% of patients, and 5.5% had a family history of thyroid cancer. The nodules evaluated had diameter ranging from 0.7 to 14.8 cm, with a median of 3.1 cm.

Of the nodules evaluated, 26% (n=60) were classified as indeterminate, with 13.9% in category III and 12.1% in category IV (Table 2). Of these, 30 were collected through ultrasound-guided FNA (FNA-US) and 30 samples were obtained during surgery (FNA-surgical).

Analysis of mutations in the total sample

From the 231 nodules initially collected through FNA-US, 31 samples had insufficient nucleic acids, or the proportion of epithelial cells was less than 10% (CtKRT7 – CtGAPDH > 3.5). Therefore, quality DNA and RNA were obtained from 200 samples (86.6%) (Fig. 1).

Molecular analysis revealed 28 mutations, representing 14% of the total samples analyzed, of which 11 were *BRAF-like* (10 *BRAF* V600E and one *RET/PTC1* fusion) and 17 were *RAS-like* (9 *HRAS* codon 61, 5 *NRAS* codon 61, and 3 *KRAS* codons 12/13). The results of the cytology/histology and detected mutations are shown in Figure 1.

Of the 17 nodules with *RAS-like* mutations, the distribution according to the Bethesda category was as follows: Bethesda II (6), Bethesda III (3), Bethesda IV (4), and Bethesda V (4). Of these, only one was malignant, corresponding to a Bethesda V nodule with an *NRAS* mutation. On the other hand, the 11 nodules with *BRAF-like* mutations were distributed as follows: Bethesda II (1), Bethesda III (1), Bethesda IV (1), Bethesda V (1), and Bethesda VI (7). All these nodules, except the Bethesda II, were malingnant.

Relationship between cytology, histopathology and molecular evaluation

Samples with Benign cytology (Bethesda II)

The majority of analyzed samples came from the Bethesda II classification, with 123 nodules analyzed. Seven samples showed mutations (5.7%), distributed as follows: 6 *RAS* and 1 *BRAF* V600E. Of these, two were referred for thyroidectomy. One of the six *RAS-like* mutations was associated with TFND (thyroid follicular nodular disease), as was the nodule with the *BRAF* V600E mutation. The other five cases were not surgically treated (Fig. 2).

No malignancy cases were observed for nodules classified as Bethesda II (negative cytology), regardless of the presence of mutations (Table 3).

Indeterminate (III and IV)

This group included 53 nodules with indeterminate cytology. Of them, 9 samples (16.9%) with mutations were identified, distributed as follows: 2 *BRAF* V600E and 7 *RAS-like* (3 *NRAS*, 2 *HRAS*, and 2 *KRAS*) (Fig. 1). No *RET/PTC* fusion was detected. Of the two nodules with the *BRAF* V600E mutation, one was diagnosed as papillary thyroid carcinoma (PTC) and classified in the Bethesda IV category, while the second nodule (Bethesda III) is still awaiting surgery. Meanwhile, the 7 nodules with *RAS-like* mutations were post-surgically diagnosed as follows: four with follicular adenoma (FA), two with TFND, and one is still awaiting surgery (Fig. 2).

The prevalence of malignancies in indeterminate categories was 18.2% for Bethesda III and 20.0% for Bethesda IV (Fig. 3). As shown in Table 3, nodules with indeterminate cytology had a 19% probability of malignancy based on cytology alone. The specificity and sensitivity for *BRAF*-like mutations were 100% and 17%, respectively (Fig. 3). In contrast, nodules positive for *RAS*-like mutations were not associated with malignancy. No statistically significant differences were observed between patients with benign and malignant nodules (data not shown).

Fig 3. **Performance of molecular testing in specific categories of indeterminate FNA cytology**.

Suspect of Malignant and Malignant (Bethesda V and VI)

In the 10 nodules from Bethesda V category, five mutations were identified, four of which were *RAS-like* and diagnosed post-surgically as follows: two TFND, one PTC, and one sample still awaiting surgery. The sample with the *BRAF* V600E mutation was diagnosed as PTC (Fig.1).

Eight FNA samples with a cytological diagnosis of Bethesda VI were analyzed. Seven (87.5%) had mutations: six with *BRAF* V600E and one with the *RET/PTC1* fusion. Five of the six *BRAF* V600E mutations were associated with Classic PTC, and one with the follicular variant (FVPTC). The nodule with the *RET/PTC1* fusion was also diagnosed as FVPTC. In contrast, the nodule without a detected mutation was classified as PTC. It is important to note that the *BRAF* V600E mutation was present in 75% of nodules with a Bethesda VI classification.

Histological analysis

Upon analyzing 200 nodules with a molecular diagnosis, we observed that 56 samples underwent thyroidectomy. The cytological, histological, and mutation results are presented in Figure 2. Of these, 39 were confirmed as benign through histology, while 17 were classified as malignant.

Upon examining these 39 benign nodules, we found that 11 of them, classified as Bethesda II, were operated on due to compressive symptoms or hyperthyroidism. In this subgroup, mutations were detected in two cases: one with a *BRAF* mutation and another with a *RAS* mutation, both diagnosed as TFND. Meanwhile, the remaining 28 benign nodules, 25 with indeterminate cytology and 3 within the Bethesda V category, had mutations in 8 cases, all *RAS-like* type.

Considering the total number of malignant nodules, we found that 58.8% (10 out of 17) had mutations, including 8 PTC and 2 FVPTC. Of these mutations, 9 were *BRAF-like* and 1 was *RAS-like*: 7 in Bethesda VI, 2 in Bethesda V, and 1 in Bethesda IV (Fig. 1). The nodules without mutations included 5 PTC, 1 FTC, and 1 NIFTP (Fig. 2). Notably, the prevalence of cancer associated with *BRAF-like* mutations was 52.9%, while for *RAS-like* mutations it was only 5.9%.

Discussion

Molecular panels have increasingly been employed in the evaluation of thyroid nodules to optimize diagnostic accuracy and minimize the need for unnecessary interventions. However, for the correct use of these panels, it is necessary to know the universe of existing mutations in a population, as well as the malignancy rates for each cytological category (pre-test probability). To this end, we prospectively evaluated 200 patients with thyroid nodules and investigated the prevalence of the main mutations described as predictors of malignancy in a Latin American population.

In our sample, with a cancer prevalence of 7.8%, multigene panel analysis revealed a mutation rate of 14%. *BRAF*-like mutations accounted for 39% of positive samples, while the remaining 61% corresponded to *RAS*-like mutations. Among the nodules that underwent thyroidectomy (n=56), we found that 58.8% of malignant nodules exhibited a

genetic mutation, with a predominance of 90% *BRAF-like* mutations (*BRAF* V600E and *RET/PTC*). It is worth highlighting that the highest number of mutations in malignant nodules was found in those with Bethesda VI cytology (70%), while the remaining 30% were within Bethesda IV and V categories. In these cases, the presence of the *BRAF* V600E mutation could be helpful in supporting the diagnosis, given their high positive predictive value (PPV), as 89% of nodules with this mutation were malignant.

The prevalence of *RAS-like* mutations may vary according to the type of nodule, patient age, and other factors. In indeterminate thyroid nodules, *NRAS* mutations are typically the most frequent, followed by *KRAS* and *HRAS* [9,19,25]. In our sample, from the South of Brazil population, *NRAS* mutations (5.6%) were also the most common in indeterminate nodules, followed by *HRAS* and *KRAS* (both 3.7%). However, when considering the total sample, *HRAS* mutations (4.5%) were the most frequent, followed by *NRAS* (2.5%) and *KRAS* (1.5%). Among these, *NRAS* was the only mutation detected in a PTC associated with malignancy. These findings suggest a possible regional variation in the distribution of these mutations, highlighting the importance of our research in describing mutational variations within the Brazilian population.

