

MARINHA DO BRASIL
HOSPITAL NAVAL MARCÍLIO DIAS
ESCOLA DE SAÚDE DA MARINHA

**OS TESTES MOLECULARES PODEM SOLUCIONAR O PROBLEMA DOS
NÓDULOS DE TIREOIDE INDEFINIDOS NA PAAF?**

AUTORA: 1T (MD) MARIA BEATRIZ GONÇALVES GONZALEZ

ORIENTADOR: CT (MD) RENATO TORRES MEDINA

**OS TESTES MOLECULARES PODEM SOLUCIONAR O PROBLEMA DOS
NÓDULOS DE TIREOIDE INDEFINIDOS NA PAAF?**

1T (MD) MARIA BEATRIZ GONÇALVES GONZALEZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
programa de Residência Médica em Patologia do
Hospital Naval Marcílio Dias, como parte dos
requisitos necessários à obtenção do Título de
Especialista em Patologia.

Orientador: CT (Md) Renato Torres Medina.

SUMARIO

RESUMO.....4

ABSTRACT.....5

INTRODUÇÃO.....6

METODOLOGIA.....8

RESULTADOS.....9

DISCUSSÃO.....16

CONCLUSÃO.....18

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....19

RESUMO

Introdução: O câncer de tireoide é o tipo mais comum de câncer na região da cabeça e pescoço. Após a identificação do nódulo e de suas características ultrassonográficas, avalia-se a necessidade da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para exame citológico. Este é avaliado pela classificação de Bethesda, que atualmente identifica 20% a 30% dos nódulos como indeterminados (Bethesda III e IV). Muitos pacientes com nódulos considerados indeterminados são submetidos a tireoidectomia, porém relatórios histológicos indicam que até 84% dos casos de Bethesda III e IV são benignos, gerando um alto índice de cirurgias desnecessárias. Neste artigo de revisão vamos discutir os testes moleculares disponíveis para avaliação de nódulos da tireoide.

Metodologia: Foram selecionados artigos das bases de dados *PubMed* e *Clinicalkey* utilizando títulos e resumos para artigos em potencial.

Resultados e Discussão: Foram encontradas e descritas neste trabalho informações sobre os testes moleculares disponíveis: Afirma GEC, ThyroSeq v2 e v3, ThyGenX, RosettaGX Reveal, Mir-THYpe e ThyroidPrint, suas aplicações, vantagens e desvantagens.

Conclusão: Os testes moleculares para citologia de tireoide evoluíram muito nos últimos anos, mas ainda apresentam algumas desvantagens como anormalidades genéticas não detectadas e alto custo. Para que seu uso seja justificado, o teste molecular deve ser capaz de alterar significativamente o prognóstico e conduta clínica. A tendência é que, com a evolução da qualidade dos testes e redução dos custos de produção, seu uso na prática da citopatologia dos nódulos da tireoide seja ampliado.

Palavras-chave: Câncer de tireoide; Nódulos indeterminados de tireoide; punção aspirativa por agulha fina (PAAF); testes moleculares.

ABSTRACT

Introduction: Thyroid cancer is the most common type of cancer in the head and neck region. After aspiration identification for cytological examination due to its ultrasound features, assessment of fine needle aspirates (FNA) for cyto examination. This is currently assessed by the Bethesda classification which identifies 20 to 30% of the Bethesda classification criteria as undetermined (Bethesda III and IV). Many patients with indeterminate nodules undergo thyroidectomy, but histological reports indicate that up to 84% of Bethesda III and IV cases are benign, generating a high rate of unnecessary surgeries. In this review article we will evaluate the available molecular thyroid tests.

Methodology: Articles were selected from PubMed and Clinicalkey databases using titles and abstracts for potential articles.

Results and Discussion: Were and ThyroidPrint adhered to these available molecular data: Affirms G, RosettaGX v2 and v3, RosettaGXveal, Mir-THYpe and ThyroidPrint, their applications, benefits and use.

Conclusion: Molecular thyroid tests have evolved a lot, but still have some recent molecular tests, such as unproduced and high-cost genetic abnormalities. For its use to be justified, the molecular test must be able to significantly alter the prognosis and clinical management. The tendency is that, with the evolution of the quality of the tests and the reduction of production costs, its use in the practice of cytopathology of thyroid nodules will be expanded.

Keywords: Thyroid cancer; Indeterminate thyroid nodules; fine needle aspiration puncture (FNA); molecular testing.

