

ARTÍCULO DE REVISIÓN

CÓMO MEJORAR LA PRECISIÓN DE LOS DIAGNÓSTICOS I Y III DEL SISTEMA BETHESDA

How to improve the precision of Bethesda System diagnostic categories I and III

Marta RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; Cristina GONZÁLEZ-VELASCO; María Asunción GÓMEZ-MUÑOZ; José María SAYAGUÉS-MANZANO; María Dolores LUDEÑA-DE-LA-CRUZ

Servicio de Anatomía Patológica. Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. España

Correspondencia: marta_rg@usal.es

Fecha de recepción: 30 de octubre de 2020

Fecha de aceptación: 11 de noviembre de 2020

Fecha de publicación: 13 de octubre de 2020

Fecha de publicación del fascículo: 1 de diciembre de 2021

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de intereses

Imágenes: Los autores declaran haber obtenido las imágenes con el permiso de los pacientes

Política de derechos y autoarchivo: se permite el autoarchivo de la versión post-print (SHERPA/RoMEO)

Licencia CC BY-NC-ND. Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional

Universidad de Salamanca. Su comercialización está sujeta al permiso del editor

RESUMEN: Introducción y objetivo: La punción aspiración con aguja fina es el método de elección para el diagnóstico del nódulo tiroideo, permitiendo discriminar entre lesiones malignas y benignas en un alto porcentaje de pacientes. Sin embargo, las categorías diagnósticas I (No diagnóstico o insatisfactorio) y III (Atipia o Lesión folicular de Significado Incierto) del Sistema Bethesda suponen un reto en el manejo de los nódulos tiroideos. El objetivo del presente trabajo es exponer las opciones de que se disponen en el momento actual para intentar incrementar la rentabilidad de estos diagnósticos. Síntesis: En primer lugar, el abordaje multidisciplinar de los casos, la posibilidad de seguimiento, la repetición de la punción aspiración, la complementación del diagnóstico incorporando técnicas inmunohistoquímicas o moleculares, y finalmente la posibilidad de realizar una biopsiacilindro. Conclusiones: Estas alternativas son especialmente útiles en la categoría diagnóstica III, mientras que se prefiere la opción de seguimiento o repetición de PAAF en la categoría diagnóstica I.

PALABRAS CLAVE: tiroides; punción; sistema bethesda; molecular; biopsiacilindro; PAAF

SUMMARY: Introduction and objective: Fine-needle aspiration (FNA) has a primary role in the diagnosis of thyroid nodules. FNA allows us to differentiate benign lesions from malignant ones in most of the cases. However, management of Bethesda System diagnostic categories I (Nondiagnostic or Unsatisfactory) and III (Atypia of Undetermined Significance or Follicular Lesion of Undetermined Significance) are a clinical challenge. The aim of this work is to expose the options we have to improve the diagnosis of those categories using a multidisciplinary approach, an active follow-up, repeating FNA, applying immunohistochemical and/or molecular techniques or even perform a core needle biopsy. **Synthesis:**

Conclusions: Some or all of these choices are especially useful to identify category III, but active follow-up or additional FNA are preferred to detect category I.

KEYWORDS: thyroid; fine-needle; bethesda system; molecular; core-biopsy; FNA

INTRODUCCIÓN

El nódulo tiroideo es un hallazgo relativamente frecuente en nuestro medio, detectándose en casi el 50% de los pacientes por encima de los 60 años cuando se emplean técnicas ecográficas y en el 5% mediante palpación [1, 2]. Representa una gran variedad de condiciones, que van desde una hiperplasia nodular hasta un carcinoma. La incidencia del cáncer tiroideo se ha triplicado en las últimas cuatro décadas en los países desarrollados [3, 4], sin embargo, su mortalidad apenas ha variado [4], con lo que cada vez se diagnostican y sobretratan una mayor cantidad de lesiones de bajo riesgo, lo que conlleva un sobre coste y efectos secundarios para los pacientes [1].

El nódulo tiroideo constituye la principal indicación de la punción aspiración con aguja fina de tiroides (PAAF), un método mínimamente invasivo [5, 6]. Desde los años 80 en que se extendió su uso, la PAAF ha demostrado ser un método seguro y económico [7, 8]. En 2010, se publicó la primera guía de consenso para informar la citología tiroidea, el Sistema Bethesda [9], que estandarizó el informe citológico de la PAAF de tiroides en seis grupos estratificados por el riesgo de malignidad. Una nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) [10] para los tumores endocrinos y la incorporación paulatina a la rutina hospitalaria

de las técnicas moleculares han posibilitado una nueva edición en 2017 [11]. En esta guía se recogen unos criterios que facilitan enormemente la comunicación entre todos los profesionales implicados en el manejo del nódulo tiroideo, permitiendo integrar los datos clínicos, radiológicos y anatomopatológicos en la interpretación de las muestras, y ofreciendo un manejo clínico sensato del paciente [11].

