

Universidad de la República

Facultad de Medicina

Escuela de Graduados

Pro.In. Bio

Nódulo tiroideo problema, aportes de la biología molecular al diagnóstico

Tesis de Maestría

Autora: Dra. María Emilia Moreira

Tutor de especialidad: Dr. Edgardo Berriel

Directora académica: Dra. Nora Berois

Montevideo, 7 de enero, 2025

Resumen:

Introducción: El cáncer de tiroides es una neoplasia frecuente en el sexo femenino siendo de mayor incidencia los cánceres diferenciados de tiroides, predominantemente el cáncer papilar. El diagnóstico inicial se basa en la clasificación citopatológica de Bethesda a partir de muestras obtenidas por citopunción. Las lesiones Bethesda III y IV representan un reto diagnóstico por tratarse de lesiones en las que no se puede determinar su etiología por este método. El 30% de estas lesiones corresponderán a patología maligna, en su mayoría a la variante folicular del carcinoma papilar, menos frecuentemente a lesión folicular no invasiva con núcleos tipo papilares. El carcinoma folicular raras veces es hallado en la pieza quirúrgica en nuestra población. Para evitar someter a cirugía a pacientes portadores de patología benigna se han estudiado numerosos marcadores tumorales que ayuden a determinar la etiología de las lesiones, entre ellos mutaciones de *TERTp* y *BRAF* V600E. El objetivo fue valorar la utilidad de estos marcadores en la determinación etiológica de los nódulos.

Metodología: Se realizó un estudio prospectivo de los pacientes con patología nodular tiroidea asistidos en el Hospital Maciel entre octubre del 2020 y abril 2022 que voluntariamente aceptaron participar, realizando registro tabulado de variantes clínicas y ecográficas. Se obtuvo muestra al momento de la citopunción diagnóstica, y en el acto quirúrgico de aquellos que se operaron. Se realizó extracción de ADN, amplificación por PCR para genes *BRAF*, *TERT* y *KRAS*. *BRAF* V600E fue estudiado mediante AS-PCR y visualización del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa y *KRAS* con el kit cobas *KRAS* Mutation Test. Se contrastaron los resultados con las variables clínicas, ecográficas, clasificación Bethesda y la anatomía patológica de los pacientes operados. También se buscó la mutación *BRAF* V600E mediante biopsia líquida en sangre.

Resultados: Se incluyeron 155 pacientes en el estudio de los que se obtuvieron 180 muestras y 33 piezas en parafina. Para la población general de los pacientes se encontró una edad media de 55.0 +/- 14.3 años, 145 (93.5%) fueron de sexo femenino y 10 (6.5%) de sexo masculino. Los nódulos correspondieron a Bethesda II en 136 (88.3%) pacientes, Bethesda III en 2 (1.3%) pacientes, Bethesda IV en 4 (2.6%) pacientes, Bethesda V en 8 (5.2%) pacientes y Bethesda VI en 4 (2.6%) pacientes. Se sometieron a cirugía 23 (14.8%) pacientes ya sea por punción sugestiva o confirmatoria de malignidad o por el tamaño del bocio aun con punciones benignas. Se confirmó malignidad en 13 (8.4%). Se identificó la mutación *BRAF* V600E en las muestras de 16 (9.8%) de los pacientes. Entre los pacientes que presentaban la mutación y los que no la presentaban se vio diferencia significativa en el número de nódulos, la ecogenicidad y la proporción de pacientes con citología benigna. Se identificaron como factores de riesgo el sexo masculino, el número de nódulos, la presencia de calcificaciones, la hipoeogenicidad y la consistencia sólida. Se encontró asociación entre la patología maligna y la presencia de la mutación *BRAF* V600E ($p < 0.001$), estando la mutación presente en 62.5% de los pacientes portadores de patología maligna. Se obtuvo una sensibilidad de 64.7% y especificidad de 95.4%, con valor predictivo positivo de 75.9% y valor predictivo negativo de 92.3%. Se logró la amplificación de *KRAS* normal, no identificándose pacientes con las mutaciones de

interés en nuestra población. No se logró amplificación de *TERT* ni de ADN circulante de *BRAF* mediante biopsia líquida.

Conclusiones: La detección del marcador molecular *BRAF* V600E es una técnica adecuada para completar la valoración citopatológica de los nódulos tiroideos, pudiendo ayudar en la toma de decisiones terapéuticas.

Palabras clave:

Nódulo tiroideo problema, citología indeterminada, *BRAF* V600E, *TERT*_p, *KRAS*, biopsia líquida, cáncer de tiroides

Contenido

Resumen.....	2
Palabras clave.....	3
Contenido.....	4
Introducción.....	6
Importancia del tema.....	6
Reseña anatómica, histológica y funcional.....	8
Patología tiroidea.....	11
Nódulo tiroideo.....	11
Cáncer de tiroides.....	11
Diagnóstico.....	16
Presentación clínica.....	16
Estudios paraclínicos.....	16
Marcadores moleculares.....	20
Tratamiento.....	25
Objetivos.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos.....	28
Materiales y métodos.....	29
Selección de pacientes.....	29
Muestras clínicas.....	29
Extracción de ADN.....	30
Aislamiento de plasma.....	31
Primers para PCR.....	32
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para <i>BRAF</i>	32
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para <i>TERTp</i>	34
Identificación de mutaciones <i>KRAS</i>	36
Biopsia líquida.....	36
Análisis estadístico.....	36
Aspectos éticos.....	37
Resultados y discusión.....	38

Descripción de la población.....	38
Anatomía patológica.....	44
Optimización de PCR.....	46
Marcador tumoral <i>BRAF</i>	47
Marcador molecular <i>TERT</i>	53
Marcador molecular <i>KRAS</i>	54
Factores de riesgo.....	55
Biopsia líquida.....	59
Validez de la prueba diagnóstica.....	60
Limitaciones del estudio.....	61
Perspectivas.....	62
Conclusiones.....	62
Anexos.....	64
Bibliografía.....	66

Introducción:

El cáncer de tiroides es la neoplasia maligna más frecuente del sistema endocrino (Cabanillas, 2016). En Uruguay se presenta con una incidencia de 2,81 casos cada 100.000 habitantes/año en mujeres y 0,73 casos cada 100.000 habitantes/año en hombres (Barrios, 2020). Los cánceres diferenciados de tiroides corresponden aproximadamente al 95% de todos los cánceres de tiroides, siendo menos del 5% la proporción de cánceres medulares o indiferenciados (Ferrari, 2018). Suelen presentarse en forma de nódulo tiroideo el cual puede ser solitario o asentar sobre una glándula patológica. La mayoría de los nódulos tiroideos no son neoplásicos correspondiendo en general a nódulos de hiperplasia-involución (Cimarra, 2014).

La detección de nódulos tiroideos en la población adulta ha ido en aumento en los últimos años principalmente vinculado a los avances de la tecnología y el uso difundido del estudio de ecografía (Cimarra, 2014; Sanabria, 2018; Díaz, 2023). Es de fundamental importancia diferenciar si estos corresponden a patología benigna o maligna dadas sus implicancias pronósticas y terapéuticas.

Las lesiones clasificadas como Bethesda III y IV son las que representan un auténtico reto diagnóstico (Ali, 2023; Alzumaili, 2023; Macvanin, 2023; Patel, 2023). El 25 a 30% de estas lesiones corresponderán a neoplasias malignas en el estudio posquirúrgico de la pieza (Laguzzi, 2014; Ferris, 2015; Macvanin 2023). La más frecuente es la variante folicular del carcinoma papilar que corresponde a lesiones con patrón folicular no encapsuladas con atipias nucleares papilares típicas (Díaz, 2023).

En este tipo de nódulos, la citología no es suficiente para determinar si se trata de una patología benigna o maligna, siendo necesario un estudio histológico de la pieza lo que lleva en muchos a casos a recurrir a la cirugía como último gesto diagnóstico. Se suele optar por lobectomía, que en casos de patología benigna implica un sobretratamiento, mientras que de tratarse de una patología maligna el tratamiento resulta insuficiente, limitando opciones terapéuticas, en especial el uso de radioyodo, pudiendo evolucionar a una recurrencia tumoral (Angell, 2018; Walters, 2021).

El conocimiento de mecanismos moleculares de la carcinogénesis tiroidea aporta información relevante y oportunidad para el desarrollo de pruebas diagnósticas y algoritmos terapéuticos con potencial beneficio para la práctica asistencial (Prete, 2020). En el afán de evitar cirugías innecesarias, en los últimos años se han buscado marcadores moleculares, siendo los más estudiados *TERTp*, *BRAF V600E*, *TSHR*, *H/K/RAS*, *RET* y *PAX8/PPARg*, con potencial utilidad para dilucidar la etiología benigna o maligna de los nódulos tiroideos indeterminados (Nikiforov, 2017; Alzumaili, 2023; Patel, 2023).

Importancia del tema:

Los marcadores moleculares para el cáncer de tiroides ya han sido valorados a nivel mundial, sin embargo, no existen estudios sobre estos marcadores en nuestro medio. Destacamos la importancia de validar dichos marcadores en nuestra población dado que, reducir el número de cirugías realizadas en casos con patología benigna, implica

un beneficio para el paciente, evitando morbilidad a corto y largo plazo, así como para el sistema de salud, disminuyendo la carga económica de cirugías innecesarias. De la misma manera permitirá optimizar recursos optando por la opción quirúrgica en pacientes que presentan nódulos problema con mutaciones sugestivas de malignidad, evitando un seguimiento que puede ser prolongado con la posibilidad de pérdida del paciente durante el mismo y consecuente progresión de su enfermedad.

Este estudio también permitiría evaluar la prevalencia de los diferentes tipos de cáncer de tiroides en nuestra población ya que ésta ha ido cambiando con el tiempo, disminuyendo la incidencia del cáncer folicular tradicionalmente vinculado a la deficiencia de yodo. Este cambio se vio influenciado por políticas de salud pública que implican la yodación de la sal de mesa.

Cada vez surge más evidencia del interés del estudio poblacional de los marcadores moleculares en conjunto con el nuevo enfoque de la medicina personalizada y de precisión, por lo que creemos que nuestro trabajo significará una contribución real para el manejo clínico del cáncer de tiroides en Uruguay.

Reseña anatómica, histológica y funcional:



Figura 1: Imagen anterior de cuello, Bocio grado IV con nódulo mayor a derecha (Imagen de nuestra autoría)

La glándula tiroides es parte del sistema endócrino, es una glándula impar situada a nivel de la logia tiroidea en el compartimiento anterior del cuello. Esta logia se delimita por el hueso hioides por encima, el hueso esternal por debajo, los músculos esternocleidomastoideos a ambos lados y la fascia cervical y músculos infrahioides por delante. Los nódulos tiroideos grandes son visibles a simple vista (Figura 1).

La glándula está compuesta por dos lóbulos, derecho e izquierdo, unidos por un istmo transversal. Los lóbulos tiroideos presentan una base más gruesa que se adelgaza hacia arriba hasta terminar en un vértice y se extiende desde el cartílago tiroideo hasta el 5to o 6to anillo traqueal (Latarjet, 1999; Rouvier, 2005).

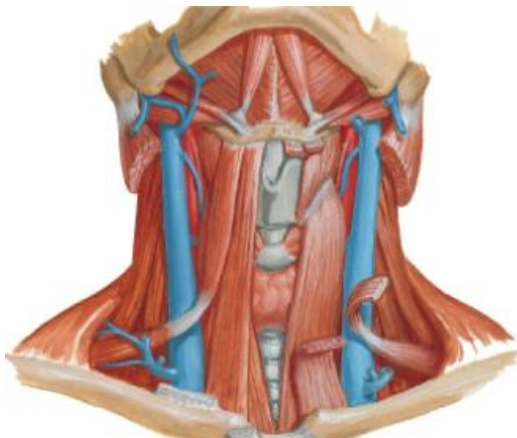


Figura 2: Visión anatómica del cuello. (Atlas de anatomía humana, Netter, F. 7ma edición)

La glándula tiroidea evoluciona con la edad y varía en las mujeres en relación con el ciclo menstrual y el embarazo. La glándula se relaciona por delante con el plano muscular infrahioides, esternocleidomastoideo y plano musculofascial superficial. Por detrás con el eje visceral del cuello compuesto por la faringe, tráquea y el esófago y los nervios laríngeo superior y recurrente. Lateralmente el eje yugulocarotideo y el nervio vago, el asa del hipogloso y el simpático cervical. A nivel de los polos superior e inferior presenta íntima relación con las glándulas paratiroides, si bien la topografía y número de estas últimas puede ser variable (Latarjet, 1999; Rouvier, 2005)

(Figura 2).

La irrigación es por las arterias tiroideas superiores e inferiores que se anastomosan entre ellas mediante el arco comunicante supraístmico y las anastomosis longitudinales posteriores. Las arterias tiroideas superiores e inferiores se acompañan de las venas tiroideas superiores e inferiores para el drenaje venoso de la glándula. Las venas tiroideas medias no acompañan arterias y se encuentran en número de dos o tres formando plexos y conducen las hormonas tiroideas a la circulación general (Latarjet, 1999; Rouvier, 2005).

El drenaje linfático de la tiroides se produce primero hacia los ganglios peritorídeos y periviscerales (ganglios prelaríngeos, pretraqueales y paratraqueales; grupo VI) y mediastinales superiores (grupos VII) y luego hacia los grupos yugulocarotídeos y supraclaviculares (grupos IIA, III, IV y VB) (Zanaret, 2005) (Figura 3)

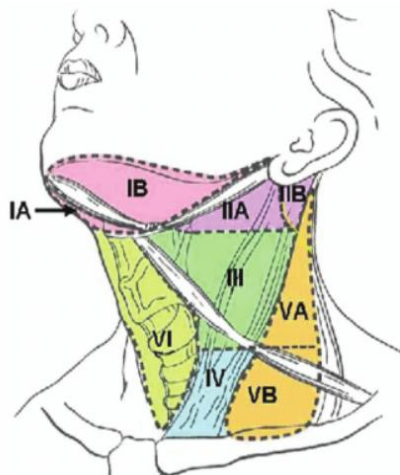


Figura 3: Grupos ganglionares: IA ganglios submentonianos; IB ganglios submandibulares; IIA ganglios yugulares altos por delante del nervio espinal; IIB por detrás del nervio espinal; III ganglios yugulares medios; IV ganglios yugulares bajos; VA ganglios del triángulo posterior por encima de borde inferior de anillo cricoideo anterior, VB por debajo de ese borde; VI ganglios del compartimiento central del cuello, periglandulares y periviscerales (prelaríngeos, pretraqueales y paratraqueales); VII mediastinales superiores.

(Pitoia, F. Thyroid cancer. In search of individualized treatment. Medicina 72(6):503-13)

Estas relaciones, así como su irrigación y drenaje linfático cobran especial importancia ante la patología maligna ya que la invasión de estructuras vecinas tendrá implicancias sobre la técnica quirúrgica.

La unidad funcional de la glándula es el folículo tiroideo que corresponde a una formación redonda u oval y con una pared revestida por células foliculares. La luz folicular contiene el coloide, entre el coloide y las células es posible encontrar vacuolas de reabsorción. Los folículos van de 1mcr a 1mm de diámetro según si se hallan en fase secretora o de almacenamiento y entre ellos encontramos tejido conectivo. Los folículos pueden componerse de células foliculares, involucradas en la producción, síntesis y almacenamiento de hormonas tiroides y células parafoliculares o C, que corresponden al sistema neuroendocrino (Heredia-Jara, 2021).

Las células foliculares normales tienen un citoplasma eosinófilo, con núcleos redondos, cromatina homogénea, uno o más nucleolos y abundante retículo endoplasmático rugoso, lisosomas mitocondrias y aparato de Golgi. Las células foliculares expresan tiroglobulina y receptor para tirotropina (TSH) (Heredia-Jara, 2021).

Las células parafoliculares corresponden a menos del 0.1% de la glándula y se ubican dentro de la membrana basal del folículo, sin estar expuestas a la luz folicular, de ahí su nombre. Los núcleos de estas células son algo más grandes y pálidos, y se identifican numerosos gránulos neurosecretorios de diferente densidad. Estas células producen calcitonina que participa en la regulación del calcio sérico y su función presenta regulación negativa por los niveles de calcio en sangre. A diferencia de las células foliculares que se tiñen con los colorantes habituales como hematoxilina y eosina, estas células se identifican mediante inmunohistoquímica con anticalcitonina (Heredia-Jara, 2021).

El coloide está compuesto por tiroglobulina que es una glucoproteína dimérica yodada producida por las células foliculares (Heredia-Jara, 2021).

La función de la glándula tiroides es la producción de hormona tiroidea que actúa en casi todos los tejidos del organismo a nivel nuclear regulando el metabolismo. La síntesis de estas hormonas se produce en la célula folicular y está compuesta de tiroglobulina y yodo. La membrana de la célula capta yoduro y lo almacena en vesículas que en su interior se oxida a yodo. Ahí se une a aproximadamente 10% de los residuos de tirosina que posteriormente formaran tiroglobulina y da monoyodotirosina o diyodotirosina. La unión de dos residuos de diyodotirosina da tiroxina (T4) y la unión de un residuo de monoyodotirosina con uno de diyodotirosina da triyodotironina (T3). En el retículo endoplasmático rugoso se produce la síntesis de tiroglobulina a partir del contenido de las vesículas y está formada por T3, T4, diyodotirosina, monoyodotirosina y tirosina sin yodar. La tiroglobulina es transportada a la luz del folículo y almacenada junto con el coloide. Cuando se requiere T4 se interioriza coloide a la célula folicular en endosomas que se fusionan a lisosomas y por acción de las hormonas líticas se libera T3 y T4 al torrente sanguíneo. La diyodotirosina y monoyodo tirosina que es degradada dentro de la célula folicular se recicla para reutilización del yodo. En la tiroides se produce el 100% de la T4 y el 20% de la T3 circulantes. A nivel sanguíneo ambas hormonas se hallan unidas a proteínas transportadoras, en su mayoría a la globulina transportadora de tiroxina (Heredia-Jara, 2021; Santiago-Peña, 2021).

Esta producción es estimulada por la hormona TSH secretada a nivel de la hipófisis, la cual tiene una regulación negativa, ante bajos niveles de hormona tiroidea aumenta la producción de TSH estimulada por la producción de triptorelina (TRH) a nivel del hipotálamo (Santiago-Peña, 2021).

Patología tiroidea

Nódulo tiroideo:

El nódulo tiroideo es una entidad de difícil definición ya que no constituye una entidad nosológica definida. Estos corresponden a una estructura distinta al parénquima circundante, de forma redondeada u ovoidea, localizada sobre una glándula tiroides homogénea. Estos nódulos pueden ser únicos o múltiples y pueden corresponder a diversas patologías benignas o malignas que asientan sobre la glándula (Cimarra, 2014, Durante, 2018).

Los nódulos tiroideos son una patología frecuente en la población y se incrementa su frecuencia con la edad. Su identificación mediante el examen clínico de cuello es del 5 al 10%. Hoy en día los avances tecnológicos y el mayor acceso a estudios paraclínicos por parte de la población permiten la identificación de nódulos más pequeños que previamente pasaban desapercibidos mediante el examen, siendo su incidencia de hasta el 70% según diversos reportes (Takami, 2013; Cimarra, 2014; Haugen, 2016, Durante, 2023). El aumento del diagnóstico también se puede ver incrementado en relación a la situación medicolegal de cada país, dado que en algunos países hay un alto número de litigios por mala praxis. Ante esta posibilidad algunos médicos solicitan paraclínica adicional para evitar pasar por alto una patología potencialmente maligna por miedo a las posibles consecuencias medicolegales, aun cuando la indicación del estudio no sea realmente necesaria (Sanabria, 2018).

El aumento del diagnóstico en la población, aún en la población asintomática, plantea el desafío de lograr también un diagnóstico etiológico.

El incremento en la detección de nódulos tiroideos implica, a nivel individual, la concurrencia a nuevas citas en el hospital para completar los estudios diagnósticos por parte del paciente. A nivel institucional, aumenta la sobrecarga del sistema en cuanto a disponibilidad de recursos materiales y humanos para realizar los procedimientos necesarios, así como un incremento exponencial en los costos. Estudios que, considerados individualmente no corresponden a un gasto elevado, al considerarlos en su conjunto con el aumento del número de pacientes, pueden representar un costo no despreciable para las diversas instituciones. Y en algunos casos este costo se puede perpetuar en el tiempo cuando los pacientes requieren un seguimiento prolongado o someterse a un procedimiento quirúrgico (Castro Porto Silva Janovskt, 2018; Hyun, 2019).

Cáncer de tiroides:

Si se toman en consideración todos los nódulos tiroideos, 5 a 15% de ellos corresponderán a cáncer de tiroides (Haugen, 2015, Durante, 2023), siendo estos los cánceres más frecuentes del sistema endócrino (Baloch, 2022). Corresponden al 1% del total de los cánceres (Takami, 2013).

La incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado en las últimas tres décadas a nivel mundial y se espera que se posicione en el 4to lugar por incidencia para el 2030

(Sanabria, 2018). Este aumento se relaciona con el avance en los métodos diagnósticos, sin embargo, la mortalidad se ha mantenido igual en la mayoría de los países (Takami, 2013; Haugen, 2016; Takano, 2017; Solis-Pazmino, 2021). Esto podría estar vinculado con el diagnóstico de mayor cantidad de nódulos de tamaño más pequeño, que podrían corresponder a microcarcinomas papilares los cuales presentan evolución menos agresiva que los cánceres diferenciados de tiroides (Sanabria, 2018). Sin embargo, es importante destacar que, en algunos países de América del Sur, como Ecuador, Colombia y Perú se registran las mayores tasas de mortalidad por cáncer de tiroides sólo superados por Kuwait (Sierra, 2016)

En Uruguay se mantiene la misma tendencia que a nivel mundial, con un gran aumento de la incidencia en los últimos años, manteniéndose estable o incluso levemente disminuyendo la mortalidad (Garau, 2019; Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer). De acuerdo a lo reportado por la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer en el Registro Nacional del Cáncer en su informe del 2024, la incidencia del cancer de tiroides fue de 10.25 casos cada 100.000 habitantes/año en mujeres y 1.94 casos cada 100.000 habitantes/año en hombres. De esta forma se posiciona en el 5to lugar por su incidencia en mujeres y no se halla dentro de los primeros 10 cánceres por incidencia en hombres (Comisión El proceso de

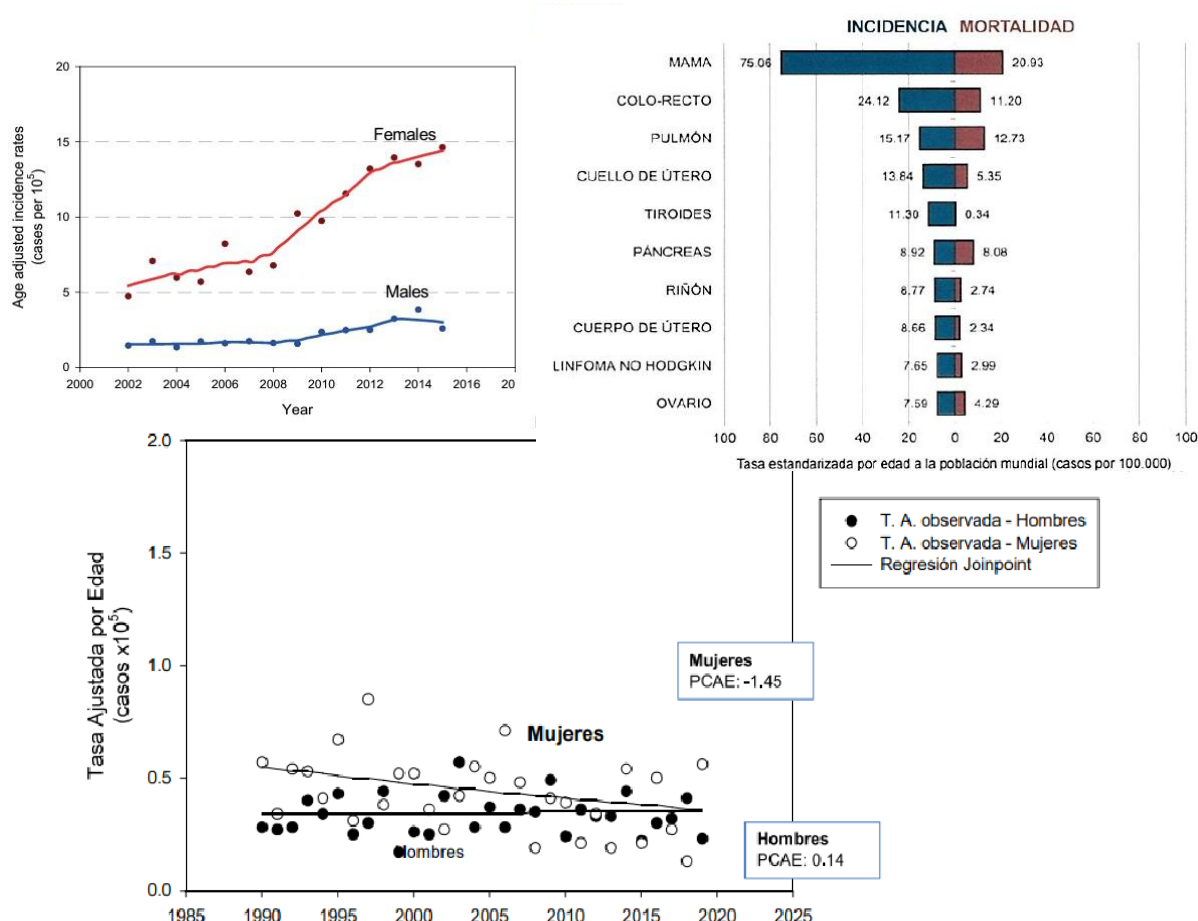


Figura 4: A la izquierda gráfica de incidencia para el período 2002-2015 por sexo, a la derecha gráfica de incidencia y mortalidad de los 10 cánceres más frecuentes en mujeres para el período 2016-2020, abajo la mortalidad por sexo para el período 1990-2020 (<https://www.comisioncancer.org.uy>).

carcinogénesis tiene múltiples pasos en los cuales las células foliculares o parafooliculares tiroideas sufren daño a nivel del genoma, particularmente sobre los proto-oncogenes o los genes supresores de tumor. Estos daños otorgan a la célula la capacidad de proliferar, invadir tejidos circundantes y en algunos casos la habilidad de generar metástasis a distancia (Takano, 2017).