1. INTRODUÇÃO

Segundo o INCA (1), o câncer de tireoide é o mais comum na região da cabeça e pescoço, afeta três vezes mais as mulheres do que os homens e, pela mais recente estimativa brasileira (2018), é o quinto tumor mais frequente em mulheres nas regiões Sudeste e Nordeste (sem considerar o câncer de pele não-melanoma). Em 2020 foram estimados 13.780 novos casos, 1.830 sendo homens e 11.950 mulheres; e 837 mortes, sendo 288 homens e 549 mulheres.

A investigação dos tumores de tireoide geralmente começa com uma suspeita clínica, seguida por dosagem de TSH no sangue e ultrassonografia. Após a identificação do nódulo e de suas características ultrassonográficas (tamanho, densidade, vascularização), avalia-se a necessidade da punção aspirativa por agulha fina (PAAF) para exame citológico. O exame citológico da tireoide é avaliado pela classificação de Bethesda, que divide as amostras entre seis categorias: (I) Amostra não diagnóstica; (II) Benigno; (III) Atipias de significado indeterminado; (IV) suspeito de neoplasia folicular; (V) Suspeito de malignidade e (VI) Maligno (2).

Já é bem estabelecido que a categoria (I) repete a PAAF, a (II) faz acompanhamento clínico e as categorias (V) e (VI) seguem para tireoidectomia. Os casos de Bethesda (III) e (IV) por sua vez compõem o grupo de nódulos indeterminados e gera grande discussão a respeito da conduta a seguir.

A citologia da aspiração por agulha fina (PAAF) identifica 20% a 30% dos nódulos como indeterminados (3). Para a categoria III de Bethesda espera-se um resultado histopatológico maligno entre 10% e 30% e para o Bethesda IV entre 25% e 40% (2).

Muitos pacientes com nódulos considerados indeterminados são submetidos a tireoidectomia, um procedimento invasivo que envolve riscos. Relatórios histológicos pós-cirúrgicos indicam que até 84% dos casos de Bethesda III e IV são benignos, gerando um alto índice de cirurgias desnecessárias (3).

Neste artigo de revisão vamos discutir sobre os testes moleculares disponíveis para avaliação de nódulos da tireoide e sua capacidade de definição de conduta para os nódulos indefinidos (Bethesda III e IV).

2. METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão de literatura que utilizou um total de 24 artigos selecionados por meio da busca de artigos científicos nas bases de dados eletrônicas PubMed e Clinicalkey, cujo objetivo foi sintetizar informações a respeito do tema testes moleculares em citologia de nódulos tireoidianos.

