Nathalie Oliveira de Santana

Perfil clínico e molecular dos carcinomas de células de Hürthle da tireoide

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Debora Lucia Seguro Danilovic

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santana, Nathalie Oliveira de Perfil clínico e molecular dos carcinomas de células de Hürthle da tireoide / Nathalie Oliveira de Santana. -- São Paulo, 2019. Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia. Orientadora: Debora Lucia Seguro Danilovic.
Descritores: 1.Nódulo da glândula tireoide 2.Neoplasias da glândula tireoide 3.Células oxífilas 4.Ultrassonografia 5.Citologia 6.Transdução de sinais 7.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 8.Via de sinalização Wnt USP/FM/DBD-288/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta pesquisa foi desenvolvida na Unidade de Tireoide, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM25), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto 2015/14819-7.

Aos meus pais

Agradecimentos

A realização de um projeto de pesquisa nunca é trabalho de uma pessoa só, foram várias as mãos que trouxeram estes resultados até aqui hoje, e sem elas eu não estaria defendendo minha tese.

Primeiramente, agradeço a minha orientadora, dra. Debora Danilovic, por ter reconhecido em mim o potencial de ser sua primeira aluna de doutorado e ter permitido que eu entrasse no mundo fascinante das neoplasias de tireoide. Aprendi muito com sua extrema competência e sempre será uma referência em minha vida profissional.

O meu agradecimento ao dr. Antonio Lerário, que me guiou com tanta paciência e maestria pelos caminhos da bioinformática. Foi uma bela jornada vislumbrar a beleza da genética humana e do avanço tecnológico.

Agradeço a dra. Claudia Kliemann, que realizou etapas cruciais e permitiu a execução desse trabalho. Ao dr. Ricardo Miguel e ao dr. Vinícius pela revisão das imagens ultrassonográficas.

Agradeço o apoio dos colegas que contribuíram com nosso trabalho fornecendo casos: Profa. Karla Freire Rezende (Universidade Federal de Sergipe), Prof. Venâncio Avancini (FMUSP) e dra. Paula Vianna (Hospital Alemão Oswaldo Cruz).

Obrigada às biologistas Isabel Mello e Eliana Frazatto (LIM 25) pela contribuição na fase de extração de DNA e na organização dos materiais. Agradeço também à equipe do SELA e aos funcionários do Departamento de Patologia, que auxiliaram na separação e disponibilização dos materiais: Camila Teixeira, Ana Paula Flora e Maiara Vicente.

No âmbito pessoal, agradeço profundamente aos meus pais, Denise e Ernesto, e a minha irmã Jéssica, pelo apoio incondicional em minha busca pelo conhecimento e crescimento profissional e por me acompanharem a cada conquista, vibrando com a mais genuína felicidade.

Ao meu namorado Philippi, que me ajudou na elaboração das ilustrações da tese, segurou minha mão, ouviu meus desabafos e minhas alegrias, sempre me apoiando nos momentos de maior tensão e preocupação inerentes à pósgraduação.

Aos familiares que me acompanharam nessa jornada, em especial a tia Givelda, que me acolheu com seu carinho e cuidados maternais durante minha estada em São Paulo, tia Vera, tia Gilná e aos primos Chris, Luiza, Luizinho e Isabela.

Aos meus amigos, que me contagiaram com sua torcida, apoio e boas vibrações: Débora Consuelo, Alexandre, Diego, Mariana, Bruno, Renata de Faria, Fernanda, Iara, Tatiana, Christiane, Marilena, Olívia, Amanda, Luiza Messias, Mônica, Laís, Renatinha, Lívia, Paula, Délio, Fabricio, Lecia e Shirley.

Agradeço aos parceiros de trabalho de Aracaju que me receberam de braços abertos e com tanta afabilidade, em especial dra. Karla Rezende, dra. Naira Horta e dra. Daniele Martins. Também sou muito grata pelo carinho e incentivo que recebi dos meus queridos alunos.

Por fim, dedico esse trabalho a todos os pacientes que padecem dessa doença. Que os nossos achados possam fazer parte de uma escada de conhecimento que culmine em avanços que beneficiem a vida dessas pessoas. Também dedico esse trabalho a todos que, assim como eu, lutam e se encantam pela ciência, especialmente às mulheres cientistas.

O meu sincero agradecimento a todos que contribuíram, por menor que tenha sido essa contribuição, para que eu chegasse até aqui, e a todos que torceram e vibram comigo nesse momento. Muito obrigada!

"Na vida, não existe nada a temer,

mas a entender." (Marie Curie)

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de "International Committee of Medical Journals Editors" (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com "List of Journals Indexed in Index Medicus".

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas
Lista de Figuras e Quadros
Lista de Tabelas
Resumo
Abstract
1. Introdução1
1.1. Aspectos clínicos das neoplasias de células de Hürthle
1.2. Vias de sinalização intracelular e câncer de tireoide6
1.2.1 Via MAPK6
1.2.2. Via PI3K-AKT-mTOR
1.2.3. Via Notch 10
1.2.4. Via Wnt/β-catenina12
1.3. Alterações moleculares dos carcinomas de células de Hürthle 14
1.4. Sequenciamento paralelo em larga escala16
2. Objetivos 17
3. Materiais e métodos 18
3.1. Seleção de pacientes 18
3.1.1. Considerações éticas 18
3.2. Avaliação clínica, ultrassonográfica, citológica e histopatológica dos
tumores de células de Hürthle 19
3.3. Sequenciamento paralelo em larga escala
3.3.1. Extração do DNA genômico de amostras conservadas em parafina26
3.3.2. Análise quantitativa e qualitativa do DNA extraído
3.3.3. Preparo das bibliotecas 29
3.3.4. Painel e sequenciamento 30
3.4. Bioinformática 32
3.7. Análise estatística
4. Resultados
4.1. Características clínicas dos tumores de células de Hürthle
4.1.1. Características clínicas e laboratoriais dos carcinomas e adenomas
de células de Hürthle 36

4.1.2. Ultrassonografia de tireoide e citologia de carcinomas e adenomas	
de células de Hürthle	36
4.1.3. Exame anatomopatológico de carcinomas e adenomas de células d	le
Hürthle	39
4.1.4. Resposta ao tratamento dos carcinomas de células de Hürthle	41
4.1.5. Carcinomas extensamente vs. minimamente invasivos	42
4.2. Características moleculares dos tumores de células de Hürthle	43
4.2.1. Relação entre perfis clínico e molecular	52
5. Discussão	53
5.1. Perfil clínico e ultrassonográfico dos carcinomas de células de Hürthle	53
5.2. Perfil molecular dos carcinomas de células de Hürthle	55
5.2.1. O gene FAT1 como possível "driver" do carcinoma de células de	
Hürthle	56
5.2.2. Outros potenciais "drivers" do carcinoma de células de Hürthle e	
impacto prognóstico6	60
6. Conclusões	63
7. Sugestões para trabalhos futuros6	64
8. Anexos	65
9. Referências	32

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACH	Adenoma de células de Hürthle		
AGAP2	Gene, do inglês, ARF GTPase-activating protein with GTPase		
	domain, ankyrin repeat and Pleckstrin homology domain 2		
AJCC	American Joint Committee on Cancer		
AKT	Oncogene, do inglês, <i>v-akt murine thymoma viral</i>		
ALK	Gene, do inglês, <i>anaplastic lymphoma kinase</i>		
AMER1	Gene, do inglês, APC membrane recruitment protein 1		
APC	Gene, do inglês, adenomatous polyposis coli		
ARID1B	Gene, do inglês, at-rich interaction domain-containing protein		
	1B		
ATA	American Thyroid Association		
ATM	Gene, do inglês, ataxia-telangiectasia mutated		
AXIN1	Gene, do inglês, <i>axin 1</i>		
AXIN 2	Gene, do inglês, <i>axin 2</i>		
BDP1	Gene, do inglês, B-double prime 1, subunit of RNA		
	polymerase III transcription initiation fator IIIB		
BRAF	Gene, do inglês, v-raf murine sarcoma viral oncogene		
	homolog B1		
BWA	Burrows-Wheller Aligner		
CCDC6	Gene, do inglês, <i>coiled-coil domain containing 6</i> , equivalente ao gene <i>H4</i>		
ССН	Carcinoma de células de Hürthle		
CCND1	Gene, do inglês, <i>cyclin D</i>		
CDH4	Gene, do inglês, <i>cadherin 4</i>		
CDK4	Gene, do inglês, <i>cyclin-dependent kinase 4</i>		
CHEK2	Gene, do inglês, checkpoint kinase 2, homólogo de S. pombe		
CKlalfa	Gene, do inglês, <i>casein kinase 1, alpha 1</i>		
Cq	Ciclo limiar		
CSNK1D	Gene, do inglês, <i>casein kinase 1, delta</i>		

CSNK1E	Gene, do inglês, <i>casein kinase 1, épsilon</i>	
CTNNB1	Gene, do inglês, cadherin-associated protein, beta	
CYLD	Gene, do inglês, <i>cylindromatosis</i>	
DICER1	Gene, do inglês, dicer 1, ribonuclease type III	
DKK1	Gene, do inglês, dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	
dsDNA	DNA de fita dupla	
DVL1	Gene, do inglês, dishevelled segment polarity protein 1	
DVL2	Gene, do inglês, dishevelled segment polarity protein 2	
EGFR	Gene, do inglês, epidermal growth factor receptor	
EIF1AX	Gene, do inglês, eukaryotic translation initiation factor 1 alpha,	
	X-linked	
EML4	Gene, do inglês, echinoderm microtubule associated protein like 4	
Ena/VASP	Complexo da fosfoproteína estimulada por vasodilatador	
ERBB2	Receptor tirosina quinase Erb-b2	
ERK	Gene, do inglês, extracellular-signal regulated kinase	
ETV6	Gene, do inglês, <i>et</i> s <i>variant 6</i>	
EXT	Carcinoma de células de Hürthle extensamente invasivo	
EZH1	Gene, do inglês, enhancer of zeste, homólogo 1 da Drosophila	
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo	
FAT1	Gene, do inglês, <i>FAT tumor supressor</i> , homólogo 1 da <i>Drosophila</i>	
FBXW7	Gene, do inglês, <i>F-box and WD40 domain protein 7</i>	
FFPE	Do inglês, formalin-fixed, paraffin-embedded	
FLCN	Gene, do inglês, folliculin	
FLT3	Gene, do inglês, fms-related tyrosine kinase 3	
FLT4	Gene, do inglês, <i>fms-related tyrosine kinase 4</i> , equivalente ao gene <i>VEGFR3</i> (do inglês, <i>vascular endothelial growth factor receptor 3</i>)	
FGFR1	Gene, do inglês, fibroblast growth factor receptor 1	
FGFR2	Gene, do inglês, fibroblast growth factor receptor 2	
FGFR3	Gene, do inglês, fibroblast growth factor receptor 3	
FOXO1	Gene, do inglês, <i>forkhead box O1</i>	
FZD1	Gene, do inglês, frizzled class receptor 1	
GNAS	Gene, do inglês, guanine nucleotide-binding protein, alpha- stimulating activity polipeptide	

GOLPH3	Gene, do inglês, golgi phosphoprotein 3
GRIM-19 GSK3beta	Gene, do inglês, <i>NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 13</i> , equivalente a <i>NDUFA13</i> Gene, do inglês, <i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
HNF1A	Gene, do inglês, <i>HNF1 homeobox A</i>
HRAS	Gene, do inglês. Harvev rat sarcoma viral oncogene homolog
INPP5D	Gene, do inglês, <i>inositol polyphosphate-5-phosphatase</i> , equivalente ao gene <i>SHIP1</i> Gene do inglês, <i>insulin recentor substrate</i> 2
IRS4	Gene, do inglês, insulin receptor substrate 4
.IAK2	Gene, do inglês, <i>Janus kinase 2</i>
KDR	Gene, do inglês, <i>kinase insert domain receptor</i> , equivalente ao gene <i>VEGFR</i> 2 (do inglês, <i>vascular endotelial growth factor receptor</i> 2)
KEAP1	Gene, do inglês, kelch-like ECH-associated protein 1
KIT	Gene, do inglês, <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral</i>
KRAS	Gene, do inglês, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Perda de heterozigose
LRP5	Gene, do inglês, low density lipoprotein receptor-related protein 5
LRP6	Gene, do inglês, <i>low-density lipoprotein receptor-related</i> protein 6
LTK	Gene, do inglês, <i>leukocyte tyrosine kinase</i>
MAP2K1	Gene, do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i> , equivalente ao gene <i>MEK1</i>
MAP2K2	Gene, do inglês, <i>mitogen-activated protein kinase kinase 2</i> , equivalente ao gene <i>MEK</i> 2
MAPK	Do inglês, mitogen-activated protein kinase
МАРКЗ	Gene, do inglês, mitogen-activated protein kinase 3,
	equivalente ao gene ERK1
mCi	Milicurie
MDM2	Gene, do inglês, mouse double minute 2 homolog
MEK	Gene, do inglês, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
MET	Proto-oncogene MET, receptor tirosina quinase
MIN	Carcinoma de células de Hürthle minimamente invasivo
MLL	Gene, do inglês, myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia
MLL3	Gene, do inglês, myeloid/lymphoid or mixed lineage leucemia

	3
MTOR	Gene, do inglês, mechanistic target of rapamycin
MYC	Gene, do inglês, <i>v-myc avian myelocytomatosis viral</i>
NCOA4	Gene, do inglês, <i>nuclear receptor coactivator 4</i> , equivalente
NDUFA13	Gene, do inglês, NADH-ubiquinone oxidoreductase 1 alpha subcomplex 13. equivalente ao gene GRIM-19
NFE2L2	Gene, do inglês, nuclear factor, erythroid 2-like 2
NFKB1	Gene, do inglês, <i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
NOTCH	Homólogo do gene Notch1 da Drosophila
NRAS	Gene, do inglês, neuroblastoma Ras viral oncogene homolog
NTRK1	Gene, do inglês, neurotrophic receptor tyrosine kinase 1
NTRK3	Gene, do inglês, neurotrophic receptor tyrosine kinase 3
NUMB	Homólogo do gene NUMB da Drosophila
p-mTOR	Do inglês, phosphorylated mammalian target of rapamycin
PAX8	Gene, do inglês, <i>paired box gene 8</i>
pb	Pares de bases
PDGFRA	Gene, do inglês, platelet-derived growth factor receptor alpha
PDGFRB	Gene, do inglês, platelet-derived growth factor receptor beta
PDK1	Gene, do inglês, proteína quinase dependente de fosfoinositídeos-1
PDPK1	Gene, do inglês, pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzima 1
PI3K	Gene do fosfatidilinositol-3-quinase
PI3KCA	Gene do fosfatidilinositol-3-quinase, catalítico alfa
PI3KCG	Gene do fosfatidilinositol-3-quinase, catalítico gama
PI3KR1	Gene fosfatidilinositol-3-quinase, subunidade reguladora 1 alfa
PI3KR4	Gene fosfatidilinositol-3-quinase, subunidade reguladora 4 alfa
PI3KR5	Gene fosfatidilinositol-3-quinase, subunidade reguladora 5 alfa
PIP2	Gene do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP3	Gene do fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PPARG	Gene, do inglês, peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PPM1D	Gene, do inglês, protein phosphatase,
	magnesium/manganese-dependent, 1D
PPP2R1A	Gene, do inglês, protein phosphatase 2, subunidade

	reguladora alfa-A
PTEN	Gene, do inglês, phosphatase and tensin homolog
RAP-TOR	Gene, do inglês, Regulatory associated protein of mTOR
RAS	Gene, do inglês, <i>rat sarcoma</i>
RHEB	Gene, do inglês, <i>Ras homolog enriched in brain</i>
RICTOR	Gene, do inglês, Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RNF43	Gene, do inglês, <i>ring finger 43</i>
RTK	Receptor tirosina quinase
SFRP1	Gene, do inglês, secreted frizzled-related protein 1
SLC5A5	Gene, do inglês, solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5
SPOP	Gene, do inglês, speckle-type poz protein
SRC	Gene, do inglês, SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine
STK11	Gene, do inglês, <i>serine/threonine kinase 11</i> , equivalente ao gene <i>LKB1</i>
TCF4	Gene, do inglês, <i>transcription factor 4</i>
TERT	Gene, do inglês, <i>telomerase reverse transcriptase</i>
THADA	Gene, do inglês, thyroid adenoma-associated
TIMM44	Gene, do inglês, translocase of inner mitochondrial membrane
	44, homólogo da levedura
TP53	Gene, do inglês, <i>tumor protein p53</i>
TRIM62	Gene, do inglês, <i>tripartite motif containing 62</i> , equivalente ao gene <i>DEAR1</i>
TSC1	Gene, do inglês, <i>tuberous sclerosis 1</i>
TSC2	Gene, do inglês, <i>tuberous sclerosis</i> 2
TSHR	Receptor do hormônio tireoestimulante
TWIST1	Gene, do inglês, twist family bHLH transcription factor 1
WNT	Gene, do inglês, wingless-type mmtv integration site family
ZFHX3	Gene, do inglês, <i>zinc finger homeobox 3</i>
ZNRF3	Gene, do inglês, zinc and ring finger 3
ΔΔCq	Escore normatizado de integridade do DNA

Lista de Figuras e Quadros

Figura 1 – Fotomicrografia de células de Hürthle 1
Figura 2 – Fotomicrografia de invasão capsular de carcinoma de células de Hürthle
Figura 3 – Fotomicrografia de invasão vascular de carcinoma de células de Hürthle
Figura 4 – A via de sinalização intracelular MAPK6
Figura 5 – Prevalência dos genes relacionados ao carcinoma papilífero de tireoide
Figura 6 – Esquema simplificado da via PI3K/AKT/mTOR e MAPK na carcinogênese tireoideana
Figura 7 – A via Notch 11
Figura 8 – A via Wnt/β-catenina e a carcinogênese tireoidiana
Figura 9 – Esquema das quatro etapas envolvidas no sequenciamento paralelo em larga escala
Quadro 1 – Lista dos genes selecionados para o painel de sequenciamento em larga escala dos carcinomas e adenomas de células de Hürthle e respectivas vias de sinalização intracelular
Figura 10 – Representação gráfica da resposta ao tratamento de carcinomas de células de Hürthle
Figura 11 – Frequência de casos apresentando mutações em genes da via Wnt/β-catenina
Figura 12 – Frequência de casos apresentando mutações em genes das vias MAPK e PI3K-AKT-mTOR
Quadro 2 – Distribuição dos genes de acordo com as vias de sinalização e o grau de patogenicidade das mutações encontradas
Figura 13 – Representação gráfica das mutações mais frequentes nos carcinomas de células de Hürthle da tireoide
Figura 14 – Localização esquemática das mutações de FAT1 de acordo com os domínios proteicos
Figura 15 – Localização esquemática das mutações de APC de acordo com os domínios proteicos
Figura 16 – Funções celulares do <i>FAT1</i> 57

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação TNM do carcinoma diferenciado de tireoide de acordo
com AJCC, 8ª edição 21
Tabela 2 - Estratificação de risco dos carcinomas de células de Hürthle
baseado nas diretrizes da ATA23
Tabela 3 – Classificação da resposta ao tratamento do carcinoma diferenciado
de tireoide segundo a ATA
Tabela 4 – Aumento recomendado do produto do sequenciamento para
amostras de DNA extraídas de material conservado em parafina de
acordo com o valor de $\Delta\Delta$ Cq obtido pela qPCR
Tabela 5 – Características clínicas e laboratoriais de carcinomas e adenomas
de células de Hürthle
Tabela 6 – Características ultrassonográficas de carcinomas e adenomas de
células de Hürthle
Tabela 7 – Desempenho das características ultrassonográficas dos nódulos no
diagnóstico de carcinomas de células de Hürthle
Tabela 8 – Padrão citológico de carcinomas e adenomas de Hürthle
Tabela 9 - Apresentação histopatológica de carcinomas e adenomas de
células de Hürthle 40
Tabela 10 – Estadiamento inicial dos carcinomas de células de Hürthle
segundo AJCC/TNM 8ª edição e o sistema de estratificação de risco
pela ATA 40
Tabela 11 – Características clínicas de pacientes portadores de carcinomas de
células de Hürthle mínima e extensamente invasivos
Tabela 12 – Distribuição das mutações somáticas conforme via de sinalização
intracelular de carcinomas de células de Hürthle extensamente e
minimamente invasivos 46
Tabela 13 – Mutações somáticas dos genes APC e FAT1 encontradas nos
carcinomas de células de Hürthle da tireoide e suas características 49

Resumo

Santana NO. *Perfil clínico e molecular dos carcinomas de células de Hürthle da tireoide* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A caracterização genômica dos carcinomas de células de Hürthle da tireoide (CCHs) está em progressão. Estudos recentes identificam alterações cromossômicas e mutações de DNA mitocondrial, além de distinto padrão de expressão gênica das vias PI3K-AKT-mTOR e Wnt/β-catenina, particularmente em CCHs extensamente invasivos. Entretanto, as potenciais mutações condutoras ou as responsáveis pelo fenótipo rico em mitocôndrias não estão completamente definidas. OBJETIVOS: caracterizar clinicamente os pacientes e avaliar o perfil molecular dos CCHs por meio de sequenciamento paralelo em larga escala e correlacioná-lo com as características clínicas, histológicas e desfechos. MÉTODOS: Avaliação retrospectiva de 52 CCHs e 49 adenomas de células de Hürthle (ACHs). Analisaram-se dados clínicos, histológicos, exames de ultrassonografia de tireoide e desfechos. Realizou-se o sequenciamento do DNA extraído de 40 CCHs e 10 ACHs por painel de 97 genes das vias MAPK, PI3K-AKT-mTOR, Wnt/ β -catenina e Notch e outros, como promotor do TERT e TP53. Os programas Lofreq, Mutect e Lancet identificaram variantes somáticas, e os achados foram revisados no "Integrative Genomics Viewer". As alterações genéticas identificadas foram avaliadas no banco de dados COSMIC70, e potenciais efeitos deletérios por ferramentas de predição "in silico". Os dados clínicos, histológicos e desfechos dos CCHs foram correlacionados com o perfil molecular. RESULTADOS: A idade média dos pacientes com CCHs foi de 57,3 ± 14,5 anos, com predomínio do sexo feminino (82,7%). Os nódulos malignos foram significativamente maiores que os benignos (47,4 ± 25,7 mm vs. 28,6 ± 19,5 mm, p<0,001). Achados ultrassonográficos suspeitos foram infrequentes nos CCHs (sólido 54,2%, hipoecoico 37,5%, macrocalcificações 12,5%, microcalcificações 8,3%, contornos irregulares 4,2%, altura > largura 16,7% e vascularização predominante central 52,6%). Os carcinomas eram extensamente invasivos em 61,5%. Metástases linfonodais ocorreram em 9,6% e à distância em 13,5%.

Em seguimento médio de 92,7 meses, recorrência e/ou persistência ocorreram em 17,3% e óbito pela doença em 3,8%. Houve variantes somáticas em 47,5% dos CCHs (190 SNPs e 5 inserções/deleções). A via Wnt/β-catenina foi a mais frequentemente alterada (30%), seguida das vias MAPK (27,5%) e PI3K-AKTmTOR (25%). Os genes com maior número de alterações foram FAT1 e APC (12 e 18 mutações, respectivamente) em 17,5% dos casos. Ocorreram mutações de NRAS em 7,5%, HRAS e KRAS em um CCH cada. Não foram identificadas mutações de BRAF e TP53, e as duas mutações do promotor do TERT foram distintas das C228T e C250T. Mutações foram mais numerosas nos carcinomas extensamente invasivos. Não houve associação significativa entre perfil mutacional e dados clínicos e histopatológicos. CONCLUSÃO: O perfil clínico dos pacientes com CCHs demonstrou idade média avançada e predomínio do sexo feminino. Na ultrassonografia, predominaram nódulos sólidos, não-hipoecoicos, sem calcificações, com contornos regulares, halo periférico e vascularização predominantemente central. Apesar de a maior parte dos casos ter sido extensamente invasiva, metástases linfonodais e à distância foram infrequentes, assim como recorrência ou persistência de doença. No sequenciamento paralelo em larga escala, observaram-se diversas mutações destacando-se a via Wnt/β-catenina e seus genes FAT1 e APC. Não houve associação do perfil mutacional com características clínicas, histológicas e desfechos.

Descritores: Nódulo da glândula tireoide; Neoplasias da glândula tireoide; Células oxífilas; Ultrassonografia; Citologia; Transdução de sinais; Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; Via de sinalização Wnt.

Abstract

Santana NO. *Clinical and molecular profile of Hürthle cell thyroid carcinomas* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

BACKGROUND: Genomic characterization of thyroid Hürthle cell carcinomas (HCCs) has evolved recently. Studies have identified recurrent driver mutations, chromosomal alterations and mitochondrial DNA mutations. PI3K-AKT-mTOR and Wnt/β-catenin pathways present distinct expression pattern, particularly in widely invasive HCCs. However, potential novel driver mutations or alterations responsible for mitochondrion-rich cells are not fully defined. OBJECTIVES: To clinically characterize patients with HCCs; to assess molecular profile of HCCs through next generation sequencing and to correlate it with clinical, pathologic characteristics and outcomes. METHODS: Retrospective assessment of 52 HCCs and 49 Hürthle cell adenomas (HCAs). Clinical, histological, ultrasound and outcome data were analyzed. Extracted DNA from 40 HCCs and 10 HCAs was sequenced through a 97-gene panel targeting MAPK, PI3K-AKT-mTOR, Wnt/β-catenin and Notch pathways and other genes, such as a TERT promoter and TP53. Variant callers Lofreg, Mutect and Lancet identified somatic variants, which were reviewed using Integrative Genomics Viewer. Genetic alterations were evaluated in COSMIC70 database and potential deleterious effects were assessed by in silico prediction tools. Clinical, histological and outcome data from HCCs were correlated with molecular profile. RESULTS: Mean age of patients with HCC was 57.3 ± 14.5 years, with a predominance of females (82.7%). Malignant nodules were significantly larger than the benign ones (47.4 ± 25.7 mm vs. 28.6 ± 19.5 mm, p < 0.001). Suspicious ultrasound features were infrequent in HCCs (solid 54.2%, hypoechoic 37.5%, coarse calcifications 12.5%, microcalcifications 8.3%, irregular contours 4.2%, taller-than-wide shape 16.7%, central vascularization 52.6%). HCCs were widely invasive in 61.5% of cases. Lymph node metastasis occurred in 9.6% and distant metastasis in 13.5%. At mean follow-up of 92.7 months, disease relapsed or persisted in 17.3%, and cancer-related death occurred in 3.8%. Somatic variants were identified in 47.5% of HCCs (190 SNPs and 5 insertions/deletions). Wnt/βcatenin was the most frequently altered pathway (30%), followed by MAPK (27.5%) and PI3K-AKT-mTOR (25%) pathways. FAT1 and APC were the most frequently mutated genes (12 and 18 mutations, respectively) in 17.5% of cases. NRAS mutations were present in 7.5% of HCCs, HRAS and KRAS in one HCC each. No BRAF or TP53 mutation was found, and there were two mutations in TERT promoter, different from C228T and C250T. Although mutations were more numerous in extensively invasive HCCs, no significant association was found between mutational profile and clinical, pathologic characteristics or outcomes. CONCLUSION: HCC clinical profile demonstrated advanced age at diagnosis and female predominance. Ultrasound showed mostly solid, regular, non-hypoechoic nodules with peripheral halo and central vascularization and without calcifications. Most HCCs were widely invasive, but persistent disease, recurrence, lymph node and distant metastasis were uncommon. HCC molecular profile depicted several mutations, mainly in Wnt/βcatenin pathway, particularly in FAT1 and APC genes. There was no association between mutational profile and clinical, pathologic characteristics and outcomes.