Los cánceres de tiroides se pueden dividir en diferenciados que incluyen el cáncer papilar y folicular, pobremente diferenciados, anaplásico y medular. Recientemente se añadió el cáncer pobremente diferenciado como una categoría aparte ya que antes era considerado dentro de los cánceres diferenciados. Dentro de estos es ampliamente más frecuente el cáncer papilar siendo su incidencia en torno al 90%, menos frecuente es el cáncer folicular en sólo el 5% de los casos (Takami, 2013).

El cáncer papilar de tiroides es en general esporádico, si bien también hay reportes de carcinoma papilar familiar y se caracteriza por la alineación de células con una forma papiloide con núcleos alargados, con cromatina periférica, nucleoplasma claro, contornos irregulares y pseudoinclusiones nucleares. Muchas veces aparecen como núcleos vacíos, por lo cual han recibido la denominación de “núcleos como los ojos de la huerfanita Annie” Estas características nucleares son las que permiten el diagnóstico mediante la citopunción preoperatoria. La permeación linfática de estos tipos de cánceres explica el relativamente alto riesgo de adenopatías positivas. Los subtipos con células altas, columnares y en tacha se asocian a mayor agresividad (Pinto-Blázquez, 2020; Baloch, 2022) (Figura 5)

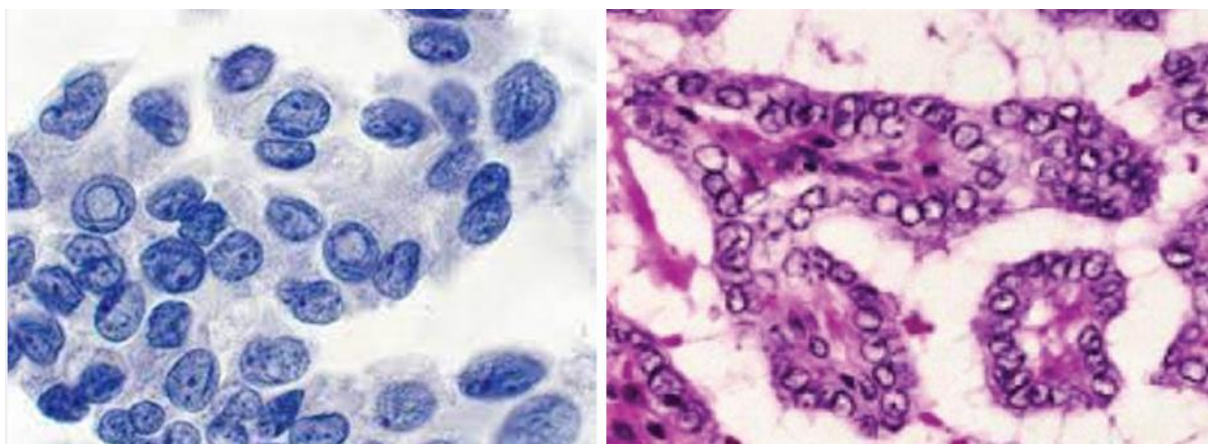


Figura 5: A la izquierda se ven núcleos irregulares, grandes y pseudoinclusiones nucleares (Pinto-Blázquez, 2020), a la derecha se ve el clásico crecimiento con patrón papilar y núcleos vacíos “como ojos de la huerfanita Annie” (<https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillary.html>).

Los microcarcinomas papilares corresponden a un subtipo del cáncer papilar definidos por tamaño menor a 1cm (Baloch, 2022) y han visto aumentada su incidencia en los últimos años como consecuencia de la mejor resolución de los ecógrafos y personal más entrenado en su uso. Si bien estos corresponden a cánceres propiamente dichos, su capacidad de proliferación es limitada y corresponden sólo en un 5 a 8% de los mismos a cánceres agresivos. No contribuyen significativamente a la mortalidad por cáncer de tiroides. Se plantea que los

macrocarcinomas presentan una evolución más agresiva en relación a mayor acumulación de mutaciones con el paso del tiempo (Takano, 2017; López, 2021).

Otra variante poco agresiva dentro de los cánceres de tiroides es la neoplasia tiroidea folicular no invasiva con características nucleares de tipo papilar o NIFTP por sus siglas en inglés, antes conocida como variante folicular no invasiva del carcinoma papilar. Para considerarse dentro de esta categoría el tumor debe cumplir con las condiciones de buena delimitación o encapsulación, menos de 1% de papilas, ausencia de cuerpos de psamoma, características nucleares de carcinoma papilar, ausencia de invasión vascular, capsular y necrosis. Si bien este tipo de tumor tiene la capacidad de producir metástasis, su incidencia es menor al 1%, misma condición que comparten con los tumores de potencial maligno incierto y los tumores trabeculares hialinizantes (Baloch, 2022). Esta clasificación tendrá también implicancias sobre la terapéutica (Figura 6).

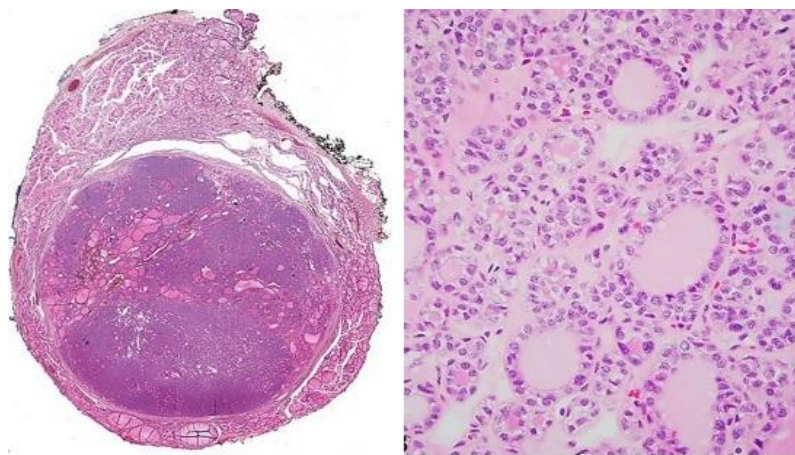


Figura 6: A la izquierda NIFTP rodeado por una cápsula, sin invasión. A la derecha se ven folículos de tamaño pequeño a normal, con características papilares como núcleos alargados, con membranas irregulares y aclaramiento de la cromatina (Baloch, 2022)

El carcinoma folicular se define como el tumor tiroideo que crece a partir de células foliculares que no presenta características nucleares del cáncer papilar. Son neoplasias encapsuladas de crecimiento invasivo. Este se puede clasificar en mínimamente invasivo, encapsulado, angioinvasivo y ampliamente invasivo aumentando su agresividad respectivamente. Los tumores de células de Hurtle presentan más del 75% de células oncocíticas y los no invasivos corresponden a adenomas oncocíticos (Baloch, 2022).

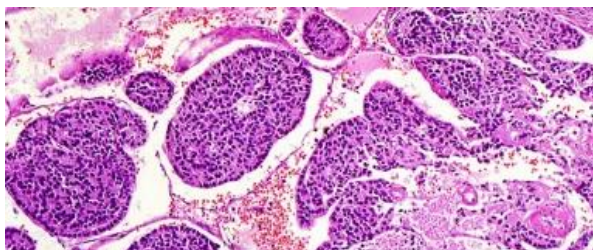


Figura 7: Carcinoma pobremente diferenciado. Se identifica necrosis y ausencia de patrón papilar (Baloch, 2022)

El carcinoma pobremente diferenciado es una neoplasia de células foliculares con escasa diferenciación y es una etapa intermedia entre el cáncer diferenciado y el anaplásico. Se presenta con histología sólida, trabecular, patrón de crecimiento insular o una combinación de estos (Baloch, 2022). (Figura 7)

Los carcinomas anaplásicos son los cánceres de tiroides de peor pronóstico y están dentro de los tumores humanos más agresivos; las células que los componen son indiferenciadas pudiendo presentar un componente de carcinoma diferenciado. Dentro de esta categoría se encuentran también los carcinomas escamosos de tiroides con el que comparte un ominoso pronóstico (Baloch, 2022). (Figura 8).

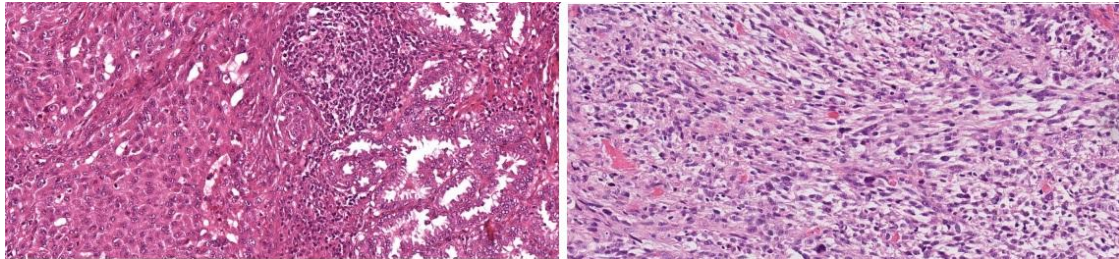


Figura 8: A la izquierda cáncer anaplásico con diferenciación escamosa asociado a carcinoma papilar con células en tachuela. A la derecha cáncer anaplásico con células en forma de huso (Baloch, 2022)

El carcinoma medular se desarrolla a partir de las células parafoliculares o células C de la glándula tiroides y se caracteriza por la producción de calcitonina. En este tipo de cáncer de tiroides es más frecuente la presentación familiar respecto a los demás y alcanzan hasta el 40% de los casos contra sólo 5% de presentación familiar en los cánceres diferenciados. Los cánceres medulares asocian el síndrome MEN2 en 20 a 25% de los pacientes (Takami, 2013). En estos casos su aparición es más temprana en la vida que en los casos esporádicos (Master, 2023). Su agresividad se valora en base a su capacidad de proliferación (actividad mitótica y Ki67) y necrosis (Baloch, 2022) (Figura 9)

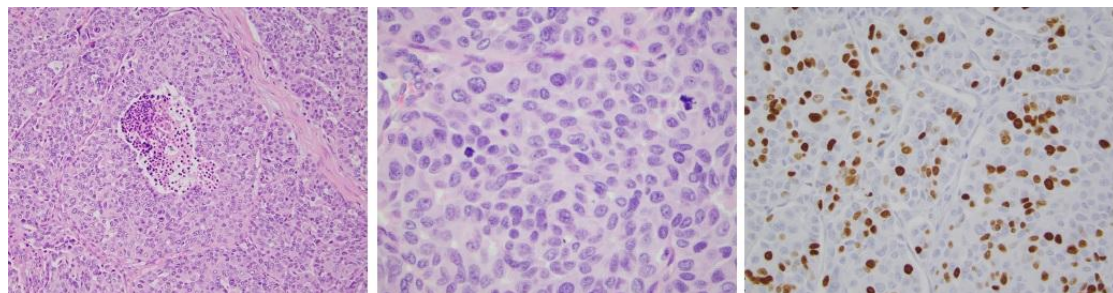


Figura 9: A la izquierda ejemplo de cáncer medular de alto grado. En el centro una cuenta mitótica de 16 mitosis por campo. A la derecha Ki 67 de 35% (Baloch, 2022)

Diagnóstico:

Presentación clínica:

La presentación clínica de la patología tiroidea maligna se manifiesta inicialmente con la identificación de un nódulo que asienta sobre la glándula tiroides. Este puede ser único o múltiple. Al tomar contacto con el paciente se debe consignar una historia clínica completa. En cuanto a los antecedentes familiares, se deberá indagar si a alguien en su familia se le diagnosticó cáncer de tiroides dada la existencia de patologías tiroideas con alto componente genético. En lo que respecta a los antecedentes personales, se deberá consignar alteraciones tiroideas funcionales o morfológicas preexistentes, tumores asociados sobre las glándulas paratiroides suprarrenales o del tracto digestivo por su asociación mediante el síndrome de neoplasia endócrina múltiple tipo 2, exposición a radiación terapéuticas o ambientales, procedencia en relación a áreas con déficit de yodo y presencia de obesidad (Takami, 2013; Cimarra, 2014; Haugen 2016, Durante, 2023). En las mujeres se deben consignar también los antecedentes ginecobstétricos dada la relación del ciclo ovulatorio con el desarrollo de nódulos tiroideos (Wang, 2021).

Una vez registrados detalladamente los antecedentes se procede a indagar sobre la patología actual del paciente. En relación al nódulo problema se debe consignar la fecha de aparición en caso de que lo haya notado el paciente, o la fecha del estudio paraclínico en el cual se identificó el mismo, la evolución en el tiempo en cuanto a aumento del tamaño y presencia de síntomas asociados como dolor, cambios en la piel, alteración en la fonación, respiración o deglución. En cuanto al funcionamiento de la glándula será importante conocer elementos clínicos de hiper o hipotiroidismo ya que la presencia de un nódulo hiperfuncionante aleja del planteo de patología maligna (Cimarra, 2014, Durante, 2023). Como característica clínica, el cáncer de tiroides no produce hormona tiroidea, y por lo tanto no da hipertiroidismo, aunque existen excepciones (Almeida, 2012).

El examen físico debe estar dirigido a identificar el nódulo o nódulos, su número, tamaño y ubicación en la glándula. Se deben examinar las cadenas ganglionares cervicales para despistar presencia de adenopatías. En lo general será importante consignar el estado general del paciente, así como su estado de ánimo y condición de piel y faneras como elementos de disfunción tiroidea (Takami, 2013; Cimarra, 2014).

Los hallazgos clínicos sugestivos de malignidad son los antecedentes familiares de cáncer de tiroides, exposición a radiaciones ionizantes en la infancia o adolescencia, sexo masculino, edad menor a 20 o mayor a 70 años, la presencia de disfagia o disfonía, rápido crecimiento, nódulo sólido, fijo y duro, tamaño mayor a 3cm y presencia de adenopatías palpables (Cimarra, 2014).

Estudios paraclínicos:

Una vez identificada la presencia de un nódulo tiroideo son necesarios estudios paraclínicos adicionales para evaluar su etiología.

Ante cualquier patología que asiente sobre la glándula tiroidea es fundamental evaluar la función glandular. Esto se realiza mediante paraclínica sanguínea con cuantificación de TSH, T3 y T4 determinando si se trata de una glándula normofuncionante, hiper o hipofuncionante. (Cimarra, 2014; Haugen, 2016)

El primer estudio imagenológico a solicitar es la ecografía tiroidea con doppler color. Este estudio es económico, ampliamente disponible y que no implica radiaciones ionizantes. Si bien es un estudio técnico dependiente, en los últimos años se ha aumentado ampliamente la sensibilidad del mismo dado los avances tecnológicos que permiten una mejor resolución, así como la mayor práctica de los técnicos actuantes. En manos expertas tiene una sensibilidad de hasta 100% y una especificidad del 93%. Este estudio permite la valoración de la glándula tiroidea, así como la determinación precisa del número, tamaño, ecogenicidad, consistencia y vascularización de los nódulos que asientan sobre ella. Evalúa también en el mismo estudio la presencia de adenopatías asociadas y sus características. A su vez se podrán identificar elementos sugestivos de malignidad tanto a nivel del nódulo como de las adenopatías. Con técnicos entrenados también se podrá detectar signos directos o indirectos de invasión de estructuras vecinas en caso de patología maligna (Cimarra, 2014, Haugen, 2016).

Distintos elementos ecográficos permiten estimar la probabilidad de que un nódulo sea maligno o benigno y se sintetizan en la clasificación TiRads. Esta cuenta con 6 categorías. TiRads 1 es la glándula tiroidea normal. TiRads 2 son los nódulos anecoicos no vascularizados con sectores hiperecogénicos, nódulos no encapsulados, mixtos o con sector sólido vascularizado y sectores hiperecogénicos, corresponde a nódulos benignos con 0% de probabilidad de malignidad. TiRads 3 son nódulos hiper, iso o hipoecogénicos, parcialmente encapsulados, con vascularización periférica en tiroiditis de Hashimoto, en general son benignos con probabilidad de malignidad <5%. TiRads 4a son nódulos sólidos o mixtos con fina capsula, lesiones hipoecogénicas con límites mal definidos sin calcificaciones o nódulos hiper, iso o hipoecogénicos, con capsula gruesa y calcificaciones, tienen significado indeterminado y probabilidad de malignidad de 5 a 10%. TiRads 4b son los nódulos hipoecogénicos, no encapsulados, con forma y márgenes irregulares, con o sin calcificaciones, son sospechosos de malignidad y su probabilidad es entre 10 y 80%. TiRads 5 son nódulos hipoecogénicos, no encapsulados, con múltiples calcificaciones periféricas e hipervascularización, son consistentes con malignidad con una probabilidad >80%. TiRads 6 corresponde a los pacientes con confirmación citológica de malignidad y esta informada una probabilidad del 100% (Horvath, 2009).

El siguiente paso diagnóstico es el estudio citológico de los nódulos y las adenopatías. Este procedimiento años atrás se realizaba a ciegas puncionando directamente sobre el nódulo palpable. Posteriormente se instauró como el gold standar la realización de punción aspirativa con aguja fina guiada por ecografía. De esta forma se logra un mejor rendimiento dado que se tiene mayor seguridad de estar obteniendo una muestra de un sector representativo del nódulo, así como también disminuye los riesgos de lesión de estructuras vecinas (Levine, 2023) (Figura 10).

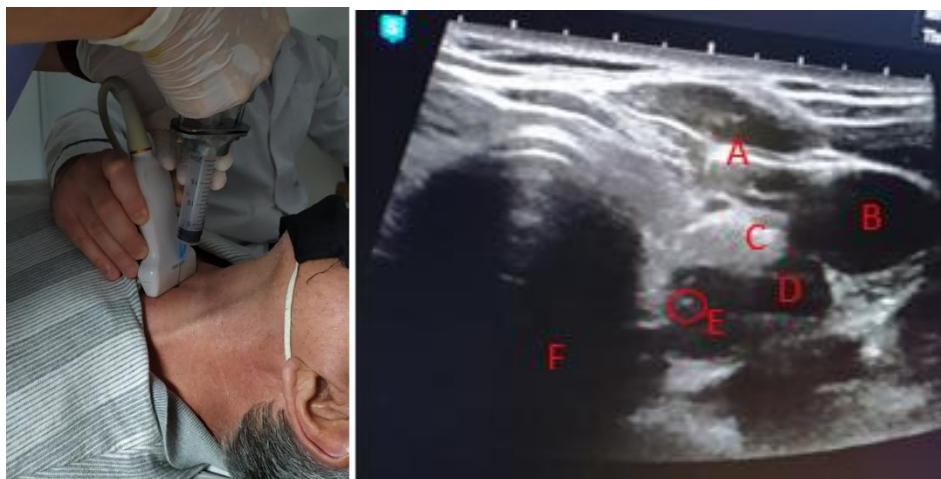


Figura 10: A la derecha punción aspirativa con aguja fina ecoguiada, a la izquierda ecografía correspondiente al paciente, A trayecto de aguja de punción; B vena yugular interna; C lóbulo tiroideo izquierdo; D arteria carótida común; E nódulo tiroideo; F tráquea; O extremo de aguja de punción. (Imagen de nuestra autoría).

El procedimiento se realiza mediante la punción con aguja nº23 y aspiración celular que posteriormente se evaluará al microscopio en busca de elementos de malignidad (Cimarra, 2014). La indicación de punción de un nódulo se basa en su tamaño y la sospecha de malignidad. La punción está indicada en nódulos mayores a 1cm con alta sospecha de malignidad, mayores a 1.5cm con baja sospecha de malignidad o mayores a 2cm con muy baja sospecha de malignidad (Haugen, 2015, Durante, 2023).

Para poder sistematizar los hallazgos citológicos en el 2009 se instauró la clasificación de Bethesda por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos. Esta utiliza 6 categorías que corresponden a Bethesda I, citología insuficiente, Bethesda II, benigno; Bethesda III, atipia folicular de significado incierto; Bethesda IV, neoplasia folicular; Bethesda V, sospechoso para malignidad y Bethesda VI, maligno. (Tabla 1) Estas categorías se asocian con distintas probabilidades de malignidad, siendo 2 a 7% para los nódulos benignos, 13 a 30% para la atipia folicular indeterminada, 23 a 34% para la neoplasia folicular, 67 a 83% para la sospecha de malignidad y 97 a 100% para los nódulos malignos (Ali, 2023).

Tabla 1: Clasificación Bethesda

		Probabilidad de malignidad
I	Citología insuficiente	
II	Benigno	2-7%
III	Atipía folicular de significado incierto	13-30%
IV	Neoplasia folicular	23-34%
V	Sospechoso de malignidad	67-83%
VI	Maligno	97-100%

El centellograma se solicita en nódulos hiperfuncionantes, no siendo el objetivo de este trabajo dado que aleja de que se trate de una patología maligna. Otras imágenes como tomografía, resonancia magnética o PET-TC no son utilizadas en la valoración nosológica, sino para evaluar repercusión o extensión lesional.

Ante el hallazgo de patología potencialmente maligna se solicitan estudios adicionales en vistas al acto anestésico quirúrgico. Estos corresponden a la cuantificación de calcemia para descartar afección previa de las glándulas paratiroides, laringoscopia indirecta y valoración por otorrinolaringólogo para descartar afección preexistente de las cuerdas vocales, radiografía de cuello de frente y perfil dado que determinadas patologías cervicales pueden limitar la movilidad del cuello para obtener una adecuada posición operatoria y valoración por cardiólogo y anestesista para valorar los riesgos de la cirugía (Cimarra, 2014).

Cuando nos encontramos con nódulos clasificados como Bethesda II no son necesarios estudios adicionales a no ser que el nódulo cambie sus características y está indicado reevaluar en 3 a 5 años (Durante, 2023). Ante las categorías Bethesda V o VI en nuestro medio se opta por la cirugía, si bien en otros países se puede considerar la vigilancia activa en casos seleccionados, esto será discutido más adelante con el tratamiento. El problema diagnóstico se plantea en los pacientes clasificados como Bethesda III o IV en los cuales no se puede descartar que se trate de una patología maligna. En estos casos se puede optar por el seguimiento de los pacientes con repetición de la citología o incluso puede ser necesario avanzar hasta el acto quirúrgico para un estudio completo de la lesión para determinar su etiología (Durante, 2023). Situación que, si bien tiene una muy baja frecuencia de complicaciones, de presentarlas puede impactar la calidad de vida del paciente sumado a la necesidad de tratamiento de remplazo hormonal de por vida en los casos que se debe realizar una resección glandular total.

Es en estos casos que precisamos contar con pruebas diagnósticas que nos orienten a la etiología evitando cirugías innecesarias, así como priorizar la cirugía en vez del seguimiento y repetición de citología en pacientes de alto riesgo. Es por este motivo que las guías diagnosticas desarrolladas por las organizaciones europeas (ETA) y americanas (ATA) incluyen hoy el uso de marcadores moleculares para contar con más información respecto a la potencial malignidad del nódulo previo a la toma de una conducta (Haugen, 2015; Durante, 2023). Actualmente en nuestro país el uso de dichos marcadores no está difundido por su costo, si bien algunas instituciones los usan en casos puntuales.

Marcadores moleculares:

En las últimas décadas se han hecho grandes avances en el conocimiento del mecanismo genético del cáncer de tiroides. Esto se dio gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación que permiten obtener las características genéticas de estos cánceres, incluyendo mutaciones específicas que podrían llevar a la activación de distintas vías de señalización que podrían promover el desarrollo de patologías malignas.

Inicialmente múltiples centros planearon el uso de marcadores inmunohistológicos como galectina-3, fibronectina-1, HBME-1, citoqueratina-19 y CITED-1 individualmente o en paneles, pero se vio que presentaban baja sensibilidad para la distinción entre neoplasias benignas y malignas (Duick, 2012; Ferraz 2018). Otros marcadores identificados fueron la detección de ARN mensajero para tiroglobulina y para el receptor de TSH, su utilidad demostró amplia variabilidad en relación a la sensibilidad de la técnica por su reproducibilidad y la capacidad de otros tejidos de aumentar los niveles circulantes además de la tiroides (Macvanin, 2023)

A principios de 1990 se demostró que el material obtenido a partir de la punción aspiración de los nódulos tiroideos es suficiente para identificar mutaciones puntuales o fusiones génicas (Nikiforov, 2017; Alzumaili, 2023).

Se estudiaron como marcadores microARN que corresponden a segmentos cortos de ARN no codificante de hasta 25 nucleótidos con función reguladora negativa sobre la expresión de genes codificantes de proteínas que participan en la proliferación, apoptosis y respuesta inmune celular, pudiendo también actuar como genes supresores de tumor o proto-oncogenes. Distintos microARN han sido descritos en cáncer de tiroides tanto diferenciado como indiferenciado con función activante de vías de señalización metabólica aberrantes (Duick, 2012). Particularmente se demostró que los microARN MiR222 y MiR146b tienen una acción promotora en el desarrollo del cáncer papilar de tiroides (Panebianco, 2015, Ferraz, 2018). También se consideraron segmentos largos de ARN no codificante como potenciales marcadores, estos corresponden a ARN con longitud mayor a 200 nucleótidos que actúan sobre proto-oncogenes y genes supresores de tumor mediante regulación de la expresión génica por mecanismos epigenéticos (Macvanin, 2023).

A inicios del 2000 se identifica la mutación *BRAF* lográndose una aplicación clínica de los hallazgos génicos. El uso de *BRAF* solo no aporta suficiente información cuando consideramos otros tipos de cáncer de tiroides por lo que a fines del 2000 se introdujeron los paneles génicos para probar otros genes como *NRAS*, *HRAS*, *KRAS*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3* y *PAX8-PPARG*. Más adelante se logró, mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), la detección de múltiples alteraciones genéticas en un solo ensayo con pocas células obtenidas a través de punción. En base a esto se han generado múltiples paneles génicos comerciales para estimar la probabilidad de presentar cáncer en el paciente de quien se extrae la muestra (Nikiforov, 2017; Alzumaili, 2023; Patel, 2023).

