

ORIGINAL

Testeo de mutaciones en nódulos tiroideos con citología indeterminada: estudio prospectivo de 112 pacientes en Argentina



Norma Tolaba^{a,*}, Yamila Spedaletti^a, Paola Bazzoni^a, Macarena Galindez^b, Valeria Cerioni^b, Cecilia Santillan^b, Gilda Richter^c, Cecilia Herrera^c, Laura Sanchez^c, Leopoldo Van Cauwlaert^d, Marta A. Toscano^a, Marcelo Nallar^c, Marcelo Monteros Alvi^{a,**} y Christian Martín Moya^e

^a Programa de Anatomía Patológica y Genética, Hospital Dr. Arturo Oñativia, Salta, Argentina

^b Programa de Endocrinología, Hospital Dr. Arturo Oñativia, Salta, Argentina

^c Área de Cirugía Percutánea, Técnicas Cardíacas e Imágenes. Hospital Dr. Arturo Oñativia, Salta, Argentina

^d Programa de Cirugía, Hospital Dr. Arturo Oñativia, Salta, Argentina

^e Unidad de Genética Médica, Ascires Sistemas Genómicos, Valencia, España

Recibido el 20 de agosto de 2020; aceptado el 21 de febrero de 2021

Disponible en Internet el 23 de junio de 2021

PALABRAS CLAVE

Nódulos tiroideos;
Marcadores
moleculares;
Mutaciones;
Carcinoma tiroideo

Resumen

Antecedentes: El estudio de mutaciones presentes en nódulos tiroideos permite mejorar el diagnóstico preoperatorio y reducir la realización de cirugías innecesarias de nódulos benignos. En este estudio analizamos el impacto de la implementación de un panel de 7 genes que permite detectar mutaciones en los genes BRAF, RAS (H/N/K) y las fusiones PAX8/PPARG, RET/PTC1 y RET/PTC2, en una población del norte de Argentina.

Método: Se analizaron prospectivamente 112 punciones aspirativas con aguja fina diagnosticadas citológicamente como indeterminadas según la clasificación del sistema Bethesda. Estas incluyen las categorías Bethesda III o atipia/lesión folicular de significado incierto y Bethesda IV o neoplasia folicular/sospechoso de neoplasia folicular. Se analizó el panel de mutaciones de 7 genes, luego esa información se vinculó con la histología disponible y el seguimiento ecográfico.

Resultados: Las mutaciones BRAF V600E y RET/PTC1 estuvieron asociadas en un 100% a carcinomas (n = 8), en cambio las mutaciones en RAS y PAX8/PPARG estuvieron asociadas en un 37,5% (n = 3) y 17% (n = 1) a carcinomas, respectivamente. El diagnóstico histológico y el seguimiento ecográfico de pacientes permitió determinar una sensibilidad del 86%, una especificidad del 77%, un valor predictivo positivo (VPP) del 54% y un valor predictivo negativo (VPN) del 94%. En este estudio, se logró disminuir las cirugías en un 48% en los pacientes analizados.

* Autor para correspondencia.

** Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: norma_tolaba@hotmail.com (N. Tolaba), monterosalvi@hotmail.com (M. Monteros Alvi).

Conclusión: La implementación del test del panel de mutaciones permitió seleccionar la estrategia quirúrgica adecuada para cada paciente, reducir las cirugías en dos pasos, y establecer un seguimiento activo en pacientes de bajo riesgo.

© 2021 SEEN y SED. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Thyroid nodules;
Molecular markers;
Mutations;
Thyroid carcinoma

Testing of mutations on thyroid nodules with indeterminate cytology: A prospective study of 112 patients in Argentina

Abstract

Background: The study of genetic mutations in thyroid nodules makes it possible to improve the preoperative diagnosis of and reduce unnecessary surgeries on benign nodules. In this study, we analysed the impact of implementing a 7-gene mutation panel that enables mutations to be detected in BRAF and RAS (H/N/K) and the gene fusions PAX8/PPARG, RET/PTC1 and RET/PTC2, in a population in northern Argentina.

Method: We performed a prospective analysis of 112 fine needle aspirations diagnosed as having indeterminate cytology according to the Bethesda classification system. These include the Bethesda III or atypia of unknown significance/follicular lesion of unknown significance and Bethesda IV or follicular neoplasm/suspicious for follicular neoplasm categories. The mutations of the 7-gene panel were analysed and this information was linked to the available histology and ultrasound monitoring.

Results: The BRAF V600E and RET/PTC1 mutations were associated with carcinoma in 100% of cases (n = 8), whereas only 37.5% (n = 3) of the nodules with RAS and 17% (n = 1) with PAX8/PPARG mutations were associated with carcinoma. From the histological diagnosis and ultrasound monitoring of patients, we can estimate that this panel has a sensitivity of 86% in detecting malignant carcinoma, a specificity of 77%, a positive predictive value (PPV) of 54% and a negative predictive value (NPV) of 94%. In this study, it was possible to reduce the number of surgeries by 48% in the patients analysed.

Conclusion: The implementation of the mutation panel allowed the appropriate surgical strategy to be selected for each patient, the number of two-step surgeries to be reduced, and active follow-up to be established in low-risk patients.

© 2021 SEEN y SED. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cáncer diferenciado de tiroides es la neoplasia endocrina más frecuente. La incidencia del cáncer de tiroides se ha incrementado en todo el mundo durante estas últimas tres décadas. Esto puede deberse, en parte, a una mayor detección de nódulos tiroideos pequeños o subclínicos mediante ecografía u otras técnicas de imágenes^{1,2} y a un verdadero aumento en la incidencia del cáncer de tiroides^{3,4}. Sin embargo, similar a lo que ocurre en otros países, estudios realizados en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Gran Buenos Aires indican que en el periodo 2012-2016 la incidencia de cáncer de tiroides sufrió un incremento del 62,5%, llegando a 11,83 nuevos casos/100.000 hab/año⁵ en relación con el periodo 2003-2011, donde fue de 6,51 casos/100.000 hab/año según la tasa estandarizada por edades⁶.