Descriptors: Thyroid nodule; Thyroid neoplasms; Oxyphil cells; Ultrasonography; Cytology; Signal transduction; High-throughput nucleotide sequencing; Wnt signaling pathway.

1. Introdução

Nódulos de tireoide são definidos como lesões radiologicamente distintas do parênquima adjacente, e sua frequência pode variar de 19 a 67% nos exames de ultrassonografia de tireoide^{1,2}. Os carcinomas de tireoide representam 7 a 15% dos nódulos tireoidianos^{1,3}, sendo que os diferenciados correspondem a cerca de 90% das neoplasias malignas da glândula. O carcinoma papilífero de tireoide é o subtipo mais frequente, enquanto os carcinomas de células de Hürthle correspondem a 3 a 4% das malignidades tireoidianas⁴.

Um nódulo é classificado como tumor de células de Hürthle quando há mais de 75% de células de Hürthle – também chamadas de oncocíticas ou oxifílicas – na análise histológica, sem características nucleares de carcinoma papilífero⁵. As células de Hürthle foram descritas pela primeira vez em 1898 por Askanazy⁶ e são derivadas das células foliculares da tireoide. Essas células apresentam citoplasma abundante, finamente granular, eosinofílico, rico em mitocôndrias – por vezes dilatadas e com formações vacuolares – além de nucléolo proeminente e baixa relação núcleo/citoplasma (Figura 1).



Figura 1 – Fotomicrografia de células de Hürthle (coloração hematoxilina eosina em aumento de 40x)

Além dos adenomas e carcinomas, as células de Hürthle estão presentes em outras patologias tireoidianas, como bócio nodular, doença de Graves e tireoidite de Hashimoto, e em tireoides expostas à irradiação cervical. Neste contexto de doenças benignas de tireoide, consideram-se as células de Hürthle resultado da senescência celular. No entanto, atualmente se sabe que essas células derivam de processo metaplásico em reposta ao estresse celular. Atribui-se o acúmulo de mitocôndrias a mutações no DNA mitocondrial, como forma de adaptação a uma fosforilação oxidativa defeituosa^{7,8}.

Em adenomas de células de Hürthle, não ocorre invasão capsular nem vascular. Por outro lado, os carcinomas de células de Hürthle são subclassificados em mínima ou extensamente invasivos, de acordo com a extensão da invasão capsular (Figura 2) e/ou vascular (Figura 3). Os carcinomas minimamente invasivos são tumores encapsulados com focos microscópicos de invasão capsular ou com menos de quatro focos de invasão vascular, enquanto os extensamente invasivos apresentam quatro focos ou mais de invasão vascular, invasão macroscópica da cápsula tumoral ou invasão extratireoidiana^{9,10}.



Figura 2 – Fotomicrografia de invasão capsular de carcinoma de células de Hürthle (coloração hematoxilina eosina em aumento de 10x)



Figura 3 – Fotomicrografia de invasão vascular de carcinoma de células de Hürthle (coloração hematoxilina eosina em aumento de 40x)

Todas as neoplasias de células de Hürthle foram inicialmente classificadas malignas, mas foi demonstrado em seguida que a presença de invasão determina a malignidade¹¹. Embora os carcinomas de células de Hürthle tenham sido considerados por um longo período subtipos dos carcinomas foliculares da tireoide, recentemente os carcinomas de células de Hürthle foram categorizados como entidade distinta pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁵, já que apresentam comportamento clínico distinto^{12,13} e perfil genético singular^{10,14,15}.

1.1. Aspectos clínicos das neoplasias de células de Hürthle

Devido à baixa frequência dos tumores de células de Hürthle, há poucos estudos, com resultados heterogêneos acerca das suas características clínicas e ultrassonográficas.

Sexo masculino e idade avançada estão associados a maior frequência de carcinoma de células de Hürthle entre pacientes com citologias de padrão folicular com células oncocíticas¹⁶. A probabilidade de malignidade em pacientes com mais de 45 anos e lesões maiores que 1,5 cm com tal citologia

chega a 65%¹⁷. Apesar de os estudos apresentarem número limitado de pacientes, o achado de carcinoma de células de Hürthle está consistentemente associado à maior dimensão do nódulo e idade mais avançada^{13,18–22}. Quando comparados a outros carcinomas diferenciados de tireoide numa série de 3.311 pacientes, os carcinomas de células de Hürthle são mais comuns entre homens e pacientes com idade mais avançada, são maiores e apresentam estadiamento mais avançado¹².

Não há associação entre concentrações mais elevadas de TSH e carcinomas de células de Hürthle, ao contrário do descrito em carcinomas papilíferos de tireoide^{23,24}.

Algumas características ultrassonográficas são classicamente associadas a maior risco de malignidade, particularmente nos carcinomas papilíferos de tireoide, e incluem nódulos sólidos, hipoecoicos, com margens irregulares, microcalcificações, altura maior que largura e vascularização predominantemente central^{1,25–28}. Entretanto, poucos são OS estudos envolvendo as neoplasias de células de Hürthle. Alguns indicaram o tamanho do tumor acima de 1,5 cm, presença de hipoecogenicidade na ultrassonografia e idade acima de 45 anos como preditores de malignidade nas neoplasias de células de Hürthle, embora esses achados não tenham sido uniformes em todas as populações estudadas^{17,29–31}.

O diagnóstico citológico também representa um desafio, pois a maioria dos resultados são indeterminados para malignidade. O valor preditivo positivo para malignidade do achado de células de Hürthle na análise citológica varia de 15% a 45%, sendo ainda mais baixo na presença de tireoidite de Hashimoto (9,5%)^{16,19,32}.

Mesmo com o advento dos testes moleculares para auxiliar no diagnóstico de citologias Bethesda III e IV, os atualmente disponíveis não apresentam desempenho satisfatório para o diagnóstico diferencial das neoplasias de células de Hürthle^{33–38}. Um novo teste genômico traz avanços em análise de transcriptoma, sequenciamento de RNA nuclear e mitocondrial, número de cópias, perda de heterozigose e aprimoramento das ferramentas de bioinformática³⁸, enquanto a terceira versão do Thyroseq apresenta alta sensibilidade para lesões oncocíticas ao incluir análise do número de cópias³⁶.

No entanto, ambos ainda demonstram baixa especificidade nesse cenário, pois quase metade dos adenomas de células de Hürthle obtêm resultado falso-positivo^{36,38}.

Dessa forma, a diferenciação mais precisa entre carcinomas e adenomas de células de Hürthle ainda depende da identificação histopatológica de invasão da cápsula tumoral ou invasão vascular ou do diagnóstico de metástases⁵.

Os carcinomas de células de Hürthle minimamente invasivos têm demonstrado comportamento menos agressivo quando comparados aos extensamente invasivos, sem persistência ou recorrência durante o seguimento¹³. De uma forma geral, a invasão vascular extensa (\geq 4 focos) é um preditor independente de recorrência em carcinomas diferenciados de tireoide, sendo o risco de recorrência de 42% entre os casos com invasão extensa e de apenas 1% entre os pacientes com invasão vascular mínima ou ausente³⁹. Num estudo envolvendo apenas carcinomas de células de Hürthle, a invasão vascular extensa foi o preditor de recorrência mais consistente. Nenhum dos pacientes com invasão vascular mínima ou ausente apresentou recorrência em cinco anos de seguimento, enquanto os casos com \geq 4 focos de invasão vascular têm sobrevida livre de recorrência de 20% no mesmo período⁴⁰.

O tratamento dos carcinomas de células de Hürthle consiste em tireoidectomia e terapia ablativa com I¹³¹, tal como os demais carcinomas diferenciados de tireoide. Entretanto, o carcinoma de células de Hürthle apresenta habitualmente menor capacidade de concentração do I^{131 13,41,42}, o que compromete seu potencial de resposta ao tratamento adjuvante com iodo radioativo. Numa revisão de literatura incluindo 342 pacientes com carcinoma de células de Hürthle, observa-se recorrência em 31,4% dos casos e mortalidade específica de 21%, variando de 3,2% a 50% conforme o centro avaliado⁴³.

1.2 Vias de sinalização intracelular e câncer de tireoide

1.2.1. Via MAPK

As alterações moleculares que levam ao desenvolvimento do adenoma ou carcinoma de células de Hürthle ainda não são amplamente conhecidas.

Os carcinomas papilíferos são os mais extensamente avaliados até o momento e têm seu perfil molecular amplamente estudado no consórcio internacional do Atlas do Genoma do Câncer^{44–46}. As principais alterações moleculares observadas envolvem principalmente a ativação da via MAPK (Figura 4), relacionada à resposta celular a sinais de crescimento e proliferação e à falha nos mecanismos de apoptose celular. A mutação p.V600E do gene *BRAF* é a alteração genética mais frequente, presente em 30 a 80% dos casos^{47,48}.



Figura 4 – A via de sinalização intracelular MAPK. Esta via é fisiologicamente ativada pela ligação de fatores de crescimento aos receptores tirosina quinase (RTKs), como o *RET*, resultando em dimerização do receptor e ativação por autofosforilação dos resíduos de tirosina do domínio intracelular. O receptor ativado, por meio de várias proteínas adaptadoras, leva à ativação da RAS, presente na face interna da membrana plasmática. A RAS ativada se liga a proteínas RAF (principalmente a BRAF), e esta, então, fosforila e ativa MEK ("mitogen-activated protein kinase/ERK kinase"), que, por sua vez, ativa ERK ("extracellular-signal regulated kinase"). ERK se transloca ao núcleo, onde regula a transcrição de genes relacionados à diferenciação, proliferação celular e apoptose. No carcinoma diferenciado de tireoide, podem ocorrer alterações em diversos pontos desta via, por alterações nos genes *BRAF, RAS* e *RET*. Adaptado de Nikiforov, 2009⁴⁹

Outras alterações moleculares relacionadas aos carcinomas papilíferos de tireoide são as mutações ativadoras e pontuais do proto-oncogene *RAS*, que incluem as isoformas *HRAS*, *KRAS* e *NRAS*, e ocorrem em menos de 10% dos carcinomas papilíferos clássicos, mas podem estar presentes em até 43% dos casos de carcinomas papilíferos de variante folicular⁵⁰. Os rearranjos intracromossômicos *RET/PTC* 1 e 3 estão associados ao carcinoma papilífero, especialmente em população previamente exposta a radiação ionizante⁵¹.

Apesar de 80% das alterações moleculares dos carcinomas papilíferos estarem concentradas em quatro genes (*BRAF*, *NRAS*, *HRAS* e *RET*), os demais eventos genéticos estão distribuídos entre mais de 30 genes com baixa frequência de mutações, a chamada "cauda comprida"^{45,52} (Figura 5).



Figura 5 – Prevalência dos genes relacionados ao carcinoma papilífero de tireoide. Os genes *BRAF, NRAS, HRAS* e *RET* acumulam mais de 80% das mutações somáticas e fusões gênicas. As demais alterações moleculares estão distribuídas entre mais de 30 genes, na "cauda comprida". Adaptado de Riesco-Eizaguirre e colaboradora, 2016⁴⁵

Em relação aos carcinomas foliculares de tireoide, as mutações dos genes *RAS* são as mais frequentes, presentes em 22 a 49% dos casos. Estas alterações do *RAS* também são ativadoras da via de sinalização intracelular da via MAPK e são consideradas eventos precoces da tumorigênese, pois são também observadas em 23 a 48% dos adenomas foliculares. Outra alteração molecular associada ao carcinoma folicular de tireoide é o rearranjo *PAX8/PPARy*, que corresponde à translocação do domínio que se liga ao DNA

do gene *PAX8* com os domínios A-F do gene *PPARγ*. Nikiforova *et al.*⁵³ demonstram que este rearranjo está presente em cerca de 40% dos carcinomas e 4% dos adenomas foliculares.

Cabe ressaltar que, apesar de ser amplamente conhecido que as mutações de *RAS*, *BRAF* e o rearranjo *RET/PTC* são mutuamente exclusivos em carcinomas papilíferos, há evidências de coexistência dessas alterações em casos avançados e associação com pior prognóstico^{47,54}.

As mutações dos genes *RAS* são pouco frequentes nos carcinomas de células de Hürthle^{10,14,15}, enquanto os rearranjos *RET/PTC* e *PAX8/PPARγ* não foram descritos nesses carcinomas¹⁰.

Sabe-se que mutações em pontos distintos da via MAPK levam a diferentes padrões de sinalização intracelular, expressão gênica е características clínicas nos carcinomas papilíferos. A mutação p.V600E do BRAF, frequente nas variantes clássica e de células altas, gera ativação intensa da proteína BRAF em monômero, irresponsiva ao efeito de retroalimentação negativa do ERK/MAPK, o que inibe a expressão de genes envolvidos na captação e metabolismo do iodo e, consequentemente, pode levar à refratariedade ao tratamento com iodo radioativo. Por outro lado, mutações do RAS e rearranjos dos genes dos receptores tirosina quinase, como RET e NTRK, encontrados nas variantes clássica e folicular do papilífero, mantêm a susceptibilidade à retroalimentação negativa do ERK e a expressão adequada dos genes relacionados ao metabolismo do iodo, com maior avidez pelo iodo radioativo^{44,52}. Entretanto, a associação de tais alterações moleculares com pior prognóstico é controversa. Possivelmente a presença de outras alterações moleculares concomitantes à mutação de BRAF, como mutação do promotor do gene TERT ("telomerase reverse transcriptase"), seja responsável pelo pior prognóstico dos carcinomas papilíferos^{55,56}. Nos carcinomas de células de Hürthle, são descritas mutações do BRAF em apenas 7% dos casos analisados, além de 12% dos casos com hiperexpressão desse gene associada à duplicação do cromossomo 714,15, enquanto mutações do promotor do TERT ocorrem em 22% dos casos de carcinomas de células de Hürthle, predominantemente nos extensamente invasivos¹⁴.

1.2.2. Via PI3K/AKT/mTOR

A ativação anômala da via fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/AKT) apresenta um papel relevante na tumorigênese tireoidiana, especialmente em carcinomas foliculares e anaplásicos. Há diversos "drivers" ativadores desta via descritos em tumores de tireoide: mutações ou amplificação do gene *PIK3CA*, mutações do *RAS* ou *PTEN*, rearranjos *RET/PTC* ou *PAX8/PPARγ*, amplificação dos genes *PIK3CB*, *PDK1* e *AKT*, além de silenciamento epigenético do *PTEN* por metilação. O rearranjo *RET/PTC*, as mutações de *RAS* ou de genes dos receptores tirosina quinase podem ativar tanto a via PI3K/AKT como a MAPK⁵⁷.

A atuação da via PI3K/AKT em neoplasias de tireoide foi descoberta pela associação entre a Síndrome de Cowden, causada por mutações no gene *PTEN*, e adenomas e carcinomas foliculares de tireoide⁵⁸.

A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), por sua vez, modula funções celulares relacionadas ao seu crescimento e proliferação, como síntese de proteínas, nucleotídeos e lipídios, além de inibição da autofagia. A mTOR tem papel importante na carcinogênese, e pode ser ativada por AKT na sua forma fosforilada (Figura 6)^{57,59,60}.



Crescimento, proliferação celular e apoptose

Figura 6 – Esquema simplificado da via PI3K/AKT/mTOR e MAPK na carcinogênese tireoidiana. O receptor tirosina quinase (RTK) é ativado por fatores de crescimento, ou constitutivamente se houver rearranjo RET/PTC. A proteína RAS pode ativar ambas as vias, enquanto PTEN é um regulador negativo da via PI3K-AKT. AKT fosforilada ativa mTOR, outra via de sinalização intracelular com papel relevante na carcinogênese

Conforme estudo recente, mutações das vias MAPK e PIK3/AKT/mTOR são encontradas em 55% dos carcinomas de células de Hürthle, sendo que 20% dos casos apresentam no mínimo um receptor tirosina quinase mutado¹⁴. Além disso, há elevada expressão de mTOR em carcinomas de células de Hürthle¹⁰.

1.2.3. Via Notch

A via Notch é uma via altamente conservada entre as espécies e está envolvida nos processos de desenvolvimento de células embrionárias, diferenciação, proliferação celulares e apoptose. Os componentes da via Notch incluem proteínas transmembrana, e sua sinalização abrange a interação intercelular⁶¹.

O papel da via Notch na carcinogênese foi inicialmente descrito em melanomas e envolve o miR-146a^{61,62} (Figura 7). Os micro-RNAs são moléculas de RNA não-codificantes, que regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional, podendo funcionar como supressores tumorais ou oncogenes.

Estudo *in vitro* mostra que a via Notch pode ser ativada pela via MAPK, uma das mais importantes na tumorigênese tireoidiana⁶³. Este estudo envolve células de carcinomas papilíferos de tireoide e demonstra que a ativação da via MAPK por meio dos oncogenes *RET/PTC3* ou *BRAF*^{T1799A} é capaz de ativar a sinalização da via Notch. Por outro lado, o bloqueio desta via com inibidores de Σ -secretase ou RNA interferente para *NOTCH1* reduz a proliferação de células de carcinomas papilíferos⁶³.



Figura 7 – A via Notch. No melanoma, a via Notch pode contribuir para a carcinogênese por meio da desregulação da atividade de um microRNA (miR-146a). A ativação oncogênica da via MAPK, como a gerada por mutações do *BRAF* ou *NRAS*, e o fator de transcrição MYC levam à regulação positiva do miR-146a. O precursor do miR-146a, particularmente o que apresenta um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) com o alelo G na posição 40, regula negativamente a proteína NUMB, a qual quando ativada suprime a atividade da NOTCH. Portanto, quando NUMB é inibida pelo miR-146a, há aumento da atividade de NOTCH, o que leva a maior proliferação celular. Adaptado de Garraway⁶²

1.2.4. Via Wnt/β-catenina

A via Wnt/ β -catenina está envolvida no crescimento e proliferação celulares, e sua ativação constitutiva foi descrita em diversas neoplasias, como o carcinoma colorretal e de mama. A β -catenina, ativada pelo Wnt, transloca-se para o núcleo e aumenta a transcrição de proto-oncogenes. Em carcinomas de tireoide, as formas conhecidas de ativação dessa via incluem a via PI3K/AKT por meio da inativação da glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β), responsável pela degradação da β -catenina, ou por mutações ativadoras do gene codificador da β -catenina, o *CTNNB1*⁶⁴. A β -catenina apresenta papel considerável nos carcinomas pouco diferenciados e anaplásicos^{65–67}, o que indica uma potencial importância desta via na agressividade tumoral (Figura 8).



Figura 8 – A via Wnt/ β -catenina e a carcinogênese tireoidiana. Inicialmente, os receptores tirosina quinase (RTK) ativados levam à ativação da proteína RAS e, subsequentemente, da PI3K. A PI3K ativada converte a fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). A PIP3, por sua vez, ativa a proteína quinase dependente de fosfoinositídeos-1 (PDK1), que se liga à AKT, levando à sua fosforilação (P) e ativação. A AKT fosforilada entra no núcleo, onde induz a expressão de oncogenes, e no citoplasma ativa outras vias de sinalização, como a via Wnt/ β -catenina. A AKT fosforilada inativa a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β). A GSK3 β normalmente inibe a β -catenina, ou seja, a AKT ativada retira o efeito supressor da GSK3 β sobre a β -catenina, permitindo que esta entre no núcleo e promova a expressão de oncogenes. Adaptado de Xing⁶⁸

1.3. Alterações moleculares específicas dos carcinomas de células de Hürthle

Os carcinomas de células de Hürthle apresentam carga mutacional elevada de 2,6/Mb, especialmente se comparados aos carcinomas papilíferos de tireoide, com apenas 0,41/Mb^{14,15}.

Alterações cromossômicas têm se mostrado evento recorrente nos carcinomas de células de Hürthle. Corver et al.69 demonstram haploidização quase completa do genoma, com retenção ou endorreduplicação do cromossomo 7. A hipótese aventada pelos autores é de que a produção deficiente de energia pelas mitocôndrias nos carcinomas de Hürthle leva a uma segregação mitótica desbalanceada, o que acaba gerando a haploidização da célula após vários ciclos de divisão celular. Como células haploides necessitam de menor quantidade de energia, teriam vantagem na sua replicação e seriam selecionadas à medida que o tumor progredisse. Análises genômicas mais recentes corroboram a relevância das alterações cromossômicas nos carcinomas de células de Hürthle. Ganly et al.¹⁴ observam que carcinomas extensamente invasivos são em sua maioria polissômicos com duplicação universal do cromossomo 7 e, ocasionalmente, apresentam também duplicação dos cromossomos 5 e 12. Os demais cromossomos apresentam-se haploides ou com dissomia uniparental¹⁴. Gopal et al.¹⁵, por sua vez, caracterizam três padrões de distribuição de ploidia entre os carcinomas de células de Hürthle: 1) haploidia quase total, 2) ploidia silenciosa, incluindo tumores diploides, e 3) ploidia complexa, podendo apresentar duplicação de todo o genoma. Esse estudo associa a ampla perda de heterozigose com pior prognóstico, sendo esta forte preditora de recorrências e metástases à distância¹⁵.

Como as células de Hürthle são ricas em mitocôndrias, parte dos estudos investigam alterações de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial. Em casos familiares de tumores oncocíticos de tireoide, há um *locus* predisponente ao carcinoma de células de Hürthle no cromossomo 19p13.2, o TCO ("Thyroid tumour with Cell Oxyphilia")⁷⁰, região cromossômica que compreende diversos genes envolvidos com o metabolismo mitocondrial. Bonora *et al.*⁷¹ estudam sangue periférico de oito famílias com tumores oncocíticos de tireoide e identificam variantes germinativas no gene do

transportador de membrana mitocondrial, *TIMM44*. Além disso, mutações do gene *NDUFA13* (previamente chamado de *GRIM19*), localizado no locus TCO, também são identificadas em 15% dos carcinomas esporádicos de células de Hürthle⁷².

Mutações de DNA mitocondrial também são relacionadas à tumorigênese de neoplasias de células de Hürthle. Gasparre et al.73 identificam mutações em genes de subunidades do complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial nos tumores oncocíticos. Os estudos de análise genômica integrada de carcinomas de células de Hürthle incluem exoma. sequenciamento de DNA mitocondrial e análise da variação do número de cópias, entre outras técnicas, e evidenciam frequentes mutações de DNA mitocondrial envolvendo subunidades do complexo I, mas sem relação com agressividade dos carcinomas. Entretanto, mutações de DNA mitocondrial também são observadas em adenomas, sugerindo que eventos adicionais seriam necessários para a progressão tumoral^{14,15}.

No que se refere a alterações do DNA genômico, os carcinomas de células de Hürthle apresentam heterogeneidade de genes mutados. Estudo do exoma de dois casos de carcinoma de células de Hürthle identifica mutações do gene *MEN1*, com perda de função associada a perda de heterozigose. A análise subsequente de outros 72 carcinomas demonstra mutações deste gene em 4% dos casos. Nenhum desses pacientes apresenta quadro clínico de neoplasia endócrina múltipla tipo 1⁷⁴. Mutações recorrentes em genes das vias MAPK e PI3K-AKT-mTOR, vias de dano/reparo do DNA e vias relacionadas a modificações epigenéticas são descritas em estudos de análise exômica, com maior frequência de mutações dos seguintes genes: *ERBB2* (11%), *NRAS* (9%), *TP53* (12%), *ATM* (10%), *CDKN1A* (7%) e *KMT2D* (7%)^{14,15}. Observa-se também maior frequência de mutações na região promotora de *TERT* (22 a 27%), mutações de *DAXX*, que é um gene relacionado a alongamento telomérico (17%), e outros genes, como *NF1* (17%) e *EIF1AX* (11%)^{14,15}.

Finalmente, a análise de expressão gênica de carcinomas de células de Hürthle demonstra perfil transcricional distinto nos carcinomas extensamente invasivos quando comparados com adenomas e carcinomas minimamente
invasivos, destacando-se a ativação das vias PI3K-AKT-mTOR e Wnt/βcatenina¹⁰.

A heterogeneidade de achados e o conhecimento limitado de potenciais mutações "driver" e do envolvimento de vias de sinalização intracelular nos carcinomas de células de Hürthle requer estudo molecular mais detalhado. Ampliar o entendimento sobre as mutações relacionadas ao carcinoma de células de Hürthle poderia não somente otimizar o diagnóstico pré-operatório de nódulos de tireoide com citologia indeterminada, como também permitir a identificação dos casos mais agressivos e auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas visando alvos moleculares específicos nos carcinomas de células de Hürthle refratários a iodoterapia.

1.4. Sequenciamento paralelo em larga escala

O sequenciamento paralelo em larga escala permite sequenciar simultaneamente milhões de fragmentos de DNA e tem auxiliado na compreensão do perfil genético de diversos tumores, inclusive de tireoide^{45,52}. Dada a complexidade e heterogeneidade da carcinogênese, o sequenciamento em larga escala se mostra particularmente útil, pois tem potencial de identificar qualquer mutação somática dentro do painel, independentemente da frequência alélica, desde que atinja a cobertura adequada. Diversas alterações genéticas podem ser avaliadas.