La mutación *BRAF* V600E implica la sustitución de la valina por glutamato en la posición 600 de la proteína b-raf. La vía de señalización MAPK activada de forma

mantenida por el oncogén *BRAF* induce un crecimiento anormal en las células tiroideas y resistencia a las señales apoptóticas (Domínguez Ayala, 2018; Macvanin, 2023) (Figura 11). Esta es la mutación más frecuente en el cáncer papilar de tiroides, presente en el 23 al 83% de los casos. La variabilidad en la frecuencia se plantea que esté relacionada con el lugar de procedencia. Esta mutación es ampliamente más frecuente en Asia, donde su prevalencia se ubica en torno al 80% y menos frecuente en Norteamérica siendo sólo del 40% lo que plantea una relación entre la prevalencia de la mutación y las diferentes etnias (Ohuri, 2020; Cho 2020). No se cuenta con estudios realizados en nuestro país sobre la prevalencia de esta mutación, se han realizado si en otros países de Sudamérica como Argentina donde se posiciona la prevalencia en torno al 77% y en Brasil con 48% (Oler 2009; Ilera, 2016).

Menos frecuentes es la mutación K601E que implica una sustitución en la posición 601 de lisina por glutamato y se asocia con la variante folicular del carcinoma papilar (Cho, 2020). Las mutaciones de *BRAF* se asocian a cánceres más agresivos y resistencia al tratamiento con radioiodo I131 (Gürbüzler, 2016)

Otra mutación presente en el desarrollo de cáncer de tiroides es sobre la familia de genes *RAS* que se relaciona con el desarrollo del cáncer folicular activando además de la vía MAPK, la vía PI3K/Akt que se asocia con la tumorigénesis, acelerando la proliferación e inhibiendo la apoptosis (Gürbüzler, 2016) (Figura 11). Es la siguiente en frecuencia siendo su prevalencia en torno al 30% para Asia y Norteamérica y menor al 10% en Europa (Odate, 2020). Entre éstas la más frecuentes es la mutación sobre el codón 61 de *NRAS*, el codón 6 en *HRAS* y los codones 61 y 12 en *KRAS*. Las mutaciones sobre *RAS* fueron halladas en neoplasias foliculares tanto benignas como malignas incluyendo adenomas, NIFTP, carcinoma folicular y cánceres agresivos pobremente diferenciados (Gürbüzler, 2016; Cho, 2020).

Las mutaciones sobre el protooncogén *RET* se asocian con el cáncer medular de tiroides y con neoplasias endócrinas múltiples MEN 2. Este gen codifica la proteína receptora de tirosina quinasa que está presente en las células C en la glándula tiroides (Gürbüzler, 2016). Su mutación puede afectar la línea germinal estando presente en más individuos de una familia por lo que el asesoramiento genético es fundamental al momento de tomar decisiones (Ohuri, 2020). Otra alteración presente sobre el gen *RET* es el rearreglo *RET/PTC* con una prevalencia de hasta el 20%. El gen *PTC* se expresa en las células foliculares, con la fusión con el gen *RET* se produce la activación de la vía de señalización MAPK independiente de ligando (Figura 11). El rearreglo *RET/PTC* es más frecuente en los cánceres papilares si bien puede ser observado también en patología benigna. Se asocia con exposición a radiaciones como por ejemplo en las poblaciones cercanas al incidente de Chernobyl y en pacientes más jóvenes, tiene mejor pronóstico que otras mutaciones relacionadas al cáncer papilar (McLeod, 2010; Gürbüzler, 2016; Alzumaili, 2023).

En los últimos años se vio en Estados Unidos un descenso en la incidencia de las translocaciones como sería *RET/PTC* que podría estar relacionada con la disminución de la exposición a radiaciones ionizantes y un aumento en la mutación *RAS* que sugiere relación con factores ambientales (Ohuri, 2020).

El gen *PAX8* codifica un factor de transcripción que contribuye a la formación de células foliculares tiroideas y *PPARG* es un factor de transcripción perteneciente a la familia de receptores hormonales nucleares incluidas las hormonas tiroideas. El rearrreglo *PAX8/PPARG* se debe a la fusión de ambos genes como resultado de translocación. Si bien su acción sobre la tumorigenesis no está del todo elucidada aún, se plantea que se relaciona con la inactivación del gen *PPARG* el cual tiene acción como supresor tumoral (Gürbüzler, 2016) (Figura 11). Aunque esta mutación tiene una baja prevalencia, es la segunda en frecuencia en los cánceres foliculares luego de *RAS*, compartiendo también con *RAS* su presencia en patología neoplásica benigna. Ha mostrado también en diferentes estudios una relación con la etnia siendo más frecuente en poblaciones occidentales respecto a las orientales, al contrario de lo que sucede con la mutación *BRAF* (Cho, 2020).

En el 2013 se identificaron mutaciones sobre el promotor del gen para la transcripción de la telomerasa (*TERTp*) en las posiciones C228T y C250T, su mutación activa la telomerasa favoreciendo la tumorigenesis. En las células normales la telomerasa está inactiva por lo que en cada división celular los telómeros se acortan llegando un momento en el cual ya no están presentes llevando a la célula a la senescencia. En las células cancerígenas la telomerasa está activa protegiendo a los telómeros de su acortamiento y permitiendo una vida celular mucho mayor respecto a las células normales (Hoon Chung, 2020). Estas se asociaron principalmente con el cáncer de células de Hurtle con una prevalencia de hasta un 27%, seguido por los cánceres foliculares en el 17% y solo 9% en los cánceres papilares. Su frecuencia aumenta significativamente en los cánceres pobremente diferenciados donde alcanza el 40% y los cánceres anaplásicos con presencia de la mutación hasta en el 73% de los pacientes (Rizwan, 2019). La mutación de *TERTp* es más frecuente en personas de edad avanzada en relación a la presencia de telómeros más cortos en esta etapa de la vida (Hoon Chung, 2020), se halla en estadios avanzados y es considerada un factor de agresividad en la progresión del cáncer de tiroides y peor pronóstico (Gürbüzler, 2016; Jin, 2018; Rizwan, 2019; Hoon Chung, 2020).

Por último, la mutación sobre *TP53* afecta la codificación de la proteína p53 que participa en el proceso de apoptosis siendo su principal contribución en los cánceres pobremente diferenciados y anaplásicos (Figura 11). Esto se relaciona con mutaciones en *PIK3CA*, *CTTNB1* y *AKT1* que lleva a la dediferenciación del cáncer de tiroides (Gürbüzler, 2016). Presenta una prevalencia menor al 1% en los cánceres diferenciados y hasta 73% en los cánceres anaplásicos (Rizwan, 2019)

La presencia de co-mutaciones, si bien poco frecuente, se ha asociado con mayor agresividad y peor pronóstico en relación tanto a la recurrencia como a la presencia de metástasis estando especialmente estudiada la co-mutación *BRAF V600E* y *TERTp* (Jin, 2018; Cho, 2020). Esta co-mutación se asocia con la edad, extensión extratiroidea, metástasis linfáticas, estadio avanzado, recurrencia y mortalidad (Alzumaili, 2023).

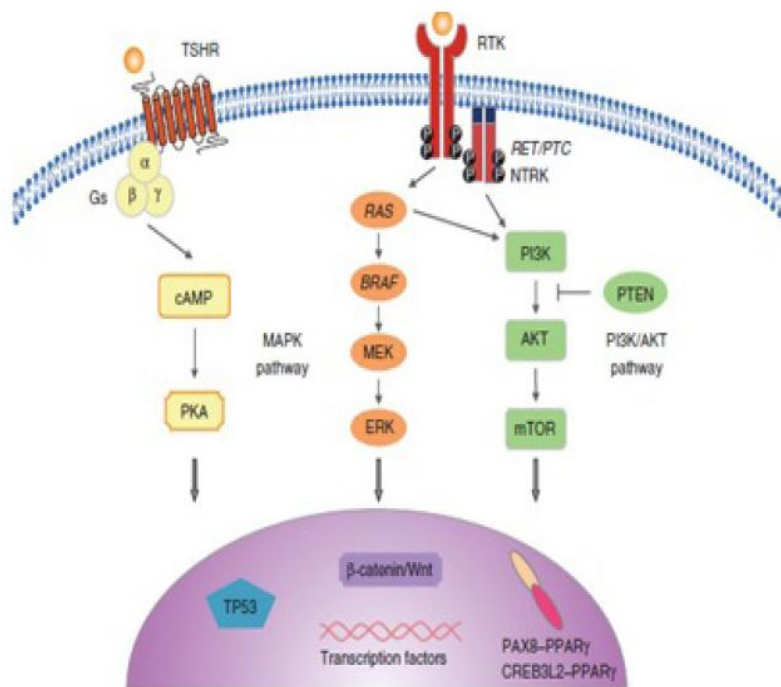


Figura 11: Vías moleculares en el cáncer de tiroides, incluye la desregulación de MAPK, PI3K, y del receptor de TSH (Younis, 2017).

Actualmente las guías de actuación de la Asociación Europea de Tiroides (ETA) recomiendan el uso de marcadores moleculares ante nódulos con citología indeterminada. El objetivo de la realización de estos estudios es identificar pacientes que presenten mutaciones sugestivas de agresividad para así proseguir con la cirugía, o en el caso contrario optar por control clínico en pacientes que no presenten dichas mutaciones. Sugieren el uso de pruebas comerciales que evalúen mutaciones somáticas, expresión de genes de interés o microARN. Dentro de estos los más usados son los paneles comerciales Tyroseq, Afirma Genomic Sequencing Clasifier y ThyGenNEXT/ThyraMIR. Se destaca que estos paneles se procesan sólo en laboratorios autorizados en Norteamérica lo que implica un alto costo para el procesamiento de muestras tomadas en otros países, por lo que se busca el desarrollo de paneles en laboratorios locales (Durante, 2023).

La Asociación Americana de Tiroides (ATA) es más reticente ante el uso de marcadores moleculares de forma sistemática ante nódulos de citología indeterminada y hace hincapié en priorizar el criterio clínico junto al resultado imagenológico y citológico. Recomienda a su vez tener en consideración la prevalencia de patología maligna en cada centro ya que ésta podrá afectar los resultados de los valores predictivos de las pruebas. Aun así, plantean recomendaciones respecto a la táctica quirúrgica según el resultado del panel molecular en el caso de que haya sido realizado (Ferris, 2015; Haugen, 2015). Se destaca que las guías americanas fueron elaboradas en el año 2015 y no han publicado aún una recomendación más reciente en cuanto a los marcadores moleculares, siendo que ésta es una técnica reciente, nueva información ha sido publicada a nivel mundial luego de la elaboración de las guías ATA, lo que podría llevar a una modificación de las recomendaciones en la próxima edición.

Un avance reciente en la valoración en pacientes portadores de cáncer es la realización de biopsia líquida. El término biopsia líquida ha sido utilizado para describir los métodos para obtener ADN circulante sin la necesidad de obtención de muestra de tejido lo que lo hace un procedimiento menos invasivo. Se plantea que fragmentos de ADN procedentes del tumor son liberados a la circulación. En individuos sanos se puede encontrar distintas cantidades de ADN circulante, en los pacientes portadores de cáncer, una porción del ADN circulante corresponde a ADN tumoral y contiene mutaciones específicas relacionadas con dicha patología (Lupo, 2018).

Algunos estudios han reportado la identificación de la mutación *BRAF* V600E en el plasma obtenido de pacientes portadores de cáncer papilar de tiroides (Li, 2019; Patel, 2021). Estos resultados son controversiales dada su baja sensibilidad, así como la detección de falsos positivos para cáncer de tiroides en relación a otra neoplasia maligna presente en el paciente. La presencia de detección de la mutación *BRAF* en plasma puede ser sugestiva de enfermedad avanzada y puede relacionarse con el tamaño del nódulo, multifocalidad, extensión extratiroidea y micrometástasis (Lupo, 2018; Romano 2021).

En los cánceres indiferenciados las mutaciones detectadas mediante biopsia líquida fueron *TP53*, *BRAF*, *NRAS* y *PIK3CA* las cuales demostraron tener concordancia con el material obtenido de los tejidos. En el seguimiento se vio que una reducción del ADN circulante se relacionaba con una disminución del tamaño del tumor. Como ventajas la biopsia líquida ofrece una mejor representatividad de la carga tumoral global del paciente.

Dado que aún se requiere mayor investigación y optimización de la técnica para la detección de mutaciones a través de biopsia líquida las guías aun no plantean su uso de forma sistematizada.

Tratamiento:

La decisión terapéutica dependerá del resultado de la citología y la presencia de elementos sugestivos de malignidad en la imagenología.

En los pacientes que presentan citología benigna (Bethesda II) y no presentan elementos imagenológicos sugestivos de malignidad la decisión de cirugía dependerá del tamaño del nódulo. Ante bocios grandes grado III o IV con síntomas compresivos de vía aérea o gran deformación de cuello se podrá optar por tiroidectomía, siendo de elección la tiroidectomía total dado que se trata de una glándula patológica. La tiroidectomía subtotal ha perdido terreno si bien cuenta con la ventaja de dejar glándula remanente que podrá suplir la función endócrina y disminuye el riesgo de lesiones o resecciones inintencionales de paratiroides superiores. De no presentar nódulos de gran tamaño se conserva la glándula y se repite la ecografía y punción en 3 a 5 años (Durante, 2023).

En pacientes con citología benigna (Bethesda II) y elementos sugestivos de malignidad en la ecografía o crecimiento rápido de los nódulos está indicada la repetición de la punción aspirativa (Durante, 2023).

Ante pacientes con atipia folicular incierta (Bethesda III), de no presentar elementos sugestivos de malignidad en la ecografía, se puede repetir la ecografía y punción aspirativa al año. De presentar elementos sugestivos de malignidad se deberá discutir con el paciente tanto las opciones quirúrgicas como de control evolutivo. En ambos casos los marcadores moleculares son útiles al momento de elegir una u otra conducta siendo recomendado realizarlos si los mismos están disponibles (Durante, 2023).

En pacientes portadores de neoplasia folicular (Bethesda IV) con nódulos sin elementos imagenológicos de malignidad se podrá ofrecer al paciente control evolutivo siempre y cuando se comprometa a la adherencia al mismo. Cuando presentan elementos imagenológicos de malignidad se deberá ofrecer cirugía o marcadores moleculares si los mismos están disponibles (Durante, 2023).

En los pacientes que presentan citología Bethesda III o IV es recomendable como procedimiento quirúrgico la hemitiroidectomía. Esto permite esperar el resultado de la anatomía patológica en diferido y conservar un lóbulo funcional en pacientes con patología benigna en el estudio, no siendo necesaria hormonoterapia posterior. En pacientes portadores de patología maligna confirmada, se completará la tiroidectomía total en un segundo acto quirúrgico. El procedimiento podrá ser modificado según elementos imagenológicos de malignidad o resultados de marcadores moleculares (Haugen, 2015; Durante, 2023). Se puede realizar inicialmente una tiroidectomía total en casos seleccionados con nódulos múltiples bilaterales y en pacientes que no quieran realizar una cirugía en dos tiempos (Haugen, 2015). En nuestro medio contamos con patólogos entrenados que podrán realizar el estudio de la pieza durante la cirugía, que en los casos de carcinoma papilar podría ser suficiente para confirmación de malignidad y eventualmente completar la resección del lóbulo contralateral en el mismo acto, si bien tiene bajo rendimiento para lesiones foliculares. Otra utilidad del estudio de la pieza intraoperatoria es para el estudio de adenopatías

sospechosas o eventualmente resección accidental de glándulas paratiroides (Cimarra, 2014)

Para los pacientes con sospecha de malignidad o malignidad confirmada mediante punción aspirativa (Bethesda V o VI) el tratamiento se basa en tres pilares, la cirugía para remoción de la glándula; el radioyodo, para eliminar tejido tiroideo remanente; y la hormonoterapia para inhibir el crecimiento de tejido remanente mediante supresión del estímulo hormonal.

La cirugía de elección ante pacientes portadores de patología maligna es la tiroidectomía total, esto permite eliminar la totalidad del tejido macroscópico. Se opta por este procedimiento por múltiples razones, de quedar tejido tiroideo remanente no sería factible la utilización de radioyodo ya que la dosis necesaria para la eliminación del mismo sería tóxica; el cáncer papilar que es el cáncer ampliamente más frecuente tiene altos índices de bilateralidad, que superan el 40% por lo que dejar un lóbulo podría implicar dejar enfermedad, o dejar tejido tiroideo lo que permitiría el desarrollo de una recidiva a futuro; y por último permite el seguimiento con tiroglobulina siendo la elevación de la misma luego de la cirugía sugestiva de tejido tiroideo remanente o recidiva.

Como cualquier procedimiento quirúrgico, no está exento de riesgos, si bien la mortalidad es menor al 1%, la morbilidad es superior pudiendo ser entre el 2 y 8% según distintos reportes. Dentro de esta destacamos especialmente la lesión recurrencial y de paratiroides. La lesión recurrencial puede ser unilateral, lo que implicaría la parálisis de la cuerda vocal homolateral con consecuente disfonía o bilateral. La lesión recurrencial bilateral es una complicación grave y potencialmente mortal de no ser detectada oportunamente ya que determina la parálisis de las cuerdas vocales bilaterales y cierre de las mismas, su tratamiento implica la confección de una traqueostomía para lograr una vía aérea permeable. Esta es una complicación muy temida y con consecuencias funcionales, estéticas y psicológicas sobre el paciente. Otra lesión que puede determinar consecuencias a largo plazo es la lesión o resección de paratiroides. Estas son unas glándulas presentes en número de 4, una superior y otra inferior a ambos lados de la tiroides y están implicadas en el metabolismo del calcio. Lesión o resección de estas glándulas requerirá la suplementación con calcio que puede ser intravenoso o vía oral según la gravedad de la hipocalcemia y la presencia de síntomas. El hipoparatiroidismo puede ser transitorio lo cual es relativamente frecuente en el posoperatorio inmediato por edema en relación a la manipulación de la glándula y puede pasar inadvertido si no se realiza determinación de calcemia rutinaria. En ocasiones este puede llegar a durar hasta un año considerándose aún transitorio. De persistir más allá de ese período se considera permanente e implica la necesidad de suplementación con calcio de por vida (Cimarra, 2014) (Figura 12).

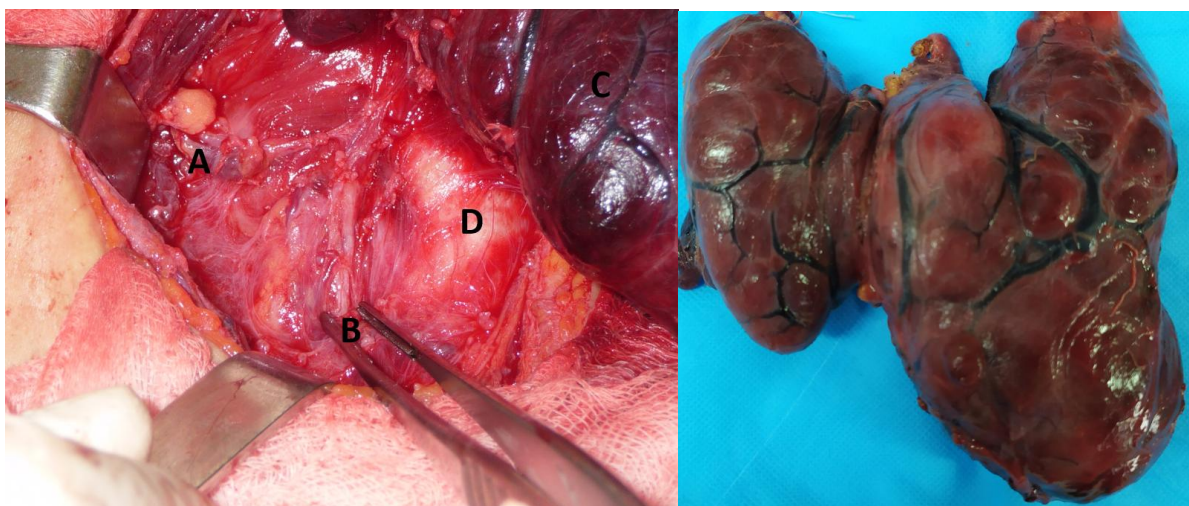


Figura 12: A la izquierda imagen del intraoperatorio. A glándula paratiroides superior derecha, B nervio laríngeo recurrente derecho, C lóbulo derecho de la tiroides rebatido, D tráquea. A la derecha imagen de pieza de resección completa (Imágenes de nuestra autoría).

Es ante el riesgo de las complicaciones mencionadas que precisamos agotar todos los elementos a nuestra disposición para lograr un diagnóstico etiológico certero antes de someter al paciente a un procedimiento quirúrgico.

Es debatido el vaciamiento del compartimento ganglionar central de cuello profiláctico pudiendo identificarse metástasis ocultas hasta en el 65% de los casos (Mukherjee, 2020). El mismo es recomendado por la Asociación Americana de Tiroides ante pacientes con tumores localmente avanzados (Haugen, 2015)

El radioyodo encuentra su indicación para la eliminación de tejido tiroideo remanente y en estos casos mejora la sobrevida libre de enfermedad. La ATA recomienda el uso de radioyodo según la estratificación del riesgo de recurrencia estando indicado en los casos de metástasis ganglionares del compartimento central sin evidencia de otras lesiones. La no realización del vaciamiento impide la estratificación del riesgo de acuerdo a las pautas ATA (Haugen, 2016). En nuestro medio el radioyodo tiene indicación en los casos de metástasis ganglionares identificadas en el vaciamiento ganglionar terapéutico. De no tener indicación de este, la realización de vaciamiento profiláctico es discutida, no se realiza la misma en nuestro servicio. En estos casos queda a criterio del endocrinólogo la indicación de radioyodo de acuerdo a las características del nódulo.

Los pacientes sometidos a tiroidectomía total tienen indicación de hormonoterapia vía oral de remplazo para compensar la que no logran producir. Más allá de eso se planteó que la supresión de TSH pueda tener relación con un mejor pronóstico a largo plazo dado que el tejido tiroideo remanente no crecerá por ausencia del estímulo por parte de la TSH. Hay resultados controvertidos respecto a la indicación de la supresión de TSH, en especial en pacientes con riesgo cardiovascular o riesgo de complicaciones óseas. Si bien la ATA plantea que no se cuenta con suficiente información para realizar una recomendación fuerte plantean que los valores de TSH deberían estar por debajo de 0.1 mg/dl en pacientes de alto riesgo y entre 1.5 y 2.0 mg/dl en pacientes de bajo riesgo (Haugen, 2016).

Objetivos:**Objetivo general:**

Valorar marcadores tumorales predictivos de patología tiroidea maligna.

Objetivos específicos:

- a - Caracterizar la población portadora de patología tiroidea.
- b - Determinar factores de riesgo para el desarrollo de patología maligna.
- c - Correlacionar el resultado de los marcadores seleccionados con la clasificación Bethesda informada por el patólogo y eventualmente con la histología de la pieza en el caso de pacientes sometidos a cirugía.
- d - Formación en metodología científica

Materiales y métodos:

Se realizó un estudio transversal, analítico, observacional.

Selección de pacientes:

Se incluyeron todos los pacientes mayores de 14,5 años a los que se les realizó PAAF o cirugía tiroidea, y fueron estudiados por parte del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Maciel en el período de octubre 2020 a setiembre 2022. Se excluyeron los pacientes con muestra insuficiente de acuerdo a la clasificación de Bethesda.

Se complementó el estudio con 33 muestras de tumor extraídas de piezas de parafina del Departamento de Anatomía Patológica para contar con mayor número de muestras correspondientes a cáncer para determinar mejor la prevalencia de las mutaciones en nuestra población.

Muestras clínicas:

En la policlínica de citopunción, previo a la misma se obtuvo la lista de pacientes anotados y se contactó con los mismos. En una breve entrevista se les explicó en qué consistía el estudio y se les ofreció participar. Una vez aceptada la participación se realizó la firma del consentimiento informado (Anexo 1) y se entregó una copia de este al paciente donde constaban los datos de contacto con el equipo. También se llenó una ficha donde se consignaban los datos patronímicos y factores de riesgo de interés (Anexo 2).

En la policlínica inicialmente realizó una ecografía para caracterizar la tiroides y los nódulos presentes en esta y se terminó de completar la ficha con los datos ecográficos del nódulo (Anexo 2). Posteriormente de acuerdo a la solicitud enviada por el médico tratante y las características de los nódulos se procedió a realizar la punción.

Para la punción se colocó al paciente en decúbito dorsal, con leve extensión de cuello, lateralizando la cabeza hacia el lado contrario al que se encuentra el nódulo. Se topografió el nódulo y se realizó una punción ecoguiada con aguja nº20 hasta topografiar el extremo de la aguja en el centro del nódulo. Esto permitió realizar el procedimiento de forma segura evitando lesionar estructuras nobles del cuello. La aguja se conectó a una jeringa de 20ml y un dispositivo que permite la aspiración mediante tracción del émbolo, pero evitando que el mismo retorne a su lugar generando así presión negativa que permite la aspiración de células tiroideas.

El material obtenido se liberó en un tubo Eppendorf con 1ml de PBS, para maximizar la recolección de células, luego de vaciado el contenido se aspiró PBS y se volvió a vaciar en el tubo Eppendorf varias veces para recolectar por arrastre células que podrían haber quedado adheridas a nivel de la aguja y jeringa.

Luego de obtenida la muestra de punción tiroidea se trasladó al paciente a un consultorio del policlínico donde se extrajo sangre en tres tubos con anticoagulante EDTA para el procedimiento de biopsia líquida.

Los tubos Eppendorf con las muestras fueron centrifugados a 1500 xg por 5 minutos, de esta forma se logró obtener un pellet de células separado del PBS y se descartó el sobrenadante. El pellet celular fue almacenado congelado para posteriormente continuar con la extracción del ADN.

En los casos en que además de células las muestras presentaban un alto contenido de sangre se realizó hemólisis mediante solución de cloruro de amonio. Luego de descartado el buffer de hemólisis se realizaron dos lavados con PBS, repitiendo la centrifugación en las mismas condiciones y se procedió a congelar el pellet seco.

Extracción de ADN:

Todo el procesamiento de las muestras obtenidas se realizó en el laboratorio de Oncología Molecular del Departamento de Oncología. La extracción del ADN de las células obtenidas por punción se realizó inicialmente con el Kit DNA Isolation del laboratorio Roche.