La punción aspirativa con aguja fina (PAAF) seguida de análisis citológico constituye una de las herramientas claves para el diagnóstico inicial de nódulos de tiroides^{7,8}. Esta metodología es de gran utilidad para el manejo quirúrgico del paciente⁹ ya que puede definir con gran precisión si un nódulo es benigno o maligno⁸. Sin embargo, existe un

20-30% de punciones que resultan indeterminadas, o en zona de grises, según la clasificación del sistema Bethesda^{8,10-12}, y corresponden a las siguientes categorías: Bethesda III, lesión de significado incierto/lesión folicular de significado incierto (AUS/FLUS), y Bethesda IV, neoplasia folicular/sospechoso de neoplasia folicular (FN/SFN)^{8,13,14}. La tasa de malignidad observada en estas categorías varía en los distintos centros e instituciones en un rango que va del 6 al 48% para Bethesda III y del 14 al 34% para Bethesda IV¹⁰. La frecuencia de malignidad en estos grupos genera una incertidumbre diagnóstica que conduce a repeticiones de PAAF o cirugías innecesarias^{10,15}. Además, se sabe que el 10-40% de estas cirugías resultan ser nódulos benignos^{8,16}.

Durante la última década, se han desarrollado numerosas pruebas moleculares en nódulos tiroideos que han permitido mejorar la precisión diagnóstica de la citología, implementando la búsqueda de mutaciones somáticas que ayudarían a discriminar con mayor sensibilidad y especificidad los cánceres de tiroides¹⁴⁻¹⁶.

El carcinoma papilar de tiroides presenta con frecuencia mutaciones en los genes BRAF, RAS o fusiones génicas RET/PTC. Estas mutaciones somáticas mutuamente excluyentes se encuentran en más del 70% de los carcinomas

papilares y en general se asocian a un comportamiento tumoral más agresivo^{17,18}. El carcinoma folicular de tiroides también puede presentar mutaciones en RAS y la fusión génica PAX8/PPARG, que se encuentran en el 80% de estos tumores¹⁷.

Se ha descrito previamente la factibilidad de estudiar las mutaciones somáticas más frecuentes de los cánceres diferenciados de tiroides en PAAF tiroideas y proporcionar información útil para el diagnóstico^{7,19,20}. Desde su revisión del 2009, la Asociación Americana de Tiroides recomienda y subraya la importancia de los estudios moleculares en nódulos con citología indeterminada (AUS/FLUS y FN/SFN) para poder guiar al médico en el manejo del paciente²¹. Sin embargo, aún, no se ha llegado a un consenso sobre cuál sería la mejor estrategia para el estudio de mutaciones en punciones de nódulos tiroideos²².

En el presente trabajo evaluamos la utilidad del panel molecular que incluye el estudio de mutaciones puntuales en los genes BRAF (exón 15), NRAS, HRAS y KRAS (exones 2 y 3), y las fusiones génicas RET/PTC1, RET/PTC3 y PAX8/PPARG a partir de PAAF de citologías indeterminadas, categorías AUS/FLUS y FN/SFN. A su vez, analizamos los resultados de este panel molecular en relación con el diagnóstico citológico e histológico determinando su utilidad para definir el tratamiento de pacientes del Hospital de Endocrinología y Metabolismo Dr. Arturo Oñativia de la ciudad de Salta, Argentina.

Materiales y métodos

Muestras de pacientes

Se analizaron de forma prospectiva 112 muestras de PAAF diagnosticadas como AUS/FLUS o FN/SFN correspondientes a pacientes del Hospital Dr. Arturo Oñativia de la ciudad de Salta. Las muestras incluidas en este estudio corresponden al periodo comprendido entre diciembre de 2014 y diciembre de 2018. La PAAF fue el método estándar para la recolección de muestras para el estudio molecular^{8,12}. Las PAAF se realizaron bajo guía ecográfica con médicos especialistas en imágenes, en cirugía mínimamente invasiva y anatomía patológica. En caso de múltiples nódulos en un paciente, se seleccionó el nódulo con mayores criterios ultrasonográficos de malignidad para el estudio. El material de las PAAF se extendió en portaobjetos con bordes esmerilados e inmediatamente se fijaron en alcohol 95% para su tinción de Papanicolaou y en seco para la tinción May-Grunwald-Giemsa. Los extendidos fueron analizados por dos especialistas en anatomía patológica. El criterio de inclusión de un extendido para el posterior análisis de mutaciones fue la presencia de al menos 6 grupos de 10 o más células, según sistema Bethesda⁸. Los pacientes incluidos en este trabajo presentaban dos PAAF consecutivas diagnosticadas como AUS o FLUS o una diagnosticada como FN/SFN. Este trabajo fue aprobado por la comisión de Docencia e Investigación del Hospital Dr. Arturo Oñativia. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado previo al estudio.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ARN total se realizó a partir del material remanente obtenido de la PAAF, luego de la realización del extendido citológico, aplicando el protocolo de Trizol (TRI-Pure Isolation Reagent, Roche). Para la obtención de ADN genómico se utilizó el raspado de células de los extendidos citológicos²³, y se purificó con kit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) según indicaciones del fabricante. La concentración de ARN y ADN se determinó con el equipo Qubit 2.0 Fluorometer v3.11. Se confirmó en cada muestra la presencia de células tiroideas, la integridad del ARN y la eficacia de la reacción de retrotranscripción por amplificación mediante PCR convencional de la expresión de los genes GUS β , PAX8 y TSH. La calidad del ADN extraído se evaluó por la amplificación mediante qPCR de los genes BRAF y RAS.