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo foram:

- Caracterizar clinicamente os pacientes com carcinomas de células de Hürthle da tireoide;
- Identificar alterações de genes relacionados à tumorigênese dos carcinomas de células de Hürthle por meio de painel de sequenciamento paralelo em larga escala;
- Relacionar as alterações moleculares identificadas com características clínicas, histológicas e desfechos dos pacientes com carcinomas de células de Hürthle.

3. Materiais e métodos

3.1. Seleção de pacientes

Foram selecionados retrospectivamente casos de carcinomas e adenomas de células de Hürthle submetidos a tireoidectomia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo no período de 1998 a 2017. Os dados clínicos, laboratoriais, ultrassonográficos, citológicos e histopatológicos foram avaliados por meio de revisão de prontuários, quando disponíveis.

O material tumoral conservado em parafina de nove casos externos de neoplasias de células de Hürthle foi obtido com a colaboração do Hospital Alemão Oswaldo Cruz de São Paulo e da Universidade Federal de Sergipe.

3.1.1. Considerações éticas

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos e orientações contidas na declaração de Helsinki e segundo os termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAAE nº 57784616.0.0000.0065, parecer da Plataforma Brasil nº 1.856.535). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado nos pacientes ainda em tratamento no nosso serviço (Anexo A). Como se tratava de pesquisa retrospectiva envolvendo levantamento de prontuários e amostras parafinadas, de acordo com o capítulo IV.8 da resolução 466/12, o TCLE foi dispensado nas seguintes circunstâncias: óbito do paciente, indivíduos que não acompanhavam mais em nosso serviço ou com cadastro desatualizado, impossibilitando sua localização.

As informações foram apresentadas de forma coletiva, sem qualquer prejuízo para os indivíduos envolvidos, especialmente no que diz respeito à

menção de nomes dos pacientes envolvidos. A confidencialidade dos resultados obtidos foi garantida a todos os pacientes envolvidos neste estudo.

Essa pesquisa foi desenvolvida com o apoio dos recursos financeiros da FAPESP (processo 2015/14819-7).

3.2. Avaliação clínica, ultrassonográfica, citológica e histopatológica dos tumores de células de Hürthle

Os seguintes dados foram avaliados nos casos de carcinomas e adenomas de células de Hürthle:

- Sexo;
- Idade ao diagnóstico;
- Função tireoidiana e anticorpos antitireoidianos pré-operatórios;
- Características ultrassonográficas pré-operatórias;
- Tamanho do tumor no exame anatomopatológico.

Nos casos de carcinoma de células de Hürthle, foram levantadas as características abaixo:

- Tipo de cirurgia;
- Multicentricidade;
- Extensão da invasão da cápsula tumoral;
- Presença de invasão vascular e/ou linfática;
- Presença de extensão extratireoidiana;
- Coexistência de outros carcinomas ou nódulos coloides;
- Dosagem de tireoglobulina e anticorpo antitireoglublina pósoperatórios;
- Estadiamento segundo a "American Joint Committee on Cancer" (AJCC)/TNM (8ª edição)⁷⁵;
- Risco de recorrência segundo a "American Thyroid Association" (ATA)¹;
- Presença de metástases linfonodais ou à distância ao diagnóstico e durante o seguimento;

- Tratamento com I¹³¹;
- Resultado da pesquisa de corpo inteiro após iodoterapia;
- Resposta ao tratamento de acordo com a classificação da ATA¹.

As concentrações séricas de TSH foram determinadas por ensaios comerciais de fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) até 2012, e eletroquimioluminescência (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) a partir de então. Os valores séricos de anti-TPO e antitireoglobulina foram obtidos por ensaios comerciais de fluoroimunoensaio indireto (AutoDELFIA ®, Upsala, Turku. Finlândia) até 2012. е quimioluminescência (Access, Beckman Coulter, Fullerton, EUA) a partir de então. A dosagem da tireoglobulina sérica foi realizada por ensaio imunoquimioluminométrico DC até 2012 e imunoquimioluminométrico DX a partir de então.

Imagens de ultrassonografia de tireoide no modo-B pré-operatórias estavam disponíveis em 53 casos (24 carcinomas e 29 adenomas de células de Hürthle), enquanto imagens do estudo de Doppler em 39 casos. Dois radiologistas experientes realizaram uma revisão simples-cego das imagens, e, no caso de discordância, um terceiro radiologista as revisou. As seguintes características foram avaliadas: tamanho, ecogenicidade, aspecto sólido e/ou cístico, calcificações, contornos, presença de halo hipoecoico periférico, padrão de vascularização e presença de outros nódulos ou linfonodos atípicos. As dimensões do nódulo foram aferidas, a fim de avaliar se a altura era maior que a largura. A ecogenicidade do nódulo foi determinada pela comparação com o parênguima tireoidiano normal. As margens foram classificadas como regulares ou irregulares. Microcalcificações foram definidas como focos hiperecóicos, de até 1 mm sem sombra acústica, enquanto as macrocalcificações como focos > 1 mm com sombra acústica posterior⁷⁶. O padrão de vascularização foi definido como periférico, se houvesse predomínio de vascularização perinodular, ou central, caso predominasse vascularização intranodular. Analisamos o desempenho diagnóstico das seguintes características ultrassonográficas suspeitas: hipoecogenicidade, aspecto sólido, contornos irregulares, ausência de halo hipoecoico, micro ou macrocalcificações, altura > largura e

vascularização central. Além disso, os nódulos foram classificados de acordo com o "Thyroid Imaging, Reporting and Data System" (TI-RADS)⁷⁷. Dessa forma, também foi avaliado o desempenho diagnóstico das categorias TI-RADS 4 e 5, que correspondem a nódulos de moderada a alta suspeição.

Foram levantados os resultados da citologia aspirativa dos carcinomas e adenomas de células de Hürthle. Em casos com punção de mais de um nódulo, foi selecionada a análise citológica da lesão correspondente à neoplasia de células de Hürthle no exame anatomopatológico. Como a avaliação foi baseada em informações de prontuário, classificamos os casos de acordo com os padrões descritos nos relatórios citológicos: bócio adenomatoso, padrão folicular e padrão folicular com células de Hürthle. O sistema Bethesda não foi utilizado nos laudos.

Os carcinomas foram classificados conforme dois sistemas. O estadiamento segundo a AJCC em sua 8^a edição, que permite estimar a sobrevida dos pacientes com carcinoma diferenciado de tireoide, e se baseia no sistema TNM (Tabela 1)⁷⁵ e a classificação da ATA, que prediz o risco tanto de recorrência como de persistência do carcinoma diferenciado de tireoide¹. Como a estratificação de risco da ATA não diferencia carcinomas de células de Hürthle, optamos por seguir os parâmetros apresentados para os carcinomas foliculares (Tabela 2).

Tabela 1 – Classificação TNM do carcinoma diferenciado de tireoide de acordo com AJCC, 8ª edição

	Definição
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor intratireoidiano ≤ 2 cm no maior diâmetro
	T1a : tumor intratireoidiano ≤ 1 cm no maior diâmetro
	T1b : tumor intratireoidiano > 1 cm $e \le 2$ cm no maior diâmetro
T2	Tumor intratireoidiano > 2 cm e ≤ 4 cm no maior diâmetro
Т3	T3a: tumor intratireoidiano > 4 cm no maior diâmetro
	T3b : tumor de qualquer tamanho com extensão extratireoidiana grosseira invadindo apenas músculos cervicais (esternohioideo, esternotireoideo, tirohioideo e omoioideo)
Т4	T4a: tumor de qualquer tamanho com extensão extratireoidiana grosseira invadindo
	tecido subcutâneo, laringe, traqueia, esôfago ou nervo laríngeo recorrente
	T4b: tumor de qualquer tamanho com extensão extratireoidiana grosseira invadindo
	fáscia pré-vertebral ou envolvendo artéria carótida ou vasos mediastinais

Tabela 1 – Classificação TNM do carcinoma diferenciado de tireoide de acordo com AJCC, 8ª edição

N0	Sem metástases linfonodais regionais								
	N0a: um ou mais li	nfonodos benignos confirmados p	ela citologia ou histopatologia						
	N0b: sem evidência	a clínica ou radiológica de metást	ases linfonodais locorregionais						
N1	Metástases em linfonodos regionais								
	N1a: Metástases em níveis VI ou VII (pré-traqueal, paratraqueal, pré-laríngeo ou								
	mediastinal superior). Uni ou bilateral								
	N1b: Metástases e	m níveis I, II, III, IV, V ou retro-far	ngeo. Uni, bi ou contralateral						
MO	Sem metástase	s à distância							
M1	Presença de me	tástases à distância							
Pacientes < 55 anos ao diagnóstico									
I I	Qualquer T	Qualquer N	MO						
Ш	Qualquer T Qualquer N M1								
Pacientes ≥ 55 anos ao diagnóstico									
1	T1	N0/NX	MO						
	T2 N0/NX M0								
II	T1 N1 M0								
	T2 N1 M0								
	T3a/T3b Qualquer N M0								
III	T4a	Qualquer N	MO						
IVA	T4b	Qualquer N	MO						
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1						

Adaptado de Tuttle e colaboradores⁷⁵

A classificação como mínima ou extensamente invasivo dos carcinomas de células de Hürthle foi revista por patologista experiente. Consideraram-se minimamente invasivos os tumores encapsulados com focos microscópicos de invasão capsular ou com menos de quatro focos de invasão vascular e como extensamente invasivos, os carcinomas com quatro focos ou mais de invasão vascular, invasão extensa da cápsula tumoral ou invasão extratireoidiana.

Risco	Definição						
Baixo	Carcinoma intratireoidiano com invasão capsular e menos de quatro focos de invasão vascular						
Intermediário Invasão microscópica de tecidos peritireoidianos							
	Captação de I ¹³¹ fora do leito tireoidiano						
	N1 clinicamente manifesto ou mais de cinco						
	linfonodos < 3 cm acometidos à histopatologia						
Alto	Carcinoma com extensa invasão vascular (mais de						
	quatro focos de invasão vascular)						
	Invasão macroscópica de tecidos peritireoidianos						
	Ressecção incompleta						
	Metástases à distância						
	Tireoglobulina pós-operatória sugestiva de						
	metástases à distância						
	N1 com linfonodo metastático > 3 cm						

Tabela 2 – Estratificação de risco dos carcinomas de células de Hürthle baseada nas diretrizes da ATA

Adaptado de Haugen e colaboradores¹

A avaliação da resposta ao tratamento também foi baseada nos critérios estabelecidos pela ATA¹ (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação	da	resposta	ao	tratamento	do	carcinoma	diferenciado	de
tireoide segundo a ATA								

Resposta	Definição
Excelente	Imagem negativa e
	Tireoglobulina (Tg) sob supressão < 0,2 ng/mL <i>ou</i>
	Tg estimulada < 1,0 ng/mL
Indeterminada	Achados radiológicos inespecíficos
	Captação tênue no leito tireoidiano na pesquisa de
	corpo inteiro com I ¹³¹
	Tg sob supressão detectável, mas < 1 ng/mL
	Tg estimulada detectável, mas < 10 ng/mL <i>ou</i>
	Anticorpo antitireoglobulina estável ou em queda
Bioquímica	Imagem negativa e
incompleta	Tg sob supressão ≥ 1,0 ng/mL <i>ou</i>
	Tg estimulada ≥ 10 ng/mL <i>ou</i>
	Anticorpo antitireoglobulina em ascensão
Estrutural incompleta	Evidência de doença estrutural

Adaptado de Haugen e colaboradores¹

Relacionamos as seguintes características clínico-patológicas com perfil mutacional: grau de invasão (mínima ou extensamente invasivo), metástases linfonodais ou à distância no diagnóstico e seguimento, recorrência e/ou persistência de doença e resposta ao tratamento (excelente/indeterminada ou bioquímica/estrutural incompleta) no primeiro ano e na última avaliação ambulatorial.

3.3. Sequenciamento paralelo em larga escala

De maneira simplificada, esta técnica consiste em quatro etapas principais (Figura 9):

- Preparo da biblioteca: o DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a sequências adaptadoras nas extremidades 5' e 3' (Figura 9A);
- Geração de "clusters" (clones): cada fragmento de DNA ligado é amplificado em agrupamentos distintos por ligação em ponte (Figura 9B);
- Sequenciamento: as bases são incorporadas sequencialmente e imagens são obtidas a partir da emissão de fluorescência de cada base incorporada (Figura 9C);
- Alinhamento e análise de dados: os fragmentos amplificados são alinhados a uma sequência de referência por "software" de bioinformática. A partir deste alinhamento, são identificadas as diferenças em relação ao genoma de referência (Figura 9D) e se utilizam ferramentas de bioinformática para processar, mapear, alinhar e analisar os dados⁷⁸.



Figura 9 – Esquema das quatro etapas envolvidas no sequenciamento paralelo em larga escala. A) preparo da biblioteca: a biblioteca é preparada por meio da fragmentação do DNA genômico e ligação dos adaptadores específicos para cada amostra em ambos os lados dos fragmentos. B) geração de clones: a biblioteca é depositada sobre a "flowcell", e os fragmentos são hibridizados em sua superfície. Cada fragmento é clonado por meio da amplificação em ponte. C) sequenciamento: reagentes de sequenciamento, inclusive nucleotídeos marcados com fluorescência, são adicionados, e a primeira base incorporada. A emissão da fluorescência de cada base incorporada em cada clone na "flowcell" é captada. O comprimento de onda emitido e sua intensidade são usados para identificar a base. Este ciclo é repetido "n" vezes para gerar a leitura de "n" bases. D) alinhamento e análise de dados: fragmentos amplificados são alinhados de acordo com uma sequência de referência por meio de "software" de bioinformática. Após o alinhamento, as diferenças entre o genoma de referência e os fragmentos amplificados recém-sequenciados podem ser identificadas. Adaptado de Illumina Inc.⁷⁹

3.3.1. Extração do DNA genômico de amostras conservadas em parafina

A partir de amostras de tumores conservados em parafina, realizamos a extração de DNA bem-sucedida de 40 carcinomas e 10 adenomas de células de Hürthle. Foram obtidas quatro secções de 10 µm dos tumores e de seus respectivos tecidos tireoidianos normais, que foram armazenadas separadamente em microtubos de 1,5 mL. A extração do DNA genômico foi realizada por meio do kit "QIAamp® DNA FFPE Tissue" (Qiagen, Düsseldorf, Alemanha) no Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM 25) da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

No processo de extração, foi adicionado 1 mL de xilol em cada microtubo contendo os cortes de material parafinado, seguido por agitação em vórtex por 15 segundos. Realizou-se a centrifugação em velocidade máxima por dois minutos em temperatura ambiente (15 a 25°C) e, posteriormente, foi retirado o sobrenadante. Foi misturado 1 mL de etanol absoluto ao precipitado e realizada a agitação em vórtex, a fim de extrair o xilol residual. Após centrifugação em velocidade máxima por dois minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante e o etanol residual foram removidos. Os microtubos abertos foram mantidos a 37°C por 10 minutos ou até todo o etanol evaporar. O precipitado foi ressuspendido com 200 µL de solução-tampão ATL e 25 µL de proteinase K, seguido por agitação em vórtex. Os microtubos foram incubados a 56°C durante a noite com agitação em banho-maria. Foi realizada centrifugação para retirar as gotículas da tampa, e em seguida incubação a 90°C em termobloco por uma hora, com o objetivo de reverter parcialmente as modificações causadas pelo formol nos ácidos nucleicos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução-tampão AL e 200 µL de etanol absoluto, agitando em vórtex e centrifugando por dois minutos após. Um volume de 700 µL do conteúdo do microtubo foi cuidadosamente transferido para a coluna de eluição ("QIAamp MinElute column") sem tocar as bordas do tubo e, então, centrifugado a 9.000 rpm por um minuto e, em seguida, o volume presente no tubo coletor foi desprezado. O tubo coletor foi desprezado e substituído por um novo. Este processo de centrifugação e descarte do tubo coletor e seu conteúdo foi repetido mais duas vezes após adição de 500 µL de soluçãotampão AW2 em cada. As amostras foram, então, centrifugadas por quatro minutos a 14.000 rpm e transferidas para novos microtubos, onde foram adicionados 40 µL de solução-tampão ATE, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente, e realizou-se a centrifugação por quatro minutos a 14.000 rpm. As amostras finais foram armazenadas a -20°C.

3.3.2. Análise quantitativa e qualitativa do DNA extraído

A análise quantitativa do DNA extraído foi realizada com o "Qubit® dsDNA High Sensitivity assay" (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Este ensaio apresenta alta sensibilidade para fita dupla de DNA e sua acurácia se mantém ao analisar concentrações baixas de amostras extraídas de material parafinado (10 pg/µL a 100 ng/µL). Para sua execução, foram misturados 1 a 20 µL da amostra de DNA extraído com o reagente concentrado do ensaio e a solução-tampão de diluição. Em seguida, a leitura foi gerada pelo fluorômetro Qubit®. Os contaminantes comuns em amostras provenientes de parafina, como sais, nucleotídeos livres, solventes, detergentes e proteínas, são bem tolerados por este kit.

As amostras que, após quantificação pelo Qubit®, obtiveram massa de DNA mínima de 10 ng foram consideradas elegíveis para a próxima etapa de análise de qualidade realizada com o kit Agilent NGS FFPE QC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

Como o DNA obtido a partir de tecidos parafinados geralmente é fragmentado, com ligações cruzadas com proteínas e alta proporção de DNA de fita simples, pode ocorrer dificuldade no preparo da biblioteca relacionada a processos de ligação dos adaptadores e amplificação. Dessa forma, após a quantificação pelo Qubit®, fez-se necessário avaliar a qualidade funcional do DNA extraído por meio do kit Agilent NGS FFPE QC antes deste preparo. Este kit utiliza reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) para avaliar a integridade do DNA e quantificar com acurácia os fragmentos amplificáveis, determinando modificações necessárias no protocolo de preparo da biblioteca.

A qPCR avalia o parâmetro Cq (ciclo limiar), que representa a quantidade de ciclos de amplificação necessários para gerar um sinal fluorescente pré-definido. A partir do Cq, a quantidade de DNA amplificado é estimada, baseando-se numa curva padrão gerada a partir de concentrações conhecidas de DNA. O valor de Cq é inversamente proporcional à concentração de DNA amplificado. Amostras de DNA fragmentado extraído de material parafinado e de DNA intacto de referência são amplificadas utilizando dois tipos de "primers": "Primer Set" A, que produz "amplicons" com 48 pares de bases, e "Primer Set" B, que gera "amplicons" com 123 pares de bases do mesmo locus. Em seguida, a diferença do Cq (Δ Cq) determinada pelo "Primer Set" A e B nas amostras (Δ Cq_{amostra} = Cq_B – Cq_A) e na referência (Δ Cq_{referência} = Cq_B – Cq_A) é registrada. O escore normatizado de integridade do DNA (Δ ACq) para cada amostra de DNA extraído é calculado subtraindo o valor de Δ Cq da amostra do valor da referência: Δ ACq = Δ Cq_{amostra} - Δ Cq_{referência}.

O volume necessário de cada amostra para o preparo da biblioteca pelo SureSelectXT HS (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) depende do $\Delta\Delta$ Cq. Amostras com $\Delta\Delta$ Cq \leq 1 devem ser manejadas como amostras nãoparafinadas, utilizando a concentração encontrada no Qubit para calcular o volume necessário. Amostras com $\Delta\Delta$ Cq > 1 devem ter seu volume definido de acordo com a quantificação do qPCR e exigem aumento do produto de sequenciamento. Por exemplo, caso o produto necessário gerado pelo sequenciamento de DNA intacto para obter determinada cobertura seja 100 Mb, uma amostra proveniente de DNA fragmentado extraído de material conservado em parafina com $\Delta\Delta$ Cq de 2,5 requer um produto de sequenciamento de 300 Mb (aumento de 3x em relação à demanda basal do DNA intacto) para atingir a mesma cobertura. A maior parte das nossas amostras apresentou $\Delta\Delta$ Cq menor que 2,0. As amostras reprovadas nessa fase de análise qualitativa pela ausência de amplificação no qPCR apresentavam massa > 10 ng, então supomos que o resultado desfavorável dessas amostras estava relacionado a outros fatores que comprometeram mais acentuadamente a qualidade do DNA desses casos, como a conservação em parafina ou a possível fixação em formol inadequada após a retirada cirúrgica da peça (Tabela 4).

Após essas análises quantitativa e qualitativa do DNA extraído, 43 casos de carcinomas de células de Hürthle pareados com seus tecidos normais e 10 adenomas não-pareados foram elegíveis para a fase de preparo das bibliotecas para o sequenciamento, atingindo o máximo de 96 amostras comportadas pela "flowcell".

Tabela 4 – Aumento recomendado do produto do sequenciamento para amostras de DNA extraídas de material conservado em parafina de acordo com o valor de $\Delta\Delta$ Cq obtido pela qPCR

ΔΔCq	Recomendação quanto ao produto do sequenciamento
<0,5	Sem indicação de sequenciamento extra
0,5 a 2	Aumento de 1,5 a 2 vezes
Entre 2 e 3,5	Aumento de 3 vezes
Entre 3,5 e 5	Aumento de 4 a 5 vezes
> 5	Aumento de 6 a 10 vezes
Ausência de	Exclusão do socuenciamento
amplificação	

Adaptado de Illumina Inc⁷⁹

3.3.3. Preparo das bibliotecas

O protocolo "SureSelect XT HS Target Enrichment System" (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) foi utilizado para o preparo das bibliotecas. Para cada amostra de DNA sequenciada, uma respectiva biblioteca foi preparada. Inicialmente, uma quantidade de 10 ng de DNA foi segmentado mecanicamente por ultra-sonicação pelo equipamento Covaris (Covaris Inc, Woburn, MA, EUA), gerando fragmentos de 150 a 200 pb. As etapas seguintes foram realizadas em termociclador (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Foi realizado o reparo das extremidades dos fragmentos de DNA e adenilação das extremidades 3', possibilitando a ligação dos adaptadores, que são oligonucleotídeos complementares às sequências presentes na superfície da "flowcell" (superfície de sequenciamento). Os adaptadores foram, então, incorporados a cada extremidade dos fragmentos e, em seguida, os índexes (sequências específicas de 8 pb adicionadas a todos os fragmentos de uma determinada amostra a fim de identificá-la dentro do "pool" de amostras sequenciadas) foram adicionados.

Em seguida, foi realizada a etapa de hibridização e captura, em que foram adicionadas as sondas biotiniladas complementares dos genes selecionados para o painel aos fragmentos de DNA das amostras. A captura das regiões de interesse hibridizadas ocorreu por meio da ligação entre a sonda biotinilada e a estreptavidina acoplada a "beads" (grânulos) magnéticos.

A análise qualitativa do DNA das bibliotecas foi realizada no equipamento TapeStation 2200, com o kit D1000 Screen Tape System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A quantificação de cada biblioteca isoladamente foi obtida por qPCR, utilizando o Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

As bibliotecas foram então normalizadas e organizadas em "pools", para que apresentassem concentrações equimolares antes de serem sequenciadas. Os cálculos envolvidos nesta etapa consideraram as concentrações encontradas no qPCR e o tamanho final das bibliotecas.

3.3.4. Painel e sequenciamento

Para a construção do painel para sequenciamento, foram selecionados 97 genes de vias de sinalização intracelular ativadas nos carcinomas de células de Hürthle e de vias relacionadas a outros carcinomas diferenciados de tireoide, incluindo genes ativadores e repressores já estudados em outros tipos de neoplasias, além de genes relacionados à função das células foliculares tireoidianas (Quadro 1).

O sequenciamento foi realizado no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) em sequenciador NextSeq (Illumina Inc, San Diego, CA, EUA), que faz parte da Rede PREMiUM da FMUSP e foi financiado com recursos de Equipamentos Multiusuários da FAPESP (processo 2014/50137-5). Os "pools" equimolares das amostras foram inseridos para o sequenciamento. Os oligonucleotídeos complementares da superfície de sequenciamento ("flowcell") se ligaram aos adaptadores das extremidades dos fragmentos de DNA. Em seguida, estes fragmentos foram amplificados por meio de PCR, sendo que no primeiro ciclo de amplificação em fase sólida, o adaptador da extremidade livre do fragmento encontrou seu oligonucleotídeo complementar na "flowcell", formando uma estrutura em ponte, dando início à amplificação. A cada ciclo, a reação de PCR foi iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como "primer". Cada fragmento de DNA ligado foi amplificado em ponte diversas vezes por PCR. Ao final desta etapa, foram gerados clones ("clusters") de fragmentos de DNA idênticos ao original, ligados covalentemente à superfície da "flowcell".

Quadro 1 – Lista dos genes selecionados para o painel de sequenciamento em
larga escala dos carcinomas e adenomas de células de Hürthle e respectivas
vias de sinalização intracelular

Via MAPK		Via PI3K-AKT- mTOR		Via Notch	Via Wnt/β-catenina		Outras vias
ALK	MAP2K1	AGAP2	PIK3R4	FBXW7	AMER1	FZD1	DICER1
BRAF	MAP2K2	AKT1	PIK3R5	MIR146A	APC	GNAS	KEAP1
CCDC6	MAPK1	AKT2	PTEN	MYC	AXIN1	GSK3β	MEN1
EGFR	МАРКЗ	FOXO1	RHEB	NOTCH1	AXIN2	HNF1A	NDUFA13
EML4	MET	INPP5D	RICTOR	NOTCH2	CCND1	JAK2	(GRIM19)
ERBB2	NCOA4	IRS1	SRC	NUMB	CDK4	LRP5	SLC5A5
ETV6	NRAS	IRS2	STK11		CKla	LRP6	Promotor TERT
FGFR1	NTRK1	IRS4	TSC1		CSNK1D	PPP2R1A	TIMM44
FGFR2	NTRK3	MTOR	TSC2		CSNK1E	RNF43	TP53
FGFR3	PAX8	NFKB1			CTNNB1	SFRP1	TRIM62
FLT3	PDGFRA	PDPK1			CYLD	TCF4	(DEAR1)
FLT4	PDGFRB	PIK3CA			DKK1	ZNRF3	TSHR
HRAS	PPARG	PIK3CG			DVL1		TWIST1
KDR	RET	PIK3R1			DVL2		
KIT	ROS1				FAT1		
KRAS					FLCN		

Em seguida, nucleotídeos marcados com fluoróforos foram adicionados, e as bases incorporadas sequencialmente, gerando imagens de toda a superfície da "flowcell". Os comprimentos de onda são específicos para cada fluoróforo e foram captados por um leitor de fluorescência à medida que cada base foi incorporada. Os comprimentos de onda e a intensidade da emissão foram utilizados para identificar cada base. As sequências de bases dos "clusters" aderidos à superfície da "flowcell" foram, então, identificadas e mapeadas.