A considerable number of *RAS-like* mutations (9.3%) were identified in benign nodules, including non-operated nodules classified as Bethesda II, underscoring the need for patient monitoring to assess the risk of progression. It is important to highlight that *RAS* is a potent oncogene, and there is some indirect evidence suggesting that it may promote malignant transformation and tumor dedifferentiation in thyroid cells [9,18,26]. However, whether benign nodules with *RAS* mutations can progress to follicular carcinomas or exhibit more aggressive behavior is still unclear [26]. Evaluating the clinical and ultrasound characteristics of this group of patients may significantly contribute to their follow-up.

Notably, 76% of benign nodules that underwent surgery and had a preoperative indeterminate classification did not present mutations. This result aligns with existing research indicating that most indeterminate nodules, between 82% and 94%, are not malignant and do not require surgical intervention [3,5,19,27].

It's noteworthy that the pretest probability of malignancy was 19% for the indeterminate nodules, similar to that described in the Bethesda Classification [5]. When analyzing *BRAF-like* and *RAS-like* mutations separately, we found that the isolated

presence of *BRAF*-like mutations appears to have a high PPV of 100%, showing an association with thyroid cancer, specifically papillary thyroid carcinoma (PTC). In contrast, *RAS*-like mutations were associated with a low PPV. Studies such as that by Guan et al. in 2020, report that mutations in the *RAS* gene have a low PPV, ranging from 10% to 37% [19-21]. Additionally, most reports indicate that *RAS-like* mutations are associated with follicular carcinomas (FTC) [9,12,26]; however, in our study, only one case of FTC was presented.

This study has certain limitations, the limited number of nodules with indeterminate cytology included, the patients not yet having undergone surgeries and the low prevalence of FTC and FVPTC could have influenced our results, specifically the applicability of our evaluation in indeterminate cytology. Additionally, 41.2% of malignant nodules tested negative, exceeding the 10%-30% reported in other studies [5,13,14], possibly due to unstudied mutations beyond our panel's scope.

Furthermore, it is important to emphasize that many commercially available molecular panels come with high costs, which can limit access to these diagnostic tools in underprivileged populations. In contrast, our test has been developed at a relatively low cost, estimated at just US$8 per examination, making it more accessible to a real-world population served by the Public Health System, which aims for equity and universality in access to testing.

In conclusion, the high PPV associated with *BRAF*-like mutations, along with a relatively low cost, could serve as a useful tool for diagnosing thyroid cancer. Further studies are needed to determine the possible mutations that were not detected by our molecular panel. Moreover, a set of clinical criteria needs to be identified to determine which nodules with *RAS*-like mutations require closer follow-up, particularly those with indeterminate cytology.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin 2022;72:229-263.
2. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with

thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. Thyroid 2016;26:1-133.

3. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, et al. Impact of Mutational Testing on the Diagnosis and Management of Patients with Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules: A Prospective Analysis of 1056 FNA Samples. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:3390-3397.
4. Barbosa TLM, Junior COM, Graf H, Cavalvanti T, Trippia MA, da Silveira Ugino RT, et al. ACR TI-RADS and ATA US Scores Are Helpful for the Management of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. BMC Endocr Disord 2019;19:1-11.
5. Ali SZ, VanderLaan PA, editors. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. Springer Nature 2023.
6. Yaprak Bayrak B, Eruyar AT. Malignancy Rates for Bethesda III and IV Thyroid Nodules: A Retrospective Study of the Correlation between Fine-Needle Aspiration Cytology and Histopathology. BMC Endocr Disord 2020;20:1-9.
7. Williams BA, Bullock MJ, Trites JR, Taylor SM, Hart RD. Rates of Thyroid Malignancy by FNA Diagnostic Category. J Otolaryngol Head Neck Surg 2013;42:1-5.
8. Chirayath SR, Pavithran PV, Abraham N, Nair V, Bhavani N, Kumar H, et al. Prospective Study of Bethesda Categories III and IV Thyroid Nodules: Outcomes and Predictive Value of BRAF:V600E Mutation. Indian J Endocrinol Metab 2019;23:278-281.
9. Patel J, Klopper J, Cottrill EE. Molecular Diagnostics in the Evaluation of Thyroid Nodules: Current Use and Prospective Opportunities. Front Endocrinol 2023;14:1101410.
10. Schumm MA, Lechner MG, Shu ML, Ochoa JE, Kim J, Tseng CH, et al. Frequency of Thyroid Hormone Replacement after Lobectomy for Differentiated Thyroid Cancer. Endocr Pract 2021;27:691-697.
11. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, et al. Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. N Engl J Med 2012;367:705-715.

12. Wilson M, Patel A, Goldner W, Baker J, Sayed Z, Fingeret AL, et al. Postoperative Thyroid Hormone Supplementation Rates Following Thyroid Lobectomy. Am J Surg 2020;220:1169-1173.
13. Censi S, Barollo S, Grespan E, Watutantrige-Fernando S, Manso J, Iacobone M, et al. Prognostic Significance of TERT Promoter and BRAF Mutations in TIR-4 and TIR-5 Thyroid Cytology. Eur J Endocrinol 2019;181:1-11.
14. Scheffel RS, Cristo APD, Romitti M, Vargas CVF, Ceolin L, Zanella AB, et al. The BRAFV600E Mutation Analysis and Risk Stratification in Papillary Thyroid Carcinoma. Arch Endocrinol Metab 2020;64:751-757.
15. Fussey JM, Vaidya B, Kim D, Clark J, Ellard S, Smith JA, et al. The Role of Molecular Genetics in the Clinical Management of Sporadic Medullary Thyroid Carcinoma: A Systematic Review. Clin Endocrinol 2019;91:697-707.
16. Liu R, Xing M. TERT Promoter Mutations in Thyroid Cancer. Endocr Relat Cancer 2016;23:R143-R155.
17. Kim MK., Shin JH, Hahn SY, Kim H. Delayed Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules Initially Treated as Benign with Radiofrequency Ablation: Ultrasound Characteristics and Predictors for Cancer. Korean J Radiol 2023;24:903-911.
18. Baloch ZW, Asa SL, Barletta JA, Ghossein RA, Juhlin CC, Jung CK, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. Endocr Pathol 2022;33:27-63.
19. Guan H, Toraldo G, Cerda S, Godley FA, Rao SR, McAneny D, et al. Utilities of RAS Mutations in Preoperative Fine Needle Biopsies for Decision Making for Thyroid Nodule Management: Results from a Single-Center Prospective Cohort. Thyroid 2020;30:536-547.
20. Marcadis AR, Valderrabano P, Ho AS, Tepe J, Swartzwelder CE, Byrd S, et al. Interinstitutional Variation in Predictive Value of the ThyroSeq v2 Genomic Classifier for Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. Surgery 2019;165:17-24.
21. 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;48:1254-1264.
22. Gurdasani D, Barroso I, Zeggini E, Sandhu MS. Genomics of Disease Risk in Globally Diverse Populations. Nat Rev Genet 2019;20:520-535.

23. Ferraz C. Can current molecular tests help in the diagnosis of indeterminate thyroid nodule FNAB? Arch Endocrinol Metab. 2018;62:576-84.
24. Kizys MM, Cardoso MG, Lindsey SC, Harada MY, Soares FA, Melo MCC, et al. Optimizing Nucleic Acid Extraction from Thyroid Fine-Needle Aspiration Cells in Stained Slides, Formalin-Fixed/Paraffin-Embedded Tissues, and Long-Term Stored Blood Samples. Arq Bras Endocrinol Metab 2012;56:618-626.
25. Radkay LA, Chiosea SI, Seethala RR, Hodak SP, LeBeau SO, Yip L, et al. Thyroid nodules with KRAS mutations are different from nodules with NRAS and HRAS mutations with regard to cytopathologic and histopathologic outcome characteristics. Cancer Cytopathol. 2014;122:873-82.
26. Landa I, Cabanillas ME. Genomic alterations in thyroid cancer: biological and clinical insights. Nat Rev Endocrinol 2024;20:93-110.
27. Bellevicine 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;128:107-118.