Estudio de fusiones génicas

Las fusiones génicas PAX8/PPARG, RET/PTC1 y RET/PTC3 se estudiaron mediante RT-PCR seguida de una Nested-PCR^{20,24}, con primers de diseño propio que flanquean los puntos de fusión. La retrotranscripción del ARN total a ADN complementario (ADNc), se realizó con Random Hexámeros más oligos dT y la enzima transcriptasa reversa RevertAid RT (Thermo Scientific) según el protocolo del fabricante. Para la retrotranscripción se utilizó 500 ng de ARN. La PCR convencional y la Nested-PCR se realizaron con la enzima Hot FIREPol DNA polimerasa (SolisBioDyne). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Biosystems (Marca: Veriti, 96 Well Thermo Cycler). Los productos de PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) teñido con GelGreen (Biotium. Nucleic Acid Gel Stain, 10.000 X en agua) en TAE 1X, a 150 V, durante 40 minutos a temperatura ambiente. Los fragmentos se visualizaron bajo luz azul en un transiluminador Safe Imager 2.0 Invitrogen. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 bp (Genbiotech, 100 pb DNA Ladder).

Detección de mutaciones puntuales en los genes BRAF y RAS

La detección de mutaciones puntuales en los exones 2 y 3 de H-, K- y N-RAS, más el exón 15 de BRAF se estudiaron mediante High Resolution Melting (HRM) y secuenciación Sanger. Paralelamente se utilizó el Kit Thyroid Cancer Mutation Analysis (Entrogen, Inc) para validar los resultados del HRM.

Análisis por High Resolution Melting

Se realizó una PCR en tiempo real con primers específicos de diseño propio (las secuencias de los oligonucleótidos están disponibles bajo petición) para cada exón y protocolos diseñados según las condiciones de cada amplificación, utilizando el Master Mix Hot FirePol Evagreen HRM (Solis BioDyne). Se utilizó un termociclador en tiempo real LightCycler 96 (Roche). En cada ronda de amplificación se incluyeron, además de las muestras, controles normales,

controles positivos previamente secuenciados por Sanger y controles negativos (H2O), todos por duplicado. Luego se analizó con el software del Light Cycler 96 Roche.

Secuenciación Sanger

Según los resultados arrojados por el estudio de HRM, las muestras que presentaron curvas diferentes a las normales se enviaron a secuenciar a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea del Sur). Cada amplicón se secuenció en ambos sentidos y las secuencias obtenidas se analizaron con el programa Sequencher™ (versión 4.1.4). Se usaron las plataformas Ensembl Genoma Browser 96 (www.ensembl.org) y ClinVar (www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) para el análisis de cambios encontrados en las secuencias con el objetivo de identificarlas.

Confirmación por kit comercial

El kit de análisis de mutaciones de cáncer de tiroides, Thyroid Cancer Mutation Analysis, amplifica específicamente secuencias mutadas en muestras que contienen una mezcla de ADN con y sin mutaciones. Utiliza sondas de hidrólisis con doble marca para la detección de los productos de amplificación. El kit permite el estudio de las siguientes mutaciones. **BRAF**: V600E; **KRAS**: G12D, G12A, G12V, G12S, G12R, G12C, G13D, Q61E, Q61K, Q61L, Q61R, Q61P, Q61H, Q61I; **NRAS**: G12D, G12S, G12C, G13R, G13V, Q61K, Q61L, Q61R, Q61H, A146T, y **HRAS**: G12V, G13R, Q61R. La presencia de mutaciones se detecta con una sonda marcada con FAM-BHQ, mientras que la amplificación del gen de control interno se detecta con una sonda Cal-Fluor Orange 560–BHQ (equivalente VIC/HEX).

Análisis estadístico

Para determinar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN), los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

- Sensibilidad = verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos negativos)
- Especificidad = verdaderos negativos / (verdaderos negativos + falsos positivos)
- VPP = verdaderos positivos / (verdaderos positivos + falsos positivos)
- VPN = verdaderos negativos / (verdaderos negativos + falsos negativos)

La histología se consideró el criterio de referencia para definir malignidad. En el caso de los adenomas foliculares, un resultado molecular negativo fue considerado verdadero negativo, mientras que un resultado positivo fue considerado falso positivo. Por otro lado, si el diagnóstico histológico fue de carcinoma, un resultado molecular negativo fue considerado falso negativo. En el caso de los pacientes que no fueron a cirugía, con nódulos negativos para el panel molecular, fueron considerados verdaderos negativos.

El riesgo de malignidad (ROM, por sus siglas en inglés *risk of malignancy*) fue calculado en dos momentos diferentes. En primer lugar, el denominado ROM pretest se calculó en el periodo 2012-2014, previamente a la implementación del test por biología molecular en nuestra institución. El ROM pretest se calculó para las categorías AUS/FLUS y FN/SFN sobre el total de pacientes operados en cada categoría. Luego de aplicar el test de mutaciones calculamos el ROM posttest, teniendo en cuenta los pacientes con nódulos que presentaban mutación e histología maligna en relación con el total de mutaciones encontradas en cada categoría.

Resultados

Evaluación de las muestras para el análisis molecular

Entre las 112 muestras de PAAF indeterminadas, 44 fueron diagnosticadas como AUS/FLUS (39%) y 68 de ellas FN/SFN (61%) (tabla 1). Se logró obtener ADN y ARN de calidad suficiente en 95 muestras y se solicitó una segunda punción en los 17 pacientes restantes que permitió obtener mejor calidad de ácidos nucleicos, pudiéndose completar los estudios de mutaciones y fusiones génicas. La implementación de genes de control de tejido específico, como PAX8 y TSH y constitucional como GUS β , nos permitió no solo verificar la calidad del ARN sino también confirmar el origen celular tiroideo.