El sistema Bethesda define como muestra adecuada para estudio aquella que contiene al menos 6 grupos de células foliculares bien visualizadas de, al menos, 10 células cada uno. No obstante, marca tres excepciones: i) cualquier atipia citológica significativa adecúa la muestra, ii) la presencia de material coloide abundante en un nódulo clasificado radiológicamente como coloide; finalmente, iii) en un nódulo sólido con un frotis inflamatorio (tiroiditis linfocitaria, material abscesificado o granulomas) no requiere de un mínimo de celularidad folicular. Por el contrario, los casos no diagnósticos serían aquellos con menos de 6 grupos de 10 células foliculares bien preservadas y teñidas, muestras mal preparadas o teñidas, o con abundante hemorragia o coloide que impiden la evaluación de la celularidad epitelial. Y, por último, aquellas que consisten en material quístico, con o sin histiocitos, con menos de la celularidad folicular adecuada. Estos ejemplos definirían la categoría I del sistema Bethesda (no diagnóstico o insatisfactorio).

En cuanto a la categoría III del Sistema Bethesda (atipia o lesión folicular de significado incierto), comprende un grupo heterogéneo de lesiones. Se reserva para aquellas muestras que tienen ciertas irregularidades arquitecturales o citológicas mayores a lo que se espera de una muestra benigna o reactiva, pero que al mismo tiempo son insuficientes para ser clasificadas como lesiones sospechosas o malignas [11]. Incluye 6 subapartados que tratan de cubrir todo el espectro de hallazgos citológicos y su interpretación en el contexto clínico radiológico del paciente. El primero clasifica la atipia citológica en la que no podríamos descartar la presencia de un carcinoma papilar. Comprende cuatro supuestos, el primero sería encontrar cambios focales en un aspirado benigno en su mayoría. El segundo, tener en la mayoría de las células de la muestra núcleos levemente alargados, con cromatina pálida e irregularidades focales de la membrana nuclear. En tercer lugar, encontrar células que tapizan quistes de aspecto atípico (núcleo y citoplasma aumentados de tamaño, hendiduras nucleares, nucléolo prominente, y de forma excepcional pseudoinclusiones intranucleares) en una muestra predominantemente benigna. En cuarto lugar, identificar las células «histiocitoides», características del carcinoma papilar quístico. Suelen ser difíciles de reconocer y se acompañan de histiocitos y células foliculares benignas, lo cual, dificulta aún más su identificación. Con frecuencia tienen un núcleo redondeado, con alta relación núcleo/citoplasma y un citoplasma denso, sin vacuolas o hemosiderina intracitoplasmática, más típico de los histiocitos. En el siguiente subapartado se describe la atipia arquitectural definida por la presencia de superposición celular significativa o microfoliculos con escaso coloide. Se considera microfoliculo a un grupo tridimensional circular (o dos tercios de la esfera) de no más de 15 células foliculares. Pueden darse en dos situaciones, siendo predominantes en un frotis escasamente celular, o bien, focalmente prominentes con atipia mínima, en una muestra moderada o marcadamente celular, en

la que dominan las células o los grupos foliculares benignos. Estos hallazgos plantearían el diagnóstico diferencial con la categoría IV, neoplasia folicular o sospecha de neoplasia folicular. Además, es posible encontrar en un aspirado atipias arquitectural y citológica leves juntas, que se podrían corresponder con la neoplasia folicular tiroidea no invasiva con características nucleares de carcinoma papilar o NIFTP por sus siglas en inglés. Aunque este tercer subapartado aún está en revisión, dada la reciente incorporación de NIFTP a la última clasificación de la OMS [10].

El cuarto subapartado corresponde con la presencia de las células de Hürthle en el aspirado, encontrándose escasas células oncocíticas en el frotis, o bien, en un aspirado moderado o marcadamente celular en un contexto clínico radiológico que sugiera benignidad (tiroiditis linfocitaria autoinmune o bocio multinodular).

La presencia aislada de células foliculares con núcleos agrandados, generalmente con nucléolo prominente, se suelen ver en pacientes con historia de tratamientos con yodo radioactivo u otros fármacos; los cuerpos de psamoma sin células de carcinoma papilar que los acompañen; o simplemente células atípicas que no podemos clasificar en ninguno de los apartados anteriores ni cumplen criterios de otra categoría, compondrían el quinto subapartado.

Por último, en sexto lugar, la presencia de células linfoides atípicas, cuando el grado de atipia no es suficiente para alcanzar la categoría V, nos obligaría a descartar un linfoma.

El riesgo de malignidad para la categoría I es bajo, (entre el 5 y el 10% de los casos, dependiendo de los hallazgos radiológicos) [12, 13], mientras que para la categoría III es ligeramente más elevado, 1030% [11], no obstante éste varía dependiendo de las subcategorías, dado que es una categoría muy heterogénea desde el punto de vista citológico [14–17]. Estas categorías, en especial la III, plantean un desafío en cuanto al manejo clínico, pues algunos de los pacientes son sometidos a una cirugía diagnóstica, generalmente lobectomía,

previa punción o no, cuando realmente no la necesitan [5, 18–20]. Este planteamiento subóptimo nos lleva a buscar nuevas estrategias que guíen la actitud terapéutica, evitando un trauma para el paciente y reduciendo el gasto sanitario que esto supone [1].