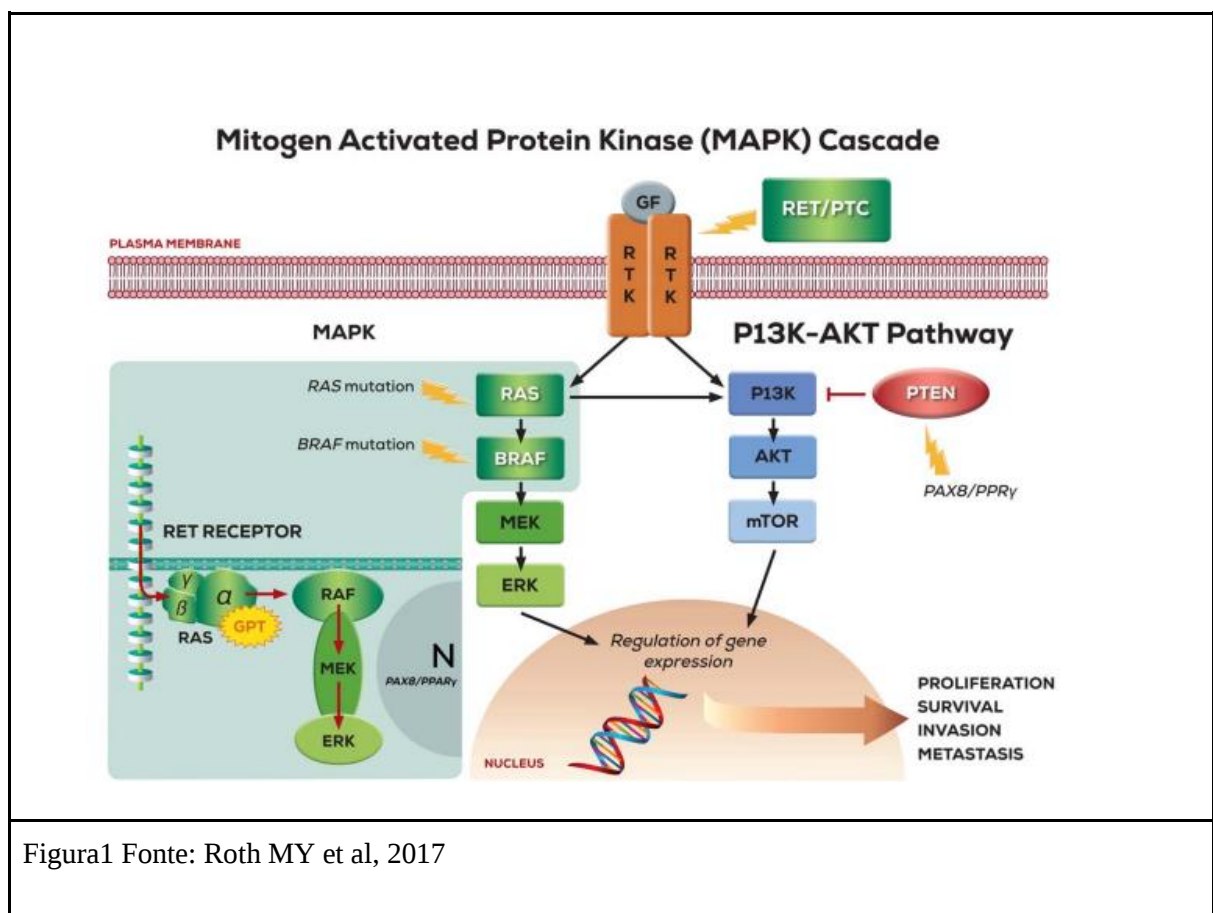
Estabeleceu-se a seguinte pergunta norteadora do estudo: “Os testes moleculares podem solucionar os problemas dos nódulos de tireoide indefinidos na PAAF?”. A busca dos artigos foi realizada no período de julho a setembro de 2022. Os seguintes descritores foram utilizados: “thyroid molecular testing”.

Os critérios de inclusão foram artigos publicados nos últimos cinco anos. Os critérios de exclusão foram publicações que discursavam core biopsia da tireoide, artigos sobre teste molecular da tireoide sem correlação com o sistema de classificação Bethesda, artigos incompletos ou escritos em idioma que não fosse o inglês.

3. RESULTADOS:

Nódulos malignos expressam diferentes perfis genômicos comparados com nódulos benignos, e testes moleculares começaram a ser implementados para melhor caracterizar os nódulos de tireoide e assim melhorar o gerenciamento de pacientes, evitar tratamento excessivo e suas complicações (4).

Os testes moleculares em amostras de PAAF da tireoide são realizados por uma variedade de métodos (imuno-histoquímica para mutações relacionadas a marcadores, hibridização in situ de fluorescência, polimerase reação em cadeia para marcadores individuais, sequenciamento de próxima geração, perfil de expressão de RNA, sequenciamento de RNA etc.) (5).



A figura 1 demonstra as mutações conhecidas de DNA e RNA que estão relacionadas a 70% dos carcinomas da tireoide (6). A maioria das mutações genéticas relacionadas ao câncer de tireoide são condutores das vias da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3 quinase-Akt (PI3K-AKT), envolvendo receptores de membrana celular de tirosina quinase, intra-proteínas de sinalização celular e receptores nucleares codificados por BRAF, RAS, RET e Genes PPARy, bem como genes reguladores, como PTEN e PAX8 (7).

Diagnóstico cirúrgico e alteração molecular relacionada	
Adenoma folicular	Nenhuma
Adenoma folicular	TP53
NIFTP	NRAS
Carcinoma papilífero da tireoide, variante folicular	NRAS, CNA
Carcinoma folicular encapsulado	NRAS, TP53, EIF1AX
Carcinoma papilífero da tireoide encapsulado, variante folicular	HRAS
Carcinoma papilífero da tireoide, variante clássica	NRAS
Carcinoma papilífero da tireoide, variante clássica	BRAF V600E, CNA
Carcinoma folicular	HRAS
Carcinoma medular	RET
Tabela 1. Diagnóstico cirúrgico e alteração molecular relacionada. Fonte: Adaptação de Belovarac, B, 2022.	

O primeiro passo para se identificar as mutações foram os estudos feitos com análise molecular de nódulos em pacientes que seguiram para cirurgia. Após a cirurgia foi realizado o exame histopatológico, considerado o padrão ouro para o diagnóstico final, e comparados os resultados. A base dos testes moleculares surge da identificação das alterações genéticas envolvidas na tumorigênese do câncer de tireoide (7).