Após finalização dessa leitura, esses primeiros fragmentos sequenciados foram removidos, e a outra extremidade do fragmento se ligou à "flowcell", possibilitando o sequenciamento do mesmo fragmento no sentido reverso (segundo "read") seguindo todas as fases supracitadas, a fim de esclarecer possíveis alinhamentos ambíguos. Este processo configura o sequenciamento "paired-end".

Os dados gerados pelo sequenciamento foram transferidos e armazenados na plataforma virtual "BaseSpace" da Illumina.

3.4. Bioinformática

O sequenciamento em larga escala produz uma vasta quantidade de dados, que são processados por uma cadeia de programas ("pipelines"), a fim de identificar a patogenicidade das variantes encontradas. Para tanto, contamos com ferramentas de bioinformática que permitiram essa análise a partir dos dados armazenados no "BaseSpace". As análises de bioinformática descritas a seguir foram realizadas com o apoio e orientação do pesquisador colaborador Dr. Antonio Lerário da Universidade de Michigan.

Inicialmente, foi realizada desmultiplexagem, que consiste na separação das sequências de cada paciente dentro dos "pools" de sequenciamento, baseando-se na sequência dos índexes. Em seguida, os dados brutos do sequenciamento (arquivos FASTQ) foram alinhados à versão hg19+decoy do genoma humano por meio do "software Burrows-Wheeler Aligner" (BWA)⁸⁰. Foi analisada a qualidade do realinhamento e recalibragem em torno dos indels

usando o "Genome Analysis Toolkit" (GATK) (versão 3.2.2, broadinstitute.org/gatk). O programa FastQC (<u>https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</u>) foi utilizado para verificação da qualidade das bibliotecas.

A cobertura do sequenciamento equivale à quantidade de vezes que cada base foi sequenciada. O "software" Qualimap⁸¹ analisou essa cobertura, enquanto o NGSCheckMate⁸², o pareamento das amostras (tumor/normal).

O "software" biobambam2 (ferramenta bamsort) ordenou as sequências de acordo com as coordenadas genômicas, ou seja, a localização desde a primeira base do cromossomo 1 até a última base do cromossomo X ou Y, comprimindo os dados em arquivos do formato BAM. Estes arquivos armazenaram informações de onde cada fragmento se encaixava no genoma, além de "mismatches" e pequenas deleções ou inserções.

A etapa de chamada das variantes ("variant call") caracterizou as variantes encontradas. Os dados foram armazenados em um arquivo VCF para cada amostra, contendo todas as variantes identificadas e suas respectivas posições, além de uma série de dados estatísticos a respeito de cada variante. O "software" ANNOVAR gerou, a partir desses arquivos, tabelas com informações a respeito das variantes detectadas (se intrônicas ou exônicas, qual a troca de aminoácido encontrada), além de outros dados, como frequência da variante na população, predição de patogenicidade e presença em bancos de dados clínicos de tumores⁸³. Para seleção das variantes somáticas, utilizamos três "softwares": Lofreq, MuTect e Lancet, que identificam essas alterações por meio de filtros estatísticos que distinguem mutações reais de artefatos^{78,84-86}. Foram selecionadas as mutações de ponto, inserções ou deleções que foram chamadas por dois ou três desses softwares, a fim de eliminar os artefatos. Todas as alterações selecionadas foram visualizadas e revisadas manualmente utilizando o Integrative Genomics Viewer (IGV), e foram consideradas válidas aquelas com frequência alélica ≥ 5% e com frequência no 1.000 Genomes $< 0.5\%^{87}$.

Além disso, utilizamos o "software" Pisces, que realiza chamada de variantes nos tumores sem pareamento com tecido normal. Foram pesquisadas nos adenomas as mutações dos seguintes genes: *FAT1, APC, KRAS, HRAS, NRAS, BRAF,* promotor do *TERT, TP53, PTEN, MEN1* e *TSHR*. Para tanto, buscamos tanto as mutações encontradas em nossa própria análise pareada como também as previamente descritas como "drivers".

A cobertura média obtida em nossas amostras foi de 1.111 x. Selecionamos as amostras tumorais com cobertura maior que 50 x (n=36). Entretanto, por se tratar de neoplasia rara e pela dificuldade inerente à extração de DNA armazenado em parafina, foram mantidas quatro amostras de carcinomas com cobertura < 50 x que apresentaram mutações identificadas por dois programas de chamadas de variantes, incluindo uma mutação conhecida de *NRAS*. Excluímos três amostras de carcinomas com cobertura muito baixa (< 10 x) que não apresentaram mutações no sequenciamento, sendo todos estes casos extensamente invasivos, um deles com metástases linfonodais e outro com metástases linfonodais e à distância que evoluiu a óbito pela neoplasia.

As alterações selecionadas foram classificadas de acordo com sua patogenicidade nas seguintes categorias: 1) mutações "drivers" conhecidas e descritas em carcinomas diferenciados de tireoide, particularmente mutações do *RAS*; 2) mutações somáticas descritas em outras malignidades no banco de dados COSMIC70⁸⁸; 3) mutações "frameshift" ou códon de parada; 4) polimorfismos de nucleotídeo único preditos como deletérios por meio de ferramentas de predição "in silico" (Polyphen, Mutation Taster, PROVEAN e FATHMM score $\geq 0,7$)^{89–92} e 5) demais alterações.

3.5. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados clínicos foram realizadas pelo programa IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Foi considerado estatisticamente significativo um valor de p < 0,05.

As variáveis categóricas foram apresentadas por valores absolutos e relativos (frequências), e as comparações entre elas foram realizadas por teste chi-quadrado de Pearson ou teste exato de Fisher.

As variáveis contínuas foram apresentadas por média ± desvio padrão (DP) ou mediana (intervalo interquartil). Quando houve distribuição normal, as comparações entre as variáveis numéricas foram realizadas por teste "Tstudent" e "one-way" ANOVA, e quando apresentaram distribuição não-normal, foram realizados os testes Mann-Whitney U, Wilcoxon e Kruskal-Wallis.

O desempenho diagnóstico da ultrassonografia de tireoide (sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança positiva e negativa e acurácia) foi avaliado. A definição de resultados verdadeiro-positivo, verdadeiro-negativo, falso-positivo e falso-negativo foi baseada no diagnóstico histológico (maligno *vs.* benigno).

4. Resultados

4.1. Características clínicas dos tumores de células de Hürthle

4.1.1. Características clínicas e laboratoriais de carcinomas e adenomas de células de Hürthle

Foram analisados os dados clínicos de 52 pacientes com diagnóstico de carcinoma e 49 de adenoma de células de Hürthle. Não foram identificadas diferenças significativas em relação às características clínicas e laboratoriais entre os grupos (Tabela 5).

Características	Carcinomas (n=52)	Adenomas (n=49)	p-valor
Idade ao diagnóstico (anos)	57,3 ± 14,5	55,2 ± 13,3	0,468
Idade ≥ 55 anos (%)	30 (57,7)	26 (53,1)	0,640
Sexo feminino (%)	43 (82,7)	40 (81,6)	0,889
TSH pré-operatório (µU/mL)	1,9 ± 1,5	$2,0 \pm 1,2$	0,647
Presença de anti-TPO (%)	3 (11,1)	4 (12,5)	0,869
Presença de anti-tireoglobulina (%)	7 (26,9)	6 (18,2)	0,421

4.1.2. Ultrassonografia de tireoide e citologia de carcinomas e adenomas de células de Hürthle

As imagens da ultrassonografia de tireoide pré-operatórias de 24 carcinomas e 29 adenomas de células de Hürthle estavam disponíveis para revisão. Não houve diferenças significativas entre os grupos (Tabela 6).

Características ultrassonográficas*	Carcinomas (n=24)	Adenomas (n=29)
Hipoecogenicidade (%)	9 (37,5)	6 (22,2)
Nódulo sólido (%)	13 (54,2)	12 (44,4)
Contornos irregulares (%)	1 (4,2)	3 (11,1)
Ausência de halo hipoecoico (%)	5 (20,8)	11 (40,7)
Microcalcificações (%)	2 (8,3)	3 (11,1)
Macrocalcificações (%)	3 (12,5)	2 (7,4)
Altura > largura (%)	4 (16,7)	8 (29,6)
Vascularização central ou predomínio central (%) TI-RADS (%)	10 (52,6)	12 (60,0)
2	5 (20,8)	4 (14,8)
3	5 (20,8)	10 (37,0)
4	12 (50,0)	10 (37,0)
5	2 (8,3)	3 (11,1)

Tabela 6 – Características ultrassonográficas de carcinomas e adenomas de células de Hürthle

* não houve diferença estatística entre os grupos

Avaliamos o desempenho diagnóstico das características ultrassonográficas para diferenciar carcinomas de adenomas de células de Hürthle. Hipoecogenicidade e presença de macrocalcificações apresentaram as razões de verossimilhança mais elevadas. Entretanto, a especificidade da hipoecogenicidade foi de apenas 77,8%. Além disso, apesar da alta especificidade, as macrocalcificações foram observadas em apenas 12,5% dos carcinomas de células de Hürthle. Nenhuma caraterística analisada apresentou acurácia adequada para descartar a malignidade (Tabela 7).

Ao analisar a performance diagnóstica do TI-RADS em neoplasias de células de Hürthle, houve 58% dos carcinomas classificados como TI-RADS 4 ou 5, enquanto 48% dos adenomas obtiveram essas classificações (Tabela 6). Portanto, as categorias TI-RADS 4 ou 5 apresentaram especificidade de apenas 51,8% com razão de verossimilhança positiva de 1,2 (Tabela 7).

Características	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	RV positiva (IC 95%)	RV negativa (IC 95%)	Acurácia (IC 95%)
Nódulo sólido	54,2%	55,6%	1,22	0,83	54,9%
	(32,8-74,5)	(35,3-74,5)	(0,7-2,1)	(0,5-1,4)	(40,3-68,9)
Hipoecogenicidade	37,5%	77,8%	1,69	0,8	58,8%
	(18,8-59,4)	(57,7-91,4)	(0,7-4,1)	(0,6-1,2)	(44,2-72,4)
Contornos irregulares	4,2%	88,9%	0,37	1,08	49%
-	(0,1-21,1)	(70,8-97,6)	(0,04-3,4)	(0,9-1,3)	(34,7-63,4)
Ausência de halo hipoecoico	20,8%	59,3%	0,51	1,34	41,2%
	(7,1-42,1)	(38,8-77,6)	(0,2-1,3)	(0,9-1,9)	(27,6-55,8)
Microcalcificações	8,3%	88,9%	0,75	1,03	51%
-	(1,0-27,0)	(70,8-97,6)	(0,1-4,1)	(0,9-1,2)	(36,6-65,2)
Macrocalcificações	12,5%	92,6%	1,69	0,94	54,9%
2	(2,7-32,4)	(75,7-99,1)	(0,3-9,3)	(0,8-1,1)	(40,3-68,9)
Altura > Largura	16,7%	70,4%	0,56	1,18	45,1%
-	(4,7-37,4)	(49,8-86,2)	(0,2-1,6)	(0,9-1,6)	(31,1-59,7)
Vascularização central	50%	36,8%	0,8	1,4	43,6%
-	(27,2-72,8)	(16,3-61,6)	(0,4-1,4)	(0,7-2,8)	(27,8-60,4)
TI-RAD 4 ou 5	58,3%	51,9%	1,2	0,8	54,9%
	(36,6-77,9)	(31,9-71,3)	(0,7-2,0)	(0,4-1,5)	(40,3-68,9)

Tabela 7 – Desempenho das características ultrassonográficas dos nódulos no diagnóstico de carcinomas de células de Hürthle

IC 95%: intervalo de confiança; RV: razão de verossimilhança.

Os resultados das análises citológicas pré-operatórias estavam disponíveis em prontuários de 38 casos de carcinoma e 30 de adenomas de células de Hürthle. O padrão folicular com células de Hürthle foi predominante, mas não houve diferença significativa nos diagnósticos citológicos entre os tumores benignos e malignos (Tabela 8). O diagnóstico citológico de padrão folicular ou padrão folicular com células de Hürthle foi sensível para o diagnóstico dos carcinomas de células de Hürthle (sensibilidade de 86,8%), mas sua especificidade foi de apenas 3,3%.

Citologia	Carcinomas (n=38)	Adenomas (n=30)	p-valor
Bócio adenomatoso	4 (10,5%)	1 (3,3%)	0,156
Padrão folicular	9 (23,7%)	12 (40%)	0,231
Padrão folicular com células de Hürthle	24 (63,1%)	17 (56,6%)	0,587
Material insuficiente	1 (2,7%)	-	-

Tabela 8 – Padrão citológico de carcinomas e adenomas de Hürthle

4.1.3. Exame anatomopatológico de carcinomas e adenomas de células de Hürthle

Os carcinomas de células de Hürthle foram significativamente maiores que os adenomas na histopatologia (Tabela 9), e sua dimensão variou de 7 mm a 120 mm, enquanto os adenomas variaram de 5 a 85 mm. Nódulos ≥ 4 cm apresentaram risco aumentado de malignidade (razão de chances 3,67; IC 95% 1,58 a 8,52). Não houve diferença entre adenomas e carcinomas em relação à coexistência de bócio, tireoidite ou carcinoma papilífero (Tabela 9). Todos os carcinomas de células de Hürthle eram unifocais, e 61,5% extensamente invasivos. Invasão vascular foi identificada em 77% dos carcinomas, enquanto a extensão extratireoidiana em apenas 7,7% dos casos. Apenas um paciente com carcinoma de 5 cm extensamente invasivo foi tratado com lobectomia devido a complicações cirúrgicas e evoluiu com resposta excelente. Metástases linfonodais e à distância foram detectadas em 9,6% e 13,5% dos casos, respectivamente. Um dos casos de carcinoma com metástases linfonodais ao diagnóstico tinha também carcinoma pouco diferenciado de tireoide em outro nódulo.

Característica histopatológica	Carcinomas (n=52)	Adenomas (n=49)	p-valor
Tamanho (mm)	47,4 ± 25,7	28,6 ± 19,5	<0,001
Tamanho ≥ 4 cm (%)	30 (58,8)	12 (26,1)	<0,001
Bócio concomitante (%)	26 (52,0)	20 (40,8)	0,265
Tireoidite concomitante (%)	8 (16,0)	8 (16,3)	0,965
Carcinoma papilífero concomitante (%)	9 (17,6)	10 (20,4)	0,725

Tabela 9 – Apresentação histopatológica de carcinomas e adenomas de células de Hürthle

De acordo com a 8ª edição da classificação da AJCC/TNM, houve predomínio de apresentação inicial como T3a. A maioria dos casos foi classificada como estadio I, particularmente devido ao ponto de corte de idade dessa nova edição, e alto risco de recorrência pela ATA (Tabela 10).

Tabela 10 – Estadiamento inicial dos carcinomas de células de Hürthle segundo AJCC/TNM, 8^a edição⁷⁵, e o sistema de estratificação de risco pela ATA¹

, (1) (
Classificação	n (%)
Estadiamento AJCC/TNM	
T1a	a 4 (7,7%)
T1I	b 4 (7,7%)
T	2 15 (34,9%)
ТЗа	a 28 (53,8%)

continua

T3b	1 (2,3%)
Т4	-
NO	50 (96,1%)
N1	3 (5,8%)
МО	48 (92,3%)
M1	4 (7,7%)
Estadio I	33 (63,5%)
Estadio II	15 (28,8%)
Estadio III	-
Estadio IVA	-
Estadio IVB	4 (7,7%)
Risco de recorrência ATA	
Risco Baixo	17 (32,7%)
Risco intermediário	5 (9,6%)
Alto risco	30 (57,7%)

Tabela 10 – Estadiamento inicial dos carcinomas de células de Hürthle segundo AJCC/TNM, 8ª edição ⁷⁵, e o sistema de estratificação de risco pela ATA ¹

4.1.4. Resposta ao tratamento dos carcinomas de células de Hürthle

A terapia adjuvante com I¹³¹ foi administrada a 74,5% dos pacientes. Houve nove pacientes com pesquisa de corpo inteiro pós-dose positivas.

Apenas três pacientes apresentaram anticorpo antitireoglobulina positivo no pós-operatório, nenhum deles com evidência de metástases. A média da dosagem de tireoglobulina mais recente foi de 86,8 ± 432,6 ng/mL.

Após um ano do tratamento, 14% dos pacientes apresentaram resposta estrutural incompleta. Ao término do seguimento médio de 92,7 meses, 17,3% dos pacientes apresentaram doença recorrente ou persistente, sendo que todos esses casos foram classificados como alto risco de recorrência pela ATA. Em toda a coorte de carcinomas de células de Hürthle, houve cinco óbitos durante o acompanhamento, sendo apenas dois deles relacionados à malignidade, e ambos apresentavam carcinomas de células de Hürthle extensamente invasivos (Figura 10).



Figura 10 – Resposta ao tratamento de carcinomas de células de Hürthle

4.1.5. Carcinomas extensamente vs. minimamente invasivos

Em relação às características clínicas, houve diferença apenas no tamanho do tumor ao comparar carcinomas de células de Hürthle extensamente e minimamente invasivos (Tabela 11). É importante ressaltar que um dos casos metastáticos era minimamente invasivo.

Características	Extensamente invasivos (n=33)	Minimamente invasivo (n=21)	p-valor
Idade ao diagnóstico (anos)	58,5 ± 15,6	54,6 ± 12,7	0,367
Idade ≥ 55 anos ao diagnóstico (%)	19 (59,4)	10 (52,6)	0,638
Tamanho (mm)	53,3 ± 27,5	37,9 ± 20,1	0,029
Tamanho ≥ 4 cm (%)	20 (62,5)	10 (55,6)	0,630
Persistência e/ou recorrência (%)	8 (25,8)	1 (5,3)	0,066
Metástases linfonodais (%)	5 (16,1)	-	0,065
Metástases à distância (%)	6 (19,4)	1 (5,3)	0,163

Tabela 11 – Características clínicas de pacientes portadores de carcinomas de células de Hürthle extensa e minimamente invasivos

4.2. Características moleculares dos tumores de células de Hürthle

Analisamos 40 carcinomas e 10 adenomas de células de Hürthle sequenciados. Alterações genéticas foram identificadas em 19 (47,5%) dos carcinomas de células de Hürthle, sendo 57,5% deles extensamente invasivos. Ao total, identificamos 190 SNPs e cinco inserções ou deleções nos carcinomas pareados. Dentre os SNPs encontrados, havia 181 não-sinônimos, oito sem-sentido e um sinônimo (Anexo B). Entre os casos sequenciados com mutações, os carcinomas extensamente invasivos apresentaram mediana de 11 mutações por tumor (mínimo de uma e máximo de 88), enquanto os minimamente tinham uma mediana de apenas 1,5, variando de uma a cinco mutações por tumor (p=0,105).

Foram identificadas mutações em 72 genes nos carcinomas de células de Hürthle, sendo que a maior parte dessas mutações envolvia a via Wnt/βcatenina (Figura 11), seguida pelas vias MAPK e PI3K-AKT-mTOR (Figura 12). Apesar de mutações de todas as vias terem sido encontradas mais frequentemente entre os carcinomas extensamente invasivos, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 12).



Figura 11 – Frequência de casos apresentando mutações em genes da via Wnt/ β -catenina



Figura 12 – Frequência de casos apresentando mutações em genes das vias MAPK e PI3K-AKT-mTOR

Tabela 12 – Distribuição das mutações somáticas conforme via de sinalização intracelular de carcinomas de células de Hürthle extensamente e minimamente invasivos

Via/Gono	Extensamente invasivos		Minimamente invasivos		Total	
Via/Gene	Casos (n=23)	Mutações (n=174)	Casos (n=17)	Mutações (n=21)	Casos (n=40)	Mutações (n=195)
Wnt/ß-catenina	7	64	5	9	12	73
with p-caterinia	(30,4%)	(36,8%)	(29,4%)	(42,9%)	(30,0%)	(37,4%)
FAT1	5	10	2	2	7	12
FATT	(21,7%)	(5,7%)	(11,8%)	(9,5%)	(17,5%)	(6,2%)
APC	5	15	2	3	7	18
AFO	(21,7%)	(8,6%)	(11,8%)	(14,3%)	(17,5%)	(9,2%)
	6	40	5	5	11	45
	(26,0%)	(23,0%)	(29,4%)	(23,8%)	(27,5%)	(23,1%)
PI3K-AKT-	7	41	3	6	10	47
mTOR	(30,4%)	(23,6%)	(17,6%)	(28,6%)	(25,0%)	(24,1%)
Natak	4	11			4	11
NOICH	(17,4%)	(6,3%)	-	-	(10,0%)	(5,6%)
Outros vias	4	18	1	1	5	19
Outras vias	(17,4%)	(10,3%)	(5,9%)	(4,8%)	(12,5%)	(9,7%)

As mutações foram estratificadas conforme sua patogenicidade (Quadro 2). Houve predomínio dos genes das vias Wnt/β-catenina e PI3K-AKT-mTOR no grupo de mutações descritas no banco de dados COSMIC70. Mutações "frameshift", códon de parada e as preditas como deletérias pelas ferramentas "in silico" foram frequentes na via Wnt/β-catenina e entre os carcinomas de células de Hürthle extensamente invasivos (Figura 13).

Quadro 2 – Distribuição dos genes de acordo com as vias de sinalização e o grau de patogenicidade das mutações encontradas

Patogenicidade	Via Wnt/ β-catenina	Via MAPK	Via PI3K- AKT-mTOR	Via Notch	Outros genes
Grupo 1: "drivers" conhecidos da carcinogênese tireoidiana	-	HRAS KRAS NRAS	-	-	-
Grupo 2: mutações descritas no COSMIC70	APC GSK3B HNF1A LRP6	KDR FGFR3	AKT2 IRS4 MTOR PIK3CG	-	-

continua

Quadro 2 – Distribuição dos genes de acordo com as vias de sinalização e o grau de patogenicidade das mutações encontradas

Grupo 3: mutações "frameshift" ou codon de parada	APC AXIN2 CSNK1D FAT1 JAK2 LRP6	ALK	AGAP2	FBXW7 NOTCH2	TIMM44
Grupo 4: genes com SNPs preditos como deletérios por quatro ferramentas "in silico"	APC AXIN2 FAT1 LRP5 SFRP1 ZNRF3	CCDC6 ERBB2 FGFR3 KDR KIT NTRK1 NTRK3	AGAP2 MTOR PIK3CA PTEN	NOTCH1 NOTCH2	KEAP1 NDUFA13 TIMM44
Grupo 4: genes com SNPs preditos como deletérios por três ferramentas "in silico"	APC AXIN2 CSNK1D CSNK1E CYLD DVL1 DVL2 FAT1 LRP5	ALK FLT4 KDR KIT MET PDGFRB	AGAP2 FOXO1 IRS2 MTOR PIK3R4 TSC1	NOTCH2	KEAP1
Grupo 4: genes com SNPs preditos como deletérios por duas ferramentas "in silico"	AMER1 APCCSNK1A1 CSNK1E CTNNB1 CYLD DVL1 FAT1 GNAS LRP5 PPP2R1A	KDR KIT MAP2K2 PDGFRA RET ROS1	AGAP2 AKT2 IRS1 MTOR PIK3CG RICTOR STK11	-	DICER1 KEAP1
Grupo 4: genes com SNPs preditos como deletérios por uma ferramenta "in silico"	APC AXIN2 FAT1 GNAS LRP5 ZNRF3	ALK ETV6 FGFR3 FLT4 KDR MET PDGFRA RET	AGAP2 AKT2 IRS2 NFKB1 PIK3R4	NOTCH2 NUMB	DICER1 SLC5A5 TRIM62
Grupo 5: demais mutações	AMER1 AXIN1 DKK1 FZD1	FGFR3 FLT4 KDR KIT	AGAP2 IRS1 PIK3R4 PIK3R5 MTOR	MIR146A	Promotor do TERT TSHR SLC5A5

* Ferramentas "in silico": Polyphen, Mutation Taster, PROVEAN e FATHMM score > 0,7.



Figura 13 – Representação gráfica das mutações dos grupos 1 a 4 e do promotor do *TERT* identificadas nos carcinomas de células de Hürthle da tireoide. A frequência se refere ao número de casos com mutação em determinado gene. As mutações foram classificadas de acordo com o grau de patogenicidade. Em vermelho (grupo 1): mutações "drivers" descritas em carcinomas de tireoide; em azul (grupo 2): mutações somáticas descritas em outras malignidades (COSMIC70); em laranja (grupo 3): mutações "frameshift" ou códon de parada; em verde (grupo 4): SNP deletério de acordo com ferramentas de predição "in silico"; em amarelo: mutações de região promotora do gene *TERT* (as demais mutações do grupo 5 não estão representadas nesta figura). EXT: carcinomas de células de Hürthle extensamente invasivos; MIN: carcinomas de células de Hürthle minimamente invasivos

FAT1 e APC foram os genes mais frequentemente alterados (Figura 13). Identificaram-se 12 mutações somáticas do gene FAT1 em sete carcinomas, sendo cinco deles extensamente invasivos. Uma dessas mutações era códon de parada, e nove preditas como deletérias pelas ferramentas "in silico". Todas essas mutações se localizavam nos domínios caderina ou citoplasmático, sendo que uma delas (p.R1268Q), detectada em três carcinomas da nossa coorte, foi descrita previamente em glioblastoma multiforme⁹³ (Tabela 13). Houve três variantes somáticas do FAT1 encontradas em seis outros carcinomas, que tinham sido previamente descritas como polimorfismos germinativos no banco de dados populacional 1.000 Genomes (rs77834784, rs3796648 e rs2304867), o que sugere que estes sejam eventos passageiros. Além disso, foram identificadas 18 mutações do gene APC em 7 (17,5%) carcinomas, sendo cinco deles extensamente invasivos. Duas dessas mutações (p.R805Q e p.E1064*) foram descritas em carcinomas colorretais (Tabela 13). Houve cinco casos (quatro extensamente invasivos) que apresentaram simultaneamente mutações de FAT1 e APC (Figura 13). Nenhum dos casos apresentou mutação isolada de APC. O esquema da localização das mutações encontradas em FAT1 e APC foram representadas nas figuras 14 e 15, respectivamente.