Se inició con la digestión de las células en tubos Eppendorf de 1.5 ml con 180ul de tampón de lisis (DNA TLB) y 70ul de proteína kinasa (PK) a 56° C con agitación a 600 rpm durante 1 hora. Posteriormente se añadió 200ul de buffer de unión (DNA BB), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se agregaron 100 ul de isopropanol, se mezcló por inversión, se transfirió a una columna y se centrifugó a 11000 xg descartándose el filtrado. Luego se realizó el lavado con 500 ul de WB I centrifugando a 11000 xg y descartó el filtrado, se repitió el mismo procedimiento con WB II y se secó la columna a máxima velocidad. Por último, se realizó la elución con 90 ul de buffer de elución (DNA EB), se incubó por 5 minutos, luego se centrifugó a 11000 xg, recentrifugó a máxima velocidad y se transfirieron 85 ul a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5ml para eliminar el sedimento de la columna.

Luego de extraído el ADN se cuantificó su concentración mediante espectrometría, así como los ratios 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza del ADN extraído y se almacenó congelado para su posterior estudio.

Dado que en algunos casos la concentración del ADN aislado fue baja se probó aumentar el tiempo de digestión hasta 24 horas, esto se probó inicialmente sobre muestras de líneas celulares. No se vio diferencia en la cantidad de ADN extraído entre las digestiones realizadas en 1 hora y 24 horas por lo que se decidió continuar realizando la misma durante 1 hora para no alargar el tiempo requerido para el procesamiento de muestras.

Se probó también disminuir el volumen utilizado de buffer de elución a 50ul y realizar una segunda elución en la misma columna con 40ul, así como aumentar el tiempo de incubación a 15 minutos. Se obtuvo un leve aumento de la concentración obtenida en el primer tubo eluido por lo que se continuó realizando la elución en dos tubos.

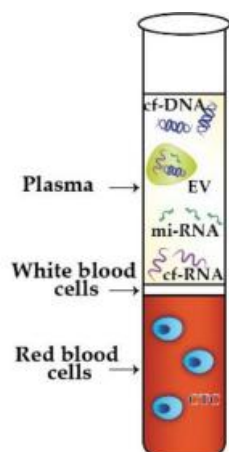
Se obtuvieron en algunas ocasiones ratios 260/280 muy bajos por lo que se planteó que el ADN podía presentar mayor proporción de proteínas de lo esperado por lo que se duplicaron los lavados, realizando dos lavados con WB I y dos lavados con WB II con una incubación de 5 minutos en cada caso.

También se consideró que la baja concentración de ADN así como la elevada presencia de proteínas pudiera deberse al kit de extracción utilizado por lo que se probó la extracción con otro kit, el kit DNeasy Blood & Tissue Kit de la empresa Qiagen, no se obtuvieron diferencias en la cantidad de ADN extraído, así como tampoco en la pureza del mismo.

Para la extracción de ADN de las muestras obtenidas de piezas en parafina previo a los pasos de extracción anteriormente mencionados se realizó la remoción de la parafina. Para esto se añade 1ml de xilol, se mezcló con vortex y se dejó reposar 5 minutos, se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se repitió este paso luego se realizaron dos lavados con etanol anhidro, centrifugando siempre a máxima velocidad por 5 minutos. Luego se dejó secar para eliminar el etanol remanente. La lisis con proteinasa K se realizó durante 24 horas a 56°C en agitación continua a 600 rpm seguido de 1 hora de incubación a 90°C para proseguir luego con los mismos pasos mencionados anteriormente para la extracción en muestras de citopunción.

En las muestras de ADN provenientes de parafina se obtuvieron altas concentraciones de ADN, siempre mayores a 100 ng/ul llegando en algunos casos incluso a 400 ng/ul y con buenas relaciones 260/280.

Aislamiento de plasma:



Los tubos con anticoagulante EDTA fueron centrifugados a 600 xg durante 10 minutos. Esto permite separar la muestra de sangre entera en glóbulos rojos al fondo, glóbulos blancos en el medio y plasma en la parte superior. El plasma fue extraído mediante pipeta Pasteur con extremo cuidado de no aspirar componentes de las otras fases y almacenado en tres tubos Eppendorf y congelado para su posterior estudio (Figura 10).

Figura 10: Fases de la sangre luego de la centrifugación (Romano, 2021)

Tabla 2: Primers para PCR			
BR-C	5'-3'	CTATGAAAATACTATAGTTGAGACCTTCAATGACTTTC	Fam Cancer 2007;6(3):301-10
BF-N	5'-3'	ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGT	
BF-M	5'-3'	ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGA	
BF-N2	5'-3'	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATT	
BF-M2	5'-3'	AAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA	
BF-N3	5'-3'	ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGT	
BF-M3	5'-3'	ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACCGA	
BF-N4	5'-3'	ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTATAGT	
BF-M4	5'-3'	ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTATAGA	
BRAF-IF	5'-3'	TGTAAAACGACGGCCAGTCCTTTACTTACTACACCTCAG	JMolDiagn-2014; 16:343-9 Diferentes missmatch diseñados según: Nuc Ac Res- 89(17)2503 Primer diseñado previamente en el laboratorio GenMed- 19(21)1594-1602
TERTp2 -F	5'-3'	GAAGCGCGGCCAGACCC	
TERTp2 -R	5'-3'	CCGCACGAACGTGGCCAG	
hTERT- F	5'-3'	GTCCTGCCCCTTCACCTTC	
hTERT- R2	5'-3'	AGCACCTCGCGGTAGTGG	
TERT-F	5'-3'	AGTGGATTCGCGGGCACAGA	
TERT-R	5'-3'	CAGCGCTGCCTGAAACTC	
TP-OF	5'-3'	GGCCGATTCGACCTCTCT	
TP-OR	5'-3'	AGCACCTCGCGGTAGTGG	
TP-IntF	5'-3'	GTCCTGCCCCTTCACCTT	BJC-13(109)497- 501 BJC-14(110)2024- 32 Mol Cancer Res. 2016;14(4):315-23 Science- 13(339)959 PNAS. 2013 9; 110 (15):6021-6 Eur Urol. 2014 65(6):e85 Diseño IDT online. https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest?returnurl=%2FPrimerquest%2FHome%2Findex
TP-IntR	5'-3'	CAGCGCTGCCTGAAACTC	
TERT- 1444-F	5'-3'	GATTCGCGGGCACAGAC	
TERT- 1658-R	5'-3'	CAGCGCTGCCTGAAACT	
TERT- 1430-F	5'-3'	CGGGCTCCAGTGGATT	
TERT- 1769-R	5'-3'	AGCACCTCGCGGTAGTG	
TERT- 1519-F	5'-3'	CCCTTCACCTTCCAGCTC	
TERT- 1673-R	5'-3'	AGCGCTGCCTGAAACTCG	

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *BRAF*:

Inicialmente se optimizó la PCR para la amplificación del gen *BRAF*. Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 7, tiene 24 exones y su mutación más frecuente se encuentra en el exón 15 (V600E). En la base de datos del National Institute of Health (NIH) de Estados Unidos se identifica con el número 673. Se probó la sensibilidad de 4 juegos de primers forward distintos para la amplificación del alelo

normal y mutado (BF-N a N4 y BF-M a M4). La secuencia de todos los primers utilizados en el trabajo se muestran en la Tabla 2. Se utilizó para todos siempre el mismo primer reverso BR-C. Los primers BF-N y M (amplicon 198pb) presentan la mutación en la última base siendo la normal tiamina y la mutada adenina. En estudios realizados por otros autores se vio que añadiendo un mismatch en las bases previas al extremo 3' se logra aumentar la afinidad de la PCR por lo que se probó si se obtenía un mejor resultado realizando la PCR con primers que presentaban mismatch en las 3 posiciones previas al extremo 3'. Los primers BF-N2 y M2 (amplicon 191 pb) tienen la sustitución guanina por tiamina en la penúltima posición; en los BF-N3 y M3 (amplicon 198pb) el cambio se realizó en la base antepenúltima sustituyendo adenina por citosina y en los primers BF-N4 y M4 (amplicon 198pb) el cambio se realizó en la base anterior a la antepenúltima con la sustitución de citosina por tiamina. Se realizó la PCR para todos los juegos de primers mencionados y si bien en todas se logró la amplificación los que presentaron mayor sensibilidad y bandas más nítidas fueron los primers BF-N2 y M2 por lo que optamos por el uso de estos para el análisis de las muestras.

Para la amplificación del gen *BRAF* se realizaron dos mix, uno para la amplificación del alelo normal y otro para la amplificación del alelo mutado. Para cada tubo se colocaron 2.5 ul de buffer 10x, 1.5 mM de MgCl, 200uM de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa termoestable para la PCR a realizar, 250nM de los primers forward y reverso y entre 50 y 100ng de ADN por reacción. El volumen de ADN añadido se hizo según la cuantificación previa por espectrometría sin superar los 10ul de ADN por tubo para evitar inhibir la PCR por aumento de la concentración de proteínas. Se completa el volumen final hasta 25ul con agua libre de DNAsas.

El primer reverso fue BR-C utilizando el mismo tanto para la amplificación de alelo normal como del mutado. Para la amplificación del alelo normal se utilizó el primer forward BF-N2 y para la amplificación del alelo mutado el primer BF-M2.

La amplificación de la PCR se realizó en un termociclador Biometra con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 45 segundos, etapa de anillado a 60°C (temperatura óptima para los primers de interés) por 45 segundos y etapa de extensión a 72°C por 1 minuto, finalizando con una etapa de estabilización a 72°C por 5 minutos.

Los productos de la PCR se visualizaron y documentaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio. Se utilizó un control de contaminación donde en vez de ADN se coloca agua y un control positivo con una línea de ADN no mutada (K562) para el alelo normal y una mutada (HT29) para el alelo mutado. Se incluye también en el gel un carril correspondiente al peso molecular para verificar que la banda obtenida corresponda al esperado de 198pb.

Dado que en algunos casos se obtuvieron bandas muy tenues se intentó mejorar la sensibilidad con una técnica heminested AS-PCR, amplificando en un primer round un amplicón mayor, utilizando otro primer forward BR-IF complementario a una secuencia proximal en relación a los primers forward específicos, siempre con el mismo primer reverso BR-C (amplicon 184pb).

El primer round de la PCR se realizó similar al anterior difiriendo en la concentración de MgCl, la cual era de 2 mM, la temperatura del anillado que fue a 58°C y repitiéndose 20 ciclos en vez de 35. Luego se utilizó 1 ul del producto de PCR de este primer round para realizar un segundo round con los primers específicos de alelo

normal y mutado según lo descrito previamente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para *TERTp*:

Se intentaron múltiples procedimientos para la amplificación de *TERTp* con diferentes primers y variando la concentración de MgCl, el tiempo y la temperatura del anillado.

Inicialmente se probó los primers forward TERT-F y reverso TERT-R con agregado de M13 para facilitar la secuenciación correspondiente a un amplicon de 235pb. Se realizó un mix con 2.5ul de buffer, 200uM de dNTP, 1U de Taq polimerasa, 300nM de los primers forward y reverso, ADN de A549 con una concentración de 50ng por reacción, se probaron distintas cantidades de MgCl de 1 a 2.5mM aumentando de 0.5 en 0.5mM y se completó el volumen hasta 25ul con agua. La amplificación de la PCR se realizó en un termociclador configurado con precalentamiento inicial hasta 94°C durante 5 minutos, luego una etapa de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, etapa de anillado a 68°C por 45 segundos y etapa de extensión a 72°C por 45 segundos. Se repiten las etapas de desnaturalización, anillado y extensión por 35 ciclos. Finalizado el 35vo ciclo se realizó una etapa de estabilización a 72°C por 5 minutos y se finaliza la PCR. Posteriormente se corrió en gel de agarosa al 2.5% los productos de la amplificación no obteniéndose bandas.

Dado que no se logró la amplificación deseada se probó modificar la temperatura de anillado añadiendo un gradiente de temperatura de 60°C a 69°C aumentando de 3°C en 3°C, tampoco en este caso se logró la amplificación.

Se probó también una temperatura de anillado a 55°C no lográndose la amplificación de los productos de PCR.

Posteriormente se probó realizar la PCR con un juego de primers diferente, siendo el primer forward TERTp2-F y el reverso TERTp2-R (amplicon 434pb) con gradiente de MgCl de 1.0 a 2.5mM y un gradiente de temperatura de anillado de 53.6 a 60°C. Para estos mismos primers se probó también con 2.0, 2.5 y 3.0mM de MgCl y temperaturas de anillado de 54.8°C, 56°C, 58°C y 60°C. El ADN utilizado en este caso fue de la línea H460.

Se obtuvieron bandas para los casos con 1.5mM de MgCl a 53.6°C y 55.7°C y para 2mM de MgCl para todos los gradientes de temperatura de 53.6°C a 60°C en la primera prueba y para todos los gradientes de la segunda prueba. Se seleccionó la banda más nítida observada en el gel aunque el peso molecular de esta no coincidía con el peso molecular esperado para el amplicon. En la secuenciación se vio que la banda obtenida no correspondía a la amplificación del gen *TERTp*.

Posteriormente se probaron las combinaciones de primers forward hTERT-F y reverso TERT-R (amplicon 163pb) y forward hTERT-F y reverso hTERT-R2 (amplicon 274 pb). Para estos dos juegos de primers se probó con 1, 1.5 y 2mM de MgCl y gradiente de temperatura de 58°C, 60°C y 63°C.

Dado que no se obtuvo la amplificación del gen de interés con los primers mencionados se procedió a considerar otros juegos de primers.

Inicialmente se intentó amplificar la PCR sin la secuencia M13 previo a los primers usando los primers forward TERT-F y reverso TERT-R; forward TP-OF y reverso TP-OR (amplicon 488pb) y forward TP-IntF y reverso TP-IntR (amplicon 163pb) con 2.0mM de MgCl y una temperatura de anillado a 57°C. Para los primers TP-OF y TP-

OR se probó también con una temperatura de anillamiento de 58°C y concentraciones de MgCl hasta 3.5mM, ninguna de las pruebas fue exitosa.

Se intentó también el diseño de nuevos primers y se identificaron como candidatos los primers forward TERT-1519-F y reverso TERT-1673-R (amplicon 355pb) probándose el mismo mix que en la instancia anterior variando las concentraciones de MgCl de 1.5 y 2.5mM y temperatura de anillado iniciando a 70°C por 15 segundos y disminuyendo en cada ciclo 0.3°C hasta llegar a 60°C. Si bien otros autores alcanzaron buenos resultados con este procedimiento en nuestro caso no se lograron visualizar bandas en el gel. En estas mismas condiciones se probó aumentar el tiempo de extensión a 40 segundos dada la longitud del fragmento a amplificar, tampoco se obtuvieron bandas en esta situación.

Se identificaron también los primers forward TERT-1444-F y reverso TERT-1658-R (amplicon 231pb) y forward TERT-1430-F y TERT-1769-R (amplicon 355pb) los cuales se probaron con una temperatura de anillado de 57 y 63°C, tampoco se obtuvieron bandas en estas condiciones

En este punto se planteó que la no amplificación de la banda deseada se debiera a inhibidores presentes en el ADN, acción de estructuras secundarias o de los cebadores de ADN, por lo que se decidió agregar DMSO y glicerol para intentar remediar esta situación. Para esto se probó inicialmente los primers forward hTERT-F y reverso TERT-R con anillado a 55°C y los juegos forward TERT-1444-F y reverso TERT-1658-R; y forward TERT-1430-F y reverso TERT-1769-R a 57 y 63°C, en todos los casos se probó solo con DMSO a 5%, solo glicerol a 5% y ambos, en todos los casos con concentraciones de 1.5 y 2.5mM de MgCl manteniéndose los demás componentes constantes respecto a las PCR anteriores.

Se probaron también los primers forward TERT-F-M13 y reverso TERT-R-M13 con agregado de DMSO al 5%, con glicerol al 5% y ambos. Con temperatura de anillado de 55°C por 30 segundos aumentando de a 5 segundos por ciclo hasta un máximo de 7 minutos en el 35vo ciclo dado que en otros estudios reportados se vio una adecuada amplificación con esta técnica, sin embargo, en nuestro experimento no se logró amplificar la PCR.

En experimentos previos en nuestro laboratorio con otras secuencias a amplificar con alta frecuencia de pares CG logramos evitar la inhibición de la amplificación con el agregado de betaina por lo que para todos los primers utilizados anteriormente se probó también añadir cantidades de betaina de 0.5M, 1M y 2M completando el volumen hasta 25ul con agua, con las temperaturas de anillado óptimas para cada primer y manteniendo constante los demás parámetros. La dificultad de amplificación de estas secuencias se debe a que presentan tres puentes de hidrógeno entre ambas bases lo que hace su unión más termoestable y la formación de estructuras secundarias que truncan la PCR bloqueando la ADN polimerasa (Shore, 2018). Se vio que la betaina se une a los pares AT y puede favorecer la hidratación de las regiones GC para desestabilizar el ADN con alta proporción de GC (Mammedov, 2008). Con este experimento tampoco logramos obtener bandas en el gel.

Por último se probaron los pares de primers OR y OF; TERTp2F y TERTp2R; TERT-1444-F TERT-1658-R; y TERT-1519-F y TERT-1673-R con el agregado de betaina a 2M como funcionó previamente en nuestro laboratorio, a sus temperaturas optimas y con una Taq de mayor rendimiento. En estas condiciones impresión que se obtuvo una banda para los primers OR y OF en un experimento inicial pero no se lograron

obtener bandas en experimentos posteriores en las mismas condiciones.

En suma, pese a los innumerables protocolos ensayados para la amplificación de TERTp, no logramos obtener resultados para este gen.

Identificación de mutaciones *KRAS*:

Para la identificación de las mutaciones *KRAS* se utilizó el kit cobas *KRAS* Mutation Test. Este kit permite la amplificación de mutaciones somáticas en los codones 12, 13 y 61 del protooncogen *KRAS*. Se utilizan primers que definen una secuencia de 85 pares de bases del exón 2 que contienen los codones 12 y 13 y una secuencia de 75 pares de bases del exón 3 que contiene el codón 61.

Se realizaron dos mix, uno para la amplificación de los codones 12 y 13 y otro para el codón 61 de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para realizar la PCR además del número de muestras se utilizó un control negativo, un control positivo para los distintos codones a amplificar y un calibrador contenido también en el kit. Las muestras fueron procesadas en el amplificador de cobas Z480 y los resultados registrados en el programa asociado.

Biopsia líquida:

Para el estudio de biopsia líquida se realizó la extracción del ADN del plasma con el KIT cfDNA Sample Preparation kit de Cobas, de uso corriente en la rutina asistencial del laboratorio de Oncología Molecular del Departamento de Oncología.

Se colocaron 2ml de plasma en tubos falcon de 15ml con 2ml de buffer de unión (DNA PBB) y 250ul de proteína kinasa (PK), se mezcla por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se añadió 200ul de isopropanol, se mezcló por inversión y se transfirió a la columna para su purificación. Se centrifugó a 4000 xg por 5 minutos, se retiró la columna del inserto y se pasó a tubo de 2ml. Se realizaron lavados con 500ul de WB I centrifugando a 8000 xg y descartando el filtrado repitiéndose el mismo procedimiento con WB II y se secó la columna a máxima velocidad por 2 minutos. Por último, se realizó la elución con 100ul de buffer de elución (DNA EB), se incubó por 5 minutos, se centrifugó a 8000 xg y se recentrifugó a máxima velocidad y se transfirieron 80ul a tubo Eppendorf de 1.5ml evitando el sedimento.

El ADN obtenido se utilizó para amplificar el gen *BRAF* en una PCR heminested para mayor sensibilidad con la misma técnica descrita previamente y se corrió en gel de agarosa utilizando los mismos controles positivos.

Análisis estadístico:

Se consignaron las variables edad, sexo, procedencia, nivel socioeconómico (considerando el nivel de estudios completado y las condiciones de la vivienda), exposición a radiaciones ionizantes en la infancia, bocio, tamaño y número de nódulos

tiroideos, uso de T4, ecogenicidad de nódulos, consistencia de nódulos, presencia de calcificaciones por ecografía, vascularización, presencia de adenopatías, clasificación Bethesda, presencia de mutaciones *BRAF* V600E tanto en la muestra de punción como en la anatomía patológica definitiva de la pieza cuando corresponda y las características anatomopatológicas de las piezas de resección.

Las variables cuantitativas fueron expresadas en media y desvío estándar si presentaban distribución normal según la prueba de normalidad Kolomogrov Smirnov, de lo contrario se consideraron la mediana y el rango intercuartilo (RIC). Las variables cualitativas se expresaron en frecuencia absoluta y frecuencia relativa porcentual.

Para la comparación de variables cuantitativas se utilizó la prueba t de student para variables con distribución normal o U de Mann Withney si las variables no presentaron distribución normal. Para las variables cualitativas se valoró asociación mediante la prueba de chi cuadrado, en caso de valores esperados menores a 5 se utilizó la prueba exacta de Fischer, y se cuantificó el riesgo mediante Odds Ratio.

Los datos perdidos aislados se excluyeron del análisis bajo el precepto de que dado que representan menos del 10% de los casos se asume que los mismos se distribuirán al azar en las distintas categorías.

Se consideró significativo un valor p menor a 0,05.

Se calculó la validez interna y externa de la prueba diagnóstica de marcadores tumorales considerando como pacientes enfermos a los que presentaban confirmación anatomopatológica de malignidad.

El procesamiento de los datos se realizó mediante software estadístico SPSS v22.0 (IBM, inc.)

Aspectos éticos:

La participación del paciente fue realizada de forma anónima, la información brindada fue manejada únicamente por los autores de la investigación respetando el secreto profesional y asignándose a cada paciente un número autogenerado con el fin de preservar la confidencialidad.

Se solicitó consentimiento informado a todos los pacientes incluidos en el estudio explicando los riesgos del procedimiento de PAAF y los beneficios de complementar el estudio citológico con los marcadores tumorales seleccionados.

Los pacientes involucrados no obtuvieron ningún beneficio directo más allá del vinculado directamente al resultado de los marcadores utilizados, así como ningún detrimento en su asistencia.

El estudio fue llevado a cabo bajo estrictas normas éticas de acuerdo a la legislación vigente. El plan de trabajo se inscribió en el registro del MSP con el número 805071 y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Maciel con el número 24 el 29 de julio, 2020.

Resultados y discusión:

Descripción de la población:

Se incluyeron en el estudio 155 pacientes contando con un total de muestras de 180 debido a que en algunos casos se puncionaron dos nódulos en el mismo paciente y en otros se extrajeron muestras tanto de la punción en policlínica como de la pieza quirúrgica.

La edad de los pacientes fue de 55.0 +/- 14.3 años, 145 (93.5%) pacientes fueron de sexo femenino y 10 (6.5%) de sexo masculino. 112 (75.7%) procedían de zonas costeras y 36 (24.3%) de zonas alejadas de la costa. 129 (89.0%) tenían un nivel socioeconómico medio, 10 (6.9%) medio bajo, 5 (3.4%) bajo y 1 (0.7%) deficitario.

Siete (4.8%) de los pacientes fueron expuestos a radiaciones ionizantes de cabeza y cuello durante la infancia o adolescencia.

En cuanto a las características de los nódulos, 5 (3.3%) de los pacientes presentaban un bocio GIV, 28 (18.7%) bocio GIII, 59 (39.3%) bocio GII, 32 (21.3%) bocio GI y 26 (17.3%) no presentaban bocio. 97 (63.0%) de los pacientes no tomaban levotiroxina, 6 (3.9%) tomaban solo 25 ug, 22 (14.3%) 50 ug, 7 (4.5%) 75 ug, 19 (12.3%) 100ug y 1 (0.6%) 125, 150 y 200ug en cada caso.

Se sometieron a cirugía 23 (14.8%) pacientes ya sea por punción sugestiva o confirmatoria de malignidad o por el tamaño del bocio aun con punciones benignas. Se confirmó malignidad en 13 (8.4%) pacientes de los cuales 12 se sometieron a cirugía, destacamos que un paciente con punción confirmatoria de malignidad no se operó dado que por el tamaño y la diseminación de su enfermedad estaba fuera de sanción quirúrgica (Tabla 3).