Na tabela 1 observamos algumas lesões que tiveram suas mutações mapeadas em estudo que relacionou exame de imagem, testagem molecular e diagnóstico histopatológico final.

Realizada a identificação das principais mutações relacionadas a cada tipo de neoplasia, foram criados painéis de testes moleculares que tentam contemplar o maior número de mutações possíveis.

Dos artigos revisados foram apresentados seis tipos principais de painéis de testes moleculares voltados para citologia da tireoide: Afirma Gene Expression Classifier (GEC), ThyroSeq v2 e v3, ThyGenX, RosettaGX Reveal, Mir-THYpe e ThyroidPrint.

O Afirma Gene Expression Classifier utiliza um classificador de expressão de RNA proprietário baseado em tecnologia microarray, sendo usado como um teste de “exclusão” para identificar nódulos que provavelmente são benignos (8).

ThyroSeqV3 é baseado em sequenciamento de próxima geração e teste de fusão, podendo ser usado como um teste de "exclusão" e "inclusão" para identificar nódulos que são provavelmente benignos ou malignos. Uma contribuição importante do teste foi melhor discriminação de neoplasias malignas e benignas de células de Hurthle (8, 7).

ThyGenX é a combinação de um painel de oncogenes usando sequenciamento de próxima geração, bem como um classificador de miRNA para inclusão e exclusão de malignidade (8).

RosettaGX Reveal é baseado em 24 miRNAs. Neste teste, os níveis de expressão de um conjunto de biomarcadores de miRNA são medidos e usados para classificar os nódulos da tireoide como benignos ou suspeitos (6). O teste RosettaGX não está mais disponível (7).

Mir-THYpe é um teste desenvolvido no Brasil que analisa os perfis de expressão de 11 miRNAs obtidos das mesmas lâminas de esfregaço de citologia e foi projetado para raspar apenas as células da tireoide em zonas delimitadas por um citopatologista (3).

ThyroidPrint é um teste diagnóstico que utiliza um classificador genético da tireoide de 10 genes (3, 9).

Os dois testes moleculares mais extensivamente estudados são: Afirma GEC e ThyroSeq (10). A alta sensibilidade e o alto valor preditivo negativo do Afirma GEC e Thyroseq V3 são os principais fatores para determinar malignidade entre nódulos de tireoide com resultados de citologia indeterminada. Não houve diferença no desempenho diagnóstico entre os dois testes moleculares indicando que qualquer um dos dois testes é apropriado para determinar a malignidade dos nódulos da tireoide (11).

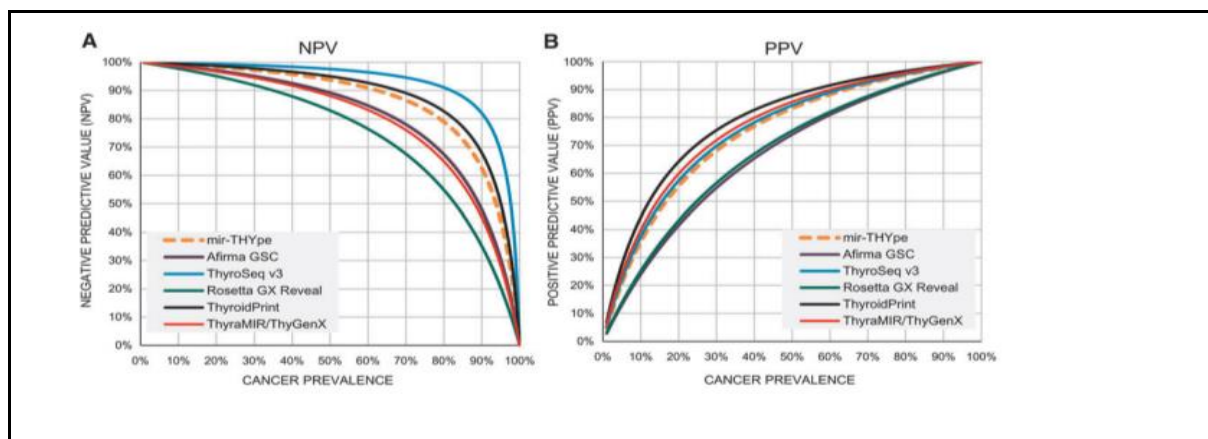


Figura 2. Análise do desempenho teórico entre os testes moleculares disponíveis para todas as possíveis prevalências de câncer. (A) Valores preditivos negativos estimados (VPN). (B) Valor preditivo positivo estimado (VPP). Fonte: Santos MTD et al, 2018.