Gene	Éxon	Posição genômica	Mutação	Troca de aminoácido	Domínio	Patogenicidade
APC						
	11	112154688	c.C959T	p.S320L	-	Deletério ^{a,b,c,d}
	11	112154943	c.G1214A	p.R405Q	-	Deletério ^{a,b,d}
	12	112157655	c.G1375A	p.D459N	-	Deletério ^{a,b,d}
	13	112162822	c.G1426A	p.A476T	Repetições armadillo	Deletério ^{a,b,d}

Tabela 13 – Mutações somáticas dos genes *APC* e *FAT1* encontradas nos carcinomas de células de Hürthle da tireoide e suas características

49

continua

APC	17	112173593	c.C2302A	p.H768N	-	Deletério ^{a,b,c}
	17	112173683	c.G2392A	p.D798N	-	Deletério ^{a,b,c,d,e}
	17	112173705	c.G2414A	p.R805Q	-	COSM1432203 ^e
	17	112174481	c.G3190T	p.E1064*	Ligação β- catenina	COSM3428825 ^e
	17	112176353	c.G5062A	p.D1688N	Regulação da β-catenina	Deletério ^{b,c,d}
	17	112176986	c.G5695A	p.E1899K	Regulação da β-catenina	Deletério ^{b,c}
	17	112178319	c.C7028T	p.S2343F	Domínio básico	Deletério ^{a,b,c,d}
	17	112178879	c.C7588T	p.R2530W	-	Deletério ^{a,b,c,d}
	17	112178919	c.G7628A	p.R2543K	-	Deletério ^{b,c,d}
	17	112179531	c.C8240T	p.P2747L	Ligação a EB1	Deletério ^c
FAT1						
	2	187628139	c.G2843A	p.W948*	Caderina 8	Códon de parada
	5	187557908	c.G3803A	p.R1268Q	Caderina 11	COSM5946179 ^f
	5	187557879	c.G3832A	p.D1278N	Caderina 11	Deletério ^{a,b,c,d}
	8	187549821	c.G4420A	p.E1474K	Caderina 13	Deletério ^{a,b}
	10	187542752	c.C4988T	p.A1663V	Caderina 14	Deletério ^{a,b,d}
	10	187541042	c.C6698T	p.T2233I	Caderina 20	Deletério ^{a,b,d}
	10	187539996	c.G7744A	p.V2582M	Caderina 23	Deletério ^{a,b,d}
	14	187532836	c.C9557T	p.P3186L	Caderina 29	Deletério ^{a,b}
	19	187525086	c.G10594A	p.D3532N	Caderina 32	Deletério ^b
	25	187517814	c.G12880A	p.G4294R	Citoplasmático	Deletério ^{b,c,d}

Tabela 13 – Mutações somáticas dos genes *APC* e *FAT1* encontradas nos carcinomas de células de Hürthle da tireoide e suas características

Preditores "in silico": a, PROVEAN; b, Mutation Taster; c, FATHMM score; d, Polyphen; e, identificado em carcinoma de cólon; f, identificado em glioblastoma multiforme ⁹³; COSM: número do registro da mutação somática no COSMIC70 (the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer)



Figura 14 – Localização esquemática das mutações de *FAT1* de acordo com os domínios proteicos



Figura 15 – Localização esquemática das mutações de *APC* de acordo com os domínios proteicos

Foram detectados dois carcinomas de células de Hürthle com a mutação p.Q61R de *NRAS*, e um com a mutação p.Q61K do mesmo gene. Um carcinoma de células de Hürthle apresentou a mutação p.N54E de *HRAS* e outro a p.G12C de *KRAS*.

Não foram identificadas mutações nos genes *BRAF*, *TP53* ou *AKT1*. Observaram-se mutações somáticas de *AKT2* em 10% dos carcinomas de células de Hürthle. Houve duas mutações da região promotora de *TERT*
(cr5:1295594 G>A, cr5:1295494 A>G) em dois casos de carcinomas de células de Hürthle, sendo que ambos eram extensamente invasivos, mas evoluíram com resposta excelente ao tratamento. Dois carcinomas apresentaram mutações no gene do cotransportador de sódio/iodeto, *SLC5A5*, porém não eram metastáticos. Houve um carcinoma minimamente invasivo com mutação no *PTEN* (p.L281F) (Figura 13).

Em relação aos adenomas, identificamos dois casos com a mutação p.Q61R de *NRAS*, outro com mutação do *APC* (p.P2747L), a qual havia sido identificada em dois carcinomas dessa casuística, e um terceiro caso, com mutação de *FAT1* (p.I1127V). Porém, esta não foi identificada em nenhum dos nossos casos de carcinoma de células de Hürthle. Estas mutações de *APC* e *FAT1* foram preditas como deletérias em apenas uma ferramenta de predição "in silico".

4.2.1. Relação entre perfis clínico e molecular

Nenhuma associação significativa entre o perfil molecular e os desfechos foi observada. Não foram identificadas mutações em carcinomas com metástases linfonodais. Apenas um paciente com metástases à distância refratárias a I¹³¹ (EXT8, Figura 13), apresentou mutação no gene *ROS1* da via MAPK. Este foi o único indivíduo com doença persistente e, consequentemente, resposta incompleta ao tratamento, que teve mutação identificada no tumor primário.

5. Discussão

A apresentação clínica predominante de carcinomas de células de Hürthle foi de pacientes do sexo feminino com idade mais avançada. Os nódulos malignos eram maiores, mas sem características ultrassonográficas ou citológicas que os distinguissem dos adenomas de células de Hürthle. Houve mutações recorrentes nas vias Wnt/β-catenina, MAPK e PI3K-AKT-mTOR nos carcinomas de células de Hürthle, particularmente dos genes *FAT1* e *APC*, envolvidos na via Wnt.

5.1. Perfil clínico e ultrassonográfico dos carcinomas de células de Hürthle

Os carcinomas de células de Hürthle eram nódulos significativamente maiores que os adenomas e, exceto por esta característica, não houve diferença na apresentação das lesões benignas e malignas que permitisse um diagnóstico pré-operatório adequado. Estudos evidenciam a correlação entre tamanho do tumor e risco de malignidade nas lesões oncocíticas. Tamanho tumoral > 4 cm é um preditor independente de malignidade, conforme achados de estudo anterior envolvendo 330 tumores de células de Hürthle, 61 deles malignos³². Em nossa casuística, lesões maiores que 4 cm apresentaram maior risco de malignidade. Entretanto, ao contrário de relato da literatura de que todas as lesões de células de Hürthle ≤ 2 cm são benignas e todas > 6 cm são malignas^{21,29}, encontramos lesões benignas de até 8,5 cm e a menor maligna tinha 0,7 cm.

As características ultrassonográficas analisadas nesse estudo também não demonstraram capacidade de diferenciar lesões oncocíticas malignas de benignas⁹⁴. Neoplasias de células de Hürthle podem apresentar uma ampla variedade de achados ultrassonográficos^{17,29–31,94–97}, e hipoecogenicidade é preditora de malignidade nessas lesões⁹⁸. Ito *et al.*³² observam que nódulos

sólidos, arredondados e hipoecoicos e nódulos sólidos com contornos irregulares ou microcalcificações representam 83% dos carcinomas de células de Hürthle e 78% dos adenomas, mas tais apresentações ultrassonográficas são preditoras independentes de malignidade em pacientes com padrão citológico folicular com células de Hürthle³². Por outro lado, nódulos ovalados, não-hipoecoicos, com halo periférico foram padrões recorrentes entre os carcinomas de células de Hürthle no presente estudo, sendo observadas tais características nas frequências de 83,3%, 62,5% e 79,2%, respectivamente.

Os aspectos ultrassonográficos dos carcinomas foliculares também diferem dos observados nos carcinomas papilíferos de tireoide. Os achados mais frequentes nas ultrassonografias de carcinomas foliculares são: nódulos sólidos (82,6%), ovalados (72,7%), isoecoicos (65,2%), com halo hipoecoico (86,6%) e ausência de calcificações (82,6%)²⁸. Supõe-se que o halo periférico corresponda à cápsula ou pseudocápsula do tumor, o que pode ser identificado tanto em carcinomas como em adenomas de células de Hürthle^{94,96}. Ao contrário do padrão previamente descrito dos carcinomas foliculares²⁸, degeneração cística (45,8%) e macrocalcificações (12,5%) foram observadas em nossos casos de carcinomas de células de Hürthle. Lee et al.96 identificam componente cístico em 50% e macrocalcificações em 20% dos tumores de células de Hürthle, sem diferença significativa entre as lesões benignas e malignas, apesar de haver apenas três carcinomas em sua casuística. Em relação à vascularização, nosso estudo demonstrou predomínio do padrão central tanto nos carcinomas (52,6%) como nos adenomas de células de Hürthle (60%). Além disso, a classificação TI-RADS em nossa amostra não foi capaz de distinguir adequadamente as lesões malignas, achado semelhante ao reportado em estudo coreano que avalia lesões foliculares⁹⁹.

A análise citológica dos nossos casos não foi capaz de identificar adequadamente os nódulos malignos, visto que 87% dos carcinomas e 97% dos adenomas foram diagnosticados como padrão folicular ou padrão folicular com células de Hürthle (Bethesda IV). Estudos anteriores reportam baixo valor preditivo positivo para malignidade do padrão citológico folicular com células de Hürthle, entre 15 e 45%^{16,19}, que reduz para 9,5% na presença de tireoidite de

Hashimoto³³. Portanto, outros aspectos pré-operatórios têm que ser avaliados, a fim de permitir um diagnóstico apropriado da malignidade.

A avaliação clínica e ultrassonográfica desses pacientes apresentou algumas limitações devido ao seu caráter retrospectivo. Analisamos apenas casos de neoplasias de células de Hürthle confirmados pela histopatologia, em vez de todos os nódulos com padrão folicular com células de Hürthle pela citologia. Apesar da raridade desse tumor e de esta série ter incluído uma quantidade maior de casos de carcinomas de células de Hürthle quando comparada a outras casuísticas, o número de casos ainda foi limitado para identificar diferenças significativas entre lesões malignas e benignas.

5.2. Perfil molecular dos carcinomas de células de Hürthle

Apesar do recente avanço do conhecimento sobre as bases moleculares dos carcinomas de células de Hürthle, mutações condutoras ("drivers") e alterações genômicas responsáveis pelo fenótipo rico em mitocôndrias das células oncocíticas ainda não foram completamente elucidadas.

Mutações somáticas frequentemente associadas а carcinomas diferenciados de tireoide são incomuns nos carcinomas de células de Hürthle. De acordo com o Atlas do Genoma do Câncer, mutações do BRAF estão presentes em até 60% dos carcinomas papilíferos^{52,100}. No entanto, não foi detectada nenhuma mutação do BRAF em nossos casos de carcinomas de células de Hürthle. Gopal et al.¹⁵ identificam dois casos de carcinoma de células de Hürthle primário com mutação de BRAF, enquanto Ganly et al.¹⁴ confirmam nosso achado negativo em relação a esse gene. Por outro lado, mutações do RAS foram observadas em 5 (12,5%) dos nossos carcinomas sequenciados, uma frequência similar à detectada nos papilíferos⁵², mas bem menor que a observada em carcinomas foliculares (49%)⁵³. Contudo, demonstramos que a via MAPK de fato é relevante nos carcinomas de células de Hürthle, visto que 27,5% dos nossos casos apresentavam mutações de genes desta via, sendo os mais frequentes: ALK (10%), FGFR3 (10%), KDR (10%), KIT (7,5%), NRAS (7,5%), FLT4 (5%) e MET (5%).

Considerando que carcinomas de células de Hürthle extensamente invasivos apresentam aumento da expressão de genes das vias Wnt/β-catenina e PI3K-AKT-mTOR¹⁰, observamos, em nossa casuística, 30% dos carcinomas com mutações em genes da via Wnt/β-catenina (58,3% destes extensamente invasivos) e 25% com mutações na via PI3K-AKT-mTOR (70% extensamente invasivos).

5.2.1. O gene *FAT1* como possível "driver" do carcinoma de células de Hürthle

A via Wnt/β-catenina, conforme os dados expostos, está associada a carcinogênese dos tumores de Hürthle e engloba genes cujas alterações podem ser "drivers" dessa neoplasia, não só ativando a via Wnt, como também controlando o crescimento celular por meio da interação com o complexo I mitocondrial^{93,101}. Mutações "driver" conferem vantagem ao crescimento clonal das células neoplásicas e são os focos primordiais de terapias-alvo¹⁰². O principal gene candidato em nossa casuística foi o *FAT1*.

O *FAT1* é um gene longo que se localiza na região 4q35.2 e codifica uma caderina, proteína transmembrana presente em tecidos epiteliais, que apresenta mais de 4.500 resíduos de aminoácidos. As funções da proteína FAT1 incluem adesão, polaridade e migração celulares, além de participação em vias de sinalização intracelular, como Wnt/ β -catenina e Hippo^{93,103}. FAT1 ativa o complexo Ena/VASP, promovendo polimerização da actina e a mobilidade celular, interage com Scribble na via Hippo, gerando fosforilação de YAP1 e inibição do crescimento celular, e também regula negativamente a translocação nuclear da β -catenina, restringindo a via Wnt e o crescimento celular^{93,104,105}. A proteína transmembrana do alelo selvagem do *FAT1* se liga à β -catenina, enquanto a proteína FAT1 truncada não consegue deter a β catenina na membrana celular, permitindo a migração da β -catenina ao núcleo e a ativação da via Wnt, o que favorece proliferação celular⁹³ (Figura 16). Dados do Atlas do Genoma do Câncer mostram maior ativação da via Wnt em casos com reduzida expressão do *FAT1*⁹³.



Figura 16 – Funções celulares do FAT1

O papel do *FAT1* na carcinogênese ainda não foi completamente elucidado, visto que há descrições de sua ação tanto como supressor quanto como oncogene¹⁰⁶. A função de supressão tumoral do *FAT1* "in vitro" é evidenciada pelo fato de que a inativação de FAT1 acarreta um crescimento acelerado de células neoplásicas, mas essa perda de função de FAT1 leva à ativação da via Wnt/ β -catenina de forma heterogênea entre diferentes linhagens celulares⁹³. Em neoplasias de mama invasivas, há menor expressão de *FAT1*^{107,108}, enquanto a leucemia linfoblástica aguda tem hiperexpressão e associaç3ão com pior prognóstico¹⁰⁹. O processamento aberrante da proteína FAT1 ocorre em células de melanomas¹¹⁰ e mutações de ponto em neoplasias pancreáticas e espinocelulares de cabeça e pescoço^{93,103}.

A proteína FAT1 endógena se liga à β-catenina e suprime o crescimento e a proliferação celulares⁹³. A mutação p.G4294R do FAT1 que identificamos num caso de carcinoma de células de Hürthle se localizava no domínio intracitoplasmático, que é responsável pela ligação com a β -catenina. Entretanto, as evidências acerca da ativação da β-catenina após redução da expressão do FAT1 em células provenientes de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço são controversas^{103,111}, indicando que os mecanismos pelos quais as mutações do FAT1 comprometem a função proteica são variados e ainda parcialmente desconhecidos. Em neoplasias de cabeça e pescoço, a perda de função do FAT1 não afeta a proliferação, mas aumenta a migração e invasão celulares¹⁰³. Quase todas as mutações do FAT1 em nossa amostra se localizavam nos domínios extracelulares (caderinas), e essa porção da proteína normal parece ser suficiente para suprimir a mobilidade celular¹⁰³. Ganly et al.¹⁴ observam mutações de ponto do FAT1 em 7% dos carcinomas de células de Hürthle (não foram especificadas as localizações), menos frequentes do que em nossa casuística (17,5%), o que sugere heterogeneidade dos eventos genéticos determinantes desta neoplasia. O Atlas do Genoma do Câncer não reporta mutações inativadoras do FAT1 em neoplasias diferenciadas de tireoide, mas avaliam apenas carcinomas papilíferos e foliculares⁵².

Outro aspecto importante da proteína transmembrana FAT1 é o controle da função mitocondrial por meio do seu domínio intracelular, que limita a atividade dos complexos I e II. Estudo "in vivo" observa aumento da expressão de *FAT1* em células musculares lisas, após lesão vascular, contribuindo para conter o crescimento celular na fase de reparação do dano. Fragmentos da proteína FAT1 são localizados na mitocôndria dessas células, limitando os complexos I e II na membrana interna da mitocôndria. Células musculares lisas com "knockout" de *FAT1* apresentam maior proliferação, consumo de oxigênio mais elevado e níveis mais altos de aspartato. No entanto, essa vantagem no crescimento destas células "knockout" é significativamente reduzida após inibição do complexo I, o que não ocorre nas células normais, indicando que o aumento da proliferação celular gerado pela perda de função do *FAT1* depende da respiração mitocondrial^{101,112}.

Além disso, o papel do *FAT1* na carcinogênese é sugerido por meio da análise pormenorizada da deleção cromossômica 4q35 documentada em várias neoplasias, como glioblastoma, carcinoma de ovário e espinocelular de cabeça e pescoço, em que ocorre ativação da via Wnt apesar de não existirem mutações nos componentes clássicos da via, como *APC*, *CTNNB1*, *AXIN1* e *AXIN2*^{113–116}. Em carcinomas colorretais, quando as mutações mais frequentes dos genes *APC*, *AXIN1*, *AXIN2*, *TCF4* e *CTNNB1* estão ausentes, há mutações do *FAT1* ativando a via⁹³.

Mutações e reduzida expressão do *FAT1* em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço se associam a metástases linfonodais, permeação vascular linfática, maior recorrência e pior sobrevida livre de progressão de doença, enquanto tamanho tumoral, estadio TNM e sobrevida global não estão relacionados¹⁰³. Por outro lado, mutações do *FAT1* se associam a melhor prognóstico em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço negativos para o papilomavírus humano, glioma e neoplasias de ovário^{93,116,117}, o que parece ocorrer nos carcinomas de células de Hürthle, uma vez que nenhum dos nossos casos com mutações do *FAT1* apresentou desfechos desfavoráveis.

Apesar de termos detectado uma mutação do *FAT1* num caso de adenoma de células de Hürthle, outros potenciais "drivers" para essa neoplasia, como mutações do *RAS* e do DNA mitocondrial, também são identificados em adenomas^{14,15}. Tal achado sugere que provavelmente são necessários eventos genéticos adicionais para permitir a progressão tumoral. Além disso, como o aumento da proliferação celular gerada pela perda de função do *FAT1* depende da atividade mitocondrial¹⁰¹, supomos que este gene pode estar envolvido no fenótipo rico em mitocôndrias das células oncocíticas. Até o momento, os estudos "in vitro" acerca do papel do *FAT1* na carcinogênese não envolveram tumores de células de Hürthle, então a interface entre a alteração funcional de FAT1 com o excesso de mitocôndrias não foi explorada, e este estudo pode suscitar novas pesquisas nesse âmbito.

Portanto, apesar de o gene *FAT1* ainda não ter sido extensamente investigado nos carcinomas de células de Hürthle, sua associação com a via

Wnt/β-catenina, metabolismo mitocondrial, migração e invasão celulares reforçam a hipótese de que esse gene pode constituir relevante "driver" nessa neoplasia.

5.2.2. Outros potenciais "drivers" do carcinoma de células de Hürthle e impacto prognóstico

O gene APC é um supressor tumoral que controla a via Wnt/ β -catenina, e suas mutações ocorrem principalmente em carcinomas colorretais¹¹⁸. Este foi o gene com maior número de mutações em nossos carcinomas de células de Hürthle. O gene APC está mutado em carcinomas papilíferos variante cribiforme de portadores da Polipose Adenomatosa Familiar (PAF)¹¹⁹. A região na qual se concentram mais de 65% das mutações somáticas e 23% das germinativas do gene APC em carcinomas colorretais está entre os códons 1296 e 1513 no éxon 15, que se situa no domínio de repetições de 20 aminoácidos, onde ocorre ligação e regulação da β-catenina^{118,120}. Entretanto, não identificamos nenhuma mutação nessa região em nossas amostras. Cabe ressaltar que as mutações do gene APC fora dessa região de interesse também são mais comuns em portadores de PAF com carcinoma papilífero concomitante quando comparados aos pacientes com a síndrome sem tumor tireoidiano¹¹⁹. Além disso, em casos de PAF com carcinoma papilífero frequentemente coexistiam mutações do APC e o rearranjo RET/PTC1¹²¹, sugerindo que a perda de função do APC poderia ser evento inicial, mas isoladamente insuficiente na carcinogênese tireoidiana. Em nosso estudo, nenhum dos casos apresentou mutação isolada do APC e houve cinco carcinomas com mutações concomitantes de APC e FAT1.

Mutações do gene *APC* são conhecidas por ativarem a via Wnt/βcatenina, principalmente nos carcinomas colorretais¹¹⁸. Apesar de não haver descrição de mutações do *APC* em estudos genômicos prévios de carcinomas de células de Hürthle^{14,15,74}, as mutações que detectamos apresentaram potencial de patogenicidade considerável. A única exceção foi a mutação p.P2747L, identificada tanto em carcinoma como em adenoma na nossa amostra, predita como deletéria apenas pelo FATHMM score. Esta mutação se encontra no domínio de ligação à "end-binding protein" EB1, o qual se conecta a outras estruturas celulares, como microtúbulos. Em ratos portadores de versão truncada da *Apc*, sem o sítio de ligação à EB1, não há aumento do risco de neoplasias gastrointestinais¹²².

As mutações de outros genes da via Wnt/β-catenina que foram reportadas em nossa casuística (*AXIN2, DVL2, LRP5, LRP6, AMER1, CSNK1D, DVL1, GNAS* e *ZNRF3*) não são descritas nos demais estudos genômicos envolvendo carcinomas de células de Hürthle^{14,15,74}.

O gene *AGAP2* tem ação antiapoptótica por meio da ativação do PI3K nuclear e está hiperexpresso em algumas neoplasias, como do sistema nervoso central⁸⁸. Em estudo de transcriptoma de casos de neoplasias de tireoide do Atlas do Genoma do Câncer, a expressão de *AGAP2* não tem impacto prognóstico¹²³, e a frequência de mutações de ponto deste gene em câncer de tireoide no banco de dados COSMIC70 é menor que 1%⁸⁸. O *AGAP2* foi o gene da via PI3K-AKT-mTOR mais frequentemente mutado em nossos casos de carcinomas de células de Hürthle. Entretanto, não há descrição de mutações deste gene nos estudos genômicos recentes envolvendo carcinomas de células de Hürthle^{14,15}. Por outro lado, estudo de hibridização genômica mostra que há notável amplificação do cromossomo 12, onde se localiza o *AGAP2*, em carcinomas de células de Hürthle¹⁰.

As mutações do gene *MTOR* foram identificadas em 12,5% dos casos de carcinomas da nossa amostra. Entretanto, a análise de 507 carcinomas diferenciados de tireoide no atlas do genoma do câncer não revelou nenhuma mutação desse gene, enquanto houve apenas 1,2% (1/84) de carcinomas pouco diferenciados de tireoide e 6,1% (2/33) de anaplásicos com mutações de $MTOR^{124}$. Suspeita-se que mutações de MTOR possam contribuir com agressividade tumoral, induzindo invasão e metástases¹²⁴. Apesar de os tumores que apresentaram mutações de *MTOR* em nossa casuística não terem evoluído com metástases, todos eram extensamente invasivos.

Houve dois casos com mutação de splicing de *SLC5A5*, sendo um deles hipermutado, mas nenhum tinha metástases. A menor expressão de *SLC5A5* em carcinomas papilíferos, foliculares e pouco diferenciados de tireoide se

associa a agressividade tumoral e pior prognóstico¹²⁵. Até o momento, não foram descritas outras mutações de *SLC5A5* em carcinomas de células de Hürthle^{14,15}.

Ao contrário do que se verifica em análises genômicas dos carcinomas de células de Hürthle^{14,15}, mutações em genes associados a comportamento tumoral agressivo, como C228T e C250T da região promotora de *TERT* ou do *TP53*, não foram identificadas em nossos casos. Observamos duas novas mutações da região promotora de *TERT* em carcinomas extensamente invasivos sem evolução desfavorável. É possível que as mutações do *TP53* e do promotor do *TERT* (C228T e C250T) sejam mutações "driver" de estágios avançados dos carcinomas de células de Hürthle, uma vez que há evidências apontando para evolução convergente envolvendo esses genes. Ao analisar a árvore filogenética de alguns casos recorrentes ou metastáticos de carcinomas de células de Hürthle, observam-se mutações independentes do promotor do *TERT* e do *TP53* em linhagens distintas da neoplasia, sugerindo origem nãoclonal desses eventos¹⁵.

Portanto, o perfil genético que encontramos, com mutações recorrentes de *FAT1* sem mutações sabidamente relacionadas a pior prognóstico poderia explicar o desfecho geral favorável da nossa coorte. Apesar do predomínio de carcinomas de células de Hürthle extensamente invasivos, durante um seguimento de aproximadamente sete anos, houve doença recorrente ou persistente em 17%, resposta estrutural incompleta em 14%, metástases linfonodais em 9,6%, à distância em 13,5% dos casos e mortalidade de apenas 3,8%. A mortalidade média por carcinomas de células de Hürthle é descrita como sendo maior que 20%, mas varia entre os centros⁴³, inclusive estudo japonês observa evolução favorável semelhante à nossa, mostrando mortalidade de apenas 3,2%¹²⁶.

