

USO DE FIRMAS MOLECULARES COMO APOYO AL DIAGNÓSTICO DE LOS NÓDULOS TIROIDEOS CON CITOLOGÍA INDETERMINADA. VALOR DE THYROIDPRINT®

Carles Zafon¹, Juan J. Díez², Aida Orois Añón³, Manuel A Gargallo Fernandez⁴, Cecilia Sánchez Ragnarsson⁵, Tomas Martin Hernández⁶, Marta Diéguez Felechosa⁷, Pablo Valderrábano Herrero⁸

- 1) Servicio de Endocrinología y Nutrición; Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus; Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- 2) Department of Endocrinology, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro Segovia de Arana, Majadahonda, Spain, Department of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid.
- 3) Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Clínic, Barcelona.
- 4) Unidad de Nodulo Tiroideo; Departamento de Endocrinología y Nutricion; Fundacion Jiménez Diaz. Madrid.
- 5) Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA)/ ISPA- Instituto de investigación del Principado de Asturias, Oviedo.
- 6) Coordinador de la Unidad de Referencia Andaluza en Patología Tiroidea Intervencionista. Servicio de Endocrinología y Nutrición; H.U. Virgen Macarena. Sevilla
- 7) S. Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario de Cabueñes (CAHU). ISPA-Instituto de investigación del Principado de Asturias, Gijón.
- 8) Servicio de Endocrinología y Nutrición, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid

INTRODUCCIÓN

Nódulos tiroideos

La presencia de nódulos tiroideos (NT) en la población es frecuente y su prevalencia varía según el método de detección y la población seleccionada oscilando del 4 al 7% por palpación y hasta el 68% por ecografía de alta resolución, con mayor frecuencia en zonas deficientes de yodo, en mujeres y ancianos. No obstante, se estima que únicamente entre el 7 y el 15% de estos nódulos son malignos.

La evaluación inicial del NT incluye una valoración de los factores de riesgo clínicos y una ecografía tiroidea. Se han desarrollado diversos sistemas de estratificación según las características ecográficas (TI-RADS) que se utilizan para estimar el riesgo de malignidad y la necesidad de una biopsia. La hipoecogenicidad, la irregularidad de sus márgenes, la presencia de microcalcificaciones, el diámetro anteroposterior mayor que transversal, la extensión extratiroidea y la presencia ganglios linfáticos cervicales con características sospechosas son criterios ecográficos asociados a malignidad. En función

del tamaño del nódulo y de la presencia o ausencia de estos rasgos de sospecha se establece la necesidad de seguimiento o de evaluación citológica mediante punción aspiración con aguja fina (PAAF).

El resultado de la citología se categoriza según la clasificación internacional de Bethesda (actualmente 3ª edición, 2023), que necesariamente nos debe informar acerca del riesgo de benignidad o malignidad del nódulo.

Dentro de esta clasificación existen dos categorías (“atipia de significado indeterminado” o categoría III y “neoplasia folicular” o categoría IV) que no cumplen criterios para ser etiquetadas de benignas (categoría II), sospechosas de malignidad (categoría V) o malignas (categoría VI). Se estima que estas categorías III y IV tienen un riesgo de malignidad que puede llegar hasta el 30%, por lo que en ocasiones se les denomina globalmente a ambas “categorías indeterminadas” al no permitir establecer con un cierto grado de certeza la naturaleza biológica del NT. Las categorías indeterminadas representan en torno al 14% de todas las citologías diagnósticas, pudiendo llegar en algunas series al 30%. Así, constituyen un importante volumen de los pacientes en los que se realiza PAAF.

Manejo de los NT con categorías indeterminadas

Las categorías indeterminadas nos enfrentan a una difícil decisión en cuanto a manejo. Si mantenemos al paciente en seguimiento periódico con ecografía sin ningún tipo de intervención, podemos estar dejando sin tratamiento un cáncer de tiroides hasta en un 30% de los casos. Si, por el contrario, realizamos una hemitiroidectomía para obtener una pieza de biopsia y un diagnóstico definitivo, estamos sometiendo al paciente a una cirugía y anestesia general con sus riesgos y posibles complicaciones, sabiendo que la mayoría de los casos van a ser benignos. Como vemos, opciones ambas muy extremas: o excesivamente conservadoras, o excesivamente agresivas.