Table 1. Primers list for PCR

Gene	Primer	Primers list for PCR (5' to 3')	Amplicon size
BRAF (codon 600)			
	Forward	TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	
	Reverse	GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA	229 bp
HRAS (codon 61)			
	Forward	GTCCTCCTGCAGGATTCCTA	
	Reverse	ATGGCAAACACACACAGGAA	152 bp
NRAS (codon61)			
	Forward	CCCCTTACCCTCCACACC	
	Reverse	TGGCAAATACACAGAGGAAGC	161 bp
KRAS (codon 12/13)			
	Forward	AAGGCCTGCTGAAAATGACTG	
	Reverse	GGTCCTGCACCAGTAATATGCA	165 bp
RET/PTC1			
	Forward	TGCAGCAAGAGAACAAGGTG	
	Reverse	TTTCAGATGGAAGGCCGTTG	199 bp
RET/PTC3			
	Forward	CCTTTCAGCGAATGGCTCCT	
	Reverse	ATTCCCACTTTGGATCCTCCT	136 bp

Table 2. Demographic and clinical-pathological characteristics of patients with thyroid nodules.

Parameters	**Patients (n=220)**
Gender: n (%)	
Female	191 (86.8)
Age at diagnosis (years)	
Mean SD	55.6 ± 13.9
Two or more nodules: n (%)	155 (70.5)
History with other malignancies	39 (17.7)
Exposure to cervical radiation therapy	5 (2.3)
Family history of thyroid cancer	12 (5.5)
Parameters	**Nodules (n=231)**
Nodule diameter (cm)	
Range	0.7 - 14.8
Median	3.1
Ecographic score: n (%)	
ACR-TIRADS 1/2/3	71 (30.7)
ACR-TIRADS 4	119 (51.5)
ACR-TIRADS 5	41 (17.8)
Cytology: n (%)	
Bethesda I	11 (4.8)
Bethesda II	141 (61.0)
Bethesda III	32 (13.9)
Bethesda IV	28 (12.1)
Bethesda V	10 (4.3)
Bethesda VI	9 (3.9)
Nodules undergoing thyroidectomy	69 (29.9)
Malignant nodules	18 (7.8)

Table 3. Probability of cancer in thyroid nodules depending on the results of cytological and molecular analysis

Results of cytology and molecular analysis	Cancer probability (%)
Positive cytology (Bethesda V and VI) and positive for mutation	82
Indeterminate cytology and positive for *BRAF*-like	100
Indeterminate cytology and positive for *RAS*-like	0
Indeterminate cytology and negative for mutation	21
Indeterminate cytology	19
Negative cytology (Bethesda II) and negative for mutation	0
Negative cytology (Bethesda II)	0

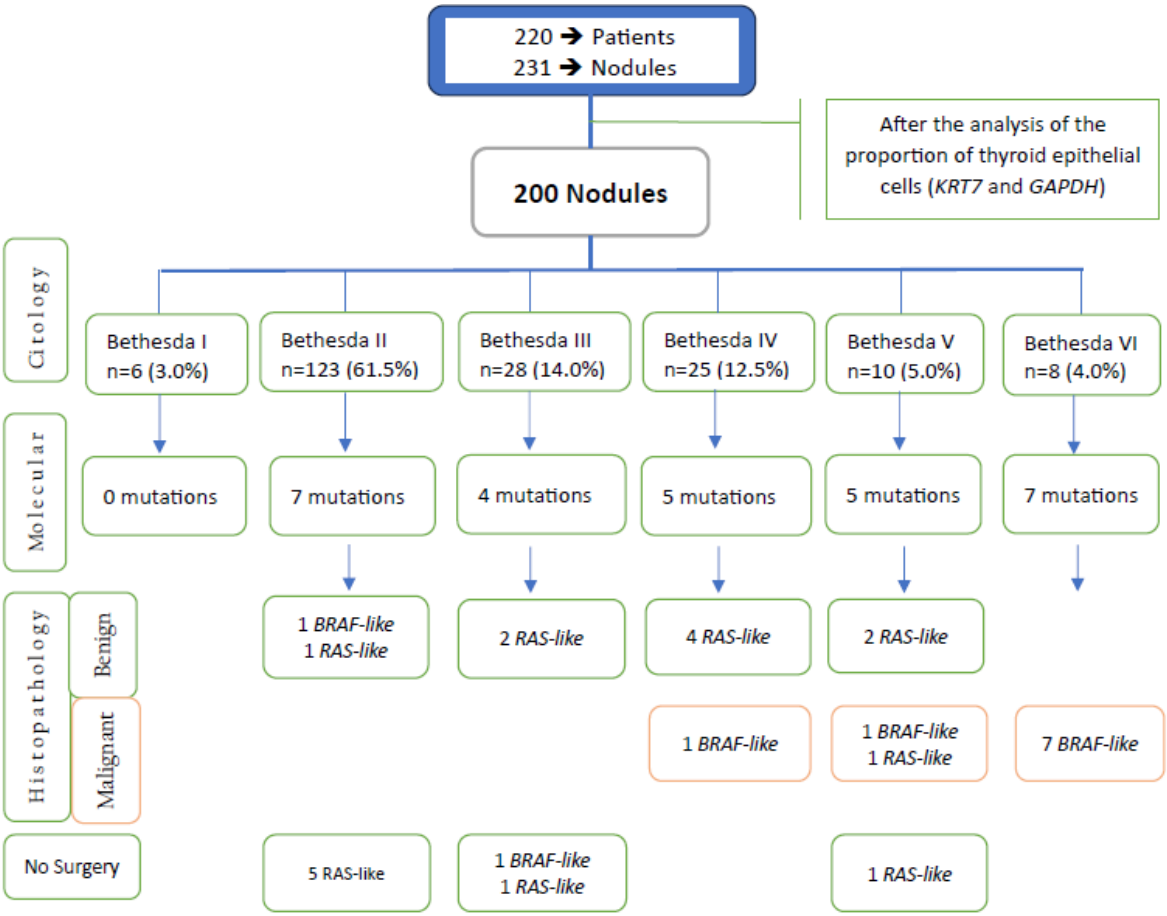


Fig 1. Classification of thyroid nodules based on cytological analysis. The diagram illustrates the classification of thyroid nodules according to their cytology based on the 2023 Bethesda system, the presence of mutations and the subsequent post-surgery histopathological results.