Como os outros relatos sobre a caracterização genômica de carcinomas de células de Hürthle^{14,15}, este estudo foi limitado pelo tamanho da amostra. No entanto, tanto carcinomas extensamente como minimamente invasivos foram representados, e as mutações mais relevantes foram investigadas em adenomas. Restringimos a nossa análise a tumores primários com foco na

identificação de mutações "driver" de carcinomas de células de Hürthle. Portanto, afirmações sobre a aquisição de novas mutações favorecendo a disseminação metastática não foram possíveis.

6. Conclusões

As características clínicas e os padrões ultrassonográfico e citológico dos carcinomas de células de Hürthle se assemelharam ao dos adenomas, exceto pelo tamanho tumoral, significativamente maior nos tumores malignos.

A evolução da coorte de carcinomas foi favorável, com menores frequências de metástases e mortalidade que as descritas na literatura, além do predomínio de resposta excelente ao tratamento.

No sequenciamento paralelo em larga escala dos carcinomas de células de Hürthle, observaram-se diversas mutações em genes das vias com aumento de expressão reportado previamente nestes carcinomas: Wnt/β-catenina, MAPK e PI3K-AKT-mTOR, sendo *APC* e *FAT1* os genes mais frequentemente mutados, tendo este último diversas funções celulares, inclusive controle da atividade mitocondrial. Não houve mutações em *BRAF*, e a frequência de mutações do *RAS* foi semelhante à relatada em carcinomas papilíferos, mas inferior à dos carcinomas foliculares. Mutações habitualmente associadas a pior prognóstico em carcinomas diferenciados de tireoide, como as C228T e C250T da região promotora de *TERT* e mutações de *TP53*, não foram encontradas. Além disso, não houve associação entre o perfil mutacional e as características clínicas, histológicas e desfechos.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Os eventos genéticos envolvidos na tumorigênese dos carcinomas de células de Hürthle são heterogêneos e ainda não foram completamente elucidados. Os achados acerca dos genes mais frequentemente envolvidos em nossa casuística podem gerar estudos funcionais que esclareçam o papel dessas mutações nas neoplasias oncocíticas. O *FAT1*, um dos principais achados do nosso estudo, é um gene ainda pouco explorado no contexto do carcinoma de células de Hürthle, e seu papel nessa neoplasia com fenótipo rico em mitocôndrias requer investigação mais ampla.

Ampliar a casuística e realizar análises genômicas mais extensas, inclusive com análise dos tecidos tumorais metastáticos, poderiam auxiliar na compreensão da genética desse subtipo singular de carcinoma diferenciado de tireoide. 8. Anexos

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M $\hfill \ $ F $\hfill \$
DATA NASCIMENTO://
ENDEREÇO APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:)
2.RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M 🛛 F 🗆
DATA NASCIMENTO.://
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP:)

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador: _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO PARA DETECÇÃO DE MUTAÇÕES EM CARCINOMAS DE CÉLULAS DE HÜRTHLE DA TIREOIDE"

2.PESQUISADOR : Debora Lucia Seguro Danilovic

CARGO/FUNÇÃO: Médica-assistente

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 100676

UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Tireoide, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	Х	RISCO MÉDIO	
RISCO BAIXO 🗆		RISCO MAIOR	

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo: O carcinoma de células de Hürthle é considerado uma variante dos carcinomas foliculares com comportamento clínico diferenciado. Apenas uma pequena parte destes tumores tem alteração molecular conhecida. Identificar estas alterações poderia melhorar o diagnóstico pré-operatório de nódulos de tireoide, identificar os casos de pior evolução e permitir o desenvolvimento de tratamentos genéticos. Os objetivos deste trabalho são identificar alterações de genes relacionados ao desenvolvimento de tumores de células de Hürthle da tireoide e relacionar as alterações encontradas com características dos pacientes;

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: Para poder participar deste estudo, você precisa ser um adulto submetido à remoção da tireoide pela presença de nódulo. Após a explicação de todos os procedimentos, você poderá decidir se quer ou não participar. Caso você deseje participar do estudo, toda a avaliação será feita a partir de pequenas amostras de sua tireoide, já removida na cirurgia;

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados: A coleta de amostras de tecidos de sua tireoide será em material da cirurgia armazenado no arquivo do serviço de Anatomia Patológica do Hospital;

4 - Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens
2 e 3: Como a coleta de material será feita após a remoção cirúrgica de sua tireoide, não haverá qualquer desconforto ou risco adicional;
5 - Benefícios para o participante: Trata-se de um estudo experimental. Com a avaliação de seu tumor de tireoide, será possível avaliar as alterações de genes que poderiam causar sua doença. Somente no final do estudo poderemos concluir quais serão os genes envolvidos na formação do câncer de tireoide;

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador: _____

6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar: Sua participação no estudo é voluntária. Caso você não deseje participar do estudo, não haverá qualquer modificação no seu atendimento médico no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo;

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Debora Lucia Seguro Danilovic, que pode ser encontrada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, telefones: 3061-8456 ou 3061-7467. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, e-mail: cappesq@hcnet.usp.br;

8 – Garantias de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento: É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

9 – Direito de confidencialidade: As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 - Garantia de que o participante receberá informações atualizadas: Terá direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais e finais da pesquisa;
11 - Despesas, compensações e indenizações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. O paciente tem direito a solicitar indenização em caso de danos comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa;

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado em outras pesquisas apenas com autorização do paciente: Da amostra de tumor cedida pelo (a) Sr (a) será extraído DNA (material genético) que poderá ser utilizado em outras pesquisas que também tenham o objetivo de estudar pacientes com nódulos na tireoide. Para que seu material genético possa ser armazenado e usado em outras pesquisas é necessária sua autorização. Por favor, informe abaixo se há necessidade de consultá-lo(a) para autorizar o uso do seu material biológico em outras pesquisas científicas futuras.

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material coletado em outras pesquisas científicas?

(....) **SIM.** Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material que eu estou cedendo.

Rubrica do participante da pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador: _____

Se o (a) Sr (a). concordar em disponibilizar este material para outras futuras pesquisas científicas ele será armazenado no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) da Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, permanecendo sob a responsabilidade institucional da Dra. Debora Lucia Seguro Danilovic.

O prazo de armazenamento do seu material biológico no Biorrepositório do Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular (LIM/25) será de acordo com o cronograma da pesquisa, sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o projeto de pesquisa "Sequenciamento de nova geração para detecção de mutações em carcinomas de células de Hürthle da tireoide"

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável, Dra. Debora Lucia Seguro Danilovic sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Data ____/ ___/____

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/___ /____

Assinatura da testemunha para pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data ____/ ___/

Assinatura do responsável pelo estudo

Gene	Cromos- somo	Casos	Programas	Posição genômica	Refe- rência	Alte- ração	Função gene	Tipo de variante	Troca de aminoácido
AGAP2	12	EXT4	Lofreq Mutect	58131556	-	Т	éxon	Inserção frameshift	AGAP2:NM_001122772:exon1:c.473_474insA:p.Arg158fs
		EXT2	Lofreq	58131527	G	А	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_001122772:exon1:c.C503T:p.Ser168Phe
			Mutect				-	sinônimo	
		EXT1	Lofreq	58125237	С	Т	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_001122772:exon10:c.G2057A:p.Arg686GIn,
		EXT3	Mutect					sinônimo	AGAP2:NM_014770:exon10:c.G1049A:p.Arg350Gln
		EXT1	Lancet	58124704	С	Т	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_001122772:exon11:c.G2178A:p.Met726lle,
			Lofreq					sinônimo	AGAP2:NM_014770:exon11:c.G1170A:p.Met390lle
		EXT1	Lancet	58124693	С	Т	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_001122772:exon11:c.G2189A:p.Arg730Gln,
			Lofreq					sinônimo	AGAP2:NM_014770:exon11:c.G1181A:p.Arg394GIn
		EXT1	Lofreq	58128124	Т	С	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_001122772:exon4:c.A1379G:p.Glu460Gly,
			Mutect					sinônimo	AGAP2:NM_014770:exon4:c.A371G:p.Glu124Gly
		EXT1	Lancet	58126193	G	Т	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_001122772:exon7:c.C1787A:p.Ala596Asp,
			Lofreq					sinônimo	AGAP2:NM_014770:exon7:c.C779A:p.Ala260Asp
		EXT6	Lofreq	58121328	G	А	éxon	SNP	AGAP2:NM_014770:exon16:c.C1827T:p.lle609lle,
			Mutect					sinônimo	AGAP2:NM_001122772:exon17:c.C2895T:p.lle965lle
		EXT2	Lofreq	58120890	G	А	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_014770:exon17:c.C2135T:p.Ala712Val,
			Mutect					sinônimo	AGAP2:NM_001122772:exon18:c.C3203T:p.Ala1068Val
		MIN2	Lofreq	58120962	А	G	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_014770:exon17:c.T2063C:p.Leu688Pro,
			Mutect					sinônimo	AGAP2:NM_001122772:exon18:c.T3131C:p.Leu1044Pro
		EXT2	Lancet	58120478	G	А	éxon	SNP não-	AGAP2:NM_014770:exon18:c.C2368T:p.His790Tyr,
			Lofreq					sinônimo	AGAP2:NM_001122772:exon19:c.C3436T:p.His1146Tyr
			Mutect						
AKT2	19	EXT1	Lancet	40748466	G	А	éxon	SNP não-	AKT2:NM_001243028:exon4:c.C230T:p.Ala77Val,
			Lofreq					sinônimo	AKT2:NM_001330511:exon4:c.C416T:p.Ala139Val,
									AKT2:NM_001243027:exon5:c.C230T:p.Ala77Val,
									AKT2:NM_001626:exon5:c.C416T:p.Ala139Val
		MIN2	Lofreq	40748467	С	Т	éxon	SNP não-	AKT2:NM_001243028:exon4:c.G229A:p.Ala77Thr,
			Mutect					sinônimo	AKT2:NM_001330511:exon4:c.G415A:p.Ala139Thr,
									AKT2:NM_001243027:exon5:c.G229A:p.Ala77Thr,
									AKT2:NM_001626:exon5:c.G415A:p.Ala139Thr

Anexo B – Variantes somáticas identificadas nos carcinomas de células de Hürthle chamadas por dois ou três programas de chamada de variantes

		EXT1	Lofreq Mutect	40741909	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	AKT2:NM_001330511:exon9:c.C934T:p.His312Tyr, AKT2:NM_001243028:exon10:c.C877T:p.His293Tyr, AKT2:NM_001243027:exon11:c.C877T:p.His293Tyr, AKT2:NM_001626:exon11:c.C1063T:p.His355Tyr
		EXT2 EXT6	Lancet Lofreq	40741857	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	AKT2:NM_001330511:exon9:c.C986T:p.Thr329Met, AKT2:NM_001243028:exon10:c.C929T:p.Thr310Met, AKT2:NM_001243027:exon11:c.C929T:p.Thr310Met, AKT2:NM_001626:exon11:c.C1115T:p.Thr372Met
ALK	2	EXT1	Lancet Lofreq Mutect	30143374	С	A	éxon	SNP não- sinônimo	ALK:NM_004304:exon1:c.G152T:p.Arg51Met
		EXT3	Lancet Lofreq	29416563	G	A	éxon	Stop codon	ALK:NM_004304:exon29:c.C4390T:p.Arg1464X
		EXT2	Lofreq Mutect	29416094	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	ALK:NM_004304:exon29:c.C4859T:p.Pro1620Leu
		EXT9	Lofreq Mutect	29606654	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	ALK:NM_004304:exon5:c.G1226A:p.Ser409Asn
AMER1	X	EXT1	Lancet Lofreq Mutect	63411030	С	A	éxon	SNP não- sinônimo	AMER1:NM_152424:exon2:c.G2137T:p.Asp713Tyr
		MIN1	Lancet Mutect	63410222	С	A	éxon	SNP não- sinônimo	AMER1:NM_152424:exon2:c.G2945T:p.Arg982Met
APC	5	EXT9	Lofreq Mutect	112162822	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	APC:NM_001127511:exon10:c.G1372A:p.Ala458Thr, APC:NM_000038:exon12:c.G1426A:p.Ala476Thr, APC:NM_001127510:exon13:c.G1426A:p.Ala476Thr
		EXT1	Lofreq Mutect	112173593	С	A	éxon	SNP não- sinônimo	APC:NM_001127511:exon14:c.C2248A:p.His750Asn, APC:NM_000038:exon16:c.C2302A:p.His768Asn, APC:NM_001127510:exon17:c.C2302A:p.His768Asn
		EXT2	Lancet Lofreq Mutect	112178319	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	APC:NM_001127511:exon14:c.C6974T:p.Ser2325Phe, APC:NM_000038:exon16:c.C7028T:p.Ser2343Phe, APC:NM_001127510:exon17:c.C7028T:p.Ser2343Phe
		EXT4	Lancet Lofreq Mutect	112178879	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	APC:NM_001127511:exon14:c.C7534T:p.Arg2512Trp, APC:NM_000038:exon16:c.C7588T:p.Arg2530Trp, APC:NM_001127510:exon17:c.C7588T:p.Arg2530Trp
		EXT2 EXT3	Lancet Lofreq	112173683	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	APC:NM_001127511:exon14:c.G2338A:p.Asp780Asn, APC:NM_000038:exon16:c.G2392A:p.Asp798Asn,

									APC:NM_001127510:exon17:c.G2392A:p.Asp798Asn
		EXT1	Lofreq	112173705	G	А	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon14:c.G2360A:p.Arg787GIn,
			Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon16:c.G2414A:p.Arg805GIn,
									APC:NM_001127510:exon17:c.G2414A:p.Arg805GIn
		MIN1	Lofreq	112174481	G	Т	éxon	Stop	APC:NM_001127511:exon14:c.G3136T:p.Glu1046X,
			Mutect					codon	APC:NM_000038:exon16:c.G3190T:p.Glu1064X,
									APC:NM_001127510:exon17:c.G3190T:p.Glu1064X
		EXT9	Lofreq	112176353	G	А	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon14:c.G5008A:p.Asp1670Asn,
			Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon16:c.G5062A:p.Asp1688Asn,
									APC:NM_001127510:exon17:c.G5062A:p.Asp1688Asn
		EXT3	Lancet	112176986	G	А	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon14:c.G5641A:p.Glu1881Lys,
			Lofreq					sinônimo	APC:NM_000038:exon16:c.G5695A:p.Glu1899Lys,
									APC:NM_001127510:exon17:c.G5695A:p.Glu1899Lys
		EXT1	Lofreq	112178919	G	А	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon14:c.G7574A:p.Arg2525Lys,
			Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon16:c.G7628A:p.Arg2543Lys,
									APC:NM_001127510:exon17:c.G7628A:p.Arg2543Lys
		MIN4	Lofreq	112154688	С	Т	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon8:c.C905T:p.Ser302Leu,
			Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon10:c.C959T:p.Ser320Leu,
									APC:NM_001127510:exon11:c.C959T:p.Ser320Leu
		EXT1	Lofreq	112154943	G	А	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon8:c.G1160A:p.Arg387GIn,
			Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon10:c.G1214A:p.Arg405Gln,
									APC:NM_001127510:exon11:c.G1214A:p.Arg405GIn
		EXT9	Lofreq	112157655	G	А	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon9:c.G1321A:p.Asp441Asn,
			Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon11:c.G1375A:p.Asp459Asn,
									APC:NM_001127510:exon12:c.G1375A:p.Asp459Asn
		EXT1	Lofreq	112179531	С	Т	éxon	SNP não-	APC:NM_001127511:exon14:c.C8186T:p.Pro2729Leu,
		MIN1	Mutect					sinônimo	APC:NM_000038:exon16:c.C8240T:p.Pro2747Leu,
									APC:NM_001127510:exon17:c.C8240T:p.Pro2747Leu
AXIN1	16	EXT1	Lancet	347883	GTGG	-	éxon	Deleção	AXIN1:NM_003502:exon6:c.1612_1623del:p.538_541del,
			Lofreq		TGGA			não-	AXIN1:NM_181050:exon6:c.1612_1623del:p.538_541del
					CGTG			tramesnitt	
AXIN2	17	EXT4	Lofreq	63554666	-	С	éxon	Inserção	AXIN2:NM_004655:exon2:c.72_73insG:p.Pro25fs
			Mutect					frameshift	
		EXT1	Lancet	63553966	G	А	éxon	SNP não-	AXIN2:NM_004655:exon2:c.C773T:p.Thr258Met
			Lofreq					sinônimo	

		MIN3	Lofreq	63545658	С	Т	éxon	SNP não-	AXIN2:NM_004655:exon3:c.G936A:p.Met312IIe
		EVT2	Lofrog	63533123	C		óxon	SND não	AVING:NM 004655:0x007:0 C1771A:0 Alo501Thr
		EATZ	Mutect	00000120	C		exon	SINF 11a0-	AAINZ.NM_004055.ex011.0.01771A.p.Ala591111
CCDC6	10	EXT2	Lofreg	61612372	G	Δ	éxon	SNP não-	CCDC6:NM 005/36:exon2:c C302T:n Ala131\/al
CCDCO	10	LAIZ	Mutect	0.0.2012	0	~	exon	sinônimo	
CSNK1A1	5	EXT1	Lofreg	148885091	C	т	éxon	SNP não-	CSNK1A1:NM_001271741:exon9:c G925A:p Ala309Thr
	5		Mutect		U	•	CAON	sinônimo	CSNK1A1:NM_001271742:exon9:c.G742A:p.Ala248Thr.
			Wateet					311011110	CSNK1A1:NM_001892:exon9:c.G925A:p.Ala309Thr,
									CSNK1A1:NM_001025105:exon10:c.G1009A:p.Ala337Thr
CSNK1D	17	EXT1	Lofreq	80209373	С	Т	éxon	SNP não-	CSNK1D:NM_001893:exon6:c.G767A:p.Arg256His,
			Mutect					sinônimo	CSNK1D:NM_139062:exon6:c.G767A:p.Arg256His
		EXT2	Lofreq	80209271	С	Т	éxon	Stop	CSNK1D:NM_001893:exon6:c.G869A:p.Trp290X,
			Mutect					codon	CSNK1D:NM_139062:exon6:c.G869A:p.Trp290X
CSNK1E	22	EXT1	Lofreq	38698874	С	Т	éxon	SNP não-	CSNK1E:NM_001894:exon4:c.G328A:p.Asp110Asn,
			Mutect					sinônimo	CSNK1E:NM_152221:exon4:c.G328A:p.Asp110Asn,
									CSNK1E:NM_001289912:exon8:c.G328A:p.Asp110Asn
		EXT1	Lofreq	38690408	G	А	éxon	SNP não-	CSNK1E:NM_001894:exon8:c.C1018T:p.Arg340Trp,
			Mutect					sinônimo	CSNK1E:NM_152221:exon8:c.C1018T:p.Arg340Trp,
									CSNK1E:NM_001289912:exon12:c.C1018T:p.Arg340Trp
CTNNB1	3	EXT1	Lofreq	41266885	С	Т	éxon	SNP não-	CTNNB1:NM_001098209:exon5:c.C556T:p.His186Tyr,
			Mutect					sinônimo	CTNNB1:NM_001098210:exon5:c.C556T:p.His186Tyr,
									CTNNB1:NM_001904:exon5:c.C556T:p.His186Tyr,
									CTNNB1:NM_001330729:exon6:c.C535T:p.His179Tyr
CYLD	16	EXT1	Lofreq	50828322	G	А	éxon	SNP não-	CYLD:NM_001042355:exon17:c.G2660A:p.Ser887Asn,
			Mutect					sinônimo	CYLD:NM_001042412:exon17:c.G2660A:p.Ser887Asn,
									CYLD:NM_015247:exon19:c.G2669A:p.Ser890Asn
		EXT1	Lofreq	50788288	С	Т	éxon	SNP não-	CYLD:NM_001042355:exon5:c.C866T:p.Ala289Val,
			Mutect					sinônimo	CYLD:NM_001042412:exon5:c.C866T:p.Ala289Val,
									CYLD:NM_015247:exon6:c.C866T:p.Ala289Val
		EXT1	Lofreq	50813729	G	А	éxon	SNP não-	CYLD:NM_001042355:exon8:c.G1283A:p.Gly428Glu,
			Mutect					sinônimo	CYLD:NM_001042412:exon8:c.G1283A:p.Gly428Glu,
									CYLD:NM_015247:exon10:c.G1292A:p.Gly431Glu
DICER1	14	EXT2	Lofreq	95572113	G	А	éxon	SNP não-	DICER1:NM_001195573:exon18:c.C2995T:p.Leu999Ph
			Mutect					sinônimo	DICER1:NM_001271282:exon19:c.C2995T:p.Leu999Phe
									DICER1:NM_001291628:exon19:c.C2995T:p.Leu999Phe
									DICER1:NM_1//438:exon19:c.C29951:p.Leu999Phe

						-			
									DICER1:NM_030621:exon21:c.C2995T:p.Leu999Phe
		EXT2	Lofreq	95598899	С	Т	éxon	SNP não-	DICER1:NM_001195573:exon2:c.G260A:p.Gly87Glu,
			Mutect					sinônimo	DICER1:NM_001271282:exon3:c.G260A:p.Gly87Glu,
									DICER1:NM_001291628:exon3:c.G260A:p.Gly87Glu,
									DICER1:NM_177438:exon3:c.G260A:p.Gly87Glu,
									DICER1:NM_030621:exon5:c.G260A:p.Gly87Glu
		EXT2	Lancet	95562461	С	Т	éxon	SNP não-	DICER1:NM_001195573:exon22:c.G4796A:p.Arg1599GIn,
			Lofreq					sinônimo	DICER1:NM_001271282:exon23:c.G4796A:p.Arg1599GIn,
									DICER1:NM_001291628:exon23:c.G4796A:p.Arg1599GIn,
									DICER1:NM_177438:exon23:c.G4796A:p.Arg1599GIn,
			-		-				DICER1:NM_030621:exon25:c.G4796A:p.Arg1599GIn
		EXT1	Lancet	95556997	С	Т	éxon	SNP não-	DICER1:NM_001195573:exon25:c.G5444A:p.Arg1815GIn
			Lofreq					sinônimo	
		EXT1	Lofreq	95557551	С	Т	éxon	SNP não-	DICER1:NM_001271282:exon25:c.G5516A:p.Arg1839Gln,
			Mutect					sinônimo	DICER1:NM_001291628:exon25:c.G5516A:p.Arg1839GIn,
									DICER1:NM_177438:exon25:c.G5516A:p.Arg1839Gin,
DIGIG	40	EVTO	1	E4076106	0	- -			DICER1:NM_030621:ex0n27:c.G5516A:p.Arg1839Gin
DKK1	10	EX19	Lotreq	54076106	C	1	exon	SNP nao-	DKK1:NM_012242:exon3:c.C4581:p.1nf153ile
D) (()			Mutect	4070700	-		,	sinonimo	
DVL1	1	EX11	Lancet	12/3/33	G		exon	SNP nao-	DVL1:NM_001330311:exon13:c.C1423A:p.Leu4/5Met,
			Lofreq	4070400	-		,	sinonimo	DVL1:NM_004421:exon13:c.C1348A:p.Leu450Met
		EX13	Lancet	1273488	G	A	exon	SNP nao-	DVL1:NM_001330311:exon14:c.C15831:p.Pro528Leu,
			Lofreq		-			sinônimo	DVL1:NM_004421:exon14:c.C1508T:p.Pro503Leu
DVL2	17	EXT4	Lofreq	7134091	С	G	éxon	SNP não-	DVL2:NM_004422:exon2:c.G220C:p.Asp74His
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lancet	7132938	С	Т	éxon	SNP não-	DVL2:NM_004422:exon6:c.G716A:p.Arg239GIn
		EXT9	Lofreq					sinônimo	
			Mutect						
ERBB2	17	EXT1	Lofreq	37866422	G	А	éxon	SNP não-	ERBB2:NM_001289937:exon6:c.G727A:p.Gly243Ser,
			Mutect					sinônimo	ERBB2:NM_004448:exon6:c.G727A:p.Gly243Ser,
									ERBB2:NM_001005862:exon9:c.G637A:p.Gly213Ser,
									ERBB2:NM_001289938:exon9:c.G637A:p.Gly213Ser,
									ERBB2:NM_001289936:exon10:c.G682A:p.Gly228Ser
ETV6	12	EXT4	Lancet	12006408	С	Т	éxon	SNP não-	ETV6:NM_001987:exon4:c.C376T:p.Pro126Ser
			Lofreq					sinônimo	
FAT1	4	EXT4	Lancet	187542752	G	А	éxon	SNP não-	FAT1:NM_005245:exon10:c.C4988T:p.Ala1663Val
			Lofreq					sinônimo	

		EXT3	Lancet Lofreg	187539996	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon10:c.G7744A:p.Val2582Met
		EXT2	Lofreq	187532836	G	A	éxon	SNP não-	FAT1:NM_005245:exon14:c.C9557T:p.Pro3186Leu
		EXT1	Lofreq Mutect	187525086	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon19:c.G10594A:p.Asp3532Asn
		EXT1	Lofreq Mutect	187628139	С	Т	éxon	Stop codon	FAT1:NM_005245:exon2:c.G2843A:p.Trp948X
		EXT2	Lancet Lofreq	187517814	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon25:c.G12880A:p.Gly4294Arg
		EXT2	Lancet Lofreq	187557908	С	Т		SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon5:c.G3803A:p.Arg1268GIn
		EXT1	Lofreq Mutect	187557879	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon5:c.G3832A:p.Asp1278Asn
		EXT2	Lofreq Mutect	187549821	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon8:c.G4420A:p.Glu1474Lys
		MIN1	Lancet Lofreq	187541042	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	FAT1:NM_005245:exon10:c.C6698T:p.Thr2233lle
FBXW7	4	EXT4	Lofreq Mutect	153259087	С	-	éxon	Deleção frameshift	FBXW7:NM_001013415:exon4:c.374delG:p.Ser125fs, FBXW7:NM_018315:exon4:c.488delG:p.Ser163fs, FBXW7:NM_033632:exon5:c.728delG:p.Ser243fs, FBXW7:NM_001349798:exon7:c.728delG:p.Ser243fs
FGFR3	4	EXT2 EXT9	Lancet Lofreq	1801059	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FGFR3:NM_000142:exon3:c.C188T:p.Pro63Leu, FGFR3:NM_001163213:exon3:c.C188T:p.Pro63Leu, FGFR3:NM_022965:exon3:c.C188T:p.Pro63Leu
		EXT3	Lancet Lofreq	1806087	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	FGFR3:NM_000142:exon9:c.C1106T:p.Ala369Val, FGFR3:NM_001163213:exon9:c.C1112T:p.Ala371Val
		EXT1	Lofreq Mutect	1807877	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	FGFR3:NM_022965:exon12:c.G1600A:p.Asp534Asn, FGFR3:NM_000142:exon14:c.G1936A:p.Asp646Asn, FGFR3:NM_001163213:exon14:c.G1942A:p.Asp648Asn
		EXT9	Lancet Lofreq Mutect	1808316	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	FGFR3:NM_022965:exon14:c.G1738A:p.Gly580Ser, FGFR3:NM_000142:exon16:c.G2074A:p.Gly692Ser, FGFR3:NM_001163213:exon16:c.G2080A:p.Gly694Ser
		EXT1	Lofreq Mutect	1807777	G	A	splicing	-	-