O teste ideal deve ser usado de acordo com a necessidade de inclusão e exclusão de malignidade (6). No caso do Afirma GEC, o uso ideal é para exclusão de malignidade.

No geral, os testes moleculares para nódulos tireoidianos de citologia indeterminada têm uma sensibilidade de 91% a 94% e uma especificidade de 68% a 82% para a detecção de malignidade (12). O valor preditivo negativo e positivo vai variar de acordo com a incidência do tipo de câncer em cada população, dessa forma, todos os testes foram previstos para ter um valor preditivo negativo (VPN) superior a 90%. No entanto, como observamos na figura 2, ao considerar a prevalência de câncer usada pelo estudo ThyroSeq v3 (52,6%), apenas o mir-THYpe, ThyroSeq v3, e o ThyroidPrint apresentaram um VPN superior a 90% (3).

De acordo com as Diretrizes para Pacientes com Nódulos de Tireoide e Câncer Diferenciado de Tireoide da American Thyroid Association (ATA) de 2015 existe um menu de opções para pacientes com nódulos indeterminados e entre essas opções está o segmento com teste molecular, como sugerido na figura 3.

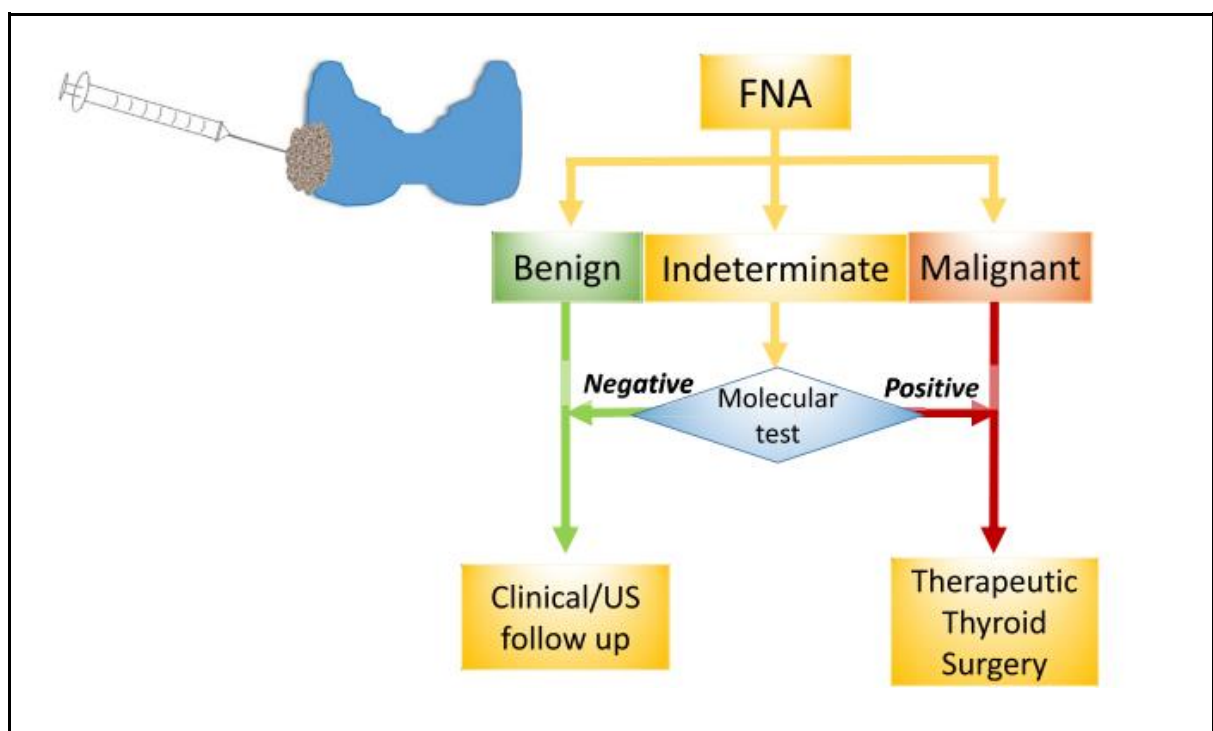
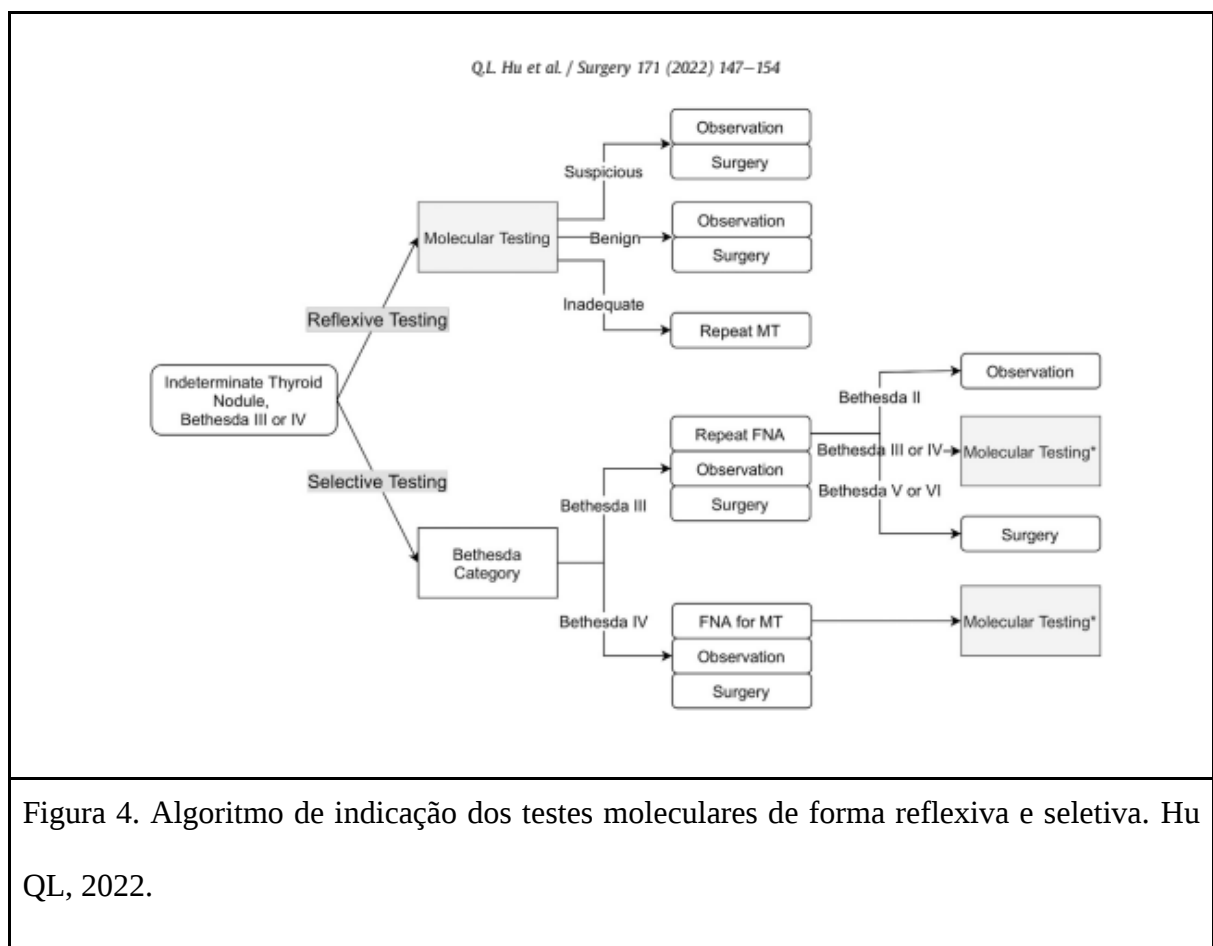


Figura 3. Algoritmo para utilização do teste molecular em citologia da tireoide. Fonte: Mayson SE, 2019.

Um dos artigos discutiu o momento ideal de aplicação dos testes, de forma reflexiva ou seletiva. Conforme observado na figura 4, a forma reflexiva faz o teste molecular para todos os casos de Bethesda III e IV, porém a forma seletiva faz o teste molecular para todos os casos de Bethesda IV e repete PAAF para os casos de Bethesda III. Os testes moleculares reflexivos reduziram o número de lobectomia tireoidiana diagnóstica para doença benigna em 9,5% comparado com uma estratégia de teste seletivo, porém o custo dessa forma de uso será maior (13, 14)



Outra forma de avaliar a necessidade do uso do teste molecular é de acordo com a classificação radiológica TI-RADS. Os testes moleculares forneceram informações mais importantes sobre malignidade em lesões ACR TI-RADS de maior risco (TR4 e TR5) (15).