En la actualidad, las opciones que tenemos para evitar cirugías innecesarias serían en primer lugar valorar los hallazgos anatomopatológicos en el contexto clínicoradiológico del paciente, información de la que, por lo general, no suele disponer el patólogo en el momento de realizar el informe. En este sentido, el valor clínico de un frotis constituido exclusivamente por células oncocíticas no es igual en un paciente con una tiroiditis autoinmune que en un paciente con una orientación radiológica de TIRADS 5. De ahí la importancia de los comités multidisciplinares [5, 11]. Otra alternativa interesante podría ser la repetición de la punción tal y como recomienda el propio Sistema Bethesda [5], tanto para la categoría I [21–23], salvo que la imagen radiológica sea completamente quística, como para la categoría III. Dado el riesgo de malignidad de la categoría III [24], la guía de la *American Thyroid Association* (ATA) [5, 25] recomienda un manejo conservador de estas lesiones, bien repitiendo la PAAF o con test moleculares. Entre el 10 y el 30% de los nódulos son clasificados nuevamente como categoría III tras una segunda punción [26, 27], pacientes en los que se puede evitar una lobectomía diagnóstica. Teniendo siempre la opción de seguimiento radiológico en ambas categorías, y en el caso de un cambio significativo en las características del nódulo debemos realizar una nueva PAAF [5, 11].

La inmunohistoquímica (IHQ) ha resultado ser una técnica útil y relativamente barata para el diagnóstico y tratamiento de multitud de patologías, incluidas las lesiones endocrinas. No obstante, hoy en día aún no hemos encontrado ningún marcador inmunohistoquímico que nos permita discriminar por sí solo entre lesiones benignas y malignas. No obstante, la literatura muestra que la

expresión de la ciclina D1 y BRAF podría ayudar en la orientación clínica de las muestras citológicas equívocas o indeterminadas, en pacientes clasificados dentro de la categoría III. Cyclina D1 es un regulador del ciclo celular, actúa promoviendo el paso de la célula de la fase G1 a S, y está sobrepresado en distintos tipos de neoplasias, entre ellos el carcinoma papilar de tiroides [28–32]. En este sentido, se considera positiva la tinción nuclear como marcador subrogado de su acúmulo en el núcleo. Más aún, autores como Teshima *et al.* [33] han propuesto un algoritmo en el que la positividad inmunocitoquímica para ciclina D1 en extendidos citológicos seleccionaría pacientes sobre los que realizar un estudio mutacional de un panel de genes específicos, discriminando adenomas y subtipos malignos de lesiones foliculares, del tejido tiroideo benigno y de la hiperplasia nodular, en las cuales la expresión es negativa.

La mutación de BRAF está presente en el 80% de los carcinomas papilares de tiroides esporádicos (10, 34), consistiendo en un 98% [10] en una sustitución de una adenina por una timina en la posición 1799 (c.T1799>A), lo que conlleva un cambio de una valina por ácido glutámico en el codón 600 (p.V600E). Esta mutación puede ser detectada por el anticuerpo monoclonal anti-BRAF V600E (clon VE1) con una sensibilidad y especificidad superiores al 95% en muestras histológicas de carcinoma papilar primario y metastásico [35–38]. También se ha demostrado el alto valor predictivo de la presencia de la mutación V600E de BRAF en distintos tipos de muestras citológicas tanto en bloques celulares [39], como en citología en medio líquido [40, 41]. Sin embargo, otros autores han observado que este clon tiene una alta tasa de falsos positivos en muestras clasificadas como benignas e indeterminadas [41].

En los últimos años, se han publicado multitud de artículos que han propuesto como alternativa la configuración de distintos paneles de anticuerpos que ayuden a discriminar entre lesiones de alto y bajo riesgo ante una muestra citológica ambigua.

Saggiorato *et al.* [42] sugirieron que la mejor combinación podría ser Galectina-3 (Gal-3), HBME1 y CK19, los tres anticuerpos con expresión citoplasmática. Gal-3 es un polipéptido con un papel importante en la interacción de la célula con otras células y con la matriz extracelular, la organización de esta, el crecimiento celular y la apoptosis, la transformación neoplásica y la capacidad metastásica [43]. Utilizado conjuntamente a HMBE-1, tienen una alta especificidad. Sin embargo, Gal-3 también puede ser positivo en la tiroiditis y en la hiperplasia [42, 44]. HBME-1 es un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de los microvillios de la superficie de las células mesoteliales, que ha resultado positivo en las neoplasias malignas del tiroides, mientras que es negativo en las lesiones benignas [42, 45]. Finalmente, la CK19 es una citoqueratina de bajo peso molecular expresada intensa y ampliamente en el carcinoma papilar de tiroides, mientras que lo hace de forma heterogénea en el carcinoma folicular, y en los adenomas no se expresa o lo hace de forma focal [46–48]. Saggiorato *et al.* [42] utilizaron bloques celulares de punción y un algoritmo en el que se realizaría inicialmente la determinación de Gal-3 seguida de HBME1 para muestras no oncocíticas o CK19 en el caso de celularidad oncocítica. Saleh *et al.* [49] también propone que la mejor combinación para complementar el diagnóstico de la PAAF es Gal-3 y HBME-1, sobre todo en lesiones con patrón folicular.