FLT4	5	EXT2	Lancet	180052870	G	А	éxon	SNP não-	FLT4:NM_002020:exon10:c.C1420T:p.Leu474Phe,
			Lotreq	400040047	-		,	sinonimo	FLT4:NM_182925:exon10:c.C14201:p.Leu474Pne
		EX11	Lancet	180048817	C	A	exon	SNP nao-	FL14:NM_002020:exon13:c.G17451:p.Ser582lle,
			Lofreq					sinônimo	FLT4:NM_182925:exon13:c.G1745T:p.Ser582lle
		EXT1	Lancet	180047630	GAG	-	éxon	Deleção	FLT4:NM_002020:exon16:c.2383_2385del:p.795_795del,
			Lofreq					nao- framachift	FLT4:NM_182925:exon16:c.2383_2385del:p.795_795del
		EXT1	Lofreg	180057603	C	G	évon	SNP não-	FLT4:NIM_002020:exon3:c G352C:n Ala118Pro
			Mutect		U	0	CAUL	sinônimo	FLT4:NM_182925:exon3:c G352C:p.Ala118Pro
FOX01	13	EXT1	Lofreg	41239821	C	т	évon	SNP não-	EOXO1:NM_002015:evon1:c G520A:n Ala177Thr
10/01	15		Mutect		U	1	CAUL	sinônimo	
	Q	FXTQ	Lofreg	90894260	G	Δ	éxon	SNP não-	FZD1:NM_003505:exon1:c G65A:n Cvs22Tvr
1201	J	LXIS	Mutect		Ŭ	~	CAON	sinônimo	
GNAS	20	FXT1	Lofreg	57430264	G	Α	éxon	SNP não-	GNAS:NM_001077490:exon1:c G1757A:n Cvs586Tvr
0////0	20	2/(11	Mutect		Ŭ		0, OII	sinônimo	GNAS:NM_001309883:exon1:c G1757A:p Cvs586Tvr
			matoot						GNAS:NM_080425:exon1:c.G1944A:p.Met648lle
		EXT4	Lofrea	57415201	С	Т	éxon	SNP não-	GNAS:NM 016592:exon1:c.C40T:p.Arg14Cvs
			Mutect					sinônimo	
GSK3B	3	EXT1	Lancet	119634960	С	Т	éxon	SNP não-	GSK3B:NM_001146156:exon5:c.G539A:p.Arg180GIn,
			Lofreq					sinônimo	GSK3B:NM_002093:exon5:c.G539A:p.Arg180GIn
HNF1A	12	EXT2	Lofreq	121426811	С	Т	éxon	SNP não-	HNF1A:NM_000545:exon2:c.C502T:p.Arg168Cys,
			Mutect					sinônimo	HNF1A:NM_001306179:exon2:c.C502T:p.Arg168Cys
HRAS	11	EXT1	Lofreq	533894	G	Т	éxon	SNP não-	HRAS:NM_001130442:exon3:c.C162A:p.Asp54Glu,
			Mutect					sinônimo	HRAS:NM_005343:exon3:c.C162A:p.Asp54Glu,
									HRAS:NM_176795:exon3:c.C162A:p.Asp54Glu
IRS1	2	EXT2	Lofreq	227661104	G	А	éxon	SNP não-	IRS1:NM_005544:exon1:c.C2351T:p.Ala784Val
			Mutect					sinônimo	
		EXT2	Lancet	227660745	С	G	éxon	SNP não-	IRS1:NM_005544:exon1:c.G2710C:p.Asp904His
			Lofreq					sinônimo	
			Mutect						
		EXT1	Lofreq	227660171	С	Т	éxon	SNP não-	IRS1:NM_005544:exon1:c.G3284A:p.Cys1095Tyr
			Mutect		_			sinônimo	
IRS2	13	EXT2	Lofreq	110437791	G	A	éxon	SNP não-	IRS2:NM_003749:exon1:c.C610T:p.Pro204Ser
		_	Mutect					sinônimo	
		EXT2	Lancet	110436450	С	T	éxon	SNP não-	IRS2:NM_003749:exon1:c.G1951A:p.Asp651Asn
			Lofreq					sinônimo	

		EXT9	Lofreq Mutect	110435457	С	Т	éxon	SNP não-	IRS2:NM_003749:exon1:c.G2944A:p.Asp982Asn
		EXT3		110436111	C	т	évon	SNP não-	IRS2:NM 003749:exon1:c G2290A:n Glv764Arg
		LXIS	Mutect		Ŭ		CXOII	sinônimo	1.02.100_000740.00011.0.022007.p.0197047.ig
IRS4	Х	EXT1	Lofreq	107977986	С	Т	éxon	SNP não-	IRS4:NM_003604:exon1:c.G1589A:p.Arg530GIn
			Mutect		_			sinônimo	
JAK2	9	EXT3	Lancet	5054630	С	Т	éxon	Stop	JAK2:NM_001322204:exon4:c.C235T:p.Arg79X,
			Lofreq					codon	JAK2:NM_001322195:exon6:c.C682T:p.Arg228X,
									JAK2:NM_001322196:exon6:c.C6821:p.Arg228X,
									JAK2:NM_001322194:exon7:c.C6821:p.Arg228X,
		EVT0	1	55072052	0	•			JAK2:NM_004972:exon7:c.C6821:p.Arg228X
KDR	4	EX13	Lancet	55973953	G	А	exon	SNP nao-	KDR:NM_002253:exon10:c.C13631:p.His4551yr
		EVT0	Lofreq	55056045	-	0		SINONIMO	
		EXIZ	Lotreq	55956215	1	C	exon	SNP nao-	KDR:NM_002253:exon23:c.A3100G:p.lle1034Val
		EVT0	Mutect	55055110	-	+ -		SINONIMO	
		EX12	Lofreq	55955112	C	I	exon	SNP nao-	KDR:NM_002253:exon26:c.G3433A:p.Gly1145Arg
		EVT0	Mutect	55040440	-	-		SINONIMO	
		EXI3	Lancet	55946115	C	1	exon	SNP hao-	KDR:NM_002253:exon30:c.G4066A:p.vai1356lie
		EVTO	Lofreq	55091554	<u> </u>	•	<i></i>	SINONIMO	
		EXIZ	Lorreq	55961554	G	А	exon	SNP hao-	KDR:NM_002253:exon4:c.C3831:p.Ser128Pne
			Mutect	55076900		•		SINONIMO	
		EX14	Lorreq	55976699	G	A	exon	SNP hao-	KDR:NM_002253:exon8:c.C10131:p.Ser338Phe
		EVT4	Mutect	55090202	<u> </u>	-		sinonimo	
		EXIT	Lorreq	55960292	C		splicing	-	-
KFAP1	19	EXT1		10610111	Т	Δ	éxon	SNP não-	KEAP1:NM 012289:exon2:c A599T:n His2001 eu
	13		Lofreg		1		CAUL	sinônimo	KEAP1:NM 203500:exon2:c A599T:p.His200Leu
			Mutect					311011110	REAT 1.100_200000.0x012.0.70001.p.1110200200
		FXT1	Lancet	10602341	G	Α	éxon	SNP não-	KEAP1:NM_012289:exon3:c C1237T:p Arg413Cvs
			Lofreg		Ŭ	~	0X011	sinônimo	KEAP1:NM_203500:exon3:c C1237T:p Arg413Cvs
			Mutect					Childrando	
		EXT1	Lancet	10602859	С	Т	éxon	SNP não-	KEAP1:NM 012289:exon3:c.G719A:p.Arg240His.
			Lofrea		-	•	5	sinônimo	KEAP1:NM 203500:exon3:c.G719A:p.Ara240His
KIT	4	MIN7	Lofreg	55593448	G	A	éxon	SNP não-	KIT:NM 000222:exon10:c.G1605A:p.Met535Ile
	·		Mutect		Ŭ		5,011	sinônimo	KIT:NM_001093772;exon10;c.G1593A:p.Met531Ile

		EXT9	Lofreq	55595566	С	Т	éxon	SNP não-	KIT:NM_000222:exon14:c.C2056T:p.Arg686Cys,
			Mutect					sinônimo	KIT:NM_001093772:exon14:c.C2044T:p.Arg682Cys
		EXT3	Lancet	55604715	G	А	éxon	SNP não-	KIT:NM_000222:exon21:c.G2923A:p.Asp975Asn,
			Lofreq					sinônimo	KIT:NM_001093772:exon21:c.G2911A:p.Asp971Asn
		EXT3	Lofreq	55592180	G	А	éxon	SNP não-	KIT:NM_000222:exon9:c.G1504A:p.Ala502Thr,
			Mutect					sinônimo	KIT:NM_001093772:exon9:c.G1504A:p.Ala502Thr
KRAS	12	MIN5	Lancet	25398285	С	А	éxon	SNP não-	KRAS:NM_004985:exon2:c.G34T:p.Gly12Cys,
			Lofreq					sinônimo	KRAS:NM_033360:exon2:c.G34T:p.Gly12Cys
LRP5	11	EXT2	Lancet	68178944	G	А	éxon	SNP não-	LRP5:NM_001291902:exon11:c.G616A:p.Val206Met,
			Lofreq					sinônimo	LRP5:NM_002335:exon11:c.G2359A:p.Val787Met
		EXT2	Lofreq	68192643	G	А	éxon	SNP não-	LRP5:NM_001291902:exon15:c.G1567A:p.Glu523Lys,
			Mutect					sinônimo	LRP5:NM_002335:exon15:c.G3310A:p.Glu1104Lys
		EXT1	Lancet	68201139	G	Т	éxon	SNP não-	LRP5:NM 001291902:exon18:c.G2090T:p.Trp697Leu,
			Lofreq					sinônimo	LRP5:NM_002335:exon18:c.G3833T:p.Trp1278Leu
			Mutect						
		EXT3	Lancet	68207296	G	А	éxon	SNP não-	LRP5:NM 001291902:exon21:c.G2657A:p.Arg886GIn,
			Lofreq					sinônimo	LRP5:NM 002335:exon21:c.G4400A:p.Arg1467GIn
		EXT3	Lofreg	68131300	С	T	éxon	SNP não-	LRP5:NM 002335:exon4:c.C772T:p.Arg258Cvs
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofreg	68133167	G	А	éxon	SNP não-	LRP5:NM 002335:exon5:c.G1012A:p.Ala338Thr
			Mutect					sinônimo	
		MIN7	Lofreg	68154096	С	T	éxon	SNP não-	LRP5:NM 002335:exon6:c.C1328T:p.Thr443Met
			Mutect					sinônimo	
LRP6	12	EXT1	Lofreg	12311897	С	T	éxon	SNP não-	LRP6:NM 002336:exon12:c.G2657A:p.Arg886GIn
_			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofrea	12284919	С	Т	éxon	SNP não-	LRP6:NM 002336:exon18:c.G3806A:p.Arg1269GIn
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofreg	12397292	С	T	éxon	SNP não-	LRP6:NM 002336:exon2:c.G353A:p.Arg118GIn
			Mutect		_			sinônimo	
		MIN4	Lancet	12277563	G	А	éxon	Stop	LRP6:NM 002336:exon22:c.C4483T:p.Ara1495X
			Mutect		-			codon	
MAP2K2	19	EXT1	Lofrea	4099337	С	G	éxon	SNP não-	MAP2K2:NM 030662:exon7:c.G781C:p.Ala261Pro
			Mutect		-	-		sinônimo	
MET	7	EXT4	Lancet	116339238	G	А	éxon	SNP não-	MET:NM 000245:exon2:c.G100A:p.Glu34Lvs.
			Lofrea		-			sinônimo	MET:NM_001127500:exon2:c.G100A:p.Glu34Lvs.
									MET:NM 001324401:exon2:c.G100A:p.Glu34Lvs

		EXT1	Lofreq	116412010	G	А	éxon	SNP não-	MET:NM_001324402:exon13:c.G1705A:p.Glu569Lys,
			Mutect					sinônimo	MET:NM_000245:exon14:c.G2995A:p.Glu999Lys,
									MET:NM_001127500:exon14:c.G3049A:p.Glu1017Lys
MIR146A	5	EXT1	Lofreq	159912418	С	G	RNA	-	-
			Mutect				nao-		
							cante		
MTOR	1	EXT1	Lancet	11269392	С	Т	éxon	SNP não-	MTOR:NM_004958:exon25:c.G3778A:p.Val1260lle
			Lofreq					sinônimo	
		EXT3	Lofreq	11316113	С	Т	éxon	SNP não-	MTOR:NM_004958:exon5:c.G641A:p.Arg214His
			Mutect					sinônimo	
		EXT4	Lofreq	11177067	С	Т	éxon	SNP não-	MTOR:NM_004958:exon50:c.G7010A:p.Gly2337Glu
			Mutect					sinônimo	
		EXT2	Lofreq	11313928	С	Т	éxon	SNP não-	MTOR:NM_004958:exon6:c.G808A:p.Glu270Lys
			Mutect					sinônimo	
		EXT5	Lofreq	11307708	G	А	éxon	SNP não-	MTOR:NM_004958:exon8:c.C1199T:p.Ala400Val
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofreq	11316985	С	Т	splicing	-	-
			Mutect						
NDUFA13	19	EXT1	Lofreq	19627133	G	А	éxon	SNP não-	NDUFA13:NM_015965:exon1:c.G86A:p.Gly29Glu
			Mutect					sinônimo	
NFKB1	4	EXT1	Lofreq	103533247	С	Т	éxon	SNP não-	NFKB1:NM_001165412:exon21:c.C2396T:p.Ser799Phe,
			Mutect					sinônimo	NFKB1:NM_001319226:exon21:c.C2396T:p.Ser799Phe,
									NFKB1:NM_003998:exon21:c.C2399T:p.Ser800Phe
NOTCH1	9	EXT1	Lofreq	139407560	С	Т	éxon	SNP não-	NOTCH1:NM_017617:exon15:c.G2380A:p.Glu794Lys
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofreq	139404399	С	G	éxon	SNP não-	NOTCH1:NM_017617:exon18:c.G2755C:p.Gly919Arg
			Mutect			_		sinônimo	
		EXT1	Lofreq	139402444	G	A	éxon	SNP não-	NOTCH1:NM_017617:exon21:c.C3473T:p.Ala1158Val
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofreq	139417590	С	T	éxon	SNP não-	NOTCH1:NM_017617:exon4:c.G454A:p.Gly152Ser
			Mutect					sinônimo	
NOTCH2	1	EXT1	Lofreq	120466375	С	A	éxon	SNP não-	NOTCH2:NM_024408:exon26:c.G4744T:p.Asp1582Tyr
			Mutect					sinônimo	
		EXT1	Lofreq	120464968	G	A	éxon	Stop	NOTCH2:NM_024408:exon28:c.C5104T:p.Arg1702X
			Mutect					codon	

		EXT2	Lofreq	120458809	G	А	éxon	SNP não-	NOTCH2:NM_024408:exon34:c.C6536T:p.Ser2179Leu
			Mutect					sinônimo	
		EXT3	Lofreq	120458347	G	А	éxon	SNP não-	NOTCH2:NM_024408:exon34:c.C6998T:p.Ala2333Val
			Mutect					sinônimo	
NRAS	1	MIN6	Lancet	115256529	Т	С	éxon	SNP não-	NRAS:NM_002524:exon3:c.A182G:p.Gln61Arg
		MIN8	Lofreq					sinônimo	
			Mutect						
		MIN3	Lancet	115256530	G	Т	éxon	SNP não-	NRAS:NM_002524:exon3:c.C181A:p.Gln61Lys
			Lofreq					sinônimo	
NTRK1	1	EXT1	Lofreq	156849848	С	Т	éxon	SNP não-	NTRK1:NM_001012331:exon15:c.C2086T:p.Arg696Cys,
			Mutect					sinônimo	NTRK1:NM_001007792:exon16:c.C1996T:p.Arg666Cys,
									NTRK1:NM_002529:exon16:c.C2104T:p.Arg702Cys
NTRK3	15	EXT1	Lofreq	88476265	С	Т	éxon	SNP não-	NTRK3:NM_001320135:exon14:c.G1573A:p.Gly525Arg,
			Mutect					sinônimo	NTRK3:NM_001243101:exon15:c.G1843A:p.Gly615Arg,
									NTRK3:NM_001012338:exon16:c.G1867A:p.Gly623Arg,
									NTRK3:NM_002530:exon16:c.G1867A:p.Gly623Arg
NUMB	14	EXT1	Lofreq	73746072	G	А	éxon	SNP não-	NUMB:NM_003744:exon11:c.C1124T:p.Pro375Leu
			Mutect					sinônimo	,NUMB:NM_001005743:exon12:c.C1157T:p.Pro386Leu
PDGFRA	4	EXT1	Lofreq	55127295	С	Т	éxon	SNP não-	PDGFRA:NM_001347827:exon3:c.C83T:p.Pro28Leu,
			Mutect					sinônimo	PDGFRA:NM_001347829:exon3:c.C83T:p.Pro28Leu,
									PDGFRA:NM_001347830:exon3:c.C122T:p.Pro41Leu,
									PDGFRA:NM_006206:exon3:c.C83T:p.Pro28Leu,
									PDGFRA:NM_001347828:exon4:c.C158T:p.Pro53Leu
		EXT1	Lofreq	55156692	G	Т	éxon	SNP não-	PDGFRA:NM_001347829:exon22:c.G3093T:p.Glu1031Asp,
			Mutect					sinônimo	PDGFRA:NM_001347830:exon22:c.G3132T:p.Glu1044Asp,
									PDGFRA:NM_006206:exon22:c.G30931:p.Glu1031Asp,
PDGERB	5	EXT1	Lofreg	149515195	C	Δ	éxon	SNP não-	PDGERR:NM_002609;evon3;c G287T;p Glv96V;al
1 20112	5		Mutect		Ŭ	~	CXOII	sinônimo	
PIK3CA	3	FXT1	Lofreg	178951934	С	Т	éxon	SNP não-	PIK3CA:NM_006218:exon21:c C2989T:n Leu997Phe
	Ũ	-///	Mutect		Ũ		o, con	sinônimo	
PIK3CG	7	EXT1	Lofrea	106545677	С	Т	éxon	SNP não-	PIK3CG:NM_001282426:exon11:c.C3154T:p.Arg1052Trp,
			Mutect		•	•	encer:	sinônimo	PIK3CG:NM_001282427:exon11:c.C3154T:p.Arg1052Trp,
									PIK3CG:NM_002649:exon11:c.C3154T:p.Arg1052Trp
		EXT1	Lofreq	106513003	С	T	éxon	SNP não-	PIK3CG:NM_001282426:exon3:c.C2017T:p.His673Tyr,
			Mutect					sinônimo	PIK3CG:NM_001282427:exon3:c.C2017T:p.His673Tyr,
						1			PIK3CG:NM_002649:exon3:c.C2017T:p.His673Tyr

PIK3R4	3	EXT9	Lofreq Mutect	130405270	G	A	splicing	-	-
		EXT2	Lofreq Mutect	130427174	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	PIK3R4:NM_014602:exon10:c.G2494A:p.Asp832Asn
		MIN2	Lofreq Mutect	130464014	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	PIK3R4:NM_014602:exon2:c.G49A:p.Glu17Lys
		EXT1	Lofreq Mutect	130452661	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	PIK3R4:NM_014602:exon4:c.C1181T:p.Ser394Phe
PIK3R5	17	EXT1	Lofreq Mutect	8812386	С	A	splicing	-	-
		EXT1	Lancet Lofreq Mutect	8812386	C	A	splicing	-	-
PPP2R1A	19	EXT1	Lofreq Mutect	52723460	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	PPP2R1A:NM_014225:exon11:c.G1321A:p.Glu441Lys
PTEN	10	MIN1	Lofreq Mutect	89692838	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	PTEN:NM_000314:exon5:c.C322T:p.Leu108Phe, PTEN:NM_001304717:exon6:c.C841T:p.Leu281Phe
RET	10	EXT1	Lofreq Mutect	43620426	G	A	éxon	SNP não- sinônimo	RET:NM_020630:exon18:c.G3035A:p.Arg1012Lys, RET:NM_020975:exon18:c.G3035A:p.Arg1012Lys
		EXT1	Lofreq Mutect	43602002	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	RET:NM_020630:exon5:c.C1046T:p.Ala349Val, RET:NM_020975:exon5:c.C1046T:p.Ala349Val
RICTOR	5	EXT1	Lancet Lofreq	38950237	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	RICTOR:NM_001285439:exon31:c.G3713A:p.Arg1238Gln, RICTOR:NM_001285440:exon31:c.G2858A:p.Arg953Gln, RICTOR:NM_152756:exon31:c.G3713A:p.Arg1238Gln
ROS1	6	EXT8	Lancet Lofreq	117704557	A	G	éxon	SNP não- sinônimo	ROS1:NM_002944:exon16:c.T2419C:p.Tyr807His
SFRP1	8	EXT2	Lofreq Mutect	41166411	С	Т	éxon	SNP não- sinônimo	SFRP1:NM_003012:exon1:c.G268A:p.Val90Met
SLC5A5	19	EXT3	Lofreq Mutect	17983490	С	Т	splicing	-	-
		EXT1	Lofreq Mutect	17999268	G	A	splicing	-	-
		EXT1	Lancet Lofreq Mutect	17985541	G	A	splicing	-	-

STK11	19	MIN2	Lofreq	1223156	G	А	éxon	SNP não-	STK11:NM_000455:exon8:c.G1093A:p.Asp365Asn
			Mutect					sinonimo	
Promotor	5	EXT2	Lofreq	1295594	G	A	pro-mo-	-	-
do TERT			Mutect				tor		
		EXT9	Lofreq	1295494	Α	G	pro-mo-	-	-
			Mutect				tor		
TIMM44	19	EXT1	Lofreq	7998412	G	Α	éxon	Stop	TIMM44:NM_006351:exon7:c.C727T:p.Gln243X
			Mutect					codon	
		MIN2	Lofreq	7997616	С	Т	éxon	SNP não-	TIMM44:NM_006351:exon9:c.G883A:p.Glu295Lys
			Mutect					sinônimo	
TRIM62	1	EXT1	Lofreq	33625445	G	Α	éxon	SNP não-	TRIM62:NM_001330483:exon3:c.C242T:p.Ala81Val,
			Mutect					sinônimo	TRIM62:NM_018207:exon3:c.C605T:p.Ala202Val
TSC1	9	EXT1	Lofreq	135797337	С	Т	éxon	SNP não-	TSC1:NM_001162427:exon6:c.G379A:p.Val127lle,
			Mutect					sinônimo	TSC1:NM_000368:exon7:c.G532A:p.Val178lle,
									TSC1:NM_001162426:exon7:c.G532A:p.Val178lle
TSHR	14	EXT2	Lofreq	81528489	С	Т	splicing	-	-
			Mutect						
ZNRF3	22	EXT3	Lofreq	29439419	G	Α	splicing	-	-
			Mutect						
		EXT5	Lancet	29446403	С	Т	éxon	SNP não-	ZNRF3:NM_001206998:exon8:c.C2234T:p.Pro745Leu,
			Lofreq					sinônimo	ZNRF3:NM_032173:exon8:c.C1934T:p.Pro645Leu

9. Referências

- 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 [Internet]. 2016;26(1):1–133. Available from: http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2015.0020
- Hagag P, Strauss S, Weiss M. Role of Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration Biopsy in Evaluation of Nonpalpable Thyroid Nodules. Thyroid [Internet]. 1998 Nov;8(11):989–95. Available from: http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/thy.1998.8.989
- Veiga LHS, Neta G, Aschebrook-Kilfoy B, Ron E, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997-2008. Thyroid [Internet]. 2013;23(6):748–57. Available from:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3675840&tool= pmcentrez&rendertype=abstract

- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. Cancer. 1998;83(12):2638–48.
- Lloyd R, Osamura R, Kloppel G. WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. 4^a. Lyon, France: IARC; 2017.
- M A. Pathologish-anatomische Beiträge zur Kenntnis des Morbus Basedowii, insbesondere über die dabei auftretende Muskelerkrankung. Dtsch Arch Klin Med. 1898;61:118–86.
- Auger M. Hürthle cells in fine-needle aspirates of the thyroid: A review of their diagnostic criteria and significance. Cancer Cytopathol. 2014;122(4):241–9.

- Cannon J. The Significance of Hurthle Cells in Thyroid Disease.
 Oncologist. 2011;16(10):1380–7.
- Ahmadi S, Stang M, Jiang XS, Sosa JA. Hürthle cell carcinoma: Current perspectives. Onco Targets Ther. 2016;9:6873–84.
- Ganly I, Filho JR, Eng S, Ghossein R, Morris LGT, Liang Y, et al. Genomic dissection of hurthle cell carcinoma reveals a unique class of thyroid malignancy. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(5):962–72.
- Xu B, Ghossein R. Evolution of the histologic classification of thyroid neoplasms and its impact on clinical management. Eur J Surg Oncol [Internet]. 2018 Mar;44(3):338–47. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S074879831730478X
- 12. Goffredo P, Roman SA, Sosa JA. Hurthle cell carcinoma: A populationlevel analysis of 3311 patients. Cancer. 2013;119(3):504–11.
- Chindris A-M, Casler JD, Bernet VJ, Rivera M, Thomas C, Kachergus JM, et al. Clinical and Molecular Features of Hürthle Cell Carcinoma of the Thyroid. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(January):55–62.
- Ganly I, Makarov V, Deraje S, Dong YY, Reznik E, Seshan V, et al. Integrated Genomic Analysis of Hürthle Cell Cancer Reveals Oncogenic Drivers, Recurrent Mitochondrial Mutations, and Unique Chromosomal Landscapes. Cancer Cell [Internet]. 2018;34(2):256-270.e5. Available from: https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.07.002
- Gopal RK, Kübler K, Calvo SE, Polak P, Livitz D, Rosebrock D, et al. Widespread Chromosomal Losses and Mitochondrial DNA Alterations as Genetic Drivers in Hürthle Cell Carcinoma. Cancer Cell. 2018;34(2):242-255.e5.
- Pu RT, Yang J, Wasserman PG, Bhuiya T, Griffith KA, Michael CW. Does Hurthle cell lesion/neoplasm predict malignancy more than follicular lesion/neoplasm on thyroid fine-needle aspiration? Diagn Cytopathol [Internet]. 2006 May;34(5):330–4. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/dc.20440
- 17. Kim TH, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Min HS, Won Kim K, et al. Tumor size and age predict the risk of malignancy in Hürthle cell neoplasm of the thyroid and can therefore guide the extent of initial thyroid surgery.