Existem ainda outros usos que não são o enfoque deste trabalho, no caso dos nódulos malignos, como marcador prognóstico e a terapia alvo. Cerca de 50 a 70% dos carcinomas papilíferos da tireoide tem a mutação do gene BRAF V600E. Verificada a presença da mutação pode ser utilizada a terapia direcionada ao BRAF (16). No entanto, mutações com especificações muito altas câncer de tireoide, como o BRAF V600E, são incomuns quando a citologia é indeterminada (17).

A biópsia aspirativa por agulha fina (PAAF) de nódulos tireoidianos permite um diagnóstico definitivo de neoplasia benigna ou maligna em 60% a 80% dos nódulos, resultando em uma diminuição significativa no número de tireoidectomias sendo realizadas para nódulos benignos (8).

4. DISCUSSÃO

Ao longo da última década, inúmeros estudos têm demonstrado aumento da sensibilidade e precisão diagnóstica geral dos testes moleculares quando aplicados para amostras citológicas de tireoide (5). Os testes moleculares para citologia de tireoide, no entanto apresentam alto custo e não estão acessíveis para a população que utiliza o serviço de saúde pública ou suplementar.

Um teste com capacidade de exclusão de malignidade como o Afirma GEC para Bethesda III-IV, se negativo e sem outras indicações para cirurgia, pode evitar a cirurgia (16). Dessa forma um teste molecular benigno fornece segurança e qualidade de vida ao longo da vigilância ultrassonográfica, sem piora de ansiedade ou depressão relacionada ao risco de malignidade (18). A qualidade de vida é um parâmetro difícil de ser quantificado, principalmente no caso de um exame de alto custo. Para pessoas com nódulos da tireoide de citologia indeterminada, é improvável que o teste molecular ao preço atual seja de custo-benefício eficaz em comparação com a lobectomia diagnóstica (12).

Apesar dos avanços, ainda existem anormalidades genéticas não detectadas relacionadas a alguns cânceres de tireoide (7). Outras desvantagens ainda observadas são: a variabilidade no desempenho do teste dependendo das taxas de prevalência de câncer, a variabilidade dos resultados dependendo da citopatologia e histopatologia subjacentes (16).

Em relação à tomada de decisão sobre fazer a cirurgia, um teste positivo para mutações BRAF e HTERT, além de definir malignidade e dar suporte à decisão cirúrgica, podem informar recomendações de terapia adjuvante. Como desvantagem: a influência na decisão cirúrgica é limitada nos algoritmos de tratamento baseados em fatores clínicos e radiográficos e o impacto na extensão da cirurgia (por exemplo, lobectomia ou tireoidectomia total) foi minimizado por mudanças nas diretrizes cirúrgicas apoiando a lobectomia para tumores até 4,0 cm (16)

A variabilidade na precisão diagnóstica e o alto custo sugerem que os teste moleculares são mais bem usados de maneira ponderada e caso a caso para nódulos com clínica ambígua, deve-se considerar fatores citopatológicos e radiográficos (que têm tido sua acurácia aumentada nos últimos anos), conforme recomendado por sociedades profissionais como a Associação Americana de Tireóide e Associação Americana de Cirurgiões Endócrinos. O teste molecular só deve ser considerado se o resultado alterar o manejo recomendado do paciente. Uso indiscriminado e rotineiro para qualquer nódulo tireoidiano suspeito deve ser evitado, pois pode levar ao sobre diagnóstico, aumento desnecessário de custos e não ter impacto no manejo do paciente (16).

5. CONCLUSÃO

Os testes moleculares para citologia de tireoide evoluíram muito nos últimos anos, já existindo diversos painéis de exames disponíveis comercialmente. Em parte dos casos, o teste molecular é capaz de solucionar o problema dos nódulos de tireoide indefinidos na PAAF.