Análisis de mutaciones

La implementación del panel que incluye las mutaciones puntuales en el exón 15 del gen BRAF, los exones 2 y 3 de los genes NRAS, HRAS y KRAS y las fusiones génicas RET/PTC1, RET/PTC3 y PAX8/PPARG permitió identificar 22 mutaciones en las 112 muestras (20%). Entre las más frecuentes se encuentran 8 muestras con mutaciones en RAS (8%), distribuidas entre los tres miembros de la familia: NRAS, HRAS y KRAS (tabla 1). Le sigue en frecuencia 6 muestras con la mutación V600E en el gen BRAF (5%). En la figura 1 se muestran ejemplos representativos de la citología, el análisis de las mutaciones por HRM, la secuenciación y la histopatología de muestras de pacientes con mutaciones en NRAS y BRAF. Luego, al analizar fusiones génicas, se observó que la más frecuente fue PAX8/PPARG hallada en 6 muestras (5%) y la fusión RET/PTC1 se halló solo en dos muestras (2%). En la figura 2 se muestran ejemplos representativos de cómo se detectan las fusiones PAX8/PPARG y RET/PTC1.

Relación entre la citología, la detección de mutaciones y la histología

De las 112 muestras de PAAF analizadas, 58 pacientes (51%) fueron sometidos a cirugía (24 con citología AUS/FLUS y 34 FN/SFN) pudiendo establecerse una relación entre citología, biología molecular e histología, y 54 pacientes fueron puestos en seguimiento. Los resultados de la citología, los estudios moleculares y la histología de los pacientes operados se detallan en la tabla 1.

Tabla 1 Detalle de mutaciones encontradas con el test molecular

Citología/Histología	Resultados del Test Molecular							Total
	BRAF	HRAS	KRAS	NRAS	PAX8/PPARG	RET/PTC1	WT	
AUS/FLUS								
No operados/seguimiento incompleto							5	5
No operados/ en seguimiento > 1 año							15	15
Otras patologías benignas							8	8
AF			1		2		5	8
CFT				1				1
CPT	2						1	3
CPTVF	2							2
CPTVFnI		1						1
CCH							1	1
Total	4	1	1	1	2		35	44
FN/SFN								
No operados/seguimiento incompleto							14	14
No operados/ en seguimiento > 1 año							20	20
Otras patologías benignas							6	6
AF			1	3	3		14	21
ACH							1	1
CFT				1	1			2
CPT						1		1
CPTVF						1		1
microCPT	2							2
Total	2		1	4	4	2	55	68

Otras patologías benignas incluyen: tiroiditis, bocios y nódulos adenomatosos.

ACH: adenoma folicular de células de Hürthle; AF: adenoma folicular; CFT: carcinoma folicular de tiroides; CPT: carcinoma papilar de tiroides; CPTVF: carcinoma papilar de tiroides variante folicular; CPTVFnI: carcinoma papilar variante folicular encapsulado no invasivo; microCPT: microcarcinoma papilar de tiroides; CCH: carcinoma de células de Hürthle; WT: versión *wild type* o salvaje del gen.

Muestras con citologías AUS/FLUS

En las muestras con citología AUS/FLUS, se identificaron 9 muestras con mutaciones (20%), de las cuales 6 resultaron ser nódulos con histología maligna y 3 con histología benigna. Cuatro nódulos malignos fueron portadores de la mutación BRAF V600E, mientras que 2 presentaron mutaciones en los genes RAS. A su vez, se determinaron 3 nódulos benignos positivos (2 con fusión PAX8/PPARG y una mutación RAS) que fueron considerados falsos positivos por presentar diagnóstico histológico de adenoma folicular. Estos resultados permitieron calcular un riesgo de malignidad (ROM-postest) del 67% para nódulos con citologías AUS/FLUS, positivos para una mutación (tabla 2). Todos los nódulos que presentaron mutaciones en BRAF V600E fueron diagnosticados posquirúrgicamente como carcinomas papilares, 2 carcinomas papilares clásicos y 2 carcinomas papilares variante folicular. Los 3 nódulos con mutaciones en los genes RAS fueron diagnosticados como un carcinoma folicular, un adenoma folicular y un carcinoma papilar variante folicular encapsulado no invasivo. Este último fue reclasificado como neoplasia folicular no invasiva con características nucleares de papilar (NIFTP). Realizando una subdivisión de los nódulos en aquellos que poseen características AUS (n=8) y FLUS (n=16), podemos observar que las citologías AUS poseen mayor frecuencia de mutaciones (62,5%) y mayor riesgo de malignidad en presencia de una mutación (80%) que la citologías FLUS (25% de mutaciones y 25% de malignidad en presencia de mutación). Esto puede asociarse a la

mayor frecuencia de la mutación BRAF V600E en las muestras con citologías AUS (3 de 5 mutaciones halladas) respecto de aquellas con citología FLUS (1 de 4 mutaciones halladas).

En relación con los 15 nódulos en los cuales no se hallaron mutaciones, se detectaron 5 adenomas foliculares, 8 con otras patologías benignas y 2 carcinomas, que fueron un carcinoma papilar clásico y el otro un carcinoma de células de Hürthle. En el caso del carcinoma papilar clásico pudo repetirse el panel de 7 genes sobre la pieza quirúrgica confirmándose la ausencia de las mutaciones investigadas con el panel utilizado. En esta categoría, 20 pacientes con nódulos negativos para las mutaciones del panel de 7 genes y no sometidos a cirugía fueron puestos en seguimiento mediante ecografía por un tiempo mayor de un año (en 5 de estos pacientes no se pudo completar el seguimiento). Estos resultados permitieron calcular un VPN del 93% y una especificidad del 90%. Finalmente, al calcular el riesgo de malignidad para la categoría AUS/FLUS antes y después de la implementación del panel de mutaciones observamos un incremento del 17 al 67% (tabla 2).