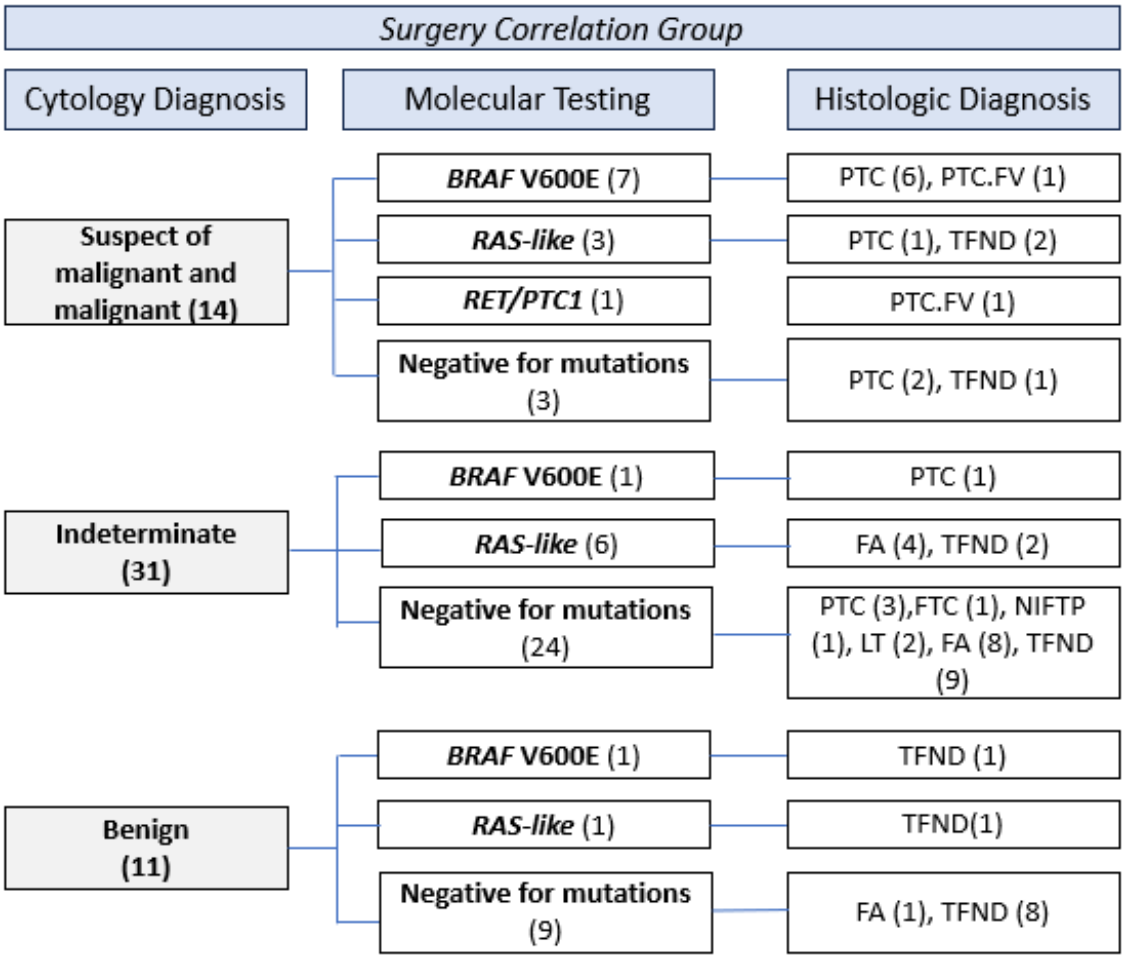
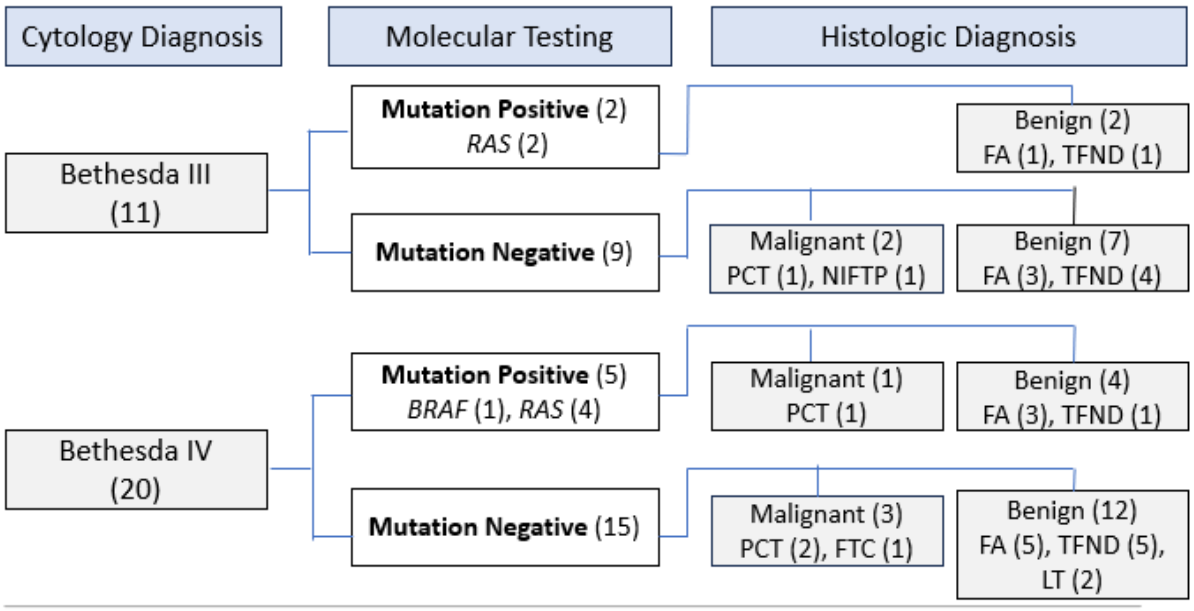


Fig 2. Correlation between cytology, molecular findings, and histological diagnosis. LT: lymphocytic thyroiditis; TFND: thyroid follicular nodular disease; FA: follicular adenoma; PTC: papillary thyroid cancer; FVPTC: papillary thyroid carcinoma, follicular variant; FTC: follicular carcinoma of the thyroid; FNA: fine-needle aspiration; NIFTP: non-invasive follicular thyroid neoplasm with papillary-like nuclear features



Diagnostic performance of molecular test in 31 indeterminate cytology nodules

Molecular Test vs Histology	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
BRAF-like	17%	100%	100%	79%
RAS-like	0	76%	0	79%
***BRAF* + RAS**	17%	76%	14%	79%

PPV: positive predictive value; NPV: Negative predictive value

Fig 3. Performance of molecular testing in specific categories of indeterminate FNA cytology.

4. DISCUSSÃO

A avaliação de nódulos tireoidianos com painéis moleculares visa aumentar a precisão diagnóstica e reduzir intervenções desnecessárias. Para aplicar corretamente esses painéis, é fundamental conhecer o espectro de mutações presentes em uma população e as taxas de malignidade para cada categoria citológica (probabilidade pré-teste). Neste estudo, analisamos prospectivamente uma amostra de pacientes com nódulos tireoidianos para investigar a prevalência das principais mutações descritas como preditoras de malignidade.

Em nossa amostra, a prevalência de câncer foi de 7.8%. Ao analisar as categorias Bethesda, observamos que as taxas de câncer foram de 18.1% na categoria III e 20% na categoria IV. Esses resultados são semelhantes aos relatados pelo Sistema de Classificação Bethesda (Ali et al., 2023).

A avaliação molecular das 200 amostras analisadas revelou que 28 apresentaram mutações, o que representa uma taxa de 14%. Das mutações detectadas, 39% eram do tipo *BRAF-like* e 61% do tipo *RAS-like*. Entre os nódulos que foram submetidos à tireoidectomia (n=56), encontramos que 58.8% dos nódulos malignos apresentaram uma mutação genética, com uma predominância de 90% de mutações *BRAF-like* (BRAF *V600E* e *RET/PTC*). É importante notar que essas mutações, especialmente a *BRAF* V600E, estão fortemente associadas a uma alta probabilidade de malignidade, o que é consistente com achados de outros estudos (Fussey et al., 2019; Censi et al., 2019; Scheffel et al., 2020). Além disso, o maior número de mutações em nódulos malignos foi encontrado naqueles com citologia Bethesda VI (70%), enquanto os 30% restantes estavam dentro das categorias Bethesda IV e V. Isso sugere que a detecção de mutações BRAF *V600E* pode ser um marcador valioso para apoiar o diagnóstico, dado seu alto valor preditivo positivo (VPP), uma vez que 89% dos nódulos com essa mutação eram malignos.

A prevalência de mutações *RAS-like* pode variar de acordo com o tipo de nódulo, a idade do paciente e outros fatores. No entanto, as mutações *NRAS* são comumente as mais frequentes em nódulos tireoidianos indeterminados, seguidas por *KRAS* e *HRAS* (Yoon et al., 2015; Guan et al., 2020; Patel et al., 2023). Em nossa amostra da população do Sul do

Brasil, encontramos que as mutações *NRAS* (5.6%) também foram as mais comuns em nódulos indeterminados, seguidas por *KRAS* e *HRAS* (ambas 3.7%). Em contraste, ao considerar a amostra total, as mutações *HRAS* (4.5%) foram as mais frequentes, seguidas por *NRAS* (2.5%) e *KRAS* (1.5%). Esses achados sugerem uma possível variação regional na distribuição dessas mutações, destacando a importância de nossa pesquisa em descrever as variações mutacionais dentro da população brasileira.