Las guías de práctica clínica hacen recomendaciones terapéuticas generales para cada una de las categorías diagnósticas. Para las categorías indeterminadas la evaluación molecular se ha incorporado como alternativa en los últimos años, pero tradicionalmente la actitud recomendada para los nódulos clasificados en la categoría III de Bethesda ha sido repetir

el estudio citológico mediante PAAF. Hasta hace poco, se desconocía el rendimiento diagnóstico de este procedimiento. Un metaanálisis recientemente publicado en casi 3.000 nódulos clasificados en la categoría III de Bethesda rebiopsiados mostró que casi el 50% se reclasifica como benigno; un tercio permanece en la misma categoría diagnóstica; y un 15% se reclasifica en categorías de mayor sospecha diagnóstica. Además, este metaanálisis también mostró que la tasa de malignidad de las categorías citológicas en la segunda PAAF es la esperada para cada una de ellas en el sistema de Bethesda, por lo que esta reclasificación parece fiable. En concreto, los nódulos reclasificados como benignos tienen una probabilidad de malignidad menor del 4%, similar a lo observado en nódulos con una citología benigna en la primera PAAF. Por tanto, parece razonable repetir la PAAF antes de evaluar un nódulo clasificado como Bethesda III con test moleculares.

Alternativamente a las pruebas moleculares, tras dos citologías Bethesda III, se podría plantear realizar una BAG (biopsia con aguja gruesa) aunque con frecuencia no resuelve la indeterminación ya que muchos de estos nódulos son neoplasias de patrón folicular. Por eso, la recomendación tradicional para los nódulos clasificados como Bethesda IV o con dos citologías clasificadas como Bethesda III ha sido la “cirugía diagnóstica”. Esta recomendación se basa en la incapacidad de la citología para evaluar la presencia de invasión capsular o vascular en lesiones que son predominantemente de patrón folicular y al hecho de que la probabilidad de malignidad en estas situaciones se sitúa entre el 10% y el 40%.

El tratamiento quirúrgico en la enfermedad nodular tiroidea se puede realizar con finalidad terapéutica o diagnóstica. La cirugía tiroidea con finalidad diagnóstica se aplica actualmente en los nódulos con hallazgos citológicos indeterminados o no claramente concluyentes de malignidad y también, según algunos autores, puede emplearse en casos de enfermedad nodular con características ecográficas de sospecha, incluso en presencia de hallazgos citológicos benignos. Aparte de en las categorías indeterminadas, hay otras situaciones que pueden llevar a realizar una tiroidectomía diagnóstica, como la categoría Bethesda I (no diagnóstica), cuando persiste repetidamente. La presencia de otros factores de riesgo puede modular la indicación de cirugía, incluso con independencia de resultados citológicos. Estos factores comprenden antecedentes familiares de neoplasias tiroideas, síndromes asociados a susceptibilidad genética, antecedentes de radioterapia cervical o características ecográficas de alta sospecha. La decisión de realizar una cirugía

diagnóstica se basa, en todo caso, en un conjunto de factores, incluyendo todo lo anterior y, además, la expectativa de vida y preferencias del paciente, las características técnicas y la experiencia de los equipos disponibles.

De forma global, la probabilidad de que un nódulo concreto sea en realidad maligno se puede refinar utilizando información clínica disponible, como el patrón de sospecha ecográfica y el escenario citológico descrito en el aspirado, lo que permite en cierto grado individualizar la actitud terapéutica. Esta estratificación del riesgo tiene además impacto sobre el rendimiento diagnóstico de las pruebas moleculares y sobre la interpretación de sus resultados. Por ello es recomendable que se haga una auditoría periódica de la calidad y resultados de la vía clínica institucional para la evaluación de NT, particularmente en los centros en los que vayan a utilizarse test moleculares para la evaluación de nódulos tiroideos con citología indeterminada. Estos son los puntos clave que deberían auditarse periódicamente:

1. Calidad de los informes de ecografía tiroidea: el correcto uso de los sistemas de clasificación estandarizados de patrón de sospecha ecográfica permite clasificar aproximadamente el 50% de los nódulos como benignos con una tasa de falsos negativos <1%. Sin embargo, la adherencia a estos sistemas de clasificación es pobre en la mayoría de los centros, lo que lleva a realizar punciones innecesarias. Por eso es necesario asegurar que se describen todas las características ecográficas relevantes utilizando terminología estandarizada; y que los nódulos se clasifican utilizando uno de los sistemas de clasificación validados.