Muestras con citologías FN/SFN

En los nódulos con diagnóstico citológico FN/SFN se detectaron 13 muestras con mutaciones (19%), de las cuales 5 fueron mutaciones en el gen RAS, 2 mutaciones en BRAF, 4 fusiones PAX8/PPARG y 2 fusiones RET/PTC1. La caracterización histológica de los 2 nódulos con mutación BRAF V600E y los 2 nódulos con fusión RET/PTC1 reveló que estaban asociadas

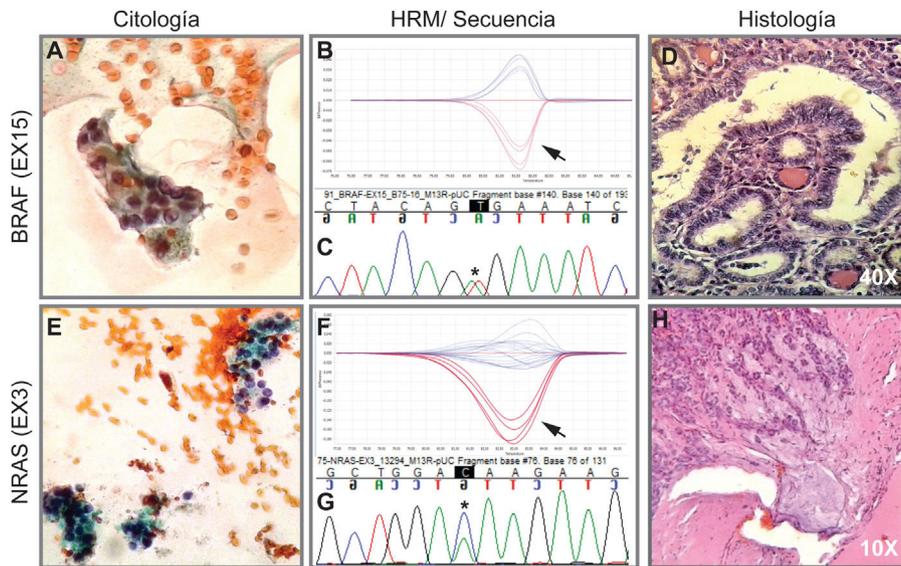


Figura 1 Imagen de citología, HRM, secuencia e histología. Arriba. Ejemplo de un extendido citológico de una proliferación folicular indeterminada categoría AUS/FLUS (A) que fue positivo para la mutación BRAF V600E indicado por la flecha en la curva de HRM (B) confirmado por secuenciación Sanger (C). Luego, la histología en D indica que es un carcinoma papilar variante folicular no encapsulado invasivo. Abajo. Ejemplo de citología de un nódulo diagnosticado como sospechoso de neoplasia folicular (E) con presencia de la mutación en NRAS-Ex3 detectada por HRM (F) y confirmada por secuenciación Sanger (G). La histología H indica que se trata de un carcinoma folicular encapsulado mínimamente invasivo. A y E corresponden a citologías coloreadas con la técnica de Papanicolaou. Las biopsias D y H están coloreadas con hematoxilina-eosina. Las flechas negras indican la curva de la muestra positiva más el control positivo. Los asteriscos en negro indican el cambio de base asociada a la mutación.

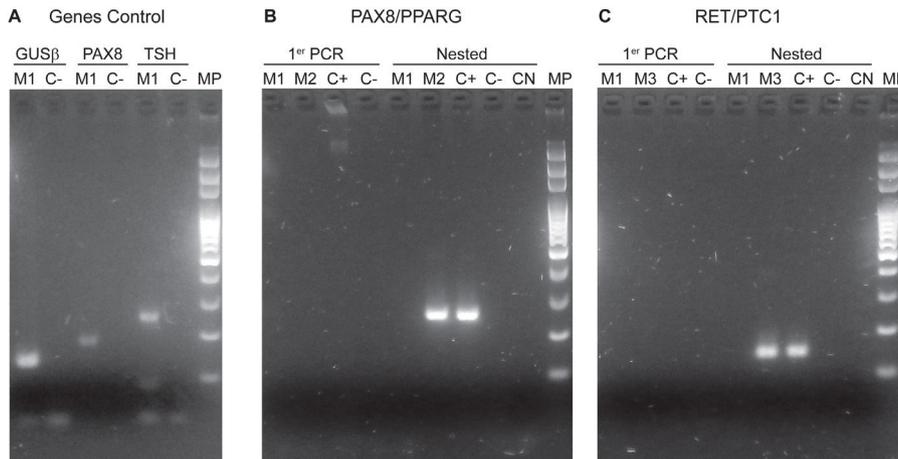


Figura 2 Fotos de corridas electroforéticas de PCR realizadas para la identificación de fusiones. A) Genes Control: GUSβ en líneas 1 y 2. PAX8 en líneas 3 y 4. TSH en líneas 5 y 6. Se observan las bandas positivas de la muestra M1. B) Fusión PAX8/PPARG: Se observa en las líneas 1, 2, 3 y 4 la primer PCR de las muestras M1 y M2. En las líneas 5, 6, 7, 8 y 9 se encuentra la nested PCR; se puede observar la banda correspondiente a la presencia de la fusión PAX8/PPARG en la muestra M2 y el correspondiente control positivo. C) Fusión RET/PTC1. En las líneas 1, 2, 3 y 4 la primer PCR de las muestras M1 y M3. En las líneas 5, 6, 7, 8 y 9 se encuentra la nested PCR. Se pueden observar las bandas correspondientes a la presencia de la fusión RET/PTC1 en la muestra M3 y el control positivo. MP: marcador de peso molecular. C(+): control positivo. C(-): control negativo. CN: control negativo de las nested PCR. M1, M2 y M3 son muestras de pacientes diferentes.