Um número considerável de mutações do tipo *RAS-like* (9.3%) foi identificado em nódulos benignos, incluindo nódulos não operados classificados como Bethesda II, o que é consistente com descobertas anteriores que relatam uma frequência de mutações *RAS-like* em nódulos benignos variando de 5% a 15%, ressaltando a necessidade de monitoramento dos pacientes para avaliar o risco de progressão (Marcadis et al., 2019; Lupo et al., 2020; Guan et al., 2020). Embora *RAS* seja um potente oncogene, há algumas evidências indiretas que sugerem que ele pode promover a transformação maligna e a desdiferenciação tumoral em células tireoidianas (Censi et al., 2019; Patel et al., 2023). A questão de saber se nódulos benignos com mutações *RAS* podem progredir para carcinomas foliculares ou exibir um comportamento mais agressivo permanece sem resposta. A análise das características clínicas e ultrassonográficas desses pacientes pode fornecer contribuições valiosas para o seu acompanhamento e o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o tratamento.

Notavelmente, 76% dos nódulos benignos que foram submetidos à cirurgia e tinham uma classificação indeterminada pré-operatória não apresentaram mutações. Esse resultado é consistente com pesquisas anteriores que indicam que a maioria dos nódulos indeterminados entre 82% e 94%, não são malignos e não requerem intervenção cirúrgica (Nikiforov et al., 2011; Bellevicine et al., 2020; Ali et al., 2023).

É importante notar que a probabilidade pré-teste de malignidade foi de 19% para os nódulos indeterminados, semelhante àquela descrita na Classificação Bethesda (Ali et al., 2023). Ao analisar separadamente as mutações do tipo *BRAF-like* e *RAS-like*, encontramos que a presença isolada de mutações do tipo *BRAF-like* parece ter um alto valor preditivo positivo (VPP) de 100%, mostrando uma associação com câncer de tireoide,

especificamente carcinoma papilífero da tireoide (CPT). Em contraste, as mutações do tipo *RAS-like* foram associadas a um baixo VPP. Outros estudos, como o de Guan et al. em 2020, relatam que mutações no gene *RAS* têm um baixo valor VPP, variando de 10% a 37% (Cibas et al., 2017; Tolaba et al., 2022). Além disso, a maioria dos relatos indica que mutações do tipo *RAS-like* estão associadas a carcinomas foliculares (CFT) (Madeleine et al., 2020; Patel et al., 2023); no entanto, em nosso estudo, apenas um caso de CFT foi apresentado.

É fundamental ressaltar que muitos painéis moleculares disponíveis comercialmente têm altos custos, o que pode limitar o acesso a essas ferramentas de diagnóstico em populações desfavorecidas. Em contraste, nosso teste foi desenvolvido a um custo relativamente baixo, estimado em apenas US$ 8 por exame, tornando-o mais acessível a uma população real atendida pelo Sistema Único de Saúde, que busca equidade e universalidade no acesso aos testes. Vale destacar que, no Brasil, a análise de amostras geralmente é apenas através do envio para os Estados Unidos, com um custo significativamente mais elevado, variando entre 1500 e 3000 dólares (Ahmadi et al., 2018).

Este estudo apresenta certas limitações, como o número limitado de nódulos com citologia indeterminada incluídos, o fato de que os pacientes ainda não terem sido submetidos a cirurgias e a baixa prevalência do câncer papilar de tiroide e do carcinoma papilar de tireoide da variante folicular (CPT, VF), que podem ter influenciado nossos resultados, especificamente a aplicabilidade de nossa avaliação em citologia indeterminada. Além disso, 41.2% dos nódulos malignos testaram negativo, superando os 10%-30% relatados em outros estudos (Ali et al., 2023; Censi et al., 2019; Scheffel et al., 2020), possivelmente devido a mutações não estudadas além do escopo do nosso painel.

Para superar esses desafios, nossa equipe de pesquisa planeja realizar estudos futuros que empreguem metodologias mais avançadas, e abordagens inovadoras, como o diagnóstico de ARN circular (circRNA), a fim de ampliar nossa compreensão e desenvolver estratégias mais eficazes.

5. CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa revelaram uma taxa de mutação de 14% no total de amostras analisadas, com uma distribuição de 39% de mutações *BRAF-like* e 61% de mutações *RAS-like*. Notavelmente, 32.1% estavam dentro das categorias indeterminadas.

Nossa análise mutagênica identificou que a presença da mutação *BRAF* V600E apresenta uma robusta associação com o câncer de tireoide, especificamente com o carcinoma papilífero de tireoide (PTC), evidenciada pelo fato de que 89% dos nódulos com essa mutação foram malignos. Este achado destaca o alto valor preditivo positivo (VPP) da mutação *BRAF* V600E para o câncer de tireoide, posicionando-a como um marcador molecular chave no diagnóstico e manejo dessa doença.

Foi observada a presença de um número considerável de mutações *RAS-like* (9.3%) em nódulos benignos, incluindo aqueles classificados como Bethesda II, o que destaca a importância do monitoramento contínuo desses pacientes para avaliar o risco de progressão. Embora o *RAS-like* seja um oncogene com potencial transformador para câncer, sua progressão ainda é incerta. A avaliação clínica e ultrassonográfica pode ser fundamental para um melhor acompanhamento.

A população estudada apresentou uma variação regional nas mutações de tipo *RAS-like*, sendo *HRAS* (4.5%) a mais frequente, seguidas por *NRAS* (2.5%) e *KRAS* (1.5%). Esses achados indicam que a distribuição dessas mutações pode ser influenciada por fatores regionais, o que destaca a relevância em caracterizar as variações mutacionais na população brasileira.

6. REFERÊNCIAS

1. RECIO-CÓRDOVA, J. M. et al. Evaluación endocrinológica del paciente con enfermedad nodular tiroidea. Revista ORL, v. 11, n. 3, p. 265-272, 2020.
2. TAMHANE, S.; GHARIB, H. Thyroid nodule update on diagnosis and management. Clinical diabetes and endocrinology, v. 2, p. 1-10, 2016.
3. BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, v. 74, n. 3, p. 229-263, 2024.
4. LAHA, D.; BOUFRAQECH, M. New therapies for advanced thyroid cancer. Frontiers in endocrinology, v. 11, p. 497118, 2020.
5. GRIMM, D. Recent advances in thyroid cancer research. International Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 9, p. 4631, 2022.
6. BALOCH, Z. W. et al. Overview of the 2022 WHO classification of thyroid neoplasms. Endocrine pathology, v. 33, n. 1, p. 27-63, 2022.
7. WILTSHIRE, J. J. et al. Systematic Review of Trends in the Incidence Rates of Thyroid Cancer. Thyroid, v. 26, n. 11, p. 11, 2016.
8. HAUGEN, B. R. et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, v. 26, n. 1, p. 1-133, 2015.
9. KIM, T. H. et al. Subclinical hypothyroidism in addition to common risk scores for prediction of cardiovascular disease: a 10-year community-based cohort study. European Journal of Endocrinology, v. 171, n. 5, p. 649-657, 2014.
10. TESSLER, F. N. et al. ACR thyroid imaging, reporting and data system (TI-RADS): white paper of the ACR TI-RADS committee. Journal of the American college of radiology, v. 14, n. 5, p. 587-595, 2017.
11. DE CRISTO, A. P. et al. Increasing diagnostic effectiveness of thyroid nodule evaluation by implementation of cell block preparation in routine US-FNA analysis. Arch Endocrinol Metab, v. 60, n. 4, p. 1-8, 2016.
12. NIKIFOROV, Y. E. et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 96, n. 11, p. 3390-3397, 2011.
13. OHORI, N. P.; SCHOEDEL, K. Variability in the atypia of undetermined significance/follicular lesion of undetermined significance diagnosis in the Bethesda System for Reporting thyroid cytopathology: sources and recommendations. Acta Cytol, v. 55, p. 492-498, 2011.