2. Tasa de malignidad institucional para cada patrón de sospecha ecográfica: Las clasificaciones de sospecha ecográfica vinculan cada patrón de sospecha a una tasa de malignidad estimada. Estas se utilizan rutinariamente para seleccionar nódulos que precisan de estudio citológico; pero además son útiles para estratificar el riesgo de malignidad de nódulos con citología indeterminada. Así, NT con un patrón de muy baja sospecha ecográfica se asocian con una probabilidad de malignidad <5% de forma consistente, incluso entre nódulos con citología indeterminada. Por eso, en esa circunstancia podría ser innecesario repetir la citología o realizar estudios moleculares y optar directamente por la observación ecográfica. Por otra parte, la tasa de malignidad en nódulos citológicamente indeterminados con un patrón de sospecha elevada es habitualmente mayor del 50%.

3. Tasa de malignidad de cada categoría de diagnóstico citológico: La tasa de malignidad de las categorías indeterminadas de diagnóstico citológico es muy variable entre centros. Esto se debe a que la interpretación citológica es subjetiva y dependiente de la experiencia del observador. De hecho, se ha descrito que la concordancia entre patólogos a la hora de evaluar una citología tiroidea es del 65-75%. Por eso, es preciso conocer las tasas de malignidad específicas de cada centro, particularmente si va a implementarse el uso de marcadores moleculares.

4. Distribución y resultados de los distintos escenarios citológicos: Las citologías indeterminadas incluyen aspirados con características citológicas diversas. Estos escenarios no solo se asocian con diferentes tasas de malignidad, sino que también se asocian con distintos tipos de cáncer y distintos perfiles moleculares y pueden emplearse para estratificar la probabilidad de malignidad de un nódulo concreto. Por ejemplo, los nódulos que presentan atipia nuclear tienen un riesgo de malignidad 2.5-3.0 veces superior a los que no la tienen; y presentan con más frecuencia la mutación *BRAF V600E*, típica del carcinoma papilar de tiroides. Por el contrario, entre los aspirados con atipia arquitectural encontramos con más frecuencia carcinomas de patrón folicular y mutaciones en *RAS* o *RAS-like*.

5. Umbral institucional para el diagnóstico de malignidad en tumores de patrón folicular: El umbral diagnóstico para la atipia nuclear leve asociada a mutaciones *RAS* o *RAS-like* es muy variable entre patólogos. Esto tiene un impacto directo sobre la tasa de malignidad de los nódulos citológicamente indeterminados, el rendimiento diagnóstico de las pruebas moleculares y la interpretación de sus resultados.

Por último, aunque no hay datos de coste-efectividad, se puede utilizar la determinación sérica de calcitonina para descartar o confirmar la presencia de un carcinoma medular. Esta recomendación es obligada cuando el citólogo sugiere esa posibilidad, o el paciente tiene antecedentes familiares de carcinoma medular de tiroides. Sin embargo, dado que el 40% de los carcinomas medulares se diagnostican postquirúrgicamente, parece también oportuno realizar una determinación de calcitonina sérica en aspirados con patrón onco-cítico. Por el contrario, la calcitonina es probablemente innecesaria en aspirados con atipia arquitectural y/o presencia de abundante coloide.

TÉCNICAS MOLECULARES

Después de considerar todo expuesto y tras valorar los diferentes aspectos para individualizar al máximo cada caso, las pruebas moleculares pueden constituir herramientas diagnósticas adicionales que permiten estratificar la probabilidad de malignidad antes de la cirugía, especialmente en las citologías indeterminadas. Hasta la fecha han sido poco empleados en nuestro entorno debido a su escasa disponibilidad y, en parte también, a su elevado coste. Sin embargo, algunos de ellos ya cuentan con estudios de validación clínica que han mostrado su utilidad para reducir el número de cirugías diagnósticas innecesarias entre este tipo de NT. No obstante, para optimizar su rendimiento diagnóstico, estas pruebas moleculares deben integrarse en la vía clínica institucional de evaluación de los nódulos tiroideos.