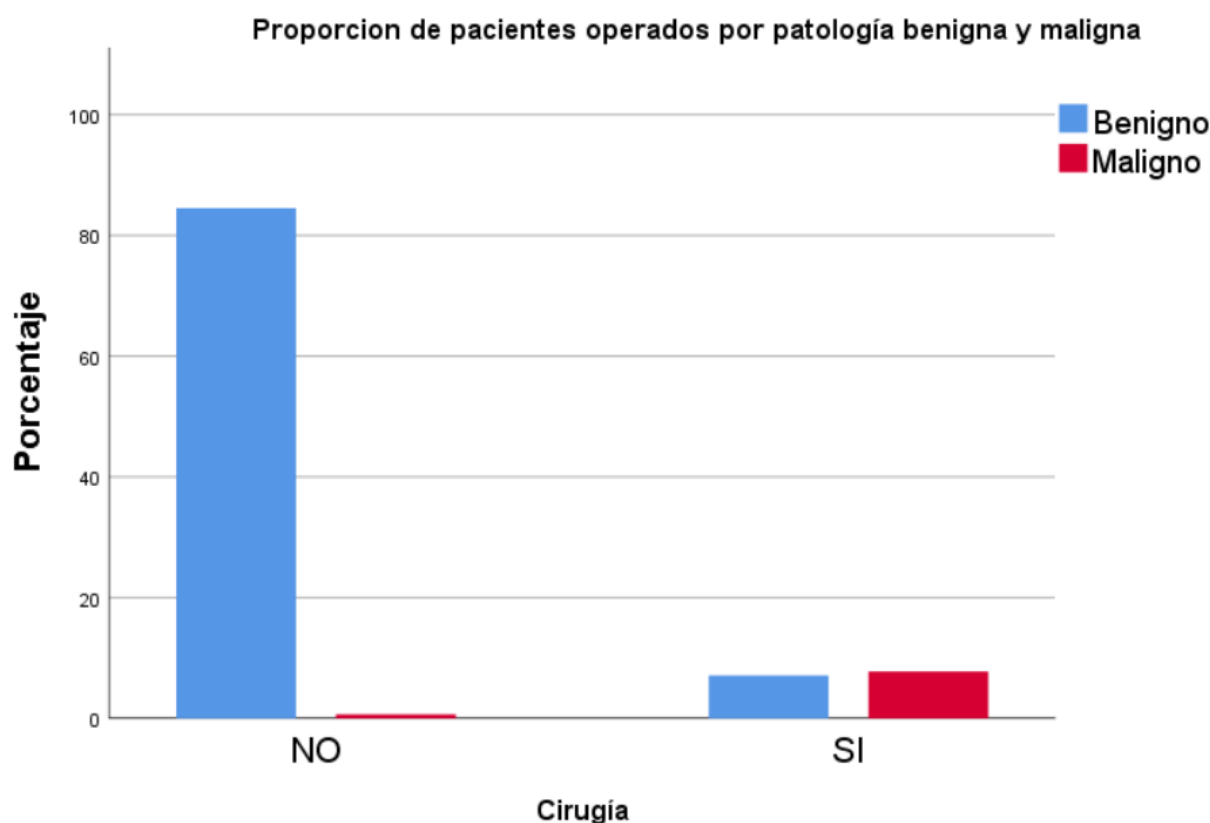


Tabla 3: Descripción de la población

Edad (años)	55.0 +/- 14.3
Sexo femenino	145 (93.5%)
Zona costera	112 (75.7%)
Nivel socioeconómico: medio	129 (89.0%)
medio bajo	10 (6.9%)
Bajo	5 (3.4%)
Deficitario	1 (0.7%)
Exposición a radiaciones ionizantes	7 (4.8%)
Bocio: sin bocio	26 (17.3%)
I	32 (21.3%)
II	59 (39.3%)
III	28 (18.7%)
IV	5 (3.3%)
Levotiroxina: 0ug	97 (63.0%)
25ug	6 (3.9%)
50ug	22 (14.3%)
75ug	7 (4.5%)
100ug	19 (12.3%)
125ug	1 (0.6%)
150ug	1 (0.6%)
200ug	1 (0.6%)
Cirugía	23 (14.8%)
Patología maligna	13 (8.4%)

Al evaluar la epidemiología de los nódulos tiroideos en algunas de las características registradas podemos ver valores similares a los reportados por otros autores a nivel mundial. Es coincidente en múltiples reportes la gran prevalencia de nódulos en el sexo femenino, esto se relaciona con la presencia de receptores de estrógeno en las células tiroideas tanto normales como neoplásicas. Esto también afecta la producción de TSH pudiendo tener implicancias en la generación de los nódulos. Se plantea que altos niveles de estrógeno podrían favorecer la generación de nódulos (Mu, 2022). Encontramos como diferencia en nuestro estudio el ratio mujer:hombre que fue de 14.5:1, ampliamente superior a lo reportado por otros autores de 6:1 (Patel, 2023).

En nuestra población la media de la edad se localiza en 55 años siendo una población relativamente joven. En estudios recientes encontramos una discordancia en cuanto a la mayor incidencia de nódulos tiroideos, mientras unos estudios reportan mayor

incidencia en poblaciones jóvenes siendo mayor entre los 19 y 45 años (Chen, 2023; Patel, 2023) otros plantean que la incidencia aumenta con la edad, siendo mayor a partir de los 70 años (Mu, 2022).

Tradicionalmente se ha reportado que la carencia de yodo se asocia con el desarrollo de nódulos tiroideos, lo que hacía que las personas procedentes del centro y noreste de nuestro país tuvieran una mayor prevalencia de nódulos tiroideos, esta diferencia se ha eliminado con la suplementación de yodo en la sal. En nuestro medio el Ministerio de Salud Pública implementó la obligatoriedad de la yodación de la sal para consumo humano directo e indirecto a partir del año 1999, Ordenanza 110 del 17/3/99 (<https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/sal-para-condimentos>). La yodación de sal no solamente se implementó en nuestro país, sino que se desarrollaron distintos programas a nivel mundial para yodación de la sal a fines de 1990. Esto logró solucionar el problema de la deficiencia de yodo en relación a la generación de nódulos tiroideos. Por otra parte, se vio que el exceso de yodo también puede producir aumento en la generación de los nódulos tiroideos como se vio en China y México, en donde aumentó la prevalencia de nódulos luego de la implementación de programas de yodación de sal (Mu, 2022; Chen, 2023). Esto se debe a que las células tiroideas aumentan la captación de yodo pudiendo también aumentar la respuesta mitótica a los estímulos proliferativos dando nódulos hiperplásicos (Yildirim Simsir, 2020). En nuestro medio no existen estudios comparativos en cuanto a la incidencia de nódulos pre y pos yodación de sal, si bien no se puede descartar que el aumento en la detección de nódulos en períodos más recientes esté relacionado con los avances tecnológicos que permiten la detección de nódulos subclínicos.

Las radiaciones ionizantes en la región del cuello antes de los 20 años aumentan la incidencia de bocio en la juventud y cáncer papilar de tiroides en edades más avanzadas. Las radiaciones recibidas pueden provenir tanto de radiografías, tomografías o administración de yodo radiactivo. A nivel mundial el episodio más representativo del aumento de bocio y cáncer de tiroides en pacientes expuesto a radiaciones ionizantes fue el incidente de Chernobyl. Al estudiarse a los niños que vivían en dicha zona al llegar a la edad adulta se vio un claro aumento de la incidencia tanto de bocio como de cáncer de tiroides (Yildirim Simsir, 2020).

A diferencia de lo reportado por otros autores encontramos una mayor prevalencia de disfunción tiroidea ya que en nuestra población un 37% de los pacientes portadores de nódulos tiroideos requieren suplementación hormonal con levotiroxina contra un 5 a 29% hallado en otras series (Mu, 2022; Fan, 2023).

La prevalencia de la patología maligna, que en nuestro caso fue de 8.4%, está en el límite inferior de lo reportado por otros autores siendo esta entre 8 y 15% (Fussey, 2020; Mu, 2022; Rehman, 2022; Patel, 2023).

En cuanto a los nódulos se consideraron distintas características. En lo topográfico, 87 (56.5%) de los pacientes se puncionó un nódulo a nivel del lóbulo derecho 63 (40.9%) nódulos a nivel del lóbulo izquierdo y 4 (2.6%) se puncionaron nódulos a nivel del istmo. En los pacientes que presentaban nódulos múltiples se optó por puncionar el más representativo o el que presentara elementos ecográficos de malignidad. En cuanto al número, 81 (23.3%) pacientes presentaban 4 o más nódulos tiroideos, 11 (7.2%) presentaban 3 nódulos, 25 (16.4%) 2 nódulos y 35 (23.0%) solo un nódulo. Los nódulos puncionados presentaron una mediana para el tamaño de 21 RIC 16mm

en su eje longitudinal midiendo el menor de ellos 4mm y el mayor 90mm; y una mediana de 15 RIC 11mm en su eje anteroposterior siendo el menor de ellos 4mm y el mayor 80mm.

Treinta y cinco (22.6%) pacientes presentaban calcificaciones en los nódulos puncionados y 4 (2.6%) presentaron adenopatías sugestivas de malignidad por ecografía. La vascularización fue central y periférica en 70 (45.8%) pacientes, periférica en 47 (30.7%) pacientes, central en 1 (0.7%) y no presentaron vascularización los nódulos de 35 (22.9%) de los pacientes puncionados. Los nódulos fueron en 39 (25.8%) pacientes hipoecogénicos, 99 (65.3%) isoecogénicos y 13 (8.6%) de los pacientes hiperecogénicos. En cuanto a su consistencia en 66 (43.2%) eran nódulos sólidos, 12 (7.8%) quísticos y 75 (49.0%) mixtos (Tabla 4).

Tabla 4: Características de los nódulos

Número de nódulos: 1	35 (23.0%)
2	25 (16.4%)
3	11 (7.2%)
4 o más	81 (53.3%)
Lóbulo: Derecho	87 (56.5%)
Izquierdo	63 (40.9%)
Istmo	4 (2.6%)
Tamaño: Longitudinal (mm)	21 RIC 16
Anteroposterior (mm)	15 RIC 11
Calcificaciones	35 (22.6%)
Adenopatías	4 (2.6%)
Vascularización: Sin vascularización	35 (22.9%)
Central	1 (0.7%)
Periférica	47 (30.7%)
Central y periférica	70 (45.8%)
Ecogenicidad: Hipoecogénicos	39 (25.8%)
Isoecogénicos	99 (65.3%)
Hiperecogénicos	13 (8.6%)
Consistencia: Sólido	66 (43.2%)
Quístico	12 (7.8%)
Mixto	75 (49.0%)

Al comparar la cantidad de pacientes que presentan nódulos solitarios y múltiples vemos reflejada la misma tendencia que en reportes internacionales en los cuales se plantea que dentro de los pacientes portadores de nódulos tiroideos los pacientes con

nódulos múltiples son el triple de los pacientes portadores de nódulos únicos (Aslan, 2020)

Los nódulos a nivel del istmo tiroideo son francamente menos frecuentes que los presentes en los distintos lóbulos. Esto se relaciona con la superficie de esta parte de la glándula, que siendo mucho menor respecto a la de los lóbulos es esperable que presente menos nódulos. Estudios reportan que solamente 4.2 a 6.4% de los nódulos asientan en esta topografía si bien en nuestro trabajo la prevalencia fue levemente inferior a esto (Dellal, 2020).

En nuestro estudio se detectaron adenopatías en solamente 4 de los pacientes incluidos que después se verá que en 3 pacientes se confirmaron adenopatías patológicas en la pieza de resección. Si bien la ecografía es el estudio de elección para la detección de la diseminación ganglionar, la sensibilidad para la identificación de adenopatías cae en relación a la que presenta para la detección de nódulos tiroideos (Liu, 2021).

La determinación de la ecogenicidad presenta variaciones según los criterios utilizados por las diferentes asociaciones de radiología a nivel mundial. Mientras algunas consideran como determinante de la ecogenicidad la que esté presente en mayor área del nódulo, otras consideran como levemente hipoecogénicos a los que presentan al menos una mínima parte hipoecogénica. Esto se relaciona con el riesgo de malignidad vinculado a esa característica. Incluso algunas consideran dentro de la hipoecogenicidad distintos grados, condición muy específica que no está difundida entre los ecografistas de nuestro medio. En estudios realizados en otros países se vio que los nódulos iso o hiperecogénicos son los más frecuentemente identificados en la población, característica que coincide en nuestro estudio (Lee, 2022).

En nuestros pacientes fueron más frecuentes los nódulos mixtos, seguidos de cerca por los nódulos sólidos y por último los nódulos quísticos. Esto difiere con lo reportado en metanálisis donde identificaron una mayor prevalencia de nódulos sólidos frente a los mixtos. Si coincide en cuanto a que son más frecuentes los nódulos mayores a 1cm. Por último diferimos ampliamente con los resultados respecto a la cantidad de nódulos ya que en nuestro caso los nódulos múltiples estuvieron presentes en 77% de los pacientes contra una prevalencia similar entre los nódulos únicos y múltiples (Mu, 2022).

Cuando consideramos la clasificación Bethesda informada por el Departamento de Anatomía Patológica encontramos que los nódulos correspondieron a Bethesda II en 136 (88.3%) pacientes, Bethesda III en 2 (1.3%) pacientes, Bethesda IV en 4 (2.6%) pacientes, Bethesda V en 8 (5.2%) pacientes y Bethesda VI en 4 (2.6%) pacientes (Tabla 5).

Tabla 5: Clasificación Bethesda

II	136 (88.3%)
III	2 (1.3%)
IV	4 (2.6%)
V	8 (5.2%)
VI	4 (2.6%)

La importancia de la clasificación Bethesda radica en que cada categoría se asocia con una probabilidad de malignidad, siendo casi nula en la categoría Bethesda II y muy próxima al 100% en los pacientes Bethesda VI. Por lo tanto, es fundamental localizar a los pacientes en la categoría que refleje lo más representativamente posible el nódulo. La categorización tiene parámetros específicos a identificar en la lámina visualizada al microscopio si bien es una prueba que se ve afectada por la capacidad del patólogo de identificar dichas características. Inicialmente se había reportado que 10 a 40% de los nódulos podrían presentar citología indeterminada (Bongiovanni, 2019). Esta proporción se aproxima más al extremo inferior en estudios más recientes lo que se plantea que se relacione con la mayor difusión del sistema de clasificación Bethesda desde su creación así como también con mayor práctica de los patólogos actuantes (Durgun, 2023).

En nuestro estudio solamente a 3.9% de los pacientes se les asignó categoría indeterminada. Esto podría relacionarse con la amplia experiencia del Departamento de Anatomía Patológica de nuestro hospital y un equipo de patólogos especialmente dedicados a patología endócrina, en especial para las afecciones de la glándula tiroides. Al concentrar su actividad en este campo podrían reconocer diferencias más sutiles que les permitan definir el diagnóstico hacia patología benigna o maligna en un mayor número de casos.

De acuerdo a reportes internacionales el 70 a 80% de las punciones son categorizadas como Bethesda II (Mulita, 2021; Durgun, 2023), en nuestro caso tenemos una cantidad superior de pacientes con punciones dentro de esta categoría. Ello podría vincularse a que se realizan punciones a pacientes derivados de todo el territorio al sur del Río Negro, en ocasiones con solicitud de punción de nódulos menores a 1cm y sin elementos clínicos ni ecográficos de malignidad. En otros casos estos pacientes no tendrían indicación de punción, pero dado el difícil acceso al estudio y seguimiento posterior, así como el tiempo y presupuesto invertido en el traslado fuerza a que se realice de todas maneras la punción, si bien a priori se esperaría que dichos nódulos fueran benignos. En Korea se realizó un estudio en el cual evaluaron las punciones realizadas sin indicación clara en el cual encontraron que entre 24 y 40% de las punciones que se realizaron en el centro de estudio no presentaban indicación de punción citológica. Ellos atribuyen el aumento de punciones innecesarias al miedo entre los especialistas médicos en pasar por alto el diagnóstico de un nódulo maligno y coinciden con lo planteado para nuestro medio. A ello se suma el hecho que es controversial retornar al paciente a su centro de atención primaria sin realizar el estudio para el cual fue referido (Jeong, 2020).

La probabilidad de malignidad para los nódulos indeterminados varía entre 15.7 y 54.6% para los nódulos Bethesda III y 16.8% a 72.4% para los nódulos Bethesda IV según las distintas regiones. Porcentaje francamente mayor respecto al reportado inicialmente para esta clasificación (Zahid, 2020; Durgun, 2023). Cuando consideramos los límites superiores de estas categorías la probabilidad de malignidad es alta por lo que es fundamental llegar a un diagnóstico etiológico, aun cuando sea necesario realizar un procedimiento quirúrgico para llegar al mismo.

Al considerar las categorías Bethesda V y VI, la prevalencia reportada por PAAF es de 4.0% y 3.3% respectivamente (Durgun, 2023), valores muy similares a los hallados en nuestro estudio.

Anatomía patológica:

Complementario al estudio para las mutaciones de *BRAF* V600E se realizó un estudio de muestras en parafina adicionando a los pacientes operados de la serie de citopunción otros pacientes operados en el hospital. Para dicho análisis anatomopatológico se estudiaron 53 pacientes, añadiéndose 33 muestras correspondientes a 30 pacientes adicionales obtenidas de cortes de parafina solicitados al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Maciel además de los 23 pacientes sometidos a cirugía de la población con citopunción. Tres de las muestras de parafina correspondieron a pacientes sometidos a citopunción en los que se confirmó patología maligna pero se obtuvo resultado negativo para la mutación *BRAF*. Estas láminas fueron previamente evaluadas por una patóloga experimentada en patología tiroidea para seleccionar las láminas representativas del nódulo añadiéndose muestras tanto de patología benigna como maligna.

La anatomía de las piezas resecadas correspondió en 11 (20.8%) pacientes a adenoma, 26 (49.1%) pacientes a carcinoma papilar, en 3 (5.7%) pacientes a microcarcinoma papilar, en 2 (3.8%) paciente a carcinoma medular, en 7 (13.2%) pacientes a hiperplasia funcional y 1 (1.8%) paciente a linfoma tiroideo, adenoma oncocítico, NIFTP y carcinoma folicular en cada caso.

Los pacientes con patología maligna presentaron multifocalidad en 17 (53.1%) casos, bilateralidad en 13 (41.9%) casos y adenopatías positivas en 8 (21.6%) casos. Se evidenció invasión de la capsula del órgano en 9 (32.1%) de los casos y extensión extratiroidea en 4 (14.3%) casos. Los nódulos malignos presentaron una mediana para el tamaño en su eje mayor de 13.0 RIC 10mm (Tabla 6).

La punción aspirativa con aguja fina es un método mínimamente invasivo, costo efectivo y que puede realizarse de forma ambulatoria y se realiza con el objetivo de diferenciar patología benigna de maligna. Se vio que en general las muestras identificadas como sospechosas de malignidad según la clasificación de Bethesda suelen confirmarse malignas en el examen histopatológico (Alshahrani, 2022). Se destaca especialmente la concordancia en este punto dado que en los casos que se identifican nódulos tanto sospechosos como malignos en nuestro medio se procede a la resección quirúrgica de la tiroides con confirmación intraoperatoria.

Es de fundamental importancia conocer la concordancia entre la citología obtenida mediante punción aspirativa y el resultado final de la pieza histológica. Ello se basa en que en muchos casos las decisiones terapéuticas se basan en los hallazgos citológicos y el objetivo es que las mismas presenten una concordancia lo más cercano al 100% posible para evitar tanto el sobretratamiento de patología benigna como el infratratamiento en pacientes portadores de patología maligna. Al igual que en el estudio de Patel hubo una mínima discordancia entre las punciones y el estudio anatomopatológico definitivo. En nuestro estudio se halló 2 (8.7%) casos de falsos negativos. Estos correspondieron a un carcinoma papilar y un microcarcinoma papilar. Estos resultados son aceptable si lo comparamos con lo reportado por otros autores que reportan entre 3 y 14% de falsos negativos. Este valor puede aumentar incluso hasta hasta 19% en nódulos mayores a 4cm, situación que se puede dar en pacientes portadores de bocio multinodular (Alshanthry, 2020; Mulita, 2021; Aliyev, 2022). Se plantea que esto pueda relacionarse con el número y tamaño de los nódulos, ya que en los casos en que hay múltiples nódulos o estos son de mayor tamaño aumenta exponencialmente la dificultad para obtener una muestra representativa de los

mismos (Patel, 2022).

Tabla 6: Resultado del estudio anatomopatológico (n=53)	
Histología: Adenoma	11 (20.8%)
Carcinoma papilar	26 (49.1%)
Microcarcinoma papilar	3 (5.7%)
Carcinoma medular	2 (3.8%)
Hiperplasia funcional	7 (13.2%)
Linfoma	1 (1.9%)
Adenoma oncocítico	1 (1.9%)
NIFTP	1 (1.9%)
Carcinoma folicular	1 (1.9%)
Adenopatías positivas	8 (21.6%)
Focos: Unifocal	15 (46.9%)
Multifocal	17 (53.1%)
Unilateral	18 (58.1%)
Bilateral	13 (41.9%)
Invasión capsular	9 (32.1%)
Extensión extratiroidea	4 (14.3%)
Tamaño en su diámetro mayor (mm)	15.5+/-9.2

La histología tipo NIFTP se propuso como remplazo de la variante folicular no invasiva del carcinoma papilar, es el segundo subtipo en frecuencia del carcinoma papilar y corresponde a 5.0 a 22.5% de los casos. Se vio en distintos estudios que histológicamente se asemeja más a los adenomas foliculares que a los carcinomas papilares clásicos siendo más frecuentemente encontrada la mutación *RAS* y estando ausente la mutación *BRAF* V600E. Al agregar la categoría NIFTP se evidenció una disminución del riesgo de malignidad según la clasificación de Bethesda, especialmente en las categorías correspondientes a citología indeterminada en relación a la limitación en la citología para evaluar la invasión capsular (Al-Maghrab, 2022).

Los resultados falsos negativos se pueden mitigar realizando 3 o 4 tomas biopsicas del mismo nódulo en los casos en que este presenta un gran tamaño o realizando en diferido una nueva punción para estudio citológico. Se vio que la realización de más de 2 punciones seguidas en el tiempo no aporta mejoras en el diagnóstico (Mulita, 2021).

Por otra parte, también tuvimos en nuestro estudio un (4.3%) caso de falso positivo que correspondía a un paciente que traía el resultado de una punción potencialmente maligna que fue realizada en otro centro. El paciente se sometió a cirugía en nuestro

hospital donde se resecó el lóbulo afectado y se realizó el estudio intraoperatorio del mismo. Dado que en el intraoperatorio no se confirmó malignidad en el nódulo identificado previamente como potencialmente maligno, se finalizó la cirugía. En el estudio en diferido de la pieza de resección se descartó definitivamente la patología maligna. Esto coincide con los falsos positivos reportados por otros autores que son entre 3.6 y 13.3% (Aliyev, 2022; Alshahrani, 2022).

Optimización de PCR:

Se logró optimizar la sensibilidad de la técnica AS-PCR para V600E del gen *BRAF*. Para esta determinación se realizaron distintas mezclas de ADN normal y mutado para el gen obtenido de distintas líneas celulares de cáncer de colon (HT29 para ADN mutado y K562 para el ADN normal). Se disminuye gradualmente la representatividad de ADN mutado presente en la mezcla para determinar el mínimo porcentaje de ADN detectable mediante la técnica utilizada. Se obtuvo una sensibilidad máxima de 0.6% (Figura 11)

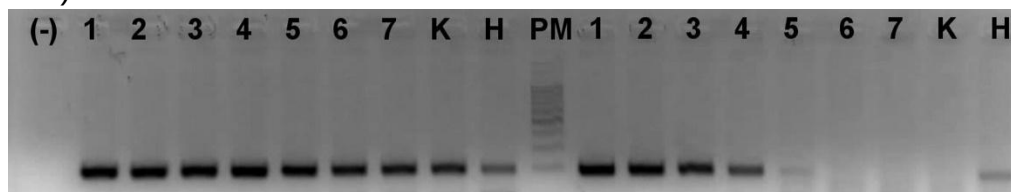


Figura 11: (-) control negativo, (K) K562, (H) HT29, PM 100bp. Los carriles a la izquierda del peso molecular corresponden a la reacción normal y a la derecha a la mutada en los que se va descendiendo la concentración de ADN mutado en cada carril. (1) 16.0%, (2) 5.5%, (3) 1.8%, (4) 0.6%, (5) 0.2%, (6) 0.07%, (7) 0.02%

Al realizar la PCR con las muestras obtenidas de los pacientes encontramos que no en todos los casos obteníamos bandas normales nítidas y en algunos casos no se obtenía ninguna banda. Inicialmente planteamos que esta situación se relacione con la baja cantidad de ADN presente en algunas muestras (Figura 12).

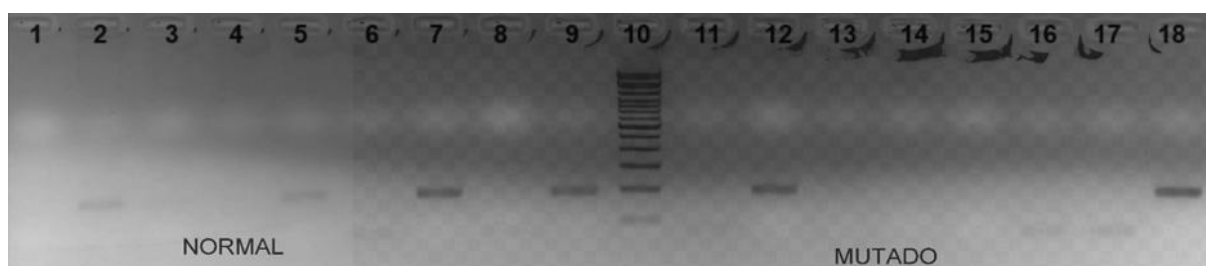


Figura 12: (1) control negativo, (2) T90A, (3) T98, (4) T166, (5) T167A, (6) T167B, (7) K562, (8) H₂O, (9) HT29, (10) peso molecular, (11) control negativo, (12) T90A, (13) T98, (14) T166, (15) T167A, (16) T167B, (17) H₂O, (18) HT29. A la izquierda del peso molecular se realiza la amplificación para el alelo normal y a la derecha para el alelo mutado. Se obtienen bandas definidas para los controles y para el alelo mutado de T90A. Se ve que en muestras normales de algunos pacientes no se obtienen bandas o las mismas son muy tenues.

En las muestras en las cuales no se obtuvieron bandas normales adecuadas al realizar la PCR inicial se procesaron nuevamente las muestras haciendo la PCR

heminested. Con este procedimiento se obtuvieron bandas normales definidas en todos los pacientes (Figura 13).

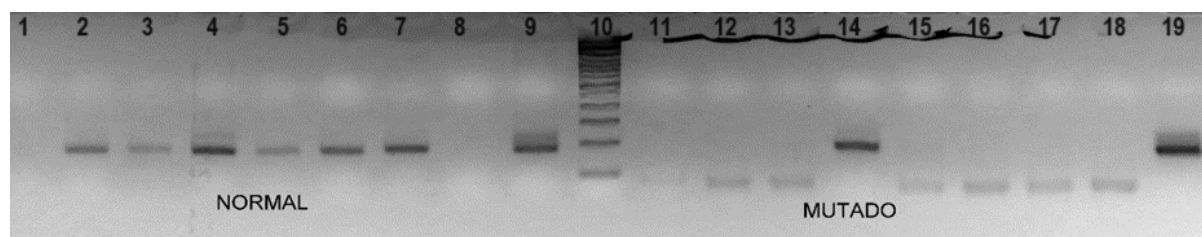


Figura 13: (1) control negativo, (2) T98, (3) T146B, (4) T146C, (5) T166 1, (6) T166 2, (7) T167B, (8) H₂O, (9) HT29, (10) peso molecular, (11) control negativo, (12) T98, (13) T146B, (14) T146C, (15) T166 1, (16) T166 2, (17) T167B, (18) H₂O, (19) HT29. A la izquierda del peso molecular se realiza la amplificación para el alelo normal y a la derecha para el alelo mutado. Se obtiene bandas definidas para todas las muestras normales y banda mutada para la muestra T146C, en ambos casos no se ve banda en el control negativo ni en el control de contaminación y si se obtiene banda para el control positivo, todas ellas al nivel de 200pb.