14. CIBAS, E. S.; ALI, S. Z. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. Thyroid, v. 27, n. 11, p. 1341-1346, 2017.

15. BALOCH, Z. W. et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of Science Conference. Diagn Cytopathol, v. 36, p. 425-437, 2008.

16. TOLABA, N. et al. Testeo de mutaciones en nódulos tiroideos con citología indeterminada: estudio prospectivo de 112 pacientes en Argentina. Endocrinología, Diabetes y Nutrición, v. 69, n. 2, p. 122-130, 2022.

17. BURMAN, K. D.; WARTOFSKY, L. Thyroid Nodules. N Engl J Med, v. 373, n. 24, p. 2347-2356, 2015.

18. SMITH, R. B.; FERRIS, R. L. Utility of diagnostic molecular markers for evaluation of indeterminate thyroid nodules. JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery, v. 142, n. 5, p. 421-422, 2016.

19. JUG, R. et al. High-risk and intermediate-high–risk results from the ThyroSeq v2 and v3 thyroid genomic classifier are associated with neoplasia: Independent performance assessment at an academic institution. Cancer cytopathology, v. 128, n. 8, p. 563-569, 2020.

20. AHMADI, Sara; SIPOS, Jennifer A. Cost-effectiveness of molecular testing for thyroid nodules with indeterminate cytology. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 109, n. 7, p. 2674, 2024.

21. GONZALEZ, H. E. et al. A 10-Gene Classifier for Indeterminate Thyroid Nodules: Development and Multicenter Accuracy Study. Thyroid, v. 27, n. 8, p. 1-8, 2017.

22. HAUCH, A. et al. Total thyroidectomy is associated with increased risk of complications for low-and high-volume surgeons. Annals of surgical oncology, v. 21, p. 3844-3852, 2014.

23. RUSS, G. et al. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography. European journal of endocrinology, v. 168, n. 5, p. 649-655, 2013.

24. KIZYS, M. M. L. et al. Optimizing nucleic acid extraction from thyroid fine-needle aspiration cells in stained slides, formalin-fixed/paraffin-embedded tissues, and long-term stored blood samples. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 56, p. 618-626, 2012.

25. HENG, H. H. Q. Cancer genome sequencing: the challenges ahead. Bioessays, v. 29, n. 8, p. 783-794, 2007.
26. HSIAO, S. J.; NIKIFOROV, Y. E. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. Endocrine-Related Cancer, v. 21, n. 5, p. T301-T313, 2014.
27. ROMITTI, M. et al. Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas. International Journal of Oncology, v. 42, n. 1, p. 19-28, 2013.
28. KIMURA, E. T. et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Research, v. 63, p. 1454-1457, 2003.
29. HOWELL, G. M. et al. RAS mutations in thyroid cancer. Oncologist, v. 18, n. 8, p. 926-932, 2013.
30. JANG, E. K. et al. NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma. Thyroid, v. 24, p. 1275-1281, 2014.
31. SALVATORE, D. et al. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. Nature Reviews Endocrinology, v. 17, n. 5, p. 296-306, 2021.
32. FERRARI, S. M. et al. Molecular testing in the diagnosis of differentiated thyroid carcinomas. Gland surgery, v. 7, suppl. 1, p. S19, 2018.
33. KO, Y. S. et al. Diagnostic limitation of fine-needle aspiration (FNA) on indeterminate thyroid nodules can be partially overcome by preoperative molecular analysis: Assessment of RET/PTC1 rearrangement in BRAF and RAS wild-type routine air-dried FNA specimens. International Journal of Molecular Sciences, v. 18, n. 4, p. 806, 2017.
34. JUNG, C. K. et al. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 99, n. 2, p. E276-E285, 2014.
35. SANTORO, M. et al. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 963, n. 1, p. 116-121, 2002.

36. BOOS, L. A. et al. Diagnostic and prognostic implications of the PAX 8–PPAR γ translocation in thyroid carcinomas—a TMA-based study of 226 cases. Histopathology, v. 63, n. 2, p. 234-241, 2013.
37. RAMAN, P.; KOENIG, R. J. Pax-8–PPAR-γ fusion protein in thyroid carcinoma. Nature Reviews Endocrinology, v. 10, n. 10, p. 616-623, 2014.
38. ZHANG, Y. et al. Genomic binding of PAX8-PPARG fusion protein regulates cancer-related pathways and alters the immune landscape of thyroid cancer. Oncotarget, v. 4, n. 8, p. 5761, 2017.
39. SANTOS, M. T.; et al. Clinical decision support analysis of a microRNA-based thyroid molecular classifier: a real-world, prospective and multicentre validation study. EBioMedicine, v. 82, p. 1-9, 2022.
40. AGRAWAL, N. et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. Cell, v. 159, n. 3, p. 676-690, 2014.
41. CENSI, S. et al. Prognostic significance of TERT promoter and BRAF mutations in TIR-4 and TIR-5 thyroid cytology. European Journal of Endocrinology, v. 181, n. 1, p. 1-11, 2019.
42. GUAN, H. et al. Utilities of RAS mutations in preoperative fine needle biopsies for decision making for thyroid nodule management: results from a single-center prospective cohort. Thyroid, v. 30, n. 4, p. 536-547, 2020.
43. MARCADIS, A. R. et al. Interinstitutional variation in predictive value of the ThyroSeq v2 genomic classifier for cytologically indeterminate thyroid nodules. Surgery, v. 165, n. 1, p. 17-24, 2019.
44. EIDT, L. B. et al. A prospective comparison of ACR-TIRADS and EU-TIRADS in thyroid nodule assessment for FNA-US. Clinical Endocrinology, v. 98, n. 3, p. 415-425, 2023.
45. LI, H. et al. Performance of ThyroSeq v3.0 in Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. Thyroid, v. 30, n. 10, p. 1430-1438, 2020.
46. ALI, S. Z.; VANDERLAAN, P. A. (Eds.). The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: definitions, criteria, and explanatory notes. Springer Nature, 2023.
47. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, p. 1-160, 2022.

48. SCHEFFEL, R. S. et al. The BRAFV600E mutation analysis and risk stratification in papillary thyroid carcinoma. Archives of endocrinology and metabolism, v. 64, n 6, p. 751-757, 2020.

ANEXO I – Registro do Projeto de Pesquisa

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação de aspectos clínicos, ultrassonográficos, citopatológicos e moleculares na doença nodular de tireoide

Pesquisador: Lenara Golbert

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 29368320.0.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericordia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.866.267

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento Informações Básicas da Pesquisa.