Metodología y resultados de ThyroidPrint®

ThyroidPrint es un clasificador diseñado para la evaluación de nódulos citológicamente indeterminados que mide la expresión de 10 genes por q-PCR en muestras citológicas obtenidas mediante PAAF. Estos niveles de expresión se analizan posteriormente mediante un algoritmo desarrollado con redes neuronales que clasifica el nódulo a estudio como benigno o sospechoso. La firma genética estudiada por ThyroidPrint® representa condiciones del microambiente tumoral (CXCR3, CXCL10, CCR3, CCR7 y CXADR) y de las células epiteliales tumorales (TIMP1, CLDN1, KTR19, AFAPL2 y HMOX1). Hasta 2023, ThyroidPrint® se ha ofrecido como un servicio centralizado en un laboratorio CLIA acreditado por el College of American Pathologists (CAP). En este formato, ThyroidPrint® ha sido validado clínicamente en dos ensayos clínicos prospectivos multicéntricos independientes realizados en USA y Chile. Estos estudios demostraron que el rendimiento diagnóstico de ThyroidPrint® era equivalente entre dos cohortes étnicamente diversas. Recientemente, se ha publicado el primer estudio post-comercialización de utilidad clínica que evalúa el impacto de ThyroidPrint® en la decisión médica y el beneficio neto para los pacientes en vida real. Este estudio fue desarrollado en un solo centro en Chile, por lo que tiene varias limitaciones, incluyendo la generalización de los resultados y posibles sesgos de selección. Sin embargo, este estudio muestra evidencia en vida real de la potencial utilidad de ThyroidPrint® para reducir la tasa de cirugías diagnósticas. Los hallazgos más relevantes son: 1) en pacientes evaluados con ThyroidPrint® se redujo la tasa de cirugía diagnóstica un 67%, concordante con la tasa de resultados

benignos. Esta tasa permaneció inalterada durante todo el periodo de seguimiento (media de 18 meses); 2) la tasa de malignidad entre los nódulos operados aumentó del 32% al 71% al comparar pacientes no evaluados con ThyroidPrint® con pacientes que sí fueron evaluados con ThyroidPrint®.

ThyroidPrint® ha sido migrado recientemente a un formato kit (cartucho) para analizar en la plataforma Idylla que permite su uso descentralizado en laboratorios clínicos y que se ha comenzado a comercializar en España. En este soporte, el test se realiza en 3 horas realizando la extracción de mRNA y qPCR por microfluidos mediante un sistema automatizado que requiere mínima manipulación del técnico de laboratorio. Este procedimiento ha sido optimizado para muestras citológicas recolectadas mediante PAAF y almacenadas en un medio conservador de RNA específico que se procesa directamente por el equipo generando un informe de resultados que se carga en una aplicación web.

Hasta ahora no hay datos publicados sobre el rendimiento diagnóstico de ThyroidPrint® en este nuevo soporte. Sin embargo, se están analizando en este momento los datos de un nuevo ensayo clínico prospectivo, multicéntrico, que incluye pacientes de España, UK, USA, Chile y Brasil. Aunque aún faltan datos de algunas de las cohortes, la empresa comercializadora del test ha compartido datos preliminares que incluyen 95 pacientes del Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid) que ya han sido analizados con la nueva plataforma y que permite comparar su rendimiento diagnóstico con el de los estudios previos analizados en el laboratorio central. En esta serie, considerando las neoplasias de bajo riesgo como enfermedad no quirúrgica, se observó una sensibilidad del 100%, una especificidad del 85%, un VPN del 100% y un VPP del 65%.

Como estimación para valorar el número de pacientes candidatos a realizar test moleculares podríamos manejar los datos siguientes. En un hospital de 800 camas que atiende a una población de 540.000 personas se realizan aproximadamente 500 PAAF anuales. De ellas aproximadamente un 15-20% son nódulos indeterminados (Bethesda III y IV), es decir unos 100 casos/año. No obstante, como hemos visto, no todos ellos serían tributarios de la aplicación de estudios moleculares. La repetición de la PAAF en los casos Bethesda III, la valoración del contexto clínico individualizado y el hecho que algunos pacientes tendrán indicación de cirugía debido a otros factores independientemente del riesgo de malignidad, sitúa un escenario verosímil en torno a 25-40 casos tributarios de estudio molecular al año en el ejemplo analizado.

