



MASTER
EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA

IBGM
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
Y GENÉTICA MOLECULAR



Trabajo de Fin de Máster

**PREVALENCIA, EN CARCINOMAS
PAPILARES DE TIROIDES
METASTÁSICOS, DE MUTACIONES
SOMÁTICAS ACTIVANTES EN LA
REGIÓN PROMOTORA DE *TERT***

MIRIAM CORRALIZA GÓMEZ

DIRIGIDO POR DRA. GINESA GARCÍA-ROSTÁN

Septiembre de 2016

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. Conceptos básicos de Oncología	1
1.1. Mecanismos de alteración celular que conducen al cáncer	1
1.2. Clasificación	1
2. Carcinomas de tiroides	1
2.1. Histología del tiroides	2
2.2. Clasificación de los carcinomas de tiroides	2
2.3. Carcinomas papilares bien diferenciados de tiroides (PTCs)	3
2.3.1. Principales histotipos de carcinomas papilares de tiroides (PTCs)	3
2.4. Motivación del trabajo	3
3. Importancia de la región promotora de <i>TERT</i>	4
3.1. Regiones promotoras	4
3.2. Los telómeros y la telomerasa	4
3.3. La telomerasa y <i>TERT</i>	5
3.4. Características de las células cancerosas y relación con el promotor de <i>TERT</i>	5
3.4.1. Posible relación de mutaciones en <i>TERT</i> con otras alteraciones moleculares y características clínico-patológicas agresivas en carcinomas de tiroides	6

II. OBJETIVOS

Objetivos	7
-----------------	---

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño del estudio - Material Biológico	8
2. Métodos	10
2.1. Extracción de ADN genómico	10
2.2. Cuantificación y calidad del ADN genómico	11
a) Análisis espectrofotométrico en un NanoDrop	11
b) Electroforesis en gel de agarosa al 1%	11
2.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	12
2.3.1. Gradiente de optimización de la PCR	13
2.4. SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism)	14
2.5. Purificación de ADN	14
2.6. Secuenciación directa mediante el método de Sanger	16
2.7. Análisis estadístico	16

IV. RESULTADOS

1. Análisis de mutaciones en la región promotora de <i>TERT</i>	17
1.1. Carácter clonal o subclonal de las mutaciones C228T y C250T	17
1.2. Relación entre mutaciones en la región promotora de <i>TERT</i> y diseminación a ganglios linfáticos	17

1.3. Implicación de las mutaciones en el promotor de <i>TERT</i> en metástasis a distancia	19
2. Coexistencia de mutaciones en otros genes.....	19
3. Estudios de correlación clínico-patológicos-moleculares	21
3.1. Papel de las mutaciones de <i>TERT</i> en el curso clínico y supervivencia de los pacientes	21

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. Análisis de mutaciones en la región promotora de <i>TERT</i>	23
1.1. Carácter clonal o subclonal de las mutaciones C228T y C250T.	23
1.2. Relación entre mutaciones en la región promotora de <i>TERT</i> y diseminación a ganglios linfáticos	24
1.3. Implicación de las mutaciones en el promotor de <i>TERT</i> en metástasis a distancia	24
1.4. Asociación de las mutaciones de <i>TERT</i> con subtipos de carcinomas papilares	25
2. Coexistencia con otras alteraciones moleculares.....	25
3. Estudios de correlación clínico-patológicos-moleculares	26
3.1. Asociación a multifocalidad tumoral	26
3.2. Asociación con mayor riesgo de dediferenciación.....	26
3.3. Asociación con invasión y metástasis	26
3.4. Curso clínico y supervivencia	26
3.5. Cooperación con otras alteraciones en curso clínico desfavorable	27
4. Evaluación de <i>TERT</i> como biomarcador	27

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones.....	28
Perspectivas futuras.....	28

VII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía	29
--------------------	----

INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTOS BÁSICOS DE ONCOLOGÍA

El cáncer permanece como una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Las neoplasias, que pueden ser benignas o malignas, se caracterizan por una reproducción celular alterada y una proliferación excesiva de tejido que no sigue la organización de los tejidos adyacentes ni es regulada por el sistema inmune del individuo. A diferencia de las neoplasias benignas, el cáncer es la expresión fenotípica de la alteración genética de un grupo celular que induce la formación de la neoplasia debido a la pérdida de los mecanismos normales de apoptosis o muerte celular programada. Esta alteración determina que las células se vuelvan inmortales, proliferen de manera descontrolada, invadan otros tejidos y eventualmente implanten poblaciones celulares a distancia del tumor de origen –proceso conocido como metástasis–. Los