Otro de los paneles incluye estos mismos marcadores (Gal-3, HBME1 y CK19) a los que se añade CD56. CD56 es una glicoproteína de superficie expresada de forma constitucional en las células foliculares del tiroides, que mantiene su expresión en la mayoría de las lesiones benignas, pero disminuye/desaparece en los tumores tiroideos malignos, especialmente en el carcinoma papilar [50, 51]. Esta propuesta de Song *et al.* [52] compara muestras pareadas de PAAF y biopsia cilindro con aguja gruesa (BAG) obteniendo buenos resultados. No obstante, este estudio muestra algunas limitaciones

importantes como el número desproporcionado de BAG, 80, frente a 21 muestras de PAAF. Además, dada la escasez de material de la PAAF no se realizaron todos los anticuerpos en todas las muestras de punción. La inclusión de CD56 en los paneles de anticuerpos para discriminar benignidad y malignidad en los nódulos tiroideos fue propuesta también por Bizarro *et al.* [53]. En este caso se combina CD56 con HBME-1 y Gal-3 y en los que se utilizan muestras de extensión y bloque celular. Otros autores, proponen HBME-1 o CK19, en combinación con Ki67 en 61 muestras procesadas en medio líquido. Ki67 es un antígeno nuclear expresado en las células que se encuentran proliferando y MIB-1 es el anticuerpo monoclonal frente algunas partes recombinantes de Ki67 [54]. Los estudios publicados que exploran el valor de MIB-1 en muestras de PAAF de distintas lesiones tiroideas han demostrado resultados contradictorios y poco comparables y sin llegar a un consenso ni en los puntos de corte para la positividad ni para el número mínimo de células requeridas para contabilizarlo [55, 56].

Si bien es cierto que el uso de algunos de estos anticuerpos en muestras histológicas dudosas ha ayudado al patólogo a identificar criterios morfológicos para el correcto diagnóstico, esto no ocurre en muestras de punción. En este sentido, es difícil elegir cuales de estos marcadores debemos priorizar, dado que la mayoría de los trabajos publicados analizan muestras de PAAF pequeñas, subdivididas en multitud de patologías tiroideas, con pocos casos en cada uno de los grupos, difícilmente comparables. Además, es habitual que en la rutina clínica el material de punción sea escaso y no permita realizar si quiera, un marcador de confirmación y otro de exclusión.

En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de las alteraciones genéticas presentes en los diferentes subtipos de neoplasias malignas tiroideas [57], permitiendo el desarrollo de paneles dirigidos a la patología tiroidea [2, 58, 59]. Además, el progreso de las

técnicas de biología molecular en la última década ha permitido analizar un número importante de alteraciones genéticas de forma simultánea en muestras con escaso material, o con una proporción relativamente baja de células tumorales, como ocurre en la categoría III del Sistema Bethesda. Así, se han diseñado distintos paneles comerciales y la *American Thyroid Association* (ATA) en su guía de 2015 propone utilizar las determinaciones moleculares en las citologías con resultado indeterminado [25]. Algunas de estas determinaciones (Tabla 1) analizan la expresión de ciertos marcadores mediante el estudio del mRNA, como es el caso de Afirma (Veracyte, South San Francisco, Ca, USA) [60–62]. Para ello, utilizan *microarrays* de RNA en dos pasos secuenciales, inicialmente estudian 25 genes para seleccionar los nódulos que puedan ser analizados con éxito en un segundo panel de más amplio (142 alteraciones genéticas). Este es un análisis de exclusión o «ruleout» [59]. La mayoría de los paneles del mercado son de inclusión o

rulein como *RosettaGX Reveal* (*Rosetta Genomics Company, Philadelphia, PA, USA*), *ThyraMIR Test* y *ThyGeNEXT* (*Interpace Diagnostic Group Inc., Parsippany, NJ, USA*) [2, 59] o *ThyroSeq v.3* (*CBLPath Inc, Ry Brook, NY, Usa*) [59, 63, 64]. Además de discriminar entre lesiones foliculares de bajo y alto riesgo, *ThyGeNEXT* y *ThyroSeq* permiten detectar alteraciones moleculares secundarias relacionadas con la agresividad y progresión del tumor [1, 2, 58, 59, 64]. Todos estos tests comerciales [33, 65] son una herramienta poderosa que permiten individualizar el riesgo, evitar el sobretratamiento de los pacientes y manejar correctamente a los pacientes desde el punto de vista quirúrgico. No obstante, tienen un coste elevado que hace difícil su consolidación como herramienta de uso hospitalario en la práctica habitual dentro de un sistema sanitario público.