En las muestras provenientes de cortes de parafina las concentraciones de ADN fueron elevadas, con buena relación 260/280 en todos los casos. De todas formas al realizar la PCR con el ADN proveniente de estas muestras, en algunos casos no se obtuvieron bandas ni normales ni mutadas al realizar la PCR simple. Si se obtuvieron bandas nítidas para todas las muestras mediante el procedimiento de PCR heminested. Se plantea que esto se deba a la presencia de inhibidores que limitan en parte la amplificación en el primer round, pero aumentando la sensibilidad con la heminested, se logran visualizar. Esta situación también se verificó en el caso de una punción aspirativa con aguja fina realizada en policlínica en la cual se contaba con una concentración de ADN de 100ng/ul y no se obtuvieron bandas mediante PCR simple y si en la PCR heminested.

Marcador tumoral *BRAF*:

Se identificó la mutación *BRAF* V600E en 16 (9.8%) de los pacientes incluidos en el estudio.

Se demostró que los pacientes portadores de la mutación *BRAF*, así como los que no la presentan no difieren en sus características demográficas (Tabla 7).

Es fundamental demostrar que no existen diferencias entre las características demográficas de ambas poblaciones para poder atribuir la asociación entre las variables consideradas y la presencia o ausencia de la mutación sin que exista el efecto de factores de confusión.

Tabla 7: Características demográficas según presencia de la mutación *BRAF*

	BRAF + n=16	BRAF – n=139	Valor p
Edad (años)	52.9+/-12.8	55.3+/-14.5	0.525
Sexo femenino	14 (87.5%)	131 (94.2%)	0.275
Zona costera	10 (83.3%)	102 (75.0%)	0.731
Nivel socioeconómico: medio	13 (92.9%)	116 (88.5%)	0.880
medio bajo	1 (7.1%)	9 (6.9%)	
Bajo	0	5 (3.8%)	
Deficitario	0	1 (0.8%)	
Exposición a radiaciones ionizantes	0	7 (5.3%)	0.489
Bocio: sin bocio	4 (26.7%)	22 (16.3%)	0.617
I	3 (20.0%)	29 (21.5%)	
II	4 (26.7%)	55 (40.7%)	
III	4 (26.7%)	24 (17.8%)	
IV	0	5 (3.7%)	
Levotiroxina: 0ug	9 (56.3%)	88 (63.8%)	0.819
25ug	0	6 (4.3%)	
50ug	2 (12.5%)	20 (14.5%)	
75ug	1 (6.3%)	6 (4.3%)	
100ug	4 (25.0%)	15 (10.9%)	
125ug	0	1 (0.7%)	
150ug	0	1 (0.7%)	
200ug	0	1 (0.7%)	

Cuando consideramos las características de los nódulos en relación a la presencia o ausencia de la mutación *BRAF* V600E encontramos una diferencia significativa entre los grupos en cuanto al número de nódulos, teniendo mayor cantidad de nódulos en los pacientes que presentan la mutación (valor p 0.018); en la ecogenicidad, teniendo mayor proporción de nódulos hipoecogénicos en los pacientes que presentan la mutación (valor p 0.01) y en la confirmación anatomopatológica de malignidad siendo está ampliamente mayor en los pacientes que presentan la mutación (valor p < 0.001). (Tabla 8).

Tabla 8: Características de los nódulos según mutación *BRAF* en muestras citológicas

	<i>BRAF</i> + n=16	<i>BRAF</i> – n=139	Valor p
Número de nódulos: 1	1 (6.3%)	34 (25.0%)	0.018
2	3 (18.8%)	22 (16.2%)	
3	4 (25.0%)	7 (5.1%)	
4 o más	8 (50%)	73 (53.7%)	
Lóbulo: Derecho	0	75 (54.3%)	0.266
Izquierdo	4 (25.0%)	59 (42.8%)	
Istmo	12 (75.0%)	4 (2.9%)	
Tamaño: Longitudinal (mm)	18 RIC 22	22 RIC 16	0.327
Anteroposterior (mm)	15 RIC 15	15 RIC 10	0.917
Calcificaciones	7 (43.8%)	28 (20.1%)	0.053
Adenopatías	1 (6.3%)	3 (2.2%)	0.356
Vascularización: Sin vascularización	3 (20.0%)	32 (23.2%)	0.926
Central	0	1 (0.7%)	
Periférica	4 (26.7%)	43 (31.2%)	
Central y periférica	8 (53.3%)	62 (44.9%)	
Ecogenicidad: Hipoecogénicos	9 (56.3%)	30 (22.2%)	0.01
Isoecogénicos	7 (43.8%)	92 (68.1%)	
Hiperecogénicos	0	13 (9.6%)	
Consistencia: Sólido	9 (56.3%)	57 (41.6%)	0.330
Quístico	0	12 (8.8%)	
Mixto	7 (43.8%)	68 (49.6%)	

Se evidenció asociación entre la patología maligna y la mutación *BRAF* V600E con un valor p <0.001 viéndose una mayor proporción de mutaciones en los pacientes portadores de patología maligna (Tabla 9)

Tabla 9: Patología maligna en relación con la mutación *BRAF*

	<i>BRAF</i> + n=16	<i>BRAF</i> – n=139	Valor p
Patología maligna	10 (62.5%)	3 (2.2%)	<0.001
Patología benigna	6 (37.5%)	136 (97.8%)	

En nuestro caso se vio un franco predominio de los nódulos hipoeogénicos en los pacientes portadores de la mutación *BRAF*, característica que coincide con los factores de riesgo ecográficos sugestivos de malignidad en los nódulos tiroideos. Hay autores que hallan en sus estudios resultados concordantes con los nuestros (Xu, 2022) mientras que otros no encuentran asociación entre la ecogenicidad y la mutación *BRAF* (Dong, 2020).

En lo que respecta a las microcalcificaciones, si bien el valor p para esta variable fue próximo a 0.05, no fue inferior a este por lo que no se logró demostrar asociación con la mutación *BRAF*. Esta característica presenta la misma discordancia mencionada para la ecogenicidad variando sus resultados entre los distintos autores (Dong, 2020; Xu, 2022). Se podría plantear que en nuestro caso se vincule al bajo número de pacientes que presentaron la mutación pudiendo variar el resultado con muestras más grandes.

No se encontró registros sobre trabajos previos que relacionen la cantidad de nódulos que asientan sobre la glándula y la mutación *BRAF*.

Dadas estas discordancias sería importante contar con estudios con alto nivel de evidencia o la confección de un metanálisis para poder identificar fehacientemente los elementos clínicos asociados a la mutación *BRAF*.

Identificamos en nuestro estudio un franco predominio de pacientes portadores de la mutación *BRAF* V600E en los cuales se confirmó la presencia de patología maligna. Distintos estudios demostraron que la presencia de la mutación en la posición 600 de *BRAF* se asocia con el desarrollo y la progresión del cáncer papilar de tiroides. La combinación de la detección de esta mutación con el resultado citológico aumenta la precisión del diagnóstico de cáncer papilar de tiroides. Esta mutación también se asocia con un peor pronóstico, mayor incidencia de metástasis y recurrencia (Xu, 2022; Kasko 2023).

Al considerar la distribución de la mutación *BRAF* en relación a la clasificación citológica de Bethesda encontramos mayor proporción de pacientes portadores de la mutación en las categorías correspondientes a patología maligna (Bethesda V y VI) respecto a la categoría benigna (Bethesda II) (valor $p < 0.001$) (Tabla 10).

Tabla 10: Clasificación Bethesda según mutación *BRAF*

		<i>BRAF</i> + n=16	<i>BRAF</i> – n=139	Valor p
Bethesda: II		7 (43.8%)	129 (93.5%)	< 0.001
0	III	0	2 (1.4%)	
0	IV	0	4 (2.9%)	
0	V	6 (37.5%)	2 (1.4%)	
0	VI	3 (18.8%)	1 (0.7%)	

Tenemos una mayor proporción de pacientes con patología maligna en el grupo de pacientes que presentan la mutación respecto a los pacientes que no la presentan lo que coincide con otros reportes a nivel mundial. Llama la atención que en 7 casos se

haya identificado la mutación *BRAF* en pacientes Bethesda II. Al analizar más detenidamente estos pacientes hallamos que dos de los siete pacientes fueron sometidos a cirugía por presentar un bocio grado III, en el estudio de la pieza quirúrgica se encontró que uno correspondió a un microcarcinoma papilar y otro a un adenoma folicular. Sería interesante contar con un seguimiento más prolongado de los 5 pacientes restantes para evaluar si desarrollan patología maligna en la evolución pero dicho período escapa a los plazos de este estudio. En otros países la mutación en pacientes portadores de patología benigna es mínima o incluso nula (Bellevicine, 2019; Li, 2022). Destacamos que en nuestro medio no es aceptada la indicación de cirugía basados solo en los marcadores moleculares y en ausencia de elementos clínicos, imagenológicos o citológicos sugestivos de malignidad.

Algunos autores plantean que los resultados falsos positivos de la mutación *BRAF* en realidad se trate de una situación de “vanishing tumor” que establece que la realización de PAAF induce cambios secundarios que llevan al reemplazo del carcinoma tiroideo (Bellevicine, 2019). Otros sugieren que para la realización de los marcadores moleculares con adecuado rendimiento costo efectividad, estos no deben realizarse de rutina sino que deben hacerse en nódulos indeterminados o sospechosos de malignidad (Chen, 2021). En estos casos podría existir la mutación también en nódulos con citología Bethesda II pero se desconoce su prevalencia dado que los mismos no son estudiados.

No identificamos en nuestro trabajo pacientes que presentaran la mutación clasificados como Bethesda III o IV lo que coincide con lo reportado por Qui en su estudio (Qui, 2020) si bien otros autores como Sheng encuentran mutaciones sobre el gen *BRAF* ya presentes en la categoría Bethesda III (Sheng, 2021).

El análisis con el agregado de las muestras provenientes de cortes de parafina no difiere significativamente del obtenido de los datos de la población general mediante punción aspirativa. Los resultados de la citología son concordantes con los resultados de la histología donde se encuentra una mayor proporción de carcinoma o microcarcinoma papilar en los pacientes que presentan la mutación (valor p 0.039) (Tabla 11).

En las muestras obtenidas de los corten en parafina se incluyeron 3 pacientes en los cuales pese a ser portadores de patología maligna no se halló la mutación *BRAF* ni en la punción aspirativa con aguja fina realizada en policlínica ni en la aspiración realizada al extraer la pieza quirúrgica. En uno de los pacientes tampoco se verificó la presencia de la mutación al extraerse la muestra de una zona confirmada tumoral al microscopio mientras que en los otros dos si se halló la mutación por este método. Destacamos que esto no afectó significativamente los resultados globales del estudio de citopunción, obteniéndose una aceptable relación entre la mutación *BRAF* y las muestras obtenidas de la citología.

Se vio una asociación significativa entre la histología de los tumores y la mutación *BRAF* V600E. Se encontró una mayor proporción de muestras positivas para los carcinomas papilares mientras que para los adenomas fue mayor la proporción de muestras negativas para la mutación.

Tabla 11: Características histopatológicas de los nódulos según mutación *BRAF*

	<i>BRAF</i> + n=23	<i>BRAF</i> – n=30	Valor p
Histología: Adenoma	1 (4.3%)	10 (33.3%)	0.039
Carcinoma papilar	20 (87.0%)	6 (20.0%)	
Microcarcinoma papilar	2 (8.7%)	1 (3.3%)	
Carcinoma medular	0	2 (6.7%)	
Hiperplasia funcional	0	7 (23.3%)	
Linfoma	0	1 (3.3%)	
Adenoma oncocítico	0	1 (3.3%)	
NIFTP	0	1 (3.3%)	
Carcinoma folicular	0	1 (3.3%)	
Adenopatías positivas	6 (27.3%)	2 (13.3%)	0.639
Focos: Unifocal	10 (45.5%)	5 (50.0%)	0.704
Multifocal	12 (52.2%)	5 (50.0%)	
Unilateral	11 (50.0%)	7 (77.8%)	0.237
Bilateral	11 (50.0%)	2 (22.2%)	
Invasión capsular	6 (35.3%)	2 (20.0%)	0.667
Extensión extratiroidea	2 (11.8%)	1 (10.0%)	0.529
Tamaño en su diámetro mayor (mm)	12.0 RIC 11.0	15 RIC 13.0	0.881

La mutación *BRAF* V600E tiene una prevalencia reportada de 35 a 87% en los pacientes con carcinoma papilar, esta variabilidad puede relacionarse con las distintas etnias y regiones de procedencia (Dong, 2020; Xu, 2022; Kasko, 2023). En nuestro caso nos encontramos próximos al límite superior de lo reportado dado que la mutación se halla presente en el 75.9% de los cánceres papilares. Esto puede relacionarse con la región de procedencia ya que si tomamos en consideración otros estudios realizados en Sudamérica encontramos una prevalencia de 66% en Argentina y 70% en Brasil (Oler, 2009; Repetto, 2023).

Se vio que la presencia de la mutación *BRAF* V600E en microcarcinoma papilar se asocia con mayor agresividad cambiando francamente su pronóstico (Kasko, 2023). Por este motivo se plantea que el estudio genético podría tener implicancias al momento de decidir la técnica quirúrgica. En este tipo de tumor una lobectomía podría ser procedimiento suficiente, o incluso considerarse el control clínico sin resección quirúrgica, en ausencia de la mutación *BRAF*; en cambio en los pacientes que presentan la mutación debería ser considerada la tiroidectomía total como procedimiento estándar (Dong, 2020; Silver 2021). Esta distinción encuentra su aplicación en otros países donde admiten distintos tratamientos para esta variante del carcinoma papilar. En nuestro servicio realizamos la tiroidectomía total en todos los

pacientes portadores de carcinoma tiroideo confirmado en el preoperatorio o intraoperatorio aunque existen distintas posturas en cuanto a la técnica a utilizar en estos casos en otros servicios del país. En nuestro caso dada la baja prevalencia de invasión capsular así como extratiroidea no logramos demostrar asociación entre la mutación y estas.

En estudios realizados en otros países se identificó asociación de la mutación *BRAF* con la presencia de adenopatías metastásicas, no así con la focalidad o el tamaño (Dong, 2020). Destacamos que en nuestro caso contamos con una muestra pequeña de piezas de resección por lo que ello puede limitar la identificación de diferencias entre los grupos mutados y no mutados.

Marcador molecular *TERT*:

La mutación del promotor del gen *TERT* es un evento precoz en la tumorigenesis y se relaciona con mayor agresividad y peor pronóstico. Algunos pacientes incluso pueden presentar lesiones foliculares por la histología y presentar ya la mutación del promotor de *TERT*. Hay autores que recomiendan que aunque se trate de una lesión benigna por histología se realice la tiroidectomía total por la potencial malignidad de esta mutación (Chung, 2020). Si bien la frecuencia de esta mutación es muy baja en pacientes con patología neoplásica benigna, hay casos en los cuales se identifica la mutación en ausencia de cáncer y podría estar vinculado al infiltrado linfocitario del nódulo (Pestana, 2020).

Esta mutación está presente en 10 a 20% de los cánceres diferenciados de tiroides, hasta 40% cuando consideramos sólo el subtipo papilar, aunque en general la mayoría de los autores reportan menos del 10%, y 65% en los cánceres anaplásicos (Agarwal, 2022). En los microcarcinomas papilares su prevalencia es mucho menor, no superando el 9% de los casos (Matsue, 2023).

La presencia de la mutación del promotor de *TERT* aumenta el riesgo de transformación anaplásica en los cánceres diferenciados. Algunos estudios encuentran mayor frecuencia de la mutación del promotor de *TERT* asociada a mutación de *BRAF* lo que plantea una acción sinérgica sobre la vía MAPK. La coexistencia de ambas mutaciones tiene peor pronóstico, menor supervivencia y otorgan resistencia al tratamiento con radioyodo (Chung, 2020).

Al igual que sucede con la mutación *BRAF* V600E hay características ecográficas que pueden hacer sospechar de la presencia de una mutación sobre el promotor de *TERT* como son nódulos más altos que anchos, márgenes microlobulados, contacto con la capsula tiroidea, edad mayor a 50 años y multifocalidad. Esto es útil para seleccionar los pacientes que se beneficiarían del estudio con este marcador y así reducir la cantidad de falsos positivos (Shi, 2020). Incluso en algunos países no plantean que sea costo-efectivo la evaluación del marcador en todos los pacientes sino que recomiendan realizarlo solo en los pacientes en edades avanzadas con elementos sugestivos de mutación del marcador (Choi, 2021).

En nuestro estudio no logramos optimizar la técnica de PCR para la amplificación del promotor de *TERT*. Se probaron múltiples primers y en múltiples condiciones tanto de temperatura como tiempo de anillado y concentración de MgCl no lográndose amplificar el fragmento de interés. En un solo caso se logró una banda en el gel pero

que no correspondía a la secuencia del promotor de *TERT* cuando se realizó la secuenciación probablemente en relación a la amplificación de otros fragmentos que coincidieran con los primers. Esta es la principal debilidad de nuestro trabajo ya que este marcador fue uno de los seleccionados para ser evaluado junto a *BRAF* para el diagnóstico de patología maligna tiroidea. Es relevante también para nuestra población dado los reportes de su agresividad ya que se podría plantear seguimiento más estricto a los pacientes que presenten la mutación.

Se realizó durante el período de estudio una búsqueda bibliográfica exhaustiva respecto a los motivos vinculados a la no amplificación del fragmento de interés y se consultaron grupos internacionales quienes si han logrado la amplificación para indagar sobre cuáles fueron sus dificultades al respecto y como poder sobrepasarlas. Se planteó la presencia de inhibidores de la PCR por lo que se utilizaron aditivos como los descritos en materiales y métodos para intentar sortear esta dificultad no teniendo éxito. Otro grupo de autores reportó dificultad en su estudio al momento de la amplificación por PCR de la secuencia de *TERTp*, difiere con nuestro caso el hecho de que ellos utilizaron kits comerciales. No consignan en el trabajo a que atribuyen la dificultad para la amplificación (Da Costa, 2021)

Marcador molecular *KRAS*:

Se buscó determinar la mutación *KRAS* en el ADN de las muestras extraídas mediante punción aspirativa por aguja fina así como también de las piezas de anatomía patológica. Se analizaron en total 49 muestras, 20 de ADN extraído de punción aspirativa con aguja fina y 33 de piezas extraídas de parafina. En ambos casos se incluyeron todos los pacientes con patología maligna confirmada, adenomas y algunos nódulos hiperplásicos, se incluyeron también todos los pacientes que presentaron la mutación *BRAF* independientemente del tipo de patología. Se contó con suficiente ADN en las muestras para realizar el procedimiento de acuerdo a las indicaciones del fabricante, pero en ninguno de los casos se identificaron las mutaciones *KRAS* de interés.

Las mutaciones sobre el protooncogén *RAS* fueron las primeras en ser reconocidas como parte de la oncogénesis del carcinoma tiroideo. Si bien la presencia de esta mutación no es patognomónica de carcinoma, es la segunda más frecuente luego de la mutación *BRAF* (Han, 2023). Sus isoformas (*H/K/N RAS*) pueden estar presentes también en adenomas o NIFTP en 20 a 100% de los casos según distintos estudios. Los tumores que presentan la mutación *KRAS* suelen comportarse de forma menos agresiva. Están presentes en 33% de los adenomas, 22% de los carcinomas papilares, 53% de los carcinomas foliculares y 60% de los cánceres indiferenciados (Marotta, 2021; Kasko, 2023).

La determinación del biomarcador *KRAS* no demostró en estudios internacionales resultados muy prometedores dado que la proporción de positividad en pacientes portadores de patología maligna es mínimamente superior a los portadores de patología benigna por lo que la determinación de esta mutación resulta controversial. Si se demuestra relevante cuando es determinada como co-mutación junto con otras mutaciones como *BRAF* ya que puede aumentar la agresividad (Marotta, 2021; Kasko, 2023).

En años anteriores había un mayor interés en la determinación de la mutación *KRAS*

aislada. Eso es previo al cambio de categorización de los tumores tiroideos cuando no existía la categoría NIFTP y los tumores con este patrón correspondían a la variante folicular no invasiva del carcinoma papilar. En ese momento se planteaba que esta mutación tenía un moderado potencial maligno comparable a la de los carcinomas diferenciados, particularmente el carcinoma papilar. Con los avances en la investigación del carcinoma tiroideo se eliminó la variante folicular no invasiva del carcinoma papilar y fue sustituida por NIFTP. Estudios de seguimiento de pacientes con este diagnóstico verificaron que se trata de una lesión de baja malignidad lo que hace que disminuya el interés de *KRAS* como marcador diagnóstico de las lesiones malignas tiroideas, manteniendo su importancia como co-mutación (Guan, 2020). A su vez en los casos en que se determina la mutación *KRAS* en nódulos malignos los mismos suelen tener una evolución más indolente.

No se vio asociación entre este marcador y elementos de peor pronóstico como es la metástasis ganglionar en el compartimiento central de cuello ni la invasión extratiroidea (Ravella, 2020).

Desafortunadamente en nuestra serie no encontramos ningún paciente portador de la mutación *KRAS*. Previo a la realización de la amplificación se previó que podrían existir dificultades con esta técnica dada la baja concentración de ADN presente en las muestras extraídas de las punciones citológicas. Al realizar la amplificación esta posibilidad fue descartada, todas las muestras contenían suficiente ADN de acuerdo a lo requerido por el fabricante dado que se logró la amplificación del gen control. También se verificó el correcto funcionamiento de la técnica dado que en la misma se identificó en todos los casos al control positivo como mutado y se utiliza también la misma técnica en el laboratorio como parte del proceso asistencial para la detección de la mutación en otros tipos de cánceres en los cuales si se obtienen resultados positivos a partir de muestras obtenidas de pacientes.

Hubiera sido relevante para nuestra investigación conocer la prevalencia de la mutación *KRAS* en nuestro medio dado que no contamos con estudios nacionales sobre la misma cuando se considera para nódulos tiroideos

Factores de riesgo:

El cálculo de los factores de riesgo se realizó en base a la población estudiada en la policlínica de citopunción incluyendo a los 155 pacientes mencionados. Se encontró asociación entre la patología maligna y el sexo, valor p 0.039, siendo el OR del sexo masculino de 5.79 (IC 1.29-25.86); el número de nódulos valor p 0.033 con un OR de 12.750 (IC 1.168-139.235) para la presencia de 3 nódulos; las calcificaciones, valor p < 0.001 con un OR de 10.04 (IC 2.87-35.12) para la presencia de calcificaciones; la ecogenicidad, valor p < 0.001, con un OR de 1.35 (IC 1.12-1.62) para los nódulos hipoecogénicos; y la consistencia, valor p 0.007 con un OR de 1.20 (IC 1.08-1.34) para los nódulos sólidos. No se vio asociación con los demás factores de riesgo propuestos (Tabla 12).

Tabla 12: Asociación entre factores de riesgo y patología maligna

Factor de riesgo	OR	Valor p
Edad		0.624
Sexo masculino	5.79 (IC 1.29-25.86)	0.039
Zona costera		0.729
Levotiroxina		0.914
Exposición a radiaciones		0.398
Bocio		0.835
Número de nódulos: 1	1	0.033
2	6.476 (IC 0.677-61.929)	
3	12.750 (IC 1.168-139.235)	
4 o más	2.237 (IC 0.252-19.883)	
Lóbulo		0.283
Tamaño L (mm)		0.162
Tamaño AP (mm)		0.401
Calcificaciones	10.04 (IC 2.87-35.12)	< 0.001
Adenopatías	12.727 (IC 1.632-99.241)	0.036
Vascularización		0.706
Ecogenicidad: Hiperecogénico	1	< 0.001
Isoecogénico	1.031 (IC 0.99-1.07)	
Hipoecogénico	1.350 (IC 1.12-1.62)	
Consistencia: Quístico	1	< 0.001
Mixto	1.030 (IC 0.99-1.08)	
Sólido	1.200 (IC 1.08-1.34)	

Destacamos que la media de la edad de los pacientes diagnosticados con cáncer fue de 53.2+/-10.8 años, coincidente con lo reportado por otros autores quienes reportan una edad media de 50 años para los pacientes portadores de esta patología (Chen, 2022; Fernandes, 2022).

Los reportes en cuanto a la asociación con uno u otro sexo varían según los autores, mientras que algunos encuentran una mayor prevalencia en el sexo masculino al igual que sucedió en nuestro estudio (Amin, 2023), otros identifican asociación con el sexo femenino (Rehman, 2022) y algunos incluso no identifican diferencias entre ambos sexos (Fernandes, 2022).

En nuestro estudio ninguno de los pacientes que presentó diagnóstico de patología

maligna estuvo expuesto a radiaciones ionizantes, si bien este es un factor de riesgo ampliamente aceptado, no pudimos demostrar asociación de este. Esto se podría relacionar al bajo número de pacientes expuestos a radiaciones y el aumento de concientización de sus efectos entre los médicos que asisten a niños y adolescentes.

En cuanto al número de nódulos, si bien se identificó un valor p significativo al considerar las distintas categorías se vio que solamente se lograba un OR con aumento del riesgo al complementarlo con el intervalo de confianza en los pacientes portadores de 3 nódulos. Aunque se obtiene un valor p significativo no se debe perder de vista que el mismo en una condición necesaria pero no suficiente por si misma para determinar que un determinado factor se relacione efectivamente con el aumento del riesgo para una determinada enfermedad destacando especialmente la condición de plausibilidad biológica para poder clasificar a un factor como de riesgo. No impresionaría a priori existir una condición biológica que explique porque la presencia de 3 nódulos pudiese ser un factor de riesgo no mantenido ni con el aumento o descenso en el número de nódulos. Esto podría deberse a un error debido al azar, que si bien poco probable no es nulo o a un error en la determinación del número de nódulos de los pacientes mediante los métodos de imagen. Encontramos relevante consignar esta característica ya que tradicionalmente se planteaba que existía una mayor incidencia de cáncer en los pacientes portadores de nódulos tiroideos solitarios y el bocio multinodular era considerado una patología benigna, nuevos estudios demostraron que no existe diferencia entre ambas categorías. Esto también podría relacionarse con que en el caso de los bocios multinodulares suele biopsiarse sólo uno de los nódulos, en general el de mayor tamaño, lo que aumenta el número de falsos negativos en las punciones aspirativas con aguja fina (Fernandes, 2022; Rahman, 2022).