Aplicación de test molecular en práctica clínica

En el caso concreto del test ThyroidPrint® según las recomendaciones del fabricante y la cohorte de validación estaría indicado para pacientes mayores de 18 años, con nódulos tiroideos indeterminados (Bethesda III y IV) y de tamaño entre 1 y 4 cm. Así, y a modo de resumen, los nódulos en los que sería más rentable la realización de test moleculares serían aquellos que cumplan todas las condiciones siguientes:

- *Citología indeterminada (Bethesda III y IV)*
- *TI-RADS 3-4*
- *Tamaño 1-4 cm*
- *No síntomas compresivos/molestias estéticas referidas por el paciente*
- *No factores de alta sospecha de malignidad*: sin adenopatías; que no sean TR 5 con atipia nuclear o cambios oncocíticos; sin crecimiento explosivo; sin parálisis de cuerda vocal ipsilateral; etc).
- *Pacientes operables*
- *Ausencia de otras indicaciones quirúrgicas distintas a la citología indeterminada*
- *Paciente y médicos tratantes conformes con evitar la cirugía si el resultado molecular indica benignidad.*

ESTUDIOS ECONÓMICOS

Para la confección de este apartado (sirva como modelo aproximado) se han tenido en cuenta las siguientes fuentes:

- Costes del estudio molecular: Biocartis©
- Costes de procedimientos hospitalarios: Precios públicos correspondientes a los servicios sanitarios que presta el Institut català de salut (ICS), en su actualización reseñada en la orden SLT/71/2020 del 2 de junio de 2020 y publicada en el Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya (DOGC), número 8153 el 12 de junio de 2020.

- Precios públicos por la prestación de los servicios y actividades de naturaleza sanitaria. Comunidad de Madrid (<https://sede.comunidad.madrid/medias/precios-publicos-anexos-iiiiii-iv>)

A partir de esta información y con un ejemplo de 30 estudios moleculares/año, tenemos:

| GASTOS | Valor unidad | Unidades | Valor total |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------------|
| PAAF extra | 167 | 30 | 5.010 |
| THYROIDPRINT test | 1.500 | 30 | 45.000 |
| TOTAL | 1.667 | 30 | 50.010 |

De los 30 test, el 70% nos daría compatible con benignidad por lo que nos ahorraríamos la intervención quirúrgica, así:

| AHORRO | Valor unidad | Unidades | Valor total |
|--|-------------------------|-----------------|------------------------|
| Procedimiento de tiroides de gravedad menor | 4.390 | 21 | 92.190 |
| TOTAL | 4.390 | 21 | 92.190 |

De este modo, el ahorro final calculado sería de $(92.190 - 50.010)$ 42.090 euros anuales.

No se han tenido en cuenta para el cálculo:

- Complicaciones quirúrgicas
- Gastos de tratamiento con levotiroxina en pacientes intervenidos
- Gastos de controles posteriores en pacientes intervenidos y en pacientes sin intervención

CONCLUSIONES

La realización de test de diagnóstico molecular en muestras de punción tiroidea complementa a la clínica, la ecografía y la citología mejorando la estimación de riesgo y el diagnóstico de los nódulos tiroideos indeterminados. Se postula como una alternativa a la cirugía diagnóstica, permitiendo optimizar sus indicaciones y evitar intervenciones innecesarias.

NOTA: Los autores declaran que no presentan ningún conflicto de interés en la confección de este documento. La empresa responsable de Thyroidprint no ha participado, supervisado ni promovido el documento, la finalidad del cual es ofrecer una base de trabajo a posibles socios de la SEEN que se planteen la implementación de técnicas moleculares de soporte al diagnóstico del nódulo tiroideo.

PV ha participado en calidad de Investigador Principal del centro en el estudio de validación multicéntrico de ThyroidPrint del que se presentan los datos preliminares en este documento y que han sido cedidos por GeneproDx. Tanto los investigadores del estudio como el Hospital Universitario Ramón y Cajal, han recibido fondos de investigación por su labor en el estudio. PV ha recibido compensación económica de Biocartis por asesoramiento acerca de ThyroidPrint.