a microcarcinoma papilar y carcinoma papilar variante folicular, respectivamente (tabla 1). Cabe destacar que los microcarcinomas no fueron hallazgos incidentales ya que los pacientes fueron sometidos a biopsia por las características ecográficas que presentaban los nódulos. Además, fueron diagnosticados 4 adenomas foliculares y un carcinoma

folicular asociados a mutaciones en la familia de genes RAS. La fusión PAX8/PPARG fue la segunda mutación más frecuente en este grupo citológico, de las cuales 3 fueron halladas en adenomas foliculares y una en carcinoma folicular encapsulado con angioinvasión. En esta categoría, 6 de los 13 nódulos positivos fueron confirmados como malignos

Tabla 2 Rendimiento diagnóstico del análisis de test molecular en las categorías AUS/FLUS, FN/SFN

Test Molecular vs. Histología	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	ROM pretest	ROM postest
AUS/FLUS	75	90	67	93	17%	67%
FN/SFN	100	85	46	100	20%	46%
AUS/FLUS + FN/SFN	86	87	54	97	-	-

Riesgo de malignidad (ROM) antes del panel de 7 genes (ROM pretest), y después de la aplicación del test molecular (ROM postest). VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

poscirugía, es decir, un ROM-postest del 46%. Los 7 nódulos restantes fueron benignos (54%) pero con mutaciones PAX8/PPARG y RAS. De los 21 nódulos en los cuales no se hallaron mutaciones, se identificaron 14 adenomas foliculares, un adenoma de células de Hurthle y 6 correspondieron a otras patologías benignas. En esta categoría, 34 pacientes no fueron operados y fueron puestos en seguimiento mediante ecografía por un periodo mayor de un año. De estos pacientes, 14 no completaron el periodo de control y no fueron considerados verdaderos negativos. Con los resultados obtenidos en esta categoría se calculó un VPN del 100% y una especificidad del 85%. Al calcular el riesgo de malignidad para la categoría FN/SFN antes y después de la implementación del test molecular observamos un incremento del 20 al 46% (tabla 2).

Pacientes en seguimiento

El grupo de 54 pacientes que no presentaron mutación en sus nódulos fue puesto en seguimiento. El mismo consistió en ecografías de control de 12 a 48 meses. De los 54 pacientes, 20 presentaban citologías diagnosticadas como AUS/FLUS (37%) y 34 con citologías FN/SFN (63%). Se logró realizar el seguimiento correspondiente en 35 pacientes (65%), 15 con citologías AUS/FLUS y 20 con FN/SFN, los cuales no presentaron aumento de tamaño nodular en el periodo analizado y se consideran como verdaderos negativos a los fines de calcular el VPN (tabla 1).

Análisis general del total de muestras

Al analizar en conjunto el grupo total de pacientes operados y los que fueron puestos en seguimiento, se pudo observar que, de 112 nódulos tiroideos, 14 fueron diagnosticados como malignos en el análisis histológico. De las 98 muestras restantes, 44 fueron benignas confirmadas por su histología y 35 se consideraron benignas según el seguimiento ecográfico. No se logró obtener información de 19 pacientes cuyos nódulos fueron negativos para el panel de 7 genes y no completaron el seguimiento. La presencia de una mutación fue indicador de malignidad en el 55% de nódulos (12 de 22). Los 10 nódulos con mutaciones, pero con histología benigna, fueron considerados falsos positivos y por lo tanto la especificidad del test fue del 87% considerando ambas categorías juntas. De todos los nódulos malignos, solo en 2 de estos no se identificaron mutaciones por lo tanto se pudo calcular una sensibilidad del 86% (tabla 2).

Discusión

En estudios previos se ha demostrado la importancia que tiene el screening de estos 7 genes en PAAF con citologías indeterminadas^{16,19,20,25}, pero es la primera vez que se presentan los resultados obtenidos con la implementación del test de biología molecular en una población del norte de Argentina. Los resultados del panel de 7 genes sobre 112 muestras, junto con la histología y el seguimiento de los pacientes, ha permitido estimar una sensibilidad para las categorías AUS/FLUS y FN/SFN del 75% y 100%, respectivamente, comparable con la obtenida por Nikiforov et al.¹⁶ y Bellevisine et al.²². Con respecto a la especificidad, en la categoría AUS/FLUS (90%) se encuentra entre los valores reportados en otros trabajos que oscilan entre el 82 y 100%. En la categoría FN/SFN la especificidad obtenida fue del 85% y el VPP del 46%, lo cual puede deberse al mayor número de mutaciones RAS y PAX8/PPARG detectadas en nódulos con histología benigna. Por lo tanto, observamos que la mutación RAS y la fusión PAX8/PPARG se encuentran asociadas a un bajo riesgo de malignidad tiroidea del 37,5% y 17%, respectivamente.