Por último, tenemos la opción de la biopsia con aguja gruesa (BAG) para resolver algunas de las dudas planteadas por una PAAF con categoría I y

Tabla 1. Test moleculares disponibles para aspirados indeterminados. Modificado de Partyka *et al.* (2)

	Afirma Gene Sequencing Classifier	Thy Ge NEXT		Thyra MIR	Rosetta GX Reveal	Thyro Seq v3
Compañía	Veracyte, Inc.	Interpace Diagnostics Group, Inc			Rosetta Genomics	UMPC and SONIC Healthcare USA
Método	Expresión génica, mRNA	Panel de oncogenes		Expresión miARN	Expresión miARN	Panel de oncogenes
Dianas moleculares	167 genes (Afirma GEC (<i>proprietary algorithm</i>) + (MTC, BRAF, RET/PTC1, RET/PTC3	Mutaciones DNA	BRAF, KRAS, HRAS, NRAS, GNAS, ALK, PTEN, RET, PIK3CA, TERT	10 miARNs (<i>proprietary algorithm</i>)	24 miARNs	112 oncogenes
		Traslocaciones / fusiones	ALK (2), BRAF (2), NTRK (8), RET (14), PPASRγ (6), THADA (5)			
Material para la determinación	2 pases de PAAF	1 pase de PAAF adicional (al menos 50ng de material celular) Tejido fijado en parafina Preparaciones citológicas en Thin Prep Extensiones celulares teñidas			Extensiones celulares teñidas con Diff-Quick, Giemsa o Papanicolau	Extensiones celulares Tejido fijado en formol incluido en parafina Tejido fresco y congelado

una alta sospecha clínico radiológica, y en algunos subapartados de la categoría III. Actualmente, tiene muy bajo riesgo de sangrado, su principal complicación y es bien tolerada [66, 67], su coste es menor que el de realizar una intervención quirúrgica [66, 68], y la ATA reconoce que la BAG es una estrategia válida tras una punción no concluyente [25]. Al aportar un cilindro de tejido, las BAG ofrecen más información sobre la arquitectura o detalles nucleares o citoplasmáticos que pueden no estar bien representados en la PAAF como ya se ha comentado anteriormente. Además, se pueden realizar, por lo general, múltiples estudios inmunohistoquímicos para orientar o complementar los diagnósticos más complejos. Se obtiene la mayor rentabilidad en los diagnósticos de carcinomas papilar, medular, indiferenciados y desdiferenciados, así como en los linfomas y ganglios metastásicos, aportando información diagnóstica y pronóstica que puede influenciar el manejo del paciente [25, 69, 70]. Dado la dificultad de diferenciar entre hiperplasia nodular y lesiones foliculares, y entre carcinoma y adenoma folicular, hasta un 36% de las BAG pueden no ser diagnósticos tras una PAAF indeterminada [26, 68, 71].

CONCLUSIONES

La PAAF es el procedimiento de elección en el diagnóstico del nódulo tiroideo, discriminando entre lesiones benignas y malignas en un alto porcentaje de los casos. No obstante, actualmente disponemos de varias estrategias para incrementar su rentabilidad diagnóstica en los casos indeterminados. Mientras que, en los casos insuficientes o no satisfactorios, se recomienda una actitud de vigilancia, dependiendo de los datos radiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nikiforov YE. Role of molecular markers in thyroid nodule management: Then and now. *Endocr Pract.* 2017;23(8):979–88.
2. Partyka KL, Trevino K, Randolph ML, Cramer H, Wu HH. Risk of malignancy and neoplasia predicted by three molecular testing platforms in indeterminate thyroid nodules on fineneedle aspiration. *Diagn Cytopathol.* 2019;47(9):853–62.
3. Pellegriti G, Frasca F, Regalbutto C, Squatrito S, Vigneri R. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *J Cancer Epidemiol [Internet].* 2013 [cited 2020 Oct 4];2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/965212>
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin [Internet].* 2018 Nov 1 [cited 2020 Oct 28];68(6):394–424. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21492>
5. Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, *et al.* 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;22(May):1–60.
6. Baloch ZW, Cibas ES, Clark DP, Layfield LJ, Ljung BM, Pitman MB, *et al.* The National Cancer Institute Thyroid fine needle aspiration state of the science conference: A summation. *Cytojournal.* 2008;5:1–17.
7. Nguyen GK, Lee MW, Ginsberg J, Wragg T, Bilo-deau D. Fineneedle aspiration of the thyroid: An overview. *Cytojournal.* 2005;2:1–13.
8. Cha YJ, Pyo JY, Hong SW, Seok JY, Kim KJ, Han JY, *et al.* Thyroid fineneedle aspiration cytology practice in Korea. *J Pathol Transl Med.* 2017;51(6):521–7.
9. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2009; 132:658–665.
10. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of endocrine organs [Internet]. [cited 2020 Oct 28]. 355 p. Available from: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/>

- Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Endocrine-Organs-2017
11. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid* [Internet]. 2017 [cited 2020 Oct 28];27(11):1341–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29091573>
 12. Bongiovanni M, Spitale A, Faquin WC, Mazzucchelli L, Baloch ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta Cytol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 28];56(4):333–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22846422>
 13. Coorough N, Hudak K, Jaume JC, Buehler D, Selvaggi S, Rivas J, *et al.* Nondiagnostic fine-needle aspirations of the thyroid: Is the risk of malignancy higher? *J Surg Res* [Internet]. 2013;184(2):746–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.018>
 14. Hong S-H, Lee H, Cho M-S, Lee JE, Sung Y-A, Hong YS. Malignancy Risk and Related Factors of Atypia of Undetermined Significance/Follicular Lesion of Undetermined Significance in Thyroid Fine Needle Aspiration. 2018 [cited 2020 Oct 29]; Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4521984>
 15. Nishino M, Wang HH. Should the thyroid AUS/FLUS category be further stratified by malignancy risk? *Cancer Cytopathol*. 2014;122(7):481–3.
 16. Olson MT, Clark DP, Erozan YS, Ali SZ. Spectrum of risk of malignancy in subcategories of «atypia of undetermined significance.» *Acta Cytol*. 2011;55(6):518–25.
 17. Jae Ryu Y, Seung Jung Y, Chul Yoon H, Jung Hwang M, Hyoung Shin S, Seong Cho J, *et al.* Atypia of undetermined significance on thyroid fine needle aspiration: surgical outcome and risk factors for malignancy. *Ann Surg Treat Res* [Internet]. [cited 2020 Oct 29];109. Available from: <http://dx.doi.org/10.4174/astr>
 18. Gopalakrishna Iyer N, Shaha AR. Management of Thyroid Nodules and Surgery for Differentiated Thyroid Cancer. [cited 2020 Oct 29]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4806860/pdf/nihms508330.pdf>
 19. Dincer N, Balci S, Yazgan A, Guney G, Ersoy R, Cakir B, *et al.* Follow-up of atypia and follicular lesions of undetermined significance in thyroid fine needle aspiration cytology. *Cytopathology*. 2013;24(6):385–90.
 20. Sosa JA, Hanna JW, Robinson KA, Lanman RB. Increases in thyroid nodule fine-needle aspirations, operations, and diagnoses of thyroid cancer in the United States. *Surg (United States)* [Internet]. 2013;154(6):1420–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.surg.2013.07.006>
 21. Saieg MA, Barbosa B, Nishi J, Ferrari A, Costa F. The impact of repeat FNA in non-diagnostic and indeterminate thyroid nodules: A 5-year single-centre experience. *Cytopathology*. 2018;29(2):196–200.
 22. Lubitz CC, Nagarkatti SS, Faquin WC, Samir AE, Hassan MC, Barbesino G, *et al.* Diagnostic yield of nondiagnostic thyroid nodules is not altered by timing of repeat biopsy. *Thyroid*. 2012;22(6):590–4.
 23. Deniwar A, Hammad ARY, Ali DB, Alsaleh N, Lahlouh M, Sholl AB, *et al.* Optimal timing for a repeat fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodule following an initial nondiagnostic fine-needle aspiration. *Am J Surg* [Internet]. 2017;213(2):433–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2016.04.010>
 24. Yang J, Recavarren RA, Houser PM. Potential pitfalls of needle tract effects on repeat thyroid fine-needle aspiration. *Cancer Cytopathol*. 2013;121(3):155–61.
 25. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, *et al.* 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016;26(1):1–133.
 26. Renshaw AA. Does a repeated benign aspirate change the risk of malignancy after an initial atypical thyroid fine-needle aspiration? *Am J Clin Pathol*. 2010;134(5):788–92.
 27. Vanderlaan PA, Marqusee E, Krane JF. Clinical outcome for atypia of undetermined significance