Apesar dos avanços, os testes moleculares ainda apresentam algumas desvantagens no seu uso, sendo uma das principais, seu alto custo, dessa forma, o teste molecular deve ser capaz de alterar significativamente o prognóstico e conduta clínica para que seu uso seja justificado. A tendência é que a qualidade dos testes evolua, que o preço se torne mais acessível e com o passar do tempo seja ampliado seu uso na prática da citopatologia dos nódulos da tireoide, junto ao exame de imagem, para decidir quando o procedimento cirúrgico deverá ser feito.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Câncer de tireoide [Internet]. INCA – Instituto Nacional do Câncer. 2022 [Citado em 2 de setembro de 2022]. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/tireoide>.
2. Cibas ES et al. The 2017 Bethesda system for reporting thyroid cytopathology. *Thyroid*. 27(11):1341-6, 2017
3. Santos MTD. Molecular Classification of Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: Development and Validation of a Highly Sensitive and Specific New miRNA-Based Classifier Test Using Fine-Needle Aspiration Smear Slides. *Thyroid*. 2018; 28(12):1618-1626.
4. Abdelhakam DA et al. Impact of a genomic classifier on indeterminate thyroid nodules: an institutional experience. *Journal of the American Society of Cytopathology*. 2021; 10: 155-163.
5. Ohori NP et al. A decade into thyroid molecular testing: where do we stand?. *Journal of the American Society of Cytopathology*. 2022; 11(2): 59-61.
6. Roth MY, Witt RL, Steward DL. Molecular testing for thyroid nodules: Review and current state. *Cancer*. 2018; 124(5):888-898.
7. Mitchell J. Decision Making in Indeterminate Thyroid Nodules and the Role of Molecular Testing. *Surgical Clinics*. 2019; 99: 587–598.
8. Young NA. An academic community hospital experience using commercially available molecular testing in the management of indeterminate thyroid nodules. *Journal of the American Society of Cytopathology*. 2018; 7: 92-98.
9. González HE, Martínez JR, Vargas-Salas S et al. A 10-Gene Classifier for Indeterminate Thyroid Nodules: Development and Multicenter Accuracy Study. *Thyroid*. 2017;27(8):1058-1067.

10. Ohori NP. Molecular testing and thyroid nodule management in North America. *Gland Surg.* 2020; 9(5):1628-1638.
11. Lee E. Diagnostic performance of the second-generation molecular tests in the assessment of indeterminate thyroid nodules: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery.* 2022; 43: 103394.
12. Ontario Health. Molecular testing for thyroid nodules of indeterminate cytology: a health technology assessment. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2022; 4 (2):1–111.
13. Hu QL. Cost analysis of reflexive versus selective molecular testing for indeterminate thyroid nodules. *Surgery.* 2022; 171: 147-154.
14. Mayson SE. Molecular Diagnostic Evaluation of Thyroid Nodules. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2019; 48: 85–97.
15. Belovarac B. Evaluation of ACR TI-RADS cytologically indeterminate thyroid nodules and molecular profiles: a single-institutional experience. *Journal of the American Society of Cytopathology.* 2022; 11: 165-172.
16. Khan TM, Zeiger MA. Thyroid Nodule Molecular Testing: Is It Ready for Prime Time? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020; 11:590128.
17. Angell TE. Getting more out of molecular testing for indeterminate thyroid nodules. *Cancer Cytopathology.* 2019; 127: 555-556.
18. Schumm MA, Nguyen DT, Kim J et al. Longitudinal Assessment of Quality of Life Following Molecular Testing for Indeterminate Thyroid Nodules. *Ann Surg Oncol.* 2021; 28: 8872–8881.
19. Scola WH. Molecular Testing Has Limited Utility in the Surgical Evaluation of Bethesda III Thyroid Nodules. *Journal of Surgical Research.* 2021; 12(268): 209–213.

20. Williams MD. Preoperative Molecular Testing of Thyroid Nodules Current Concepts. *Neuroimag Clin N Am*. 2021; 31: 301–312.
21. Rossi ED, Pantanowitz L, Faquin WC. The Role of Molecular Testing for the Indeterminate Thyroid FNA. *Genes (Basel)*. 2019; 10(10):736.
22. Vance J, Gilani SM. Thyroid cytopathology: updates and molecular testing. *Pathologica*. 2019; 111(2):51-57.
23. Babazadeh NT. Thyroid nodule molecular profiling: The clinical utility of Afirma Xpression Atlas for nodules with Afirma Genomic Sequencing Classifier Suspicious results. *Surgery*. 2022; 171: 155-159.
24. Kant R. Thyroid Nodules: Advances in Evaluation and Management. *American Family Physician*. 2020; 102(5):298-304.
25. Nishino M, Nikiforova M. Update on Molecular Testing for Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(4):446-457.
26. Hier J, Avior G, Pusztaszeri M et al. Molecular testing for cytologically suspicious and malignant (Bethesda V and VI) thyroid nodules to optimize the extent of surgical intervention: a retrospective chart review. *J of Otolaryngol - Head & Neck Surg*. 2021; 50: 29.