A Doença Nodular da Tireoide é uma condição clínica muito frequente, podendo atingir cerca de 2/3 da população quando avaliada por ultrassonografia, necessitando avaliação específica para descartar a presença do carcinoma da tireoide. Representa um desafio para os clínicos, em especial nos casos de citologia indeterminada, em que os métodos diagnósticos disponíveis não definem a natureza do nódulo. O manejo dos nódulos tireoidianos requer um exame ultrassonográfico (US) e posterior punção aspirativa com agulha fina guiada pela US (PAAF-US) para análise da citologia, método de escolha para verificação da natureza dos nódulos tireoidianos e seleção dos casos para tratamento cirúrgico. Vários sistemas de classificação ultrassonográfica têm sido propostos para otimizar a seleção de nódulos que necessitam prosseguir na investigação diagnóstica. Dados prospectivos sobre a acurácia e segurança destes sistemas ainda são incipientes em nosso meio. Em aproximadamente 20 - 25% das PAAF-US de nódulos de tireoide, a citologia não pode descartar o câncer de tireoide, ou por material insuficiente ou pela citologia indeterminada. Atualmente a cirurgia diagnóstica é a conduta recomendada na maioria dos nódulos com citologia indeterminada, podendo ser evitada se a avaliação pré-operatória

Endereço: Avenida Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17 ¿ Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar.
Bairro: Cidade Baixa **CEP:** 90.035-190
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

estabelecer com confiabilidade o diagnóstico de lesão benigna. A indicação cirúrgica para fins diagnósticos aumenta o risco de comorbidades aos pacientes e gera maiores custos. Ainda, o diagnóstico pré-operatório indeterminado pode acarretar planejamento cirúrgico inadequado em pacientes com câncer de tireoide, levando à necessidade de cirurgia adicional. O desenvolvimento da medicina de precisão vem modificando o manejo dos nódulos de citologia indeterminada, através da avaliação de mutações, bem como a expressão de genes envolvidos na tumorigênese tireoidiana. A avaliação molecular pode ser realizada no material proveniente da PAAF-US, aumentando a acurácia e fornecendo importantes informações diagnósticas. Recentemente, foram propostos painéis de testes moleculares para diferenciação dos nódulos benignos dos malignos. Apesar de alguns destes testes estarem disponíveis para uso clínico, sua avaliação dá-se somente através de envio das amostras para análise nos referidos laboratórios detentores das patentes nos Estados Unidos, limitando de maneira importante a acessibilidade aos mesmos e impedindo a reprodutibilidade dos resultados na realidade brasileira. A redução dos custos das análises moleculares e a evolução da medicina personalizada em nosso meio, são realidade verificada nos últimos anos em laboratórios de todo o Brasil. Frente ao exposto, o objetivo do presente projeto é avaliar os aspectos clínicos, ultrassonográficos, citopatológicos e moleculares na doença nodular de tireoide e correlacioná-los com o risco de malignidade dos nódulos, visando definir a sua viabilidade e custo-efetividade de implantação nos laboratórios brasileiros, permitindo
a sua utilização na rotina clínica. A classificação mais precisa dos nódulos tireoidianos permitirá reduzir os procedimentos diagnósticos e encaminhamentos cirúrgicos desnecessários, buscando uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes e a desoneração do Sistema Único de Saúde.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar os aspectos clínicos, ultrassonográficos, citopatológicos e moleculares na doença nodular de tireoide e correlacioná-los com o risco de malignidade dos nódulos.

Objetivo Secundário:

- Avaliar aspectos clínicos como: idade, sexo, peso, IMC, níveis de TSH, T4L, Anti-Tireoperoxidase (Anti-TPO), Anti-tireoglobulina (Anti-Tg) e sua associação com risco de malignidade; - Avaliar a acurácia diagnóstica de características ultrassonográficas isoladas e sua associação com risco de malignidade; - Avaliar a correlação entre os sistemas de classificação ultrassonográfica com

diagnóstico citológico através do sistema de Bethesda 2017 e o diagnóstico histológico, quando este estiver disponível; - Avaliar a acurácia dos diferentes sistemas de classificação ultrassonográfica em nódulos de tireoide com descrição da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo;- Avaliar a classificação ecográfica dos nódulos de citologia indeterminada e sua correlação com o diagnóstico histopatológico.- Avaliar a prevalência do câncer de tireoide em cada categoria do atual Sistema Bethesda de classificação citológica dos nódulos; - Comparar a acurácia das diferentes metodologias moleculares no diagnóstico préoperatório em nódulos de tireoide com citologia indeterminada com descrição da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo;- Avaliar o custo-efetividade da avaliação molecular em comparação à investigação atual;- Estabelecer quais pacientes com citologia indeterminada que se beneficiarão dos testes moleculares, levando em consideração os dados clínicos e ecográficos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos associados a este projeto de pesquisa são mínimos, visto que o protocolo não modifica a prática de investigação da doença nodular de tireoide bem como seu tratamento, mantendo as condutas da equipe assistente, de acordo com as recomendações atuais (literatura médica, especialmente consensos). Os possíveis riscos do projeto limitam-se a quebra de sigilo, mas conforme Declaração de Confidencialidade do sujeito
de pesquisa, asseguramos que a confidencialidade será resguardada pela equipe envolvida na condução do projeto de pesquisa e que em nenhum momento a identidade será revelada, conforme disposto na Resolução 466/2012 seus complementares, e demais normas legislativas vigentes.

Benefícios:

A classificação mais precisa dos nódulos tireoidianos permitirá reduzir os procedimentos diagnósticos e encaminhamentos cirúrgicos desnecessários, buscando uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes e a desoneração do Sistema Único de Saúde

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da solicitação de emenda ao projeto de estudo dos seguintes itens enviados por carta assinada pelo pesquisador responsável:

a) Inclusão no projeto os seguintes autores/pesquisadores:

1. Fábio Bilhar, pesquisador responsável no Hospital Nossa Senhora da Conceição do Grupo Hospitalar Conceição,
2. Freddy David Moposita Molina, pesquisador aluno de mestrado da UFCSPA;
3. Lilian Solera, aluna de Iniciação Científica e de Biomedicina da UFCSPA.

b) E inclusão de Centro Coparticipe Hospital Nossa Senhora da Conceição do Grupo Hospitalar Conceição, através da participação do Serviço de Endocrinologia. Essa inclusão tem como objetivo incluir maior número de amostras, visando número suficiente de amostras de citologia indeterminada, bem como aumentar a parceria entre os Serviços. A modificação na metodologia com a presente emenda limita-se à inclusão de coleta de dados clínicos, ultrassonográficos e citológicos dos pacientes submetidos a Punção Aspirativa por Agulha Fina de tireoide guiada por Ultrassonografia (PAAF-US) no Hospital Nossa Senhora da Conceição, que aceitarem participar do Estudo, mediante assinatura do TCLE, após explicação do mesmo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Vide campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Recomendações:
O pesquisador responsável deve enviar relatórios semestrais de atividades do projeto de pesquisa a cada 6 meses, conforme:

Conforme RESOLUÇÃO Nº 466 de 2012:
XI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL
XI.2 - Cabe ao pesquisador:
d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

E de acordo com a RESOLUÇÃO Nº 510 de 2016:
Capítulo VI - DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL
Art. 28. A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais, cabendo-lhe:
V - apresentar o relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos nos documentos da emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n° 466, de 2012 e na Norma Operacional n° 001 de 2013, do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta para o projeto de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2057503_E2.pdf	27/01/2023 09:30:02		Aceito
Outros	declaracaodeinfraestrutura_LenaraGolbert.pdf	09/01/2023 22:52:38	Lenara Golbert	Aceito
Outros	declaracaodecompromisso_resultadodapesquisa_LenaraGolbert.pdf	09/01/2023 22:51:35	Lenara Golbert	Aceito
Outros	termoanuenciachefiadoservicoGHC.pdf	09/01/2023 22:50:19	Lenara Golbert	Aceito
Outros	Emenda_projeto.pdf	09/01/2023 22:36:16	Lenara Golbert	Aceito
Outros	termo_entrega_relatorio.pdf	16/04/2020 17:43:04	Lenara Golbert	Aceito
Outros	Justificativa_emenda.pdf	16/04/2020 17:38:11	Lenara Golbert	Aceito
Outros	inscricaoCEPSantaCasa.pdf	04/02/2020 13:14:28	Lenara Golbert	Aceito
Outros	formulario_autorizacao_chefia.pdf	04/02/2020 13:12:04	Lenara Golbert	Aceito
Outros	declaracao_uso_dados_prontuario.pdf	04/02/2020 13:08:50	Lenara Golbert	Aceito
Outros	Declaracao_isencao_onus.pdf	04/02/2020 13:08:15	Lenara Golbert	Aceito
Outros	declaracao_confidencialidade.pdf	04/02/2020 13:07:22	Lenara Golbert	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_compromisso_materialbiologico.pdf	03/02/2020 21:06:10	Lenara Golbert	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	03/02/2020 21:04:39	Lenara Golbert	Aceito
Solicitação	Formularioinscricao.pdf	03/02/2020	Lenara Golbert	Aceito