Thyroid [Internet]. 2010;20(11):1229–34. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20929403

- Chen H, Nicol TL, Zeiger M a, Dooley WC, Ladenson PW, Cooper DS, et al. Hürthle cell neoplasms of the thyroid: are there factors predictive of malignancy? Ann Surg [Internet]. 1998;227(4):542–6. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1191310&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- Giorgadze T, Rossi ED, Fadda G, Gupta PK, Livolsi VA, Baloch Z. Does the fine-needle aspiration diagnosis of "h??rthle-cell neoplasm/follicular neoplasm with oncocytic features" denote increased risk of malignancy? Diagn Cytopathol. 2004;31(5):307–12.
- Zhang YW, Greenblatt DY, Repplinger D, Bargren A, Adler JT, Sippel RS, et al. Older Age and Larger Tumor Size Predict Malignancy in Hürthle Cell Neoplasms of the Thyroid. Ann Surg Oncol [Internet]. 2008 Oct 30;15(10):2842–6. Available from: http://www.springerlink.com/index/10.1245/s10434-008-0079-8
- Sippel RS, Elaraj DM, Khanafshar E, Zarnegar R, Kebebew E, Duh Q-Y, et al. Tumor Size Predicts Malignant Potential in Hürthle Cell Neoplasms of the Thyroid. World J Surg [Internet]. 2008 May 27;32(5):702–7. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00268-007-9416-5
- Pisanu A, Sias L, Uccheddu A. Factors predicting malignancy of H??rthle cell tumors of the thyroid: Influence on surgical treatment. World J Surg. 2004;28(8):761–5.
- McLeod DSA, Watters KF, Carpenter AD, Ladenson PW, Cooper DS, Ding EL. Thyrotropin and thyroid cancer diagnosis: A systematic review and dose-response meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(8):2682–92.
- 24. Fiore E, Vitti P. Serum TSH and risk of papillary thyroid cancer in nodular thyroid disease. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(4):1134–45.
- Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, et al. An Ultrasonogram Reporting System for Thyroid Nodules Stratifying Cancer Risk for Clinical Management. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2009 May;94(5):1748–51. Available from:

https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2008-1724

- 26. Ito Y, Amino N, Yokozawa T, Ota H, Ohshita M, Murata N, et al. Ultrasonographic Evaluation of Thyroid Nodules in 900 Patients: Comparison Among Ultrasonographic, Cytological, and Histological Findings. Thyroid [Internet]. 2007 Dec;17(12):1269–76. Available from: http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/thy.2007.0014
- Tae HJ, Lim DJ, Baek KH, Park WC, Lee YS, Choi JE, et al. Diagnostic Value of Ultrasonography to Distinguish Between Benign and Malignant Lesions in the Management of Thyroid Nodules. Thyroid [Internet]. 2007 May;17(5):461–6. Available from:

http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/thy.2006.0337

- Jeh SK, So LJ, Bum SK, Yoen SL. Evaluating the degree of conformity of papillary carcinoma and follicular carcinoma to the reported ultrasonographic findings of malignant thyroid tumor. Korean J Radiol. 2007;8(3):192–7.
- Lee KH, Shin JH, Ko ES, Hahn SY, Kim JS, Kim JH, et al. Predictive factors of malignancy in patients with cytologically suspicious for Hurthle cell neoplasm of thyroid nodules. Int J Surg [Internet]. 2013;11(9):898– 902. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijsu.2013.07.010
- Maizlin Z V, Wiseman SM, Vora P, Kirby JM, Mason AC, Filipenko D, et al. Hurthle cell neoplasms of the thyroid: sonographic appearance and histologic characteristics. J Ultrasound Med [Internet]. 2008 May;27(5):751–7; quiz 759. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424651
- Tuzun D, Ersoy R, Yazgan AK, Kiyak G, Yalcin S, Cakir B.
 Cytomorphologic features and ultrasonographic characteristics of thyroid nodules with Hurthle cells. Ann Diagn Pathol [Internet]. 2015;19(3):175–9.
 Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2015.03.002
- Ito Y, Hirokawa M, Miyauchi A, Kihara M, Yabuta T, Masuoka H, et al. Diagnosis and surgical indications of oxyphilic follicular tumors in Japan: Surgical specimens and cytology. Endocr J. 2016;63(11):977–82.
- 33. Roh MH, Jo VY, Stelow EB, Faquin WC, Zou KH, Alexander EK, et al.The predictive value of the fine-needle aspiration diagnosis "Suspicious

for a follicular neoplasm, Hürthle cell type" in patients with Hashimoto thyroiditis. Am J Clin Pathol. 2011;135(1):139–45.

- Brauner E, Holmes BJ, Krane JF, Nishino M, Zurakowski D, Hennessey J V., et al. Performance of the Afirma Gene Expression Classifier in Hürthle Cell Thyroid Nodules Differs from Other Indeterminate Thyroid Nodules. Thyroid [Internet]. 2015;25(7):789–96. Available from: http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2015.0049
- Harrell R, Bimston D. Surgical Utility of Afirma: Effects of High Cancer Prevalence and Oncocytic Cell Types in Patients with Indeterminate Thyroid Cytology. Endocr Pract [Internet]. 2014 Apr;20(4):364–9. Available from: http://journals.aace.com/doi/abs/10.4158/EP13330.OR
- Nikiforova MN, Mercurio S, Wald AI, Barbi de Moura M, Callenberg K, Santana-Santos L, et al. Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. Cancer. 2018;124(8):1682–90.
- Danilovic DLS, Marui S. Critical analysis of molecular tests in indeterminate thyroid nodules. Arch Endocrinol Metab [Internet]. 2018;62(6):572–5. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972018000600572&Ing=en&nrm=iso
- Patel KN, Angell TE, Babiarz J, Barth NM, Blevins T, Duh Q-Y, et al. Performance of a Genomic Sequencing Classifier for the Preoperative Diagnosis of Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. JAMA Surg [Internet]. 2018 Sep 1;153(9):817. Available from: http://archsurg.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamasurg.201 8.1153
- Xu B, Wang L, Tuttle RM, Ganly I, Ghossein R. Prognostic impact of extent of vascular invasion in low-grade encapsulated follicular cell– derived thyroid carcinomas: a clinicopathologic study of 276 cases. Hum Pathol [Internet]. 2015 Dec;46(12):1789–98. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817715003214
- 40. Ghossein RA, Hiltzik DH, Carlson DL, Patel S, Shaha A, Shah JP, et al. Prognostic factors of recurrence in encapsulated Hurthle cell carcinoma of
the thyroid gland: A clinicopathologic study of 50 cases. Cancer. 2006;106(8):1669–76.

- Lopez-Penabad L, Chiu AC, Hoff AO, Schultz P, Gaztambide S, Ordoñez NG, et al. Prognostic factors in patients with Hürthle cell neoplasms of the thyroid. Cancer. 2003;97(5):1186–94.
- 42. Besic N, Vidergar-Kralj B, Frkovic-Grazio S, Movrin-Stanovnik T, Auersperg M. The role of radioactive iodine in the treatment of Hürthle cell carcinoma of the thyroid. Thyroid [Internet]. 2003 Jun [cited 2018 Oct 14];13(6):577–84. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12930602
- 43. Kushchayeva Y, Duh QY, Kebebew E, Clark OH. Prognostic indications for Hürthle cell cancer. World J Surg. 2004;28(12):1266–70.
- Fagin JA, Wells SA. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid
 Cancer. N Engl J Med [Internet]. 2016;375(11):1054–67. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1501993
- Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Advances in the molecular pathogenesis of thyroid cancer: Lessons from the cancer genome. Eur J Endocrinol. 2016;175(5):R203–17.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov G V., Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. Nature [Internet]. 2013;499(7457):214–8. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12213
- 47. Xing M. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. Endocr Rev [Internet]. 2007 Dec 1;28(7):742–62. Available from: https://academic.oup.com/edrv/article/28/7/742/2355006
- Danilovic DLS, Lima EU, Domingues RB, Brandão LG, Hoff AO, Marui S. Pre-operative role of BRAF in the guidance of the surgical approach and prognosis of differentiated thyroid carcinoma. Eur J Endocrinol. 2014;170(4):619–25.
- 49. Yuri E. Nikiforov, M.D. P. Thyroid Carcinoma: Molecular Pathways and Therapeutic Targets. Mod Pathol. 2009;21(Suppl 2):1–12.
- 50. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular

profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma: An unusually high prevalence of ras mutations. Am J Clin Pathol. 2003;120(1):71–7.

- Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: Studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(7):3211–6.
- Network TCGAR, Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, et al. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. Cell [Internet]. 2014;159(3):676–90. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012380
- 53. Nikiforova MN, Lynch R a., Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPARγ rearrangement in thyroid tumors: Evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(5):2318–26.
- 54. Zou M, Baitei EY, Alzahrani AS, BinHumaid FS, Alkhafaji D, Al-Rijjal RA, et al. Concomitant RAS, RET/PTC, or BRAF Mutations in Advanced Stage of Papillary Thyroid Carcinoma. Thyroid [Internet]. 2014 Aug;24(8):1256–66. Available from:

https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2013.0610

- 55. Xing M, Liu R, Liu X, Murugan a. K, Zhu G, Zeiger M a., et al. BRAF V600E and TERT Promoter Mutations Cooperatively Identify the Most Aggressive Papillary Thyroid Cancer With Highest Recurrence. J Clin Oncol [Internet]. 2014;1–10. Available from: http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2014.55.5094
- Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT Promoter Mutations Are a Major Indicator of Poor Outcome in Differentiated Thyroid Carcinomas. J Clin Endocrinol Metab [Internet].
 2014 May;99(5):E754–65. Available from: https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2013-3734
- 57. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. Thyroid [Internet]. 2010;20(7):697–706.
 Available from:

http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935335&tool= pmcentrez&rendertype=abstract

- 58. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PLM, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. Nat Genet [Internet]. 1997 May 1;16(1):64–7. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng0597-64
- Saji M, Ringel MD. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 2010 May;321(1):20–8. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720709005632
- Manning BD. Game of TOR The Target of Rapamycin Rules Four Kingdoms. Phimister EG, editor. N Engl J Med [Internet]. 2017 Sep 5;377(13):1297–9. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcibr1709384
- Forloni M, Dogra SK, Dong Y, Conte D, Ou J, Zhu LJ, et al. miR-146a promotes the initiation and progression of melanoma by activating Notch signaling. Elife [Internet]. 2014 Feb 18;3. Available from: http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.01460
- Garraway LA. A Notch for Noncoding RNA in Melanoma. N Engl J Med [Internet]. 2014;370(20):1950–1. Available from: http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMcibr1402173
- 63. Yamashita AS, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kulcsar MAV, Friguglietti CUM, da Costa RB, et al. Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation. Transl Oncol [Internet]. 2013;6(2):197–205. Available from: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3610552&tool= pmcentrez&rendertype=abstract
- 64. Sastre-Perona A, Santisteban P. Role of the Wnt pathway in thyroid cancer. Front Endocrinol (Lausanne). 2012;3(FEB):1–10.
- Wiseman SM, Griffith OL, Gown A, Walker B, Jones SJM.
 Immunophenotyping of thyroid tumors identifies molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic carcinoma. Am J Surg [Internet]. 2011;201(5):578–84. Available from:

http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2011.01.010

- Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms: down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. Am J Pathol [Internet]. 2001 Mar;158(3):987–96. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238046
- Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. Cancer Res [Internet]. 1999;59(8):1811–5. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213482
- Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. Nat Rev Cancer [Internet]. 2013;13(3):184–99. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc3431
- Corver WE, Ruano D, Weijers K, den Hartog WCE, van Nieuwenhuizen MP, de Miranda N, et al. Genome haploidisation with chromosome 7 retention in oncocytic follicular thyroid carcinoma. PLoS One. 2012;7(6):1–12.
- McKay JD, Thompson D, Lesueur F, Stankov K, Pastore a, Watfah C, et al. Evidence for interaction between the TCO and NMTC1 loci in familial non-medullary thyroid cancer. J Med Genet. 2004;41(6):407–12.
- Bonora E, Evangelisti C, Bonichon F, Tallini G, Romeo G. Novel germline variants identified in the inner mitochondrial membrane transporter TIMM44 and their role in predisposition to oncocytic thyroid carcinomas. Br J Cancer. 2006;95(11):1529–36.
- 72. Máximo V, Botelho T, Capela J, Soares P, Lima J, Taveira a, et al. Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hurthle cell) tumours of the thyroid. Br J Cancer. 2005;92(10):1892–8.
- Gasparre G, Porcelli AM, Bonora E, Pennisi LF, Toller M, Iommarini L, et al. Disruptive mitochondrial DNA mutations in complex I subunits are markers of oncocytic phenotype in thyroid tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(21):9001–6.

- 74. Kasaian K, Chindris A-M, Wiseman SM, Mungall KL, Zeng T, Tse K, et al. MEN1 Mutations in Hürthle Cell (Oncocytic) Thyroid Carcinoma. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2015;100(April):jc.2014-3622. Available from: http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2014-3622
- 75. Tuttle RM, Haugen B, Perrier ND. Updated American Joint Committee on Cancer/Tumor-Node-Metastasis Staging System for Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancer (Eighth Edition): What Changed and Why? Thyroid [Internet]. 2017;27(6):751–6. Available from: http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/thy.2017.0102
- 76. Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. Eur Thyroid J [Internet]. 2017;6(5):225–37. Available from: https://www.karger.com/Article/FullText/478927
- 77. Tessler FN, Middleton WD, Grant EG, Hoang JK, Berland LL, Teefey SA, et al. ACR Thyroid Imaging, Reporting and Data System (TI-RADS):
 White Paper of the ACR TI-RADS Committee. J Am Coll Radiol [Internet].
 2017 May;14(5):587–95. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1546144017301862
- Xu C. A review of somatic single nucleotide variant calling algorithms for next-generation sequencing data. Comput Struct Biotechnol J [Internet].
 2018;16:15–24. Available from: https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.01.003
- 79. Illumina Inc. An introduction to next-Generation Sequencing Technology.
 2017;1–14. Available from: https://www.illumina.com/content/dam/illuminamarketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics. 2009;25(14):1754–60.
- Okonechnikov K, Conesa A, García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. Bioinformatics [Internet]. 2015 Oct 1;32(2):292–4. Available from: https://academic.oup.com/bioinformatics/articlelookup/doi/10.1093/bioinformatics/btv566

- Lee S, Lee S, Ouellette S, Park W-Y, Lee EA, Park PJ. NGSCheckMate: software for validating sample identity in next-generation sequencing studies within and across data types. Nucleic Acids Res [Internet]. 2017 Jun 20 [cited 2018 Oct 14];45(11):e103. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28369524
- Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res. 2010;38(16):1–7.
- Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. Nat Biotechnol [Internet]. 2013 Feb 10;31(3):213–9. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt.2514
- 85. Narzisi G, Corvelo A, Arora K, Bergmann EA, Shah M, Musunuri R, et al. Genome-wide somatic variant calling using localized colored de Bruijn graphs. Commun Biol [Internet]. 2018 Dec 22;1(1):20. Available from: http://www.nature.com/articles/s42003-018-0023-9
- Wilm A, Aw PPK, Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, et al. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. Nucleic Acids Res [Internet]. 2012 Dec 1;40(22):11189–201. Available from: https://academic.oup.com/nar/article/40/22/11189/1152727
- 87. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration.
 Brief Bioinform [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2018 Oct 31];14(2):178–92.
 Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22517427
- Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Nucleic Acids Res [Internet]. 2018 Oct 29;47(D1):D941–D947. Available from: https://academic.oup.com/nar/advancearticle/doi/10.1093/nar/gky1015/5146192
- 89. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork

P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods [Internet]. 2010 Apr 1;7(4):248–9. Available from: http://www.nature.com/articles/nmeth0410-248

- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nat Methods [Internet].
 2014 Apr 1;11(4):361–2. Available from: http://www.nature.com/articles/nmeth.2890
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. de Brevern AG, editor. PLoS One [Internet]. 2012 Oct 8;7(10):e46688. Available from: https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046688
- Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Day INM, Gaunt TR. Predicting the functional consequences of cancer-associated amino acid substitutions. Bioinformatics [Internet]. 2013 Jun 15;29(12):1504–10. Available from: https://academic.oup.com/bioinformatics/articlelookup/doi/10.1093/bioinformatics/btt182
- 93. Morris LGT, Kaufman AM, Gong Y, Ramaswami D, Walsh LA, Turcan Ş, et al. Recurrent somatic mutation of FAT1 in multiple human cancers leads to aberrant Wnt activation. Nat Genet. 2013;45(3):253–61.
- 94. Santana NO, Freitas RMC, Marcos VN, Chammas MC, Camargo RYA, Schmerling CK, et al. Diagnostic performance of thyroid ultrasound in Hürthle cell carcinomas. Arch Endocrinol Metab [Internet]. 2019;(4):1–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-

39972019005002111&lng=en&nrm=iso

- Parikh PP, Allan BJ, Lew JI. Surgeon-performed ultrasound predictors of malignancy in patients with Hü rthle cell neoplasms of the thyroid. J Surg Res [Internet]. 2013;184(1):247–52. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.03.005
- Lee SK, Rho BH, Woo SK. Hürthle cell neoplasm: Correlation of grayscale and power doppler sonographic findings with gross pathology. J Clin Ultrasound. 2010;38(4):169–76.
- 97. Rago T, Di Coscio G, Basolo F, Scutari M, Elisei R, Berti P, et al.

Combined clinical, thyroid ultrasound and cytological features help to predict thyroid malignancy in follicular and Hürthle cell thyroid lesions: Results from a series of 505 consecutive patients. Clin Endocrinol (Oxf). 2007;66(1):13–20.

- 98. Brito JP, Gionfriddo MR, Al Nofal A, Boehmer KR, Leppin AL, Reading C, et al. The Accuracy of Thyroid Nodule Ultrasound to Predict Thyroid Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2014 Apr;99(4):1253–63. Available from: https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2013-2928
- 99. Park JW, Kim DW, Kim D, Baek JW, Lee YJ, Baek HJ. Korean Thyroid Imaging Reporting and Data System features of follicular thyroid adenoma and carcinoma: a single-center study. Ultrasonography [Internet]. 2017 Oct 1;36(4):349–54. Available from: http://eultrasonography.org/journal/view.php?doi=10.14366/usg.17020
- 100. Danilovic DLS, de Mello ES, Frazzato EST, Wakamatsu A, de Lima Jorge AA, Hoff AO, et al. Oncogenic mutations in KEAP1 disturbing inhibitory Nrf2-Keap1 interaction: Activation of antioxidative pathway in papillary thyroid carcinoma. Head Neck [Internet]. 2018 Jun;40(6):1271–8. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/hed.25105
- 101. Cao LL, Riascos-Bernal DF, Chinnasamy P, Dunaway CM, Hou R, Pujato MA, et al. Control of mitochondrial function and cell growth by the atypical cadherin Fat1. Nature [Internet]. 2016;539(7630):575–8. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/nature20170
- McFarland CD, Yaglom JA, Wojtkowiak JW, Scott JG, Morse DL, Sherman MY, et al. The Damaging Effect of Passenger Mutations on Cancer Progression. Cancer Res [Internet]. 2017 May 23;77(18):4763– 72. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-15-3283-T
- 103. Lin SC, Lin LH, Yu SY, Kao SY, Chang KW, Cheng HW, et al. FAT1 somatic mutations in head and neck carcinoma are associated with tumor progression and survival. Carcinogenesis. 2018;39(11):1320–30.
- 104. Moeller MJ, Soofi A, Braun GS, Li X, Watzl C, Kriz W, et al. Protocadherin

FAT1 binds Ena/VASP proteins and is necessary for actin dynamics and cell polarization. EMBO J [Internet]. 2004 Sep 29;23(19):3769–79. Available from:

http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600380

- Tanoue T, Takeichi M. Mammalian Fat1 cadherin regulates actin dynamics and cell–cell contact. J Cell Biol [Internet]. 2004 May 24;165(4):517–28. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200403006
- 106. Katoh M. Function and cancer genomics of FAT family genes (Review).Int J Oncol. 2012;41(6):1913–8.
- 107. Nakaya K, Yamagata HD, Arita N, Nakashiro K, Nose M, Miki T, et al. Identification of homozygous deletions of tumor suppressor gene FAT in oral cancer using CGH-array. Oncogene [Internet]. 2007 Aug 26;26(36):5300–8. Available from: http://www.nature.com/articles/1210330
- 108. Lee S, Stewart S, Nagtegaal I, Luo J, Wu Y, Colditz G, et al. Differentially Expressed Genes Regulating the Progression of Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Breast Cancer. Cancer Res [Internet]. 2012 Sep 1;72(17):4574–86. Available from: http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-0636
- 109. de Bock CE, Ardjmand A, Molloy TJ, Bone SM, Johnstone D, Campbell DM, et al. The Fat1 cadherin is overexpressed and an independent prognostic factor for survival in paired diagnosis—relapse samples of precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia [Internet]. 2012 May 25;26(5):918–26. Available from: http://www.nature.com/articles/leu2011319
- 110. Sadeqzadeh E, de Bock CE, Zhang XD, Shipman KL, Scott NM, Song C, et al. Dual Processing of FAT1 Cadherin Protein by Human Melanoma Cells Generates Distinct Protein Products. J Biol Chem [Internet]. 2011 Aug 12;286(32):28181–91. Available from: http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M111.234419
- 111. Nishikawa Y, Miyazaki T, Nakashiro KI, Yamagata H, Isokane M, Goda H,

et al. Human FAT1 Cadherin controls cell migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the localization of β -catenin. Oncol Rep. 2011;26(3):587–92.

- 112. Hou R, Liu L, Anees S, Hiroyasu S, Sibinga NES. The Fat1 cadherin integrates vascular smooth muscle cell growth and migration signals. J Cell Biol [Internet]. 2006 May 8;173(3):417–29. Available from: http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200508121
- 113. Borkosky SS, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder LB, Gunduz E, AL Sheikh Ali M, et al. Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol [Internet]. 2009 May 8;135(5):703–13. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s00432-008-0507-y
- 114. Brosens RPM, Belt EJTH, Haan JC, Buffart TE, Carvalho B, Grabsch H, et al. Deletion of chromosome 4q predicts outcome in Stage II colon cancer patients. Cell Oncol [Internet]. 2011 Jun 30;34(3):215–23. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s13402-011-0042-8
- 115. McLendon R, Friedman A, Bigner D, Van Meir EG, Brat DJ, M. Mastrogianakis G, et al. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. Nature [Internet]. 2008 Oct 23;455(7216):1061–8. Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature07385
- 116. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer DW, Dao F, et al. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature [Internet].
 2011 Jun 29;474(7353):609–15. Available from: http://www.nature.com/articles/nature10166
- 117. Kim KT, Kim B-S, Kim JH. Association between FAT1 mutation and overall survival in patients with human papillomavirus-negative head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck [Internet]. 2016 Apr;38(S1):E2021–9. Available from: http://doi.wiley.com/10.1002/hed.24372
- 118. Mori Y, Nagse H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. Hum Mol Genet [Internet]. 1992 Jul [cited 2018 Nov

24];1(4):229–33. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1338904

- 119. Cetta F, Montalto G, Gori M, Curia MC, Cama A, Olschwang S. Germline Mutations of the APC Gene in Patients with Familial Adenomatous Polyposis-Associated Thyroid Carcinoma: Results from a European Cooperative Study 1. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 2000 Jan;85(1):286–92. Available from: https://academic.oup.com/jcem/articlelookup/doi/10.1210/jcem.85.1.6254
- Fearnhead NS. The ABC of APC. Hum Mol Genet [Internet]. 2001 Apr 1;10(7):721–33. Available from: https://academic.oup.com/hmg/articlelookup/doi/10.1093/hmg/10.7.721
- 121. Cetta F, Chiappetta G, Melillo RM, Petracci M, Montalto G, Santoro M, et al. The ret/ptc1 Oncogene Is Activated in Familial Adenomatous Polyposis-Associated Thyroid Papillary Carcinomas 1. J Clin Endocrinol Metab [Internet]. 1998 Mar;83(3):1003–6. Available from: https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.83.3.4614
- 122. Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S, et al. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. Genes Dev [Internet]. 1999 May 15;13(10):1309–21. Available from: http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.13.10.1309
- 123. Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. Science (80-) [Internet]. 2017 Aug 18;357(6352):eaan2507. Available from: http://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aan2507
- Murugan AK, Liu R, Xing M. Identification and characterization of two novel oncogenic mTOR mutations. Oncogene [Internet]. 2019 Jun 27;38(26):5211–26. Available from: http://www.nature.com/articles/s41388-019-0787-5
- 125. Tavares C, Coelho MJ, Eloy C, Melo M, da Rocha AG, Pestana A, et al. NIS expression in thyroid tumors, relation with prognosis clinicopathological and molecular features. Endocr Connect [Internet]. 2018 Jan;7(1):78–90. Available from:

https://ec.bioscientifica.com/view/journals/ec/7/1/EC-17-0302.xml

126. Kimorini Suguno, Koichi Ito, Takashi Mimura, Kaori Kameyama, Hiroyuki Iwasaki K ito. Hürthle Cell Tumor of the Thyroid: Analysis of 188 Cases. World J Surg. 2001;25(9):1160–3.