BIBLIOGRAFIA

Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, et al. 2016 2015 American Thyroid Association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer: the American Thyroid Association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* 26 1–133.

Trimboli P, Durante C. Ultrasound risk stratification systems for thyroid nodule: between lights and shadows, we are moving towards a new era. *Endocrine*. 2020;69(1):1-4

Ali SZ, Baloch ZW, Cochand-Priollet B, Schmitt FC, Vielh P, VanderLaan PA. The 2023 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid*. 2023 Sep;33(9):1039-1044. doi: 10.1089/thy.2023.0141. Epub 2023 Jul 8. PMID: 37427847.

Russ G, Bonnema SJ, Erdogan MF, Durante C, Ngu R, Leenhardt L. European Thyroid Association Guidelines for Ultrasound Malignancy Risk Stratification of Thyroid Nodules in Adults: The EU-TIRADS. *Eur Thyroid J*. 2017;6(5):225-237. doi:10.1159/000478927

Carty SE, Ohori NP, Hilko DA, McCoy KL, French EK, Manroa P, Morariu E, Sridharan S, Seethala RR, Yip L. The Clinical Utility of Molecular Testing in the Management of Thyroid Follicular Neoplasms (Bethesda IV Nodules). *Ann Surg*. 2020 Oct;272(4):621-627. doi: 10.1097/SLA.0000000000004130. PMID: 32773640.

Alzumaili B, Sadow PM. Update on Molecular Diagnostics in Thyroid Pathology: A Review. *Genes (Basel)*. 2023 Jun 22;14(7):1314. doi: 10.3390/genes14071314. PMID: 37510219; PMCID: PMC10379610.

Kim NE, Raghunathan RS, Hughes EG, Longstaff XR, Tseng CH, Li S, Cheung DS, Gofnung YA, Famini P, Wu JX, Yeh MW, Livhits MJ. Bethesda III and IV Thyroid Nodules Managed Nonoperatively After Molecular Testing With Afirma GSC or Thyroseq v3. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023 Aug 18;108(9):e698-e703. doi: 10.1210/clinem/dgad181. PMID: 36995878; PMCID: PMC10438873.

Olmos R, Domínguez JM, Vargas-Salas S, Mosso L, Fardella CE, González G, Baudrand R, Guarda F, Valenzuela F, Arteaga E, Forenzano P, Nilo F, Lustig N, Martínez A, López JM, Cruz F, Loyola S, Leon A, Droppelmann N, Montero P, Domínguez F, Camus M, Solar A, Zoroquiain P, Roa JC, Muñoz E, Bruce E, Gajardo R, Miranda G, Riquelme F, Mena N, González HE. ThyroidPrint®: clinical utility for indeterminate thyroid cytology. *Endocr Relat Cancer.* 2023 Oct 6;30(11):e220409. doi: 10.1530/ERC-22-0409. PMID: 37671897; PMCID: PMC10563504.

Nicholson KJ, Roberts MS, McCoy KL, Carty SE, Yip L. Molecular Testing Versus Diagnostic Lobectomy in Bethesda III/IV Thyroid Nodules: A Cost-Effectiveness Analysis. *Thyroid.* 2019 Sep;29(9):1237-1243. doi: 10.1089/thy.2018.0779. PMID: 31407625; PMCID: PMC7366255.

Balentine CJ, Vanness DJ, Schneider DF. Cost-effectiveness of lobectomy versus genetic testing (Afirma®) for indeterminate thyroid nodules: Considering the costs of surveillance. *Surgery.* 2018 Jan;163(1):88-96. doi: 10.1016/j.surg.2017.10.004. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29128178; PMCID: PMC5736452.

Rivas AM, Nassar A, Zhang J, Casler JD, Chindris AM, Smallridge R, Bernet V. ThyroSeq®V2.0 Molecular Testing: A Cost-Effective Approach for the Evaluation of Indeterminate Thyroid Nodules. *Endocr Pract.* 2018 Sep;24(9):780-788. doi: 10.4158/EP-2018-0212. Epub 2018 Aug 7. PMID: 30084677.