- in thyroid fine-needle aspirations: Should repeated FNA be the preferred initial approach? *Am J Clin Pathol*. 2011;135(5):770–5.
28. He Y, Franco OE, Jiang M, Williams K, Love HD, Coleman IM, *et al*. Tissue-specific consequences of cyclin D1 overexpression in prostate cancer progression. *Cancer Res*. 2007;67(17):8188–97.
29. Tong R, Yang Q, Wang C, Bi F, Jiang B. OVCA1 expression and its correlation with the expression levels of cyclin D1 and p16 in cervical cancer and intraepithelial neoplasia. *Oncol Lett* [Internet]. 2017 May [cited 2020 Oct 2];13(5):2929–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28521400>
30. Smalley KSM, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Eghazi S, *et al*. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2008 Sep [cited 2020 Oct 2];7(9):2876–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790768>
31. Temmim L, Ebraheem AK, Baker H, Sinowatz F. Cyclin D1 protein expression in human thyroid gland and thyroid cancer. *Anat Histol Embryol* [Internet]. 2006 Apr [cited 2020 Oct 2];35(2):125–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16542178>
32. Lantsov D, Meirmanov S, Nakashima M, Kondo H, Saenko V, Naruke Y, *et al*. Cyclin D1 overexpression in thyroid papillary microcarcinoma: its association with tumour size and aberrant beta-catenin expression. *Histopathology* [Internet]. 2005 Sep [cited 2020 Oct 2];47(3):248–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115225>
33. Teshima M, Tokita K, Ryo E, Matsumoto F, Kondo M, Ikegami Y, *et al*. Clinical impact of a cytological screening system using cyclin D1 immunostaining and genomic analysis for the diagnosis of thyroid nodules. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–10.
34. Agrawal N, Akbani R, Aksoy A, Ally A, Arachchi H, Asa SL, *et al*. NIH Public Access Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid. *Cell*. 2015;159(3):676–90.
35. Bullock M, O'Neill C, Chou A, Clarkson A, Dodds T, Toon C, *et al*. Utilization of a MAB for BRAFV600E detection in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(6):779–84.
36. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, *et al*. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol*. 2011;122(1):11–9.
37. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wöhrer A, Hackl M, *et al*. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2020 Oct 2];123(2):223–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22012135>
38. Koperek O, Kornauth C, Capper D, Berghoff AS, Asari R, Niederle B, *et al*. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E-mutated protein in papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2012 Jun [cited 2020 Oct 2];36(6):844–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22592144>
39. Zimmermann AK, Camenisch U, Rechsteiner MP, Bode-Lesniewska B, Rössle M. Value of immunohistochemistry in the detection of BRAFV600E mutations in fine-needle aspiration biopsies of papillary thyroid carcinoma. *Cancer Cytopathol*. 2014;122(1):48–58.
40. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Straccia P, Angrisani B, *et al*. Analysis of immunocytochemical and molecular BRAF expression in thyroid carcinomas: a cytohistologic institutional experience. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2014 Jul [cited 2020 Oct 2];122(7):527–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24639117>
41. Lee S-R, Yim H, Han JH, Lee KB, Lee J, Soh EY, *et al*. VE1 antibody is not highly specific for the BRAF V600E mutation in thyroid cytology categories with the exception of malignant cases. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 2015 Mar [cited 2020 Oct 2];143(3):437–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25696803>
42. Saggiorato E, De Pompa R, Volante M, Cappia S, Arecco F, Dei Tos AP, *et al*. Characterization of thyroid «follicular neoplasms» in fine-needle

- aspiration cytological specimens using a panel of immunohistochemical markers: A proposal for clinical application. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):305–17.
43. Yang RY, Liu FT. Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2003;60(2):267–76.
44. Trimboli P, Guidobaldi L, Amendola S, Nasrollah N, Romanelli F, Attanasio D, *et al*. Galectin-3 and HBME-1 improve the accuracy of core biopsy in indeterminate thyroid nodules. *Endocrine*. 2016;52(1):39–45.
45. Asa SL. The role of immunohistochemical markers in the diagnosis of follicular-patterned lesions of the thyroid. *Endocr Pathol [Internet]*. 2005 [cited 2020 Oct 2];16(4):295–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627917>
46. Schröder S, Wodzynski A, Padberg B. [Cytokeratin expression of benign and malignant epithelial thyroid gland tumors. An immunohistologic study of 154 neoplasms using 8 different monoclonal cytokeratin antibodies]. *Pathologe [Internet]*. 1996 Nov [cited 2020 Oct 29];17(6):425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082363>
47. Fonseca E, Nesland JM, Høie J, Sobrinho-Simões M. Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial-type cytokeratins. *Virchows Arch [Internet]*. 1997 Mar [cited 2020 Oct 29];430(3):239–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9099982>
48. Bose D, Das RN, Chatterjee U, Banerjee U. Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Indian J Med Paediatr Oncol [Internet]*. 2012 Apr [cited 2020 Oct 29];33(2):107–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22988353>
49. Saleh H, Feng J, Tabassum F, Al-Zohaili O, Husain M, Giorgadze T. Differential expression of galectin-3, CK19, HBME1, and Ret oncoprotein in the diagnosis of thyroid neoplasms by fine needle aspiration biopsy. *Cytojournal*. 2009;6:1–10.
50. Muthusamy S, Azhar Shah S, Abdullah Suhaimi SN, Kassim N, Mahasin M, Mohd Saleh MF, *et al*. CD56 expression in benign and malignant thyroid lesions. *Malays J Pathol*. 2018;40(2):111–9.
51. Yang A-H, Chen J-Y, Lee C-H, Chen J-Y. Expression of NCAM and OCIAD1 in well-differentiated thyroid carcinoma: correlation with the risk of distant metastasis. *J Clin Pathol [Internet]*. 2012 Mar 1 [cited 2020 Oct 2];65(3):206–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22081784>
52. Song S, Kim H, Ahn SH. Role of immunohistochemistry in fine needle aspiration and core needle biopsy of thyroid nodules. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2019;12(2):224–30.
53. Bizzarro T, Martini M, Marrocco C, D'Amato D, Traini E, Lombardi CP, *et al*. The role of CD56 in thyroid fine needle aspiration cytology: A pilot study performed on liquid based cytology. *PLoS One [Internet]*. 2015;10(7):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132939>
54. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, *et al*. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol [Internet]*. 1992 Dec [cited 2020 Oct 2];168(4):357–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1484317>
55. Mu N, Juhlin CC, Tani E, Sofiadis A, Reihné E, Zedenius J, *et al*. High Ki-67 index in fine needle aspiration cytology of follicular thyroid tumors is associated with increased risk of carcinoma. *Endocrine [Internet]*. 2018 Aug 23 [cited 2020 Oct 2];61(2):293–302. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12020-018-1627-z>
56. Sofiadis. Diagnostic and prognostic potential of MIB-1 proliferation index in thyroid fine needle aspiration biopsy. *Int J Oncol [Internet]*. 2009 Jun 26 [cited 2020 Oct 29]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/35/2/369>
57. Agrawal N, Akbani R, Aksoy BA, Ally A, Arachchi H, Asa SL, *et al*. Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell [Internet]*. 2014 Oct 23 [cited 2020 Oct 3];159(3):676–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867414012380>