Las mutaciones en RAS y PAX8/PPARG pueden encontrarse tanto en carcinomas de tiroides como en adenomas foliculares y nódulos hiperplásicos¹⁹. Varios estudios sugieren que las mutaciones en el gen RAS están involucradas en la primera fase de la transformación tumoral (adenoma a carcinoma) y en la diferenciación tumoral (carcinoma diferenciado a pobremente diferenciado e indiferenciado)²³. Además, se ha observado que ratones transgénicos que portan mutaciones en RAS desarrollan carcinomas de tiroides²³. Por lo tanto, se podría postular que RAS es un oncogén que contribuiría en la transformación gradual de las células tiroideas y la progresión de enfermedad benigna a tumor maligno²⁶. También es posible hallar mutaciones en el gen RAS en carcinomas pobremente diferenciados de tiroides y en carcinomas anaplásicos de tiroides, incrementando la evidencia de que mutaciones en este gen colaboran con la progresión hacia formas más agresivas²⁷.

En nuestro trabajo, tanto la mutación BRAF V600E como la fusión RET/PTC1 estuvieron asociadas a malignidad en un 100%. Considerando estos resultados, los pacientes con citologías indeterminadas que presenten una de estas dos mutaciones serían candidatos para tiroidectomías totales. Es importante destacar que la mayoría de los trabajos publicados incluyen en sus estudios moleculares las citologías sospechosas de malignidad, contribuyendo a aumentar la probabilidad de encontrar nódulos positivos con histología maligna sobreestimando la sensibilidad y especificidad de los test.

Existen discrepancias con respecto al seguimiento de aquellos nódulos que resultan negativos para marcadores moleculares y su consideración como patología benigna. Esto puede tener como consecuencia imprecisiones en los cálculos de valor diagnóstico³. Por esta razón, en el análisis estadístico de este estudio se incorporó a los pacientes con resultados negativos para el panel de 7 genes y con seguimiento ecográfico mayor de 1 año, sin aumento de tamaño nodular, como verdaderos negativos, de la misma forma que lo realizaron Eszlinger et al.²⁸ y Bellevicine et al.²², como así también Nikiforov et al. en 2009¹⁹, en sus estudios. Algunos autores indican que, para poder incluir estos nódulos que no han sido sometidos a cirugía y ser considerados como «verdaderos negativos», deben mantenerse sin cambios sospechosos durante un periodo de seguimiento²⁹. En un estudio prospectivo de 5 años con 1.567 nódulos tiroideos diagnosticados como benignos ecográficamente o citológicamente, se observó un crecimiento en el 11,1% de los nódulos³⁰. En nuestra experiencia, un nódulo con test molecular negativo se asoció a un riesgo residual de malignidad menor del 3%. Por lo tanto, el estudio ecográfico fue la elección clínica para el seguimiento de estos pacientes evitando, así, cirugías innecesarias.

La implementación del panel de 7 genes tuvo un impacto importante en nuestra institución. El ROM pretest calculado por el programa de anatomía patológica de la institución previo a la implementación del test de detección de mutaciones era del 17% para la categoría AUS/FLUS y del 20% para FN/SFN. El sistema Bethesda indica un incremento en el ROM que va del 10 al 30%⁸ para la categoría AUS/FLUS; en nuestra institución el incremento del ROM durante el periodo que comprende este estudio fue del 17 al 67% postest, para esta categoría. En la categoría FN/SFN, según Bethesda el incremento podría ser del 25 al 40%⁸; en nuestra experiencia el ROM se incrementó del 20 al 46% con la implementación del panel de 7 genes (ROM postest). El mayor riesgo de malignidad con test molecular en la categoría AUS/FLUS se explicaría porque las mutaciones encontradas incluyen, en mayor número, mutaciones BRAF y se correlaciona con los cambios celulares de atipia indeterminada papilar/folicular encontrados en estas categorías. En este contexto logramos disminuir las cirugías en un 48% de los pacientes analizados en este estudio que sin el uso del test molecular serían sometidos a cirugías diagnósticas.

Sin embargo, nuestro estudio presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, el número de muestras incluidas, si bien es una población de 112 pacientes, solo se detectaron 22 mutaciones (6 en BRAF, 8 en RAS, 6 fusiones PAX8/PPARG y 2 fusiones RET/PTC1). En segundo lugar, solo la mutación en BRAF y la fusión RET/PTC1 estuvieron asociadas en un 100% a malignidad. Las mutaciones en RAS y la fusión PAX8/PPARG solo se asociaron a malignidad en el 37,5% y 17% de los casos, respectivamente, por lo que tendrían un menor valor predictivo para el manejo clínico del paciente. No obstante, a pesar de la baja asociación con malignidad de las mutaciones en RAS en este estudio, la literatura indica que pueden representar formas preinvasivas de carcinomas o carcinomas mínimamente invasores³¹. Por lo tanto, la incorporación de nuevos pacientes permitirá ampliar el número de mutaciones detectadas y evaluar con mayor precisión el impacto de cada mutación en la predicción de malignidad en nuestra región.

Nuestro estudio demuestra que los pacientes con un nódulo tiroideo cuya citología es indeterminada (categorías III y IV de Bethesda) pueden beneficiarse del testeo mediante un panel de 7 mutaciones reduciendo el número de cirugías innecesarias en un 48% dado el alto valor predictivo negativo del test. Las mutaciones en BRAF y las fusiones RET/PTC1 de este panel fueron las más importantes para predecir malignidad en las categorías Bethesda III y Bethesda IV, respectivamente. En cambio, las mutaciones en los genes RAS tienen baja especificidad pues están presentes tanto en adenomas como en carcinomas. Por lo tanto, creemos que en un futuro cercano será necesaria la implementación de nuevas tecnologías como la secuenciación de nueva generación (NGS) que permita estudiar simultáneamente mutaciones en numerosos genes tales como TP53, TERT y PIK3CA³¹ para lograr una mayor precisión en el diagnóstico de malignidad en punciones tiroideas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración a los miembros del programa de endocrinología, del área de cirugía percutánea, técnicas cardíacas e imágenes y del sector de anatomía patológica del Hospital Dr. Arturo Oñativia por su colaboración en la realización de este trabajo. La presente investigación se ha realizado con los recursos del Hospital Dr. Arturo Oñativia y no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