MA Velez-Romero, P Barrio-Dorado, A Paniagua-Ruiz, JI Cornejo-Ladrero. A Cazorla-Jimenez, T Reina-Duran. M Gargallo-Fernández. Utilidad de segunda paaf en nodulos tiroideoso Bethesda III: posibles factores predictores de cambio de categoria. 64 Congreso SEEN 2023

Grani G, Sponziello M, Pecce V, Ramundo V, Durante C. Contemporary Thyroid Nodule Evaluation and Management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(9):2869-2883. doi:10.1210/clinem/dgaa322

Bayona A, Benavent P, Muriel A, et al. Outcomes of repeat fineneedle aspiration biopsy for AUS/FLUS thyroid nodules. *European journal of endocrinology.* 08/27/2021 2021;185(4)doi:10.1530/EJE-21-0330

Wang CC, Friedman L, Kennedy GC, et al. A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid.* Mar 2011;21(3):243-51. doi:10.1089/thy.2010.0243

MJ L, CY Z, EJ K, et al. Effectiveness of Molecular Testing Techniques for Diagnosis of Indeterminate Thyroid Nodules: A Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology.* 01/01/2021 2021;7(1)doi:10.1001/jamaoncol.2020.5935

Durante C, Hegedüs L, Czarniecka A, et al. 2023 European Thyroid Association Clinical Practice Guidelines for thyroid nodule management. *Eur Thyroid J.* Oct 01 2023;12(5)doi:10.1530/ETJ-23-0067

Valderrabano P, Khazai L, Thompson ZJ, et al. Cancer Risk Stratification of Indeterminate Thyroid Nodules: A Cytological Approach. *Thyroid.* 10 2017;27(10):1277-1284. doi:10.1089/thy.2017.0221

Valderrabano P, McGettigan MJ, Lam CA, et al. Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Utility of the American Thyroid Association Sonographic Patterns for Cancer Risk Stratification. *Thyroid.* Aug 2018;28(8):1004-1012. doi:10.1089/thy.2018.0085

Valderrabano P, Eszlinger M, Stewardson P, Paschke R. Clinical value of molecular markers as diagnostic and prognostic tools to guide treatment of thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf).* Jun 2023;98(6):753-762. doi:10.1111/cen.14882

Russ G, Royer B, Bigorgne C, Rouxel A, Bienvenu-Perrard M, Leenhardt L. Prospective evaluation of thyroid imaging reporting and data system on 4550 nodules with and without elastography. *European journal of endocrinology.* 04/15/2013 2013;168(5)doi:10.1530/EJE-12-0936

Hu XY, Wu J, Seal P, et al. Improvement in thyroid ultrasound report quality with radiologists' adherence to 2015 ATA or 2017 TIRADS: a population study. *Eur Thyroid J.* Jun 14 2022;11(3)doi:10.1530/ETJ-22-0035

Symonds CJ, Seal P, Ghaznavi S, Cheung WY, Paschke R. Thyroid nodule ultrasound reports in routine clinical practice provide insufficient information to estimate risk of malignancy. *Endocrine.* 2018 Aug 2018;61(2)doi:10.1007/s12020-018-1634-0

Hu TX, Nguyen DT, Patel M, et al. The Effect Modification of Ultrasound Risk Classification on Molecular Testing in Predicting the Risk of Malignancy in Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *Thyroid.* 08 2022;32(8):905-916. doi:10.1089/thy.2021.0659

Wang MM, Beckett K, Douek M, et al. Diagnostic Value of Molecular Testing in Sonographically Suspicious Thyroid Nodules. *Journal of the Endocrine Society.* 2020-09-01 2020;4(9)doi:10.1210/jendso/bvaa081

Cibas ES, Baloch ZW, Fellegara G, et al. A prospective assessment defining the limitations of thyroid nodule pathologic evaluation. *Ann Intern Med.* Sep 3 2013;159(5):325-32. doi:10.7326/0003-4819-159-5-201309030-00006

Ferris RL, Baloch Z, Bernet V, et al. American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making. *Thyroid.* Jul 2015;25(7):760-8. doi:10.1089/thy.2014.0502

Glass RE, Levy JJ, Motanagh SA, Vaickus LJ, Liu X. Atypia of undetermined significance in thyroid cytology: Nuclear atypia and architectural atypia are associated with

different molecular alterations and risks of malignancy. *Cancer Cytopathol.* Dec 2021;129(12):966-972. doi:10.1002/cncy.22495

Hirokawa M, Carney JA, Goellner JR, et al. Observer variation of encapsulated follicular lesions of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol.* Nov 2002;26(11):1508-14.