58. Nikiforov YE, Steward DL, Carty SE, Sippel RS, Yang SP, Sosa JA, *et al.* Performance of a Multigene Genomic Classifier in Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology: A Prospective Blinded Multicenter Study. *JAMA Oncol.* 2019;5(2):204–12.
59. Macerola E, Basolo F. Current methodologies for molecular screening of thyroid nodules. *Gland Surg.* 2018;7(1):S1–7.
60. Baca SC, Wong KS, Strickland KC, Heller HT, Kim MI, Barletta JA, *et al.* Qualifiers of atypia in the cytologic diagnosis of thyroid nodules are associated with different Afirma gene expression classifier results and clinical outcomes. *Cancer Cytopathol.* 2017;125(5):313–22.
61. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, *et al.* Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med.* 2012;367(8):705–15.
62. Yang SE, Sullivan PS, Zhang J, Govind R, Levin MR, Rao JY, *et al.* Has Afirma gene expression classifier testing refined the indeterminate thyroid category in cytology? *Cancer Cytopathol.* 2016;124(2):100–9.
63. Steward DL, Carty SE, Sippel RS, Yang SP, Sosa JA, Sipsos JA, *et al.* Performance of a Multigene Genomic Classifier in Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *JAMA Oncol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2020 Oct 4];5(2):204. Available from: <http://oncology.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamaoncol.2018.4616>
64. Nikiforova MN, Mercurio S, Wald AI, Barbi de Moura M, Callenberg K, Santana-Santos L, *et al.* Analytical performance of the ThyroSeq v3 genomic classifier for cancer diagnosis in thyroid nodules. *Cancer.* 2018;124(8):1682–90.
65. Yip L, Wharry LI, Armstrong MJ, Silbermann A, McCoy KL, Stang MT, *et al.* A clinical algorithm for fine-needle aspiration molecular testing effectively guides the appropriate extent of initial thyroidectomy. *Ann Surg.* 2014;260(1):163–8.
66. Na DG, Baek JH, Jung SL, Kim JH, Sung JY, Kim KS, *et al.* Core needle biopsy of the thyroid: 2016 consensus statement and recommendations from Korean society of thyroid radiology. *Korean J Radiol.* 2017;18(1):217–37.
67. Novoa E, Gürtler N, Arnoux A, Kraft M. Role of ultrasound-guided core-needle biopsy in the assessment of head and neck lesions: A meta-analysis and systematic review of the literature. Eisele DW, editor. *Head Neck* [Internet]. 2012 Oct [cited 2020 Oct 29];34(10):1497–503. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.21821>
68. Yim Y, Baek JH. Core needle biopsy in the management of thyroid nodules with an indeterminate fine-needle aspiration report. *Gland Surg.* 2019;8(Suppl 2):S77–85.
69. 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. PMID: 24989897.70. Baek JH. Current status of core needle biopsy of the thyroid. *Ultrasonography.* 2017;36(2):83–5.
71. Park VY, Kim EK, Kwak JY, Yoon JH, Moon HJ. Malignancy risk and characteristics of thyroid nodules with two consecutive results of atypia of undetermined significance or follicular lesion of undetermined significance on cytology. *Eur Radiol.* 2015;25(9):2601–7.