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE PORTO ALEGRE - ISCMPA

Continuação do Parecer: 5.866.267

Assinada pelo Pesquisador Responsável	Formularioinscricao.pdf	20:51:39	Lenara Golbert	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Avaliacaodeaspectosclinicosultrassonograficoscitopatologicosemoleculares_tireoide.pdf	03/02/2020 20:50:11	Lenara Golbert	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEprojeto_nodulo_tireoide.pdf	03/02/2020 20:49:35	Lenara Golbert	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_nodulos.pdf	03/02/2020 20:45:06	Lenara Golbert	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

PORTO ALEGRE, 27 de Janeiro de 2023

Assinado por:
RENATA NETO PIRES
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Osvaldo Aranha, nº 80, sala 17 ¿ Centro Administrativo da Santa Casa, 2º andar.
Bairro: Cidade Baixa **CEP:** 90.035-190
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3214-8571 **Fax:** (51)3214-8571 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

ANEXO II – Currículo Lattes

Freddy David Moposita Molina

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/8304639030593573

ID Lattes: **8304639030593573**

Última atualização do currículo em 27/08/2024

Possui graduação em ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA pela UNIVERSIDADE DAS FORÇAS ARMADAS ESPECIAIS-ESPE (2017). No período entre 2018 e 2022 dedicou-se ao diagnóstico molecular de doenças infecciosas em laboratórios de alta complexidade. Atualmente é investigador da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) no projeto sobre Avaliação Molecular de Nódulos de Tireoide. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biologia Molecular. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Freddy David Moposita Molina

Nome em citações bibliográficas MOLINA, F. D. M.

Lattes iD http://lattes.cnpq.br/8304639030593573

País de Nacionalidade Equador

Formação acadêmica/titulação

2022 Mestrado em andamento em BIOCIÊNCIAS.
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
Título: Avaliação Molecular de Nódulos de Tireoide.
Orientador: Vanessa Suñé Mattevi.
Coorientador: Lenara Golbert.
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

2009 - 2017 Graduação em ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA.
UNIVERSIDADE DAS FORÇAS ARMADAS ESPECIAIS-ESPE, ESPE, Equador.
Título: IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS, MICROALGAS E FUNGOS TERMOFÍLICOS DA FONTE GEOTÉRMICA "CHACHIMBIRO" ATRAVÉS DE TÉCNICAS MICROBIOLÓGICOS E MOLECULARES..
Orientador: ANDRÉS IZQUIERDO.

Formação Complementar

2021 - 2021 Gestão Interna de Resíduos e resíduos gerados em unidades de saúde. (Carga horária: 4h).
Ministério da Saúde Pública do Equador., MSP, Equador.

2021 - 2021 ExiPrep 48 Full Automatic Nucleic Extraction System. (Carga horária: 4h).
Recor Dental y Quimedic Cia. Ltda.-Bionner, RECOR, Equador.

2020 - 2020 ExiPrep TM 16 Dx Fully Automated Nuceli Extraction System. (Carga horária: 8h).
Recor Dental y Quimedic Cia. Ltda.-Bionner, RECOR, Equador.

2020 - 2020 ExiPrep 96 Lite Automated NA Purification System ExiCycler 96 Real Time Qua. (Carga horária: 16h).
Recor Dental y Quimedic Cia. Ltda.-Bionner, RECOR, Equador.

2018 - 2018 Plano de higiene química relativo aos requisitos básicos para a segurança d. (Carga horária: 8h).
Recor Dental y Quimedic Cia. Ltda.-Bionner, RECOR, Equador.

Atuação Profissional

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2022 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: INVESTIGADOR

Outras informações Projeto em Avaliação Molecular de Nódulos de Tireoide

Centro de Nanociência e Nanotecnologia CENCINAT., CENCINAT, Equador.

Vínculo institucional

2016 - 2017 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: INVESTIGADOR, Carga horária: 8

Outras informações Técnicas de Biologia Molecular como: "PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)?,Extração de DNA de microrganismos, pirosequenciamento e análise bioinformática

Colegio técnico agropecuario Genoveva German, CTAGG, Equador.

Vínculo institucional

2017 - 2018 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: PROFESSOR, Carga horária: 8

Outras informações Professor e técnico de laboratórios de biologia e química.

Diagnóstico e identificação genética, DIAGEN, Equador.

Vínculo institucional

2020 - 2020 Vínculo: PARTICULAR, Enquadramento Funcional: LABORATORISTA, Carga horária: 8

Outras informações Processamento de amostras para o diagnóstico molecular da COVID19.

CONSORCIO MEDICO GODOY, CMG, Equador.

Vínculo institucional

2020 - 2022 Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: RESPONSÁVEL PELAS ÁREAS MOLECULAR, MICROBI, Carga horária: 8

Outras informações Responsavel das Áreas de Biologia Molecular, Clínica e Microbiológica. Processamento de Testes Moleculares(COVID-19, Papilomavírus Humano, HIV, DENGUE, HEPATITE C e B, doenças sexualmente transmissíveis e paternidades)

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.

Idiomas

Espanhol Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Português Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalho

1. **MOLINA, F. D. M.**; Silva, GK ; SOLERA, L. ; ANDRADE, A. C. ; BELARDINELLI, S. O. ; EIDT, L. B. ; AGNES, G. ; ZANDONA, M. R. ; IZQUIERDO, R. F. ; ZANELLA, V. ; BILHAR, F. A. ; SOUZA, E. L. ; MATTEVI, V. S. ; GOLBERT, L. . Molecular analysis in fine needle biopsies of thyroid nodules: preliminary results from two Brazilian sites. 2024. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. **MOLINA, F. D. M.**; Silva, GK ; SOLERA, L. ; ANDRADE, A. C. ; BELARDINELLI, S. O. ; EIDT, L. B. ; AGNES, G. ; ZANDONA, M. R. ; IZQUIERDO, R. F. ; ZANELLA, V. ; BILHAR, F. A. ; SOUZA, E. L. ; MATTEVI, V. S. ; GOLBERT, L. . AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES BRAF E RAS NA DOENÇA NODULAR DA TIREOIDE. 2023. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. XXI ENCONTRO BRASILEIRO DE TIREOIDE. MOLECULAR ANALYSIS IN FINE NEEDLE BIOPSIES OF THYROID NODULES: PRELIMINARY RESULTS FROM TWO BRALIZIANS SITES.. 2024. (Congresso).

2. 3 Congresso UFCSPA. AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES BRAF, RAS E TERT EM NÓDULOS DE TIREOIDE. 2023. (Congresso).

3. 3 Congresso UFCSPA. FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS E MOLECULARES DO CARCINOMA PAPILAR DE TIREOIDE. 2023. (Congresso).

4. II Congresso Brasileiro em Biociências Aplicadas à Saúde ? II CBBAS. AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES BRAF E RAS NA DOENÇA NODULAR DA TIREOIDE. 2023. (Congresso).

5. Equipes de pesquisa de Laboratório da universidade de Saskatchewan. 2017. (Seminário).

6. XII Congresso de Ciência e Tecnologia ESPE. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS, MICROALGAS E FUNGOS TERMOFÍLICOS DA FONTE GEOTÉRMICA "CHACHIMBIRO" POR TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS E MOLECULARES. 2017. (Congresso).

7. Detecção de vírus como indicadores de contaminação da água.. 2016. (Seminário).

8. Congresso Internacional de Nanotecnologia. 2014. (Congresso).

9. Oitavo Congresso de Ciência e Tecnologia. 2013. (Congresso).