Lloyd R, Erickson L, Casey M, et al. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *The American journal of surgical pathology.* 2004 Oct 2004;28(10)doi:10.1097/01.pas.0000135519.34847.f6

Trimboli P, Valderrabano P, Pitoia F, Piccardo A, Bojunga J. Appropriate and mindful measurement of serum calcitonin in patients with thyroid nodules. A white paper. *Endocrine.* Aug 17 2023;doi:10.1007/s12020-023-03485-6

Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, Paschke R, Valcavi R, Vitti P; AACE/ACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS, AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY, AND ASSOCIAZIONE MEDICI ENDOCRINOLOGI MEDICAL GUIDELINES FOR CLINICAL PRACTICE FOR THE DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THYROID NODULES--2016 UPDATE. *Endocr Pract.* 2016 May;22(5):622-39. doi: 10.4158/EP161208.GL.

Ito Y, Miyauchi A. Active surveillance of low-risk papillary thyroid microcarcinomas in Japan and other countries: a review. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2020 Jan;15(1):5-12. doi: 10.1080/17446651.2020.1707078.

Miyauchi A, Kudo T, Ito Y, Oda H, Yamamoto M, Sasai H, Higashiyama T, Masuoka H, Fukushima M, Kihara M, Miya A. Natural history of papillary thyroid microcarcinoma: Kinetic analyses on tumor volume during active surveillance and before presentation. *Surgery.* 2019 Jan;165(1):25-30. doi: 10.1016/j.surg.2018.07.045.

Perros P, Boelaert K, Colley S, Evans C, Evans RM, Gerrard Ba G, Gilbert J, Harrison B, Johnson SJ, Giles TE, Moss L, Lewington V, Newbold K, Taylor J, Thakker RV, Watkinson J, Williams GR; British Thyroid Association. Guidelines for the management of thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014 Jul;81 Suppl 1:1-122. doi: 10.1111/cen.12515

González HE, Martínez JR, Vargas-Salas S, et al. A 10-Gene Classifier for Indeterminate Thyroid Nodules: Development and Multicenter Accuracy Study. *Thyroid.* Aug 2017;27(8):1058-1067. doi:10.1089/thy.2017.0067

Zafereo M, McIver B, Vargas-Salas S, et al. A Thyroid Genetic Classifier Correctly Predicts Benign Nodules with Indeterminate Cytology: Two Independent, Multicenter, Prospective Validation Trials. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2020 May 2020;30(5)doi:10.1089/thy.2019.0490

Medas F, Dobrinja C, Al-Suhaimi EA, Altmeier J, Anajar S, Arikan AE, Azaryan I, et al. Effect of the COVID-19 pandemic on surgery for indeterminate thyroid nodules (THYCOVID): a retrospective, international, multicentre, cross-sectional study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2023 Jun;11(6):402-413.

Sipos JA, Blevins TC, Shea HC, Duick DS, Lakhian SK, Michael BE, Thomas MJ, Sosa JA. Long-term nonoperative rate of thyroid nodules with benign results on the AFIRMA gene expression classifier. *Endocr Pract.* 2016 Jun;22(6):666-72.

Nishino M, Mateo R, Kilim H, Feldman A, Elliott A, Shen C, Hasselgren PO, Wang H, Hartzband P, Hennessey JV. Repeat Fine Needle Aspiration Cytology Refines the Selection of Thyroid Nodules for Afirma Gene Expression Classifier Testing. *Thyroid.* 2021 Aug;31(8):1253-1263.

Patel J, Klopper J, Cottrill EE. Molecular diagnostics in the evaluation of thyroid nodules: Current use and prospective opportunities. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Feb 24;14:1101410.

Rajab M, Payne RJ, Forest VI, Pusztaszeri M. Molecular Testing for Thyroid Nodules: The Experience at McGill University Teaching Hospitals in Canada. *Cancers (Basel).* 2022 Aug 26;14(17):4140.

URL: <https://www.biocartis.com/en/research/research-assays/idylla-thyroidprintr>.