Bibliografía

- Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA*. 2006;295:2164–7, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.295.18.2164>.
- Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype - Papillary, follicular, and anaplastic: A morphological and epidemiological study. *Endocr Pathol*. 2007;18:1–7, <http://dx.doi.org/10.1007/s12022-007-0002-z>.
- Sahli ZT, Smith PW, Umbricht CB, Zeiger MA. Preoperative molecular markers in thyroid nodules. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:179, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2018.00179>.
- Hsiao SJ, Nikiforov YE. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:301–13, <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-14-0166>.
- Moldes MS, Borghi Torzillo MF, Lutfi RJ, Faure EN. V Reunion Científica: XX Congreso AEM. RAEM. 2017;54:17.
- Faure EN, Soutelo MJ, Faraj G, Lutfi RJ, Juvenal GJ. Estimación de la incidencia de cáncer de tiroides en capital federal y el Gran Buenos Aires (período 2003-2011). *Rev Argent Endocrinol Metab*. 2012;49:20–4.
- Kim SW, Lee JI, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, et al. BRAF V600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAF V600E-prevalent population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:3693–700, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-2795>.

8. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *J Am Soc Cytopathol.* 2017;6:217–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasc.2017.09.002>.
9. Castro MR, Gharib H. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med.* 2005;142:926–31, <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-142-11-200506070-00011>.
10. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda system for reporting thyroid cytopathology: A meta-analysis. *Acta Cytol.* 2012;56:333–9, <http://dx.doi.org/10.1159/000339959>.
11. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, et al. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell.* 2014;159:676–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.050>.
12. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. Diagnosis of 'follicular neoplasm': A gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol.* 2002;26:41–4, <http://dx.doi.org/10.1002/dc.10043>.
13. Yassa L, Cibas ES, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Gawande A, et al. Long-term assessment of a multidisciplinary approach to thyroid nodule diagnostic evaluation. *Cancer.* 2007;111:508–16, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.23116>.
14. Ferraz C. Can current molecular tests help in the diagnosis of indeterminate thyroid nodule FNAB? *Arch Endocrinol Metab.* 2018;62:576–84, <http://dx.doi.org/10.20945/2359-3997000000081>.
15. Eszlinger M, Lau L, Ghaznavi S, Symonds C, Chandarana SP, Khalil M, et al. Molecular profiling of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13:415–24, <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.24>.
16. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: A prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:3390–7, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2011-1469>.
17. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: Genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63:1454–7, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1206706>.
18. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev.* 2007;28:742–62, <http://dx.doi.org/10.1210/er.2007-0007>.
19. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2092–8, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-0247>.
20. Cantara S, Capezzone M, Marchisotta S, Capuano S, Busonero G, Toti P, et al. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:1365–9, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2009-2103>.
21. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American thyroid association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19:1167–214, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2009.0110>.
22. Bellecicine C, Migliatico I, Sgariglia R, Nacchio M, Vigliar E, Pisapia P, et al. Evaluation of BRAF, RAS RET/PTC, and PAX8/PPARg alterations in different Bethesda diagnostic categories: A multicentric prospective study on the validity of the 7-gene panel test in 1172 thyroid FNAs deriving from different hospitals in South Italy. *Cancer Cytopathol.* 2020;128:107–18, <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.22217>.
23. Eszlinger M, Krogdahl A, Münz S, Rehfeld C, Precht Jensen EM, Ferraz C, et al. Impact of molecular screening for point mutations and rearrangements in routine air-dried fine-needle aspiration samples of thyroid nodules. *Thyroid.* 2014;24:305–13, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2013.0278>.
24. Sapio MR, Posca D, Raggioli A, Guerra A, Marotta V, Deandrea M, et al. Detection of RET/PTC TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;66:678–83, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02800.x>.
25. Ferraz C, Rehfeld C, Krogdahl A, Precht Jensen EM, Bösenberg E, Narz F, et al. Detection of PAX8/PPARG and RET/PTC rearrangements is feasible in routine air-dried fine needle aspiration smears. *Thyroid.* 2012;22:1025–30, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2011.0391>.
26. Nikiforov YE, Carty SE, Chiosea SI, Coyne C, Duvvuri U, Ferris RL, et al. Impact of the Multi-Gene ThyroSeq Next-Generation Sequencing Assay on Cancer Diagnosis in Thyroid Nodules with Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance Cytology. *Thyroid.* 2015;25:1217–23, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2015.0305>.
27. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest.* 2016;126:1052–66, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI85271>.
28. Eszlinger M, Böhme K, Ullmann M, Görke F, Siebolts U, Neumann A, et al. Evaluation of a two-year routine application of molecular testing of thyroid fine-needle aspirations using a seven-gene panel in a primary referral setting in Germany. *Thyroid.* 2017;27:402–11, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2016.0445>.
29. Duh QY, Busaidy NL, Rahilly-Tierney C, Gharib H, Randolph G, et al. Systematic review of the methods of diagnostic accuracy studies of the Afirma Gene Expression Classifier. *Thyroid.* 2017;27:1215–22, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2016.0656>.
30. Durante C, Costante G, Lucisano G, Bruno R, Merigo D, Paciaroni A, et al. The natural history of benign thyroid nodules. *JAMA.* 2015;313:926–35, <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.0956>.
31. Nishino M. Molecular cytopathology for thyroid nodules: a review of methodology and test performance. *Cancer Cytopathol.* 2016;124:14–27, <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.21612>.