La incidencia de cáncer en pacientes portadores de bocio multinodular varía entre 5 y 12%, porcentajes que no difieren con lo reportado para los pacientes portadores de nódulos tiroideos sin distinción del número de nódulos (Amin, 2023). Los cánceres hallados en pacientes portadores de bocio multinodular son en general cánceres papilares por ser este el tipo más frecuente de cáncer tiroideo. La multinodularidad podría deberse a que los cánceres papilares de tiroides son frecuentemente multifocales y bilaterales, lo que implica la presencia de más de un nódulo a nivel de la glándula (Amin, 2023). En nuestros pacientes vimos que la presencia de 3 nódulos podría presentarse como un factor de riesgo para malignidad, llama la atención que este riesgo no se mantiene en el caso de 4 nódulos. Esto podría ser un error asociado al azar. Sería interesantes en caso de que se realice un estudio similar en nuestro medio en un futuro ver si se verifican los mismos resultados.

Si bien otros estudios identificaron un aumento del riesgo de malignidad en los nódulos mayores a 1cm (Mu, 2022), en nuestro caso no hubo diferencia significativa en el tamaño entre los nódulos benignos y malignos, hallazgo respaldado por otros autores de Sudamérica (Fernandes, 2022). Pensamos que esto se pueda deber al aumento en el diagnostico de microcarcinoma papilar, que por definición se trata de nódulos malignos menores a 1cm, si bien su agresividad es debatida siendo incluso aceptado en algunos medios la posibilidad de control evolutivo en vez de resección quirúrgica. De hecho, estudios de autopsias de pacientes fallecidos por otras causas evidencian una prevalencia de hasta el 11% de microcarcinoma papilar postmortem en la población general, lo que respalda la baja agresividad de esta patología (Ghai, 2021).

Destacamos que la elección de seguimiento en vez de resección quirúrgica es considerada en poblaciones seleccionadas que se comprometan a un seguimiento estricto. Aun así, hay pacientes que optan por la cirugía dado que la noción de ser portadores de un cáncer no tratado les genera ansiedad y angustia (Chen, 2023). En nuestro medio, especialmente en el Hospital Maciel, el seguimiento de pacientes portadores de cáncer de tiroides confirmado no es planteable dado que por el medio económico y social de muchos de los pacientes son más propensos a abandonar el seguimiento. También influye el hecho que el Hospital Maciel es un centro de referencia y recibe pacientes derivados del sector del territorio nacional al sur del Río Negro. En estos pacientes se dificulta el seguimiento estricto dada la lejanía y burocracia para la coordinación de los estudios. Por estos motivos en nuestro centro optamos por el tratamiento quirúrgico en los pacientes con patología maligna confirmada independientemente de su tamaño.

Las calcificaciones son imágenes hiperecogénicas con cono de sombra posterior que corresponden a la necrosis del tejido, específicamente los cuerpos de psamoma y están presentes hasta en un 25% de los carcinomas papilares (Ghai, 2022). Se vio en diversos estudios que la presencia de calcificaciones es un probado factor de riesgo para malignidad aumentando a casi el doble el riesgo (Yin, 2019). Las microcalcificaciones son consideradas el elemento sonográfico más específico de malignidad. En nuestra población también pudimos demostrar que las mismas representan un factor de riesgo para el diagnóstico de patología maligna.

En años previos se identificó como elemento sugestivo de malignidad la presencia de vascularización intranodular, en estudios subsecuentes se vio que no había asociación entre los distintos tipos de vascularización y el riesgo de presentar patología maligna. Si se identificó que la vascularización central es más frecuente en la variante folicular del carcinoma papilar, en los carcinomas foliculares respecto a los carcinomas papilares tradicionales y en los carcinomas medulares (Uludag, 2023). En nuestro estudio no identificamos asociación entre la patología maligna y la vascularización. No contamos con un número significativamente grande para evaluar si hay asociación con algún subtipo de cáncer y no contamos en nuestra serie con muestras de carcinoma folicular para evaluar lo reportado por otros autores.

Distintos estudios comprobaron que los nódulos hipoecogénicos presentan mayor riesgo de malignidad respecto a los iso e hiperecogénicos, condición que coincide con lo hallado en nuestro estudio. Otra condición interesante es que los nódulos heterogéneos iso o hiperecogénicos presentan mayor riesgo respecto a los nódulos homogéneos de la misma categoría. También se vio mayor riesgo de malignidad en los nódulos marcadamente hipoecogénicos respecto a los moderadamente o levemente hipoecogénicos (Lee, 2022). Dado que la homogeneidad y el grado de hipoecogenicidad son muy subjetivos y dependen del técnico que realiza el estudio (Burgos, 2022) en nuestro caso no fueron consignados buscando registrar las características más objetivas posibles.

En países con mayores recursos también se realiza el estudio elastográfico del nódulo, este mide la deformación del nódulo frente a la presión ejercida por el transductor del ecógrafo (Uludag, 2023). En nuestro hospital no contamos con la posibilidad de realizar este tipo de estudios por no contar con el equipo específico para su realización ni técnicos entrenados para ello.

Si bien no se pudo demostrar relación entre el riesgo de malignidad y la topografía de

asiento de los nódulos, se vio que los nódulos localizados en el istmo tienen mayor porcentaje de multifocalidad, bilateralidad y adenopatías positivas. Esto podría relacionarse con el drenaje tanto linfático como venoso de este sector de la tiroides el cual puede derivarse hacia ambos lados de la glándula. A su vez los nódulos malignos que asientan en esta topografía suelen presentar menor tamaño (Dellal, 2020).

Biopsia líquida:

Se realizó el estudio de la mutación *BRAF* V600E en biopsia líquida de plasma obtenido de todos los pacientes con resultado positivo en PAAF y algunos de los negativos. Esta fue negativa para las 37 biopsias líquidas estudiadas.

La biopsia líquida es un método no invasivo que potencialmente puede encontrar su aplicación en el diagnóstico así como en el seguimiento. Aún no se cuenta con suficientes estudios para determinar si la cantidad de células tumorales circulantes se correlaciona con el estadio tumoral. El ADN circulante puede utilizarse para medir distintos marcadores como hicimos en nuestro estudio donde intentamos detectar la presencia de ADN circulante con la mutación *BRAF* V600E. Los autores coinciden que con la tecnología actualmente disponible la biopsia líquida aún no puede reemplazar a la medición de los marcadores a nivel de tejido pero si puede usarse para el seguimiento una vez identificadas estas mismas mutaciones a nivel tisular (Agarwal, 2022).

En los casos en los que el ADN circulante es suficiente para ser detectado por las pruebas utilizadas, la biopsia líquida encuentra su aplicación en la diferenciación de nódulos benignos y malignos, dado que presentan diferentes marcadores circulantes. También permitiría diferenciar entre cánceres foliculares y papilares. A su vez podría ser utilizada para el seguimiento de los pacientes productores de anticuerpos antitiroglobulina ya que quienes poseen esos anticuerpos no permiten la medición de tiroglobulina como indicador de recidiva o persistencia de la enfermedad. Hay autores que plantean que la presencia de la mutación *BRAF* V600E circulante, al igual que cuando es identificada en el tejido, se relaciona con mayor agresividad y peor pronóstico. En los cánceres anaplásicos se puede utilizar para monitorizar progresión o reducción de la enfermedad intratratamiento (Romano, 2021; Zeyghami, 2023).

La sensibilidad es muy variable yendo de 6 a 92% y la especificidad varia de 50 a 98% (Zeyghami, 2023)

Se destaca como ventaja frente a la biopsia tisular además de la menor invasividad, menores efectos secundarios y mayor representatividad de la heterogeneidad del tumor. Como desventajas tiene una baja sensibilidad y especificidad (Romano, 2021)

En nuestra población no logramos amplificar el gen *BRAF* en las muestras extraídas de sangre periférica. Planteamos que esto se deba a la baja concentración de ADN circulante presente en las muestras ya que no se pudo amplificar ni el alelo normal ni el mutado. No planteamos que se deba a la técnica utilizada dado que se hizo el mismo procedimiento que para la amplificación de *BRAF* V600E en PAAF mediante PCR heminested para mayor sensibilidad y si se vio amplificación de los controles positivos para ambos alelos en el gel.

En un futuro se podrán evaluar técnicas con mayor sensibilidad que permitan amplificar los marcadores de interés y así evaluar tanto la prevalencia de ADN

circulante mutado en nuestra población como su utilidad en cuanto a diagnóstico, pronóstico y seguimiento.

Al revisar la literatura encontramos que esta misma situación les sucedió a otros investigadores quienes como nosotros intentaron evaluar la concordancia de la mutación *BRAF* V600E entre tejido y sangre periférica no logrando la amplificación del gen de interés en esta última. Ellos vinculan la imposibilidad de detectar la mutación en el ADN circulante a la baja proporción de pacientes con metástasis a distancia ya que a priori estos pacientes deberían presentar mayor ADN tumoral circulante (Condello, 2018; Suh, 2021; Marotta, 2022). Las metástasis a distancia son poco frecuentes en los pacientes portadores de cáncer de tiroides, en nuestro caso no tuvimos ninguno y solo 3 presentaron adenopatías positivas.

Validez de la prueba diagnóstica:

Al evaluar la validez del marcador tumoral *BRAF* V600E como prueba diagnóstica, tomando como enfermos a los pacientes con confirmación de patología maligna independiente de su tipo, se obtuvo una sensibilidad de 64.7% y especificidad de 95.4%, con valor predictivo positivo de 75.9% y valor predictivo negativo de 92.3% (Tabla 13).

Tabla 13: Validez de la prueba diagnóstica para patología maligna

Sensibilidad	64.7%
Especificidad	95.4%
Valor predictivo positivo	75.9%
Valor predictivo negativo	92.3%

Al excluir los pacientes con anatomía patológica de cáncer medular, folicular indiferenciado y linfoma de tiroides, y considerar enfermos sólo a los portadores de carcinoma papilar o microcarcinoma mejoran los valores de sensibilidad a 75.9% y valor predictivo negativo a 95.4% manteniéndose constante la especificidad y el valor predictivo positivo (Tabla 14).

Tabla 14: Validez de la prueba diagnóstica para cáncer papilar

Sensibilidad	75.9%
Especificidad	95.4%
Valor predictivo positivo	75.9%
Valor predictivo negativo	95.4%

Es importante destacar que la evaluación de la validez cuando se consideran nuevas pruebas diagnósticas es fundamental. La validez interna de la prueba diagnóstica incluye la sensibilidad y especificidad, esto evalúa la capacidad de la prueba de medir

lo que debería medir. Mientras que la validez externa consiste en el valor predictivo positivo y negativo y esto es lo que interesa en la práctica diaria. Corresponde a la probabilidad de que un individuo que presenta un resultado positivo de la prueba diagnóstica esté efectivamente enfermo así como la probabilidad de que un individuo con un resultado negativo de la prueba esté efectivamente sano.

En nuestra prueba encontramos resultados adecuados para la validez de los marcadores moleculares, si bien al compararlos con lo reportado por otros autores estos porcentajes son algo inferiores. Sheng reporta una sensibilidad de 79.1%, especificidad de 93.7%, valor predictivo positivo de 98.9% y valor predictivo negativo de 38.5% (Sheng, 2021).

Si estos resultados los comparamos con la validez de la punción aspirativa con aguja fina se observan resultados similares o incluso superiores cuando consideramos el uso de *BRAF* V600E para la detección del carcinoma papilar. Teniendo presente que la sensibilidad del PAAF es de 84.2% y la especificidad de 97.2% con un valor predictivo positivo de 88.3% y negativo de 96.0% (Alshahrani, 2022). Otros autores reportan resultados de validez para la PAAF levemente inferiores.

La gran mayoría de los autores coinciden en que para obtener el mayor rendimiento en el diagnóstico de patología tiroidea maligna es necesario asociar la citología y los marcadores moleculares lo que aumenta la precisión del diagnóstico hasta 86.3% (Sheng, 2021). Los marcadores moleculares por sí mismos no proveen suficiente información como prueba “rule in” o “rule out”. Se debe a su vez tener en cuenta también las características clínicas, imagenológicas y citología además de los marcadores moleculares (Cochand-Priollet, 2023).

La determinación de mutaciones como las mencionadas en este trabajo son útiles ante los nódulos de citología indeterminada. Estas podrán tener implicancias al momento de la toma de decisiones en cuanto al tratamiento y la extensión del procedimiento quirúrgico. Esto podría implicar la elección de un tratamiento más agresivo en algunos casos, así como prevenir el sobretratamiento en otros reduciendo así el número de cirugías innecesarias en pacientes en los que probablemente la pieza de resección no presente patología maligna (Mavromati, 2023).

Se debe tener presente que el uso de paneles moleculares aún no está ampliamente difundido y que no existe un marcador molecular gold standar sino que todos los marcadores presentan ventajas y desventajas en su determinación. También se deben considerar las diferencias en las prácticas frente a los pacientes portadores de cáncer de tiroides, no sólo entre los distintos continentes sino también entre distintos centros dentro del mismo país.

Limitaciones del estudio:

Como limitaciones de nuestro estudio encontramos factores de riesgo que no han sido consignados que algunos autores asocian con el desarrollo de nódulos tiroideos como es la obesidad y la presencia de síndrome metabólico, que si bien no son de los factores más tradicionalmente asociados con esta enfermedad podría haber sido de interés ver su representatividad en nuestra población. Se intentó subsanar esta falencia realizando una búsqueda de los datos en las historias clínicas de los pacientes. Desafortunadamente son condiciones que no suelen registrarse en la

historia clínica salvo en ocasiones puntuales en las cuales tengan una implicancia tanto sobre la técnica anestésicoquirúrgica o sobre el tratamiento, por este motivo no se pudo completar dicha información.

Como principal limitación destacamos la imposibilidad de lograr la amplificación del promotor de *TERT* pese a múltiples intentos. Quizá en estudios futuros se pueda optimizar esta técnica y evaluar este marcador que podría ser interesante en los casos de cánceres confirmados que no presentan la mutación *BRAF* como un marcador alternativo o en los que si la presentan para evaluar la agresividad y pronóstico de la co-mutación.

Perspectivas:

El mayor conocimiento en lo que respecta marcadores moleculares en general y en los más representativos para patología tiroidea en particular me permitirá integrarlos en la práctica clínica en los cuales su uso podría aportar en el manejo de los pacientes.

Al mismo tiempo el desarrollo de marcadores moleculares en nuestro medio podría representar a futuro una alternativa más económica a los paneles comerciales vigentes.

Como primer estudio realizado en cuanto a marcadores moleculares tiroideos en nuestro medio podría representar el puntapié inicial para distintos estudios a llevarse a cabo en el futuro. Dentro de estos sería interesante contar con un estudio que incluya factores de riesgo menos difundidos o recientemente identificados como es el caso de la obesidad y el síndrome metabólico. También se podría considerar la realización de un seguimiento de los pacientes portadores de patología maligna para evaluar si la presencia de la mutación en nuestro medio también se verifica como factor de mayor agresividad y se relaciona con el desarrollo de recidivas, lo que podría tener implicancias en el plan de seguimiento de los pacientes. Así como también poder realizar seguimiento de los pacientes que presentaron patología benigna y presencia de la mutación *BRAF* en vistas a despistar si la misma se asocia con desarrollo de patología maligna en la evolución

Y por último evaluar la posibilidad de un estudio de mayor alcance con el objetivo de aumentar el número de pacientes con cánceres avanzados en relación al estadio, en particular para el estudio de biopsia líquida tanto como procedimiento diagnóstico mínimamente invasivo como para el seguimiento de pacientes con anticuerpos antitiroglobulina.

Conclusiones:

En el período del estudio se logró incluir una gran cantidad de pacientes, siendo de las series más grandes en nuestro país para esta patología. Esto permitió caracterizar con precisión a los pacientes portadores de patología tiroidea tanto benigna como maligna.

Al valorar los factores de riesgo para patología maligna pudimos identificar como significativos el sexo masculino, la presencia de calcificaciones y adenopatías, la

hipogenicidad y la consistencia sólida de los nódulos. Todos estos factores han sido ya documentados en estudios previos realizados a nivel internacional.

En cuanto al marcador tumoral *BRAF* V600E obtuvimos una prevalencia de la mutación del 75.9% en los carcinomas papilares y muy baja frecuencia en patología benigna, concordante con reportes internacionales tanto en estudios de muestras obtenidos por citopunción como en cortes de parafina.

En cuanto a los marcadores moleculares, aunque no pudimos evaluar *TERTp*, y no encontramos mutaciones en *KRAS*, observamos una prevalencia de la mutación *BRAF* V600 del 75.9% en los carcinomas papilares y muy baja frecuencia en patología benigna, concordante con reportes internacionales tanto en estudios de muestras obtenidos por citopunción como en cortes de parafina. Esto nos permite concluir que sería una técnica adecuada para completar la valoración citopatológica de los nódulos tiroideos, pudiendo ser de utilidad para la toma de decisiones terapéuticas.

Anexos:

Anexo 1: Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN ESTUDIO NÓDULO TIROIDEO PROBLEMA, APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR AL PROCESO DIAGNÓSTICO

Versión 4. 18 de junio, 2022

Nº de paciente:

Fecha:

Nombre:

Cédula:

Información brindada por: Emilia Moreira

El objetivo del estudio es el análisis de mutaciones presentes en células extraídas de la glándula tiroides y también en ADN circulante libre en una muestra de sangre periférica, que puedan orientar al origen maligno o benigno de lesiones a nivel de dicha glándula. Esto permitirá comparar la presencia de marcadores tumorales (*TERTp* y *BRAF V600E*) en ambos tipos de muestra con los estudios que se realizan habitualmente relacionados con la forma de las células. En los casos que sea necesaria una intervención quirúrgica también se comparará con una muestra del tejido removido en la cirugía. La determinación de estas mutaciones ya ha probado utilidad en otros países. También aportará un beneficio colectivo para ser considerado a futuro como parte de los protocolos diagnósticos de acuerdo con los resultados obtenidos durante este estudio.

Las muestras obtenidas serán almacenadas congeladas hasta la determinación de la presencia o ausencia de mutaciones evaluadas en el desarrollo del proyecto. Estas muestras no serán utilizadas para otros fines que los especificados en el presente proyecto y una vez finalizado el estudio, que estimamos en un plazo de dos años, serán descartadas siguiendo los estándares hospitalarios para el desecho de productos biológicos. Los datos de la historia clínica relevantes para sacar conclusiones sobre el valor de los biomarcadores (sexo, edad, anatomía patológica, tratamientos recibidos y resultado de estos) serán procesados en confidencialidad por el equipo investigador y eventualmente incluidos en publicaciones científicas preservando el anonimato de los participantes.

Declaro que se me han explicado en que consiste el estudio y que no recibiré ningún beneficio por la participación más allá del vinculado al resultado del mismo y que cuento con la posibilidad de retirar mis datos del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones, ni tener ninguna repercusión sobre la asistencia. Entiendo también que puedo negarme a la participación en el estudio sin que se vea afectado el proceso asistencial.

Soy responsable de la información aportada en relación a mis antecedentes clínicos y me comprometo a cumplir las indicaciones médicas establecidas.

Habiendo comprendido la información brindada, yo,, autorizo a la participación en el estudio "NÓDULO TIROIDEO PROBLEMA, APORTES DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR AL PROCESO DIAGNÓSTICO" a cargo de los Dres. Emilia Moreira, Edgardo Berriel y Nora Berois, y que tendré derecho a conocer los resultados del estudio al finalizar el mismo.

Firma:

Responsable: Dra. Nora Berois

Laboratorio de Oncología Molecular, Servicio de Oncología - Hospital Maciel, 25 de Mayo 174, 11000 Montevideo, Uruguay. Tel/Fax +598 29153000 int. 1805

Información brindada por: Dra. Emilia Moreira

Clínica Quirúrgica 2. Hospital Maciel – ASSE. 25 de Mayo 174, CP 11000 Montevideo, Uruguay. Tel/Fax +598 29153000 int. 1429 Email: emiliamoreira89@gmail.com

Anexo 2: Ficha del paciente

Nombre

Teléfono

N°identificadorio

Fecha

edad

sexo

procedencia

nivel socioeconómico	Medio	Medio-Bajo	Bajo	Muy bajo	
T4	25	50	75	100	150 200
exp a radiaciones ionizantes en infancia			Si	No	
bocio	No	GI	GII	GIII	GIV
tamaño de nódulo					
número de nódulos					
presencia de calcificaciones		Si	No		
vascularización	Central	Perisférica	Central y perisférica		Sin vasc
adenopatías	Si	No			
bethesda	I	II	III	IV	V VI
histología pieza					

Bibliografía:

- Agarwal S, Bychkov A, Jung CK. Emerging Biomarkers in Thyroid Practice and Research. *Cancers (Basel)*. 2021 Dec 31;14(1):204
- Al-Maghrabi H, Tashkandi M, Khayyat W, Alghamdi A, Alsalmi M, Alzahrani A, Al-Hakami H, Alqarni M. Non-invasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-Like Nuclear Features (NIFTP) Lowers the Risk of Malignancy in the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology Diagnostic Categories. *Saudi J Med Med Sci*. 2022 May-Aug;10(2):105-110
- Ali, S.; Baloch, Z.; Cochand-Priollet, B.; Schmitt, F.; Vielh, P.; VanderLaan, P. The 2023 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid* 2023 33:9, 1039-1044
- Aliyev A, Aliyeva I, Giammarile F, Talibova N, Aliyeva G, Novruzov F. Diagnostic accuracy of fine needle aspiration biopsy versus postoperative histopathology for diagnosing thyroid malignancy. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2022 Nov;5(6): e373
- Almeida, I.; Berriel, E.; Acosta, M.; Vilas, A. Carcinoma de tiroides hiperfuncionante. Caso Clínico Cirugía General. 2012 (4)3:17-20
- Alshahrani AS, Algazlan AG, Junaid M, Aldosari AA, Amer KA, Mubarki MH, Alharbi SM, Al-Qannass AM. Association of Fine-Needle Aspiration of Thyroid Nodules With Final Histopathology in Diagnosing Thyroid Malignancy: A Single Institute Retrospective Study. *Cureus*. 2022 Nov 21;14(11): e31733.
- Alshathry AH, Almeshari NZ, Alarifi AS, Aleidy AM, Aldhahri S. The Prevalence of Thyroid Papillary Microcarcinoma in Patients With Benign Thyroid Fine Needle Aspiration. *Cureus*. 2020 Dec 1;12(12):e11820
- Alzumaili B, Sadow PM. Update on Molecular Diagnostics in Thyroid Pathology: A Review. *Genes (Basel)*. 2023 Jun 22;14(7):1314
- Amin A, Amjad A, Farman G, Khaliq SU, Amin L, Khan M. Frequency and Type of Thyroid Carcinoma in Patients With Multinodular Goiter. *Cureus*. 2023 Apr 21;15(4):e37921
- Angell TE, Vyas CM, Barletta JA, Cibas ES, Cho NL, Doherty GM, Gawande AA, Howitt BE, Krane JF, Marqusee E, Strickland KC, Alexander EK, Moore FD Jr, Nehs MA. Reasons Associated with Total Thyroidectomy as Initial Surgical Management of an Indeterminate Thyroid Nodule. *Ann Surg Oncol*. 2018 May;25(5):1410-1417.
- Aslan F, Alyanak A. Nodule and cancer assessment following thyroid surgery: a cohort of 460 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Sep;24(18):9565-9570
- Aung KL, Donald E, Ellison G, Bujac S, Fletcher L, Cantarini M, Brady G, Orr M, Clack G, Ranson M, Dive C, Hughes A. Analytical validation of *BRAF* mutation testing from circulating free DNA using the amplification refractory mutation testing system. *J Mol Diagn*. 2014 May;16(3):343-9
- Baloch, Z.; Asa, S.; Barletta, J.; Ghossein, R.; Juhlin, C.; Kwon Jung, C.; LiVolsi, V.; Papotti, M.; Sobrinho-Simões, M.; Tallini, G.; Mete, O. Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocr Pathol*. 2022 Mar;33(1):27-63
- Barrios, E.; Garau, M.; Alonso, R.; Musetti, C. V Atlas de Incidencia del Cáncer en el Uruguay. Periodo 2012-2016 [Internet]. Montevideo: Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2020. Disponible en:

<https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/V-Atlas-de-Incidencia-del-Cancer-en-el-Uruguay-Periodo-2012-2016-uc250>. Citado el 03/10/2023

- Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhães A, Costa BM, Mancini A, Song JS, Costello JF. Understanding *TERT* Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Mol Cancer Res*. 2016 Apr;14(4):315-23
- Bellevicine C, Migliatico I, Sgariglia R, Nacchio M, Vigliar E, Pisapia P, Iaccarino A, Bruzzese D, Fonderico F, Salvatore D, Biondi B, Masone S, Novizio V, Scavuzzo F, Serino D, De Palma M, Chiofalo MG, Botti G, Pezzullo L, Nuzzo V, Spiezia S, De Chiara G, Iorio S, Conzo G, Docimo G, Faggiano A, Bongiovanni M, Malapelle U, Colao A, Triassi M, Troncone G; Tiroide Network. Evaluation of *BRAF*, *RAS*, *RET/PTC*, and *PAX8/PPAR γ* 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 Feb;128(2):107-118.
- Bongiovanni, M.; Bellevicine, C.; Troncone, G.; Sykietis, G. Approach to cytological indeterminate thyroid nodules. *Gland Surg* 2019;8(Suppl 2):98-104.
- Burgos N, Zhao J, Brito JP, Hoang JK, Pitoia F, Maraka S, Castro MR, Lee JH, Singh Ospina N. Clinician Agreement on the Classification of Thyroid Nodules Ultrasound Features: A Survey of 2 Endocrine Societies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022 Jul 14;107(8): e3288-e3294
- Cabanillas, M.; McFadden, D.; Durante, C. Thyroid cancer. *Lancet* 2016; 388: 2783-95
- Castro Porto Silva Janovsky, C.; Sommer Bittencourt, M.; Anderson Pires de Novais, M.; Maciel, R.; Biscolla, R.; Zucchi, P. Thyroid cancer burden and economic impact on the Brazilian public health system. *Arch Endocrinol Metab*. 2018;62-5
- Chen DW, Rob FI, Mukherjee R, Giordano TJ, Haymart MR, Banerjee M. Variation in the Diagnosis of Noninvasive Follicular Thyroid Neoplasm with Papillary-like Nuclear Features. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022 Sep 28;107(10): e4072-e4077
- Chen H, Song A, Wang Y, He Y, Tong J, Di J, Li C, Zhou Z, Cai X, Zhong D, Da J. *BRAF*^{V600E} mutation test on fine-needle aspiration specimens of thyroid nodules: Clinical correlations for 4600 patients. *Cancer Med*. 2022 Jan;11(1):40-49
- Chen P, Feng C, Huang L, Chen H, Feng Y, Chang S. Exploring the research landscape of the past, present, and future of thyroid nodules. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Jan 12;9:831346.
- Choi YS, Choi SW, Yi JW. Prospective Analysis of *TERT* Promoter Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma at a Single Institution. *J Clin Med*. 2021 May 18;10(10):2179
- Chung JH. *BRAF* and *TERT* promoter mutations: clinical application in thyroid cancer. *Endocr J*. 2020 Jun 29;67(6):577-584
- Cimarra, L.; Berriel, E. Nódulo tiroideo y cancer diferenciado de tiroides. Relato oficial del 65° Congreso Uruguayo de Cirugía. 2014

- Cochand-Priollet B, Maleki Z. Cytology and Histology of Thyroid Nodules: Exploring Novel Insights in the Molecular Era for Enhanced Patient Management. *Curr Oncol*. 2023 Aug 21;30(8):7753-7772
- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cancer. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Canceres-mas-frecuentes-en-el-Uruguay--uc65>
- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cancer. <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/Situacion-Epidemiologica-del-Uruguay-en-relacion-al-Cancer--2023-uc108>
- Condello V, Macerola E, Ugolini C, De Napoli L, Romei C, Materazzi G, Elisei R, Basolo F. Analysis of circulating tumor DNA does not improve the clinical management of patients with locally advanced and metastatic papillary thyroid carcinoma. *Head Neck*. 2018 Aug;40(8):1752-1758
- Da Costa VR, Bim LV, Pacheco E Silva LDP, Colloza-Gama GA, Bastos AU, Delcelo R, Oler G, Cerutti JM. Advances in Detecting Low Prevalence Somatic *TERT* Promoter Mutations in Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Mar 12;12:643151
- Dellal FD, Topaloglu O, Baser H, Dirikoc A, Alkan A, Altinboga AA, Kilinc I, Ersoy R, Cakir B. Are clinicopathological features of the isthmic thyroid nodule different from nodules in thyroid lobes? A single center experience. *Arch Endocrinol Metab*. 2021 Nov 3;65(3):277-288
- Díaz R, Domínguez JM, Tala H, Olmos R, Pineda P, Olivari D, Jiménez M, Mimica X, Lanás A, Ocares G, Sapunar J. Clinical and histopathological features of follicular thyroid cancer in Chile. *Arch Endocrinol Metab*. 2023 Mar 30;67(3):348-354
- Dominguez Ayala, M.; Exposito Rodríguez, A.; Bilbao González, A.; Mínguez Gabin, P.; Gutiérrez Rodríguez, T.; Rodeño Ortiz de Zarate, E.; García Carrillo, M.; Barrios Treviño, B. Mutación del gen *BRAF* V600E en el cáncer papilar de tiroides y su efecto en la terapia con yodo radiactivo (¹³¹I) posquirúrgica: deberíamos modificar nuestra estrategia terapéutica? *cir esp*. 2018; 96 (5): 276-282
- Dong SY, Chen J, Xia EJ, Lin RX, Du HY, Wang OC, Zhang XH, Hao RT. Clinical Analysis of *BRAF*^{V600E} Mutation and Its Correlation With Sonographic Image Characteristics in Papillary Thyroid Carcinoma in Chinese Coastal Areas. *Am Surg*. 2020 May;86(5):450-457
- Duick, D. Overview of molecular biomarkers for enhancing the management of cytologically indeterminate thyroid nodules and thyroid cancer. *Endocr Pract*. 2012 Jul-Aug;18(4):611-5
- Durante C, Grani G, Lamartina L, Filetti S, Mandel SJ, Cooper DS. The Diagnosis and Management of Thyroid Nodules: A Review. *JAMA*. 2018 Mar 6;319(9):914-924.
- Durante, C.; Hegedüs, L.; Czarniecka, A.; Paschke, R.; Russ, G.; Schmitt, F.; Soares, p.; Solymosi, T.; Papini, E. 2023 European Thyroid Association Clinical Practice Guidelines for thyroid nodule management. *Eur Thyroid J*. 2023 Aug 14;12(5): e230067

- Durgun C. Correlation of Thyroid Fine Needle Aspiration Biopsy With Histopathological Results. *Cureus*. 2023 May 17;15(5):e39130
- Fan X, Zhao L, Wang S, Song K, Wang B, Xie Y, Jiang Y, Lin L, Teng W, Cai C, Yao Y. Relation between iodine nutrition and thyroid diseases in Qinghai, China. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Sep 8;14:1234482
- Fernandes GA, Matos LL, Dedivitis RA. Risk Factors for Malignancy in Patients with Multinodular Goiter. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2022 Jun 17;27(1):e138-e142
- Ferrari, S.; Fallahi, P.; Ruffilli, J.; Elia, G.; Ragusa, F.; Paparo, S.; Ulisse, S.; Baldini, S.; Giannini, R.; Miccoli, P.; Antonelli, A.; Basolo F. Molecular testing in the diagnosis of differentiated thyroid carcinomas *Gland Surg* 2018;7(Suppl 1):S19-S29
- Ferraz, C. Can current molecular tests help in the diagnosis of indeterminate thyroid nodule FNAB? *Arch Endocrinol Metab*. 2018 Nov-Dec; 62(6): 576–584
- Ferris, R.; Baloch, Z.; Bernet, V.; Chen, A.; Fahey III, T.; Ganly, I.; Hodak, S.; Kebebew, E.; Platel, K.; Shaha, A.; Steward, D.; Tufano, R.; Wiseman, S.; Carty, S. American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making. *Thyroid*. 2015 Jul 1; 25(7): 760–768
- Fussey JM, Beaumont RN, Wood AR, Vaidya B, Smith J, Tyrrell J. Mendelian randomization supports a causative effect of TSH on thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2020 Oct;27(10):551-559
- Garau, M.; Musetti, C.; Alonso, R.; Brrios, E. Trends in cancer incidence in Uruguay: 2002 –2015. *Colomb Med (Cali)*. 2019 Dec 30;50(4):224-238
- Ghai S, O'Brien C, Goldstein DP, Sawka AM; Canadian Thyroid Cancer Active Surveillance Study Group. Ultrasound in active surveillance for low-risk papillary thyroid cancer: imaging considerations in case selection and disease surveillance. *Insights Imaging*. 2021 Sep 16;12(1):130
- Gil Carcedo-Sañudo, E.; De las Heras-Florez, P.; Herrero-Calvo, D.; Fernandez-Cascon, S.; Vallejo-Valdezate, LA. Anatomía quirúrgica de las glándulas tiroides y paratiroides. *Rev. ORL*, 2020, 11, 2, 161-178
- Griewank, K., Murali, R., Schilling, B.; Scholz, S.; Sucker, A.; Song, M.; Susskind, D., Grabellus, F.; Zimmer, L.; Hillen, U.; Steuhl, KP.; Schadendorf, D.; Westekemper, H.; Zeschnigket, M. *TERT* promoter mutations in ocular melanoma distinguish between conjunctival and uveal tumours. *Br J Cancer* 2013 109: 497–501
- Guan H, Toraldo G, Cerda S, Godley FA, Rao SR, McAneny D, Doherty G, Braverman L, Lee SL. Utilities of *RAS* Mutations in Preoperative Fine Needle Biopsies for Decision Making for Thyroid Nodule Management: Results from a Single-Center Prospective Cohort. *Thyroid*. 2020 Apr;30(4):536-547. doi: 10.1089/thy.2019.0116. Epub 2020 Feb 20. PMID: 31996097.
- Gürbüzler, L. The Role and Importance of Molecular Tests in Approach to Thyroid Nodules. *Turk Arch Otorhinolaryngol* 2016; 54: 74-8
- Gutierrez-Rodrigues, F.; Donaires, F.; Pinto, A.; Vicente, A.; Dillon, L.; Clé, D.; Santana, B.; Pirooznia, M.; Ibanez, M.; Townsley, D.; Kajigaya, S.; Hourigan,

- C.; Cooper, J.; Calado, R.; Young, N. Pathogenic *TERT* promoter variants in telomere diseases. *Genet Med* 2019 (21): 1594–1602
- Han D, Min D, Xie R, Wang Z, Xiao G, Wang X, Dong L, Yin Z, Fei J. Molecular testing raises thyroid nodule fine needle aspiration diagnostic value. *Endocr Connect.* 2023 Jun 1;12(8):e230135
 - Haugen, B.; Alexander, E.; Bible, K.; Doherty, G.; Mandel, S.; Nikiforov, Y.; Pacini, F.; Randolph, G.; Sawka, A.; Schlumberger, M.; Schuff, K.; Sherman, S.; Sosa, JA.; Steward, D.; Tuttle, R.; Wartofsky, L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016 Jan;26(1):1-133
 - Heredia-Jara A, Ortiz-Hidalgo C. Anatomía microscópica normal de la glándula tiroides. Principios básicos para el residente de Endocrinología y anatomía patológica con una breve nota histórica. *Rev.ACE [Internet].* 7 de febrero de 2022 [citado 1 de marzo de 2024];8(4). Disponible en: <https://revistaendocrino.org/index.php/rcedm/article/view/688>
 - Hoon Chung, J. *BRAF* and *TERT* promoter mutations: clinical application in thyroid cancer. *Endocr J.* 2020 Jun 29;67(6):577-584
 - Horn, S.; Figil, A.; Rachakonda, S.; Fischer, C.; Sucker, A.; Gast, A.; Kadel, S.; Moll, I.; Nagor, E.; Hemminki, K.; Scandendorf, D.; Kumar, R. *TERT* Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. *Science*-2013. 339(6122):959-61
 - Horvath E, Majlis S, Rossi R, Franco C, Niedmann JP, Castro A, Dominguez M. An ultrasonogram reporting system for thyroid nodules stratifying cancer risk for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1748-51
 - <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/sal-para-condimentos>
 - Hyun MK, Kim JH, Kwon JW. Incidence of thyroid cancer and medical cost among patients with newly diagnosed thyroid nodules in Korea: A retrospective cohort study using nationwide data. *J Cancer Res Ther.* 2019 Jul-Sep;15(3):676-680.
 - Ilera, V.; Dourisboure, R.; Colobraró, A.; Silva Croome, M.; Olstein, G.; Gauna, A. Mutación V600E del oncogén *BRAF* en nódulos tiroideos en Argentina. *Medicina* 76(4):223-229
 - Jeong C, Kim H, Lee J, Ha J, Kim MH, Kang MI, Lim DJ. Fine-Needle Aspiration of Subcentimeter Thyroid Nodules in the Real-World Management. *Cancer Manag Res.* 2020 Aug 21;12:7611-7618
 - Jin, A.; Jianhao Xu, S.; Wang, Y. The role of *TERT* promoter mutations in postoperative and preoperative diagnosis and prognosis in thyroid cancer. *Medicine (Baltimore).* 2018 Jul;97(29): e11548
 - Kasko M, Grigerova M, Alemayehu A, et al. Fine-needle biopsy of thyroid nodules and the contribution of molecular analysis of *BRAF* and *RAS* mutations. *Bratislavske Lekarske Listy.* 2023 ;124(12):869-872
 - Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA Jr, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih IeM, Theodorescu D,

Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H. *TERT* promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 9;110(15):6021-6

- Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, Bruno A, Paterra R, Marie Y, Rahimian A, Finocchiaro G, Houlston RS, Hoang-Xuan K, Idbaih A, Delattre JY, Mokhtari K, Sanson M. *TERT* promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations. *Br J Cancer*. 2014(10):2024-32
- Laguzzi, C; Diaz, V.; Bado, J.; Costa, JM.; Perdomo, R. Eficacia diagnóstica de la punción aspiración con aguja fina de nódulos tiroideos en el Hospital Maciel. 15vo Congreso de Cirugía, Punta del Este, Uruguay. 2014
- Latarjet, M; Ruiz Liard, A. Anatomía humana. 1999. 3ra Edición, 5ta reimpresión. Ed Médica Panamericana. Madrid, España
- Lee JY, Lee CY, Hwang I, You SH, Park SW, Lee B, Yoon RG, Yim Y, Kim JH, Na DG. Malignancy risk stratification of thyroid nodules according to echotexture and degree of hypoechogenicity: a retrospective multicenter validation study. *Sci Rep*. 2022 Oct 5;12(1):16587
- Levine, R. History of thyroid ultrasound. *Thyroid*. 2023 Aug;33(8):894-902
- Li H, Zhao J, Zhang J, Wang C, Li M, Wu S, Su Z, Pan Q. Detection of ctDNA in the plasma of patients with papillary thyroid carcinoma. *Exp Ther Med*. 2019 Nov;18(5):3389-3396
- Li H, Ma J, Xi X, Tang J, Wang L, Wang L, Lin S, Zhang B. The analysis and validation of the prediction value of conventional and contrast-enhanced ultrasonography for *BRAF* mutant papillary thyroid microcarcinoma. *Gland Surg*. 2022 Oct;11(10):1683-1696
- Liu J, Jia X, Gu Y, Chen X, Guan L, Yan J, Zhai H, Zhou N, Dong Y, Zhan W, Luo X, Zhou J. Thyroid Parenchyma Microcalcifications on Ultrasound for Predicting Lymph Node Metastasis in Papillary Thyroid Carcinoma: A Prospective Multicenter Study in China. *Front Oncol*. 2021 Mar 3;11:609075
- López, F; Garcia-Cabo, P.; Fernández-Vaéz, L.; Coca-Pelaez, A.; Rodrigo, JP; Llorente, JL. Microcarcinoma papilar de la glándula tiroides: Controversias y manejo actuales. *Rev. ORL*, 2021, 12, 4, 325-340
- Loughrey MB, Waring PM, Tan A, Trivett M, Kovalenko S, Beshay V, Young MA, McArthur G, Boussioutas A, Dobrovic A. Incorporation of somatic *BRAF* mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2007;6(3):301-10
- Lupo, M.; Guttler, R.; Geck, Z.; Tonozzi, T.; Kammesheidt, A.; Braunstein, G. la measurement of circulating tumor DNA of diagnostic use in patients with thyroid nodules? *Endocr Pract*. 2018 May;24(5):453-459
- Macvanin MT, Gluvic ZM, Zaric BL, Essack M, Gao X, Isenovic ER. New biomarkers: prospect for diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Jul 21;14:1218320

- Marotta V, Bifulco M, Vitale M. Significance of *RAS* Mutations in Thyroid Benign Nodules and Non-Medullary Thyroid Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 27;13(15):3785.
- Marotta V, Cennamo M, La Civita E, Vitale M, Terracciano D. Cell-Free DNA Analysis within the Challenges of Thyroid Cancer Management. *Cancers (Basel)*. 2022 Oct 31;14(21):5370
- Master SR, Burns B. Medullary Thyroid Cancer. 2023 Feb 15. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29083765.
- Matsuse M, Mitsutake N. *TERT* promoter mutations in thyroid cancer. *Endocr J*. 2023 Nov 28;70(11):1035-1049
- Mavromati M, Saiji E, Demarchi MS, Lenoir V, Seipel A, Kuczma P, Jornayvaz FR, Becker M, Fernandez E, De Vito C, Triponez F, Leboulleux S. Unnecessary thyroid surgery rate for suspicious nodule in the absence of molecular testing. *Eur Thyroid J*. 2023 Oct 11;12(6):e230114
- McLeod, D. Current Concepts and Future Directions in Differentiated Thyroid Cancer. *Clin Biochem Rev*. 2010 Feb; 31(1): 9–19
- Mu C, Ming X, Tian Y, Liu Y, Yao M, Ni Y, Liu Y, Li Z. Mapping global epidemiology of thyroid nodules among general population: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2022 Nov 10;12:1029926
- Mukherjee, D.; Arnav, A.; Agarwal, V.; Sharma, R.; Saidha, N. Prophylactic central node dissection in differentiated thyroid cancer: A prospective tertiary care center experience. *Cancer Treat Res Commun*. 2020;25:100228
- Mulita F, Iliopoulos F, Tsilivigkos C, Tchabashvili L, Liolis E, Kaplanis C, Perdikaris I, Maroulis I. Cancer rate of Bethesda category II thyroid nodules. *Med Glas (Zenica)*. 2022 Feb 1;19(1)
- Nikiforov Y. Role of molecular markers in thyroid nodule management: then and now. *Endocr Pract*. 2017; 23(8):979-988
- Odate, T.; Oishi, N.; Vuong, H.; Mochizuki, K.; Kondo, T. Genetic differences in follicular thyroid carcinoma between Asian and Western countries: a systematic review. *Gland Surg*. 2020 9(5):1813-1826
- Ohori, P. Molecular testing and thyroid nodule management in North America. *Gland Surg* 2020;9(5):1628-1638
- Oler G, Cerutti JM. High prevalence of *BRAF* mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinoma: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer* 2009; 115: 972-80.
- Panebianco, F.; Mazzanti, C.; Tomei, S.; Aretini, P.; Franceschi, S.; Lessi, F.; Di Coscio, G.; Bevilacqua, G.; Marchetti, I. The combination of four molecular markers improves thyroid cancer cytologic diagnosis and patient management. *BMC Cancer* (2015) 15:918
- Patel J, Kloppe J, Cottrill EE. Molecular diagnostics in the evaluation of thyroid nodules: Current use and prospective opportunities. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Feb 24;14:1101410

- Patel KA, Anandani G, Sharma BS, Parmar RA. Study of Fine Needle Aspiration Cytology (FNAC) of Thyroid Gland According to the Bethesda System. *Cureus*. 2023 Apr 10;15(4):e37371
- Pestana A, Batista R, Celestino R, Canberk S, Sobrinho-Simões M, Soares P. Comprehensive Assessment of *TERT* mRNA Expression across a Large Cohort of Benign and Malignant Thyroid Tumours. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 9;12(7):1846
- Pinto-Blázquez, J.; Ursúa-Sarmiento, I. Anatomía patológica de la patología de tiroides y paratiroides. Sistema Bethesda del diagnóstico citológico de la patología de tiroides. *Rev. ORL [Internet]*. 2020; 11(3): 259-264
- Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Mar 13;11:102. doi: 10.3389/fendo.2020.00102. eCollection 2020.
- Qi W, Shi C, Zhang P, Feng L, Wang J, Chen D. Effect of *BRAF* V600E mutation detection of fine-needle aspiration biopsy on diagnosis and treatment guidance of papillary thyroid carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2020 Aug;216(8):153037
- Ravella L, Lopez J, Descotes F, Gai J, Lapras V, Denier ML, Borson-Chazot F, Lifante JC, Decaussin-Petrucci M. Preoperative Role of *RAS* or *BRAF* K601E in the Guidance of Surgery for Indeterminate Thyroid Nodules. *World J Surg*. 2020 Jul;44(7):2264-2271.
- Rehman AU, Ehsan M, Javed H, Ameer MZ, Mohsin A, Aemaz Ur Rehman M, Nawaz A, Amjad Z, Ameer F. Solitary and multiple thyroid nodules as predictors of malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid Res*. 2022 Dec 5;15(1):22
- Repetto EM, Fernandez L, Lambertini R, Del Valle Jaen A, Ruda Vega V, Moldes S, Lutfi R, Aranda C, Faure E, Oneto A. Análisis de mutaciones *BRAF* y *NRAS* de tumores tiroideos en pacientes de Argentina [Analysis of *BRAF* and *NRAS* mutations in thyroid tumors in patients from Argentina]. *Medicina (B Aires)*. 2023;83(4):505-513
- Rizwan, M.; Al Rasheed, H.; Xu, B. Molecular Alterations in Thyroid Carcinoma. *Surg Pathol* 12 (2019) 921–930
- Romano, C.; Martorana, F.; Pennisi, M.; Stella, S.; Massimino, M.; Tirrò, E.; Vitale, S.; Di Gregorio, S.; Puma, A.; Tomarchio, C.; Manzella, L. Opportunities and Challenges of Liquid Biopsy in Thyroid Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 7707
- Rouviere H.; Delmás A. Anatomía humana. Descriptiva, topográfica y funcional. 2005. 11va Edición. Ed Masson. Barcelona, España
- Sanabria, A.; Kowalski, L.; Shah, J.; Nixon, I.; Angelos, P.; Williams, M.; Rinaldo, A.; Ferlito, A. Growing incidence of thyroid carcinoma in recent years: factors underlying overdiagnosis. *Head Neck*. 2018 April; 40(4): 855-866
- Santiago-Peña, LF. Fisiología de la glándula tiroides. Disfunción y parámetros funcionales de laboratorio en patología de tiroides. *Rev. ORL*. 2020 ; 11(3): 253-257.
- Sheng D, Yu X, Li H, Zhang M, Chen J. *BRAF* V600E mutation and the Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology of fine-needle aspiration

biopsy for distinguishing benign from malignant thyroid nodules. *Medicine* (Baltimore). 2021 Sep 17;100(37):e27167

- Shi H, Guo LH, Zhang YF, Fu HJ, Zheng JY, Wang HX, Zhao CK, Xu HX. Suspicious ultrasound and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma predict the status of *TERT* promoter. *Endocrine*. 2020 May;68(2):349-357
- Sierra, M.; Soerjomataram, I.; Forman, D. Thyroid cancer burden in Central and South America. *Cancer Epidemiol* (2016) 44: S150–S157
- Silver JA, Bogatchenko M, Pusztaszeri M, Forest VI, Hier MP, Yang JW, Tamilia M, Payne RJ. *BRAF* V600E mutation is associated with aggressive features in papillary thyroid carcinomas ≤ 1.5 cm. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2021 Nov 6;50(1):63
- Solis-Pazmino, P.; Salazar-Vega, J.; Lincango-Naranjo, E.; Garcia, C.; Jaramillo Koupermann, G.; Ortiz-Prado, E.; Ledesma, T.; Rojas, T.; Alvarado-Mafla, B.; Carcamo, C.; Ponce, O.; Brito, J. Thyroid cancer overdiagnosis and overtreatment: a cross-sectional study at a thyroid cancer referral center in Ecuador. *BMC Cancer* (2021) 21:42
- Suh YJ, Kwon MJ, Noh H-M, Lee HK, Ra YJ, Kim NY. Limited Clinical and Diagnostic Utility of Circulating Tumor DNA Detection in Patients with Early-Stage Well-Differentiated Thyroid Cancer: Comparison with Benign Thyroid Nodules and Healthy Individuals. *Healthcare*. 2021; 9(4):386.
- Takano, T. Natural history of thyroid cancer. *Endoc jour*. 2017, 64 (3), 237-244
- Takami, H.; Ito, Y.; Noguchi, H.; Yoshida A.; Okamoto, T. Treatment of thyroid tumor. Tokyo, Japón. Springer 2013
- Uludag M, Unlu MT, Kostek M, Aygun N, Caliskan O, Ozel A, Isgor A. Management of Thyroid Nodules. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul*. 2023 Sep 29;57(3):287-304.
- Yin L, Zhang W, Bai W, He W. Relationship Between Morphologic Characteristics of Ultrasonic Calcification in Thyroid Nodules and Thyroid Carcinoma. *Ultrasound Med Biol*. 2020 Jan;46(1):20-25
- Young Cho, Y.; Young Park, S.; Hee Shin, J.; Yun Oh, Y.; Ho Choe, J.; Han Kim, J.; Soo Kim, J.; Sook Yim, H.; Li Kim, Y.; Seok Ki, C.; Hyuk Kim, T.; Hoon Chung, J.; Wook Kim, S. Highly sensitive and specific molecular test for mutations in the diagnosis of thyroid nodules: A prospective study of *BRAF* prevalent population. *Int JMol Sci*. 2020. Aug 6;21 (16):5629
- Walters BK, Garrett SL, Aden JK, Williams GM, Butler-Garcia SL, Newberry TR, Mckinlay AJ. Diagnostic Lobectomy for Bethesda III Thyroid Nodules: Pathological Outcomes and Risk Factors for Malignancy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2021 Sep;130(9):1064-1068
- Wang, M.; Gong, W.; He, Q.; Hu, R.; Yu, M. Menstrual, reproductive and hormonal factors and thyroid cancer: a hospital-based case–control study in China. *BMC Womens Health*. 2021 Jan 6;21(1):13
- Xu B. Papillary thyroid carcinoma overview. PathologyOutlines.com website. <https://www.pathologyoutlines.com/topic/thyroidpapillary.html>
- Xu, Chang, Jian-Qiang Fang, Wanying Li, Chenyu Sun, Yaru Li, Scott Lowe, Rachel ET. Bentley, Shuya Chen, Cunyu He, Xinxin Li, Bing Wang, Chengliang

Yin, Wenxian Li and Wenle Li. Construction and validation of *BRAF* mutation diagnostic model based on ultrasound examination and clinical features of patients with thyroid nodules. *Front Genet*. 2022 Sep 8;13:973272

- Yildirim Simsir I, Cetinkalp S, Kabalak T. Review of Factors Contributing to Nodular Goiter and Thyroid Carcinoma. *Med Princ Pract*. 2020;29(1):1-5
- Younis, E. Oncogenesis of Thyroid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* . 2017 May 1;18(5):1191-1199
- Zahid A, Shafiq W, Nasir KS, Loya A, Abbas Raza S, Sohail S, Azmat U. Malignancy rates in thyroid nodules classified as Bethesda categories III and IV; a subcontinent perspective. *J Clin Transl Endocrinol*. 2021 Jan 29;23:100250
- Zanaret M., Paris J., Duflo S. Évidements ganglionnaires cervicaux. EMC (Elsevier SAS, Paris), Techniques chirurgicales - Tête et cou, 46-470, 2005.
- Zeyghami W, Hansen MU, Jakobsen KK, Groenhøj C, Feldt-Rasmussen U, von Buchwald C, Hahn CH. Liquid biopsies in thyroid cancers: a systematic review and meta-analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2023 Oct 26;30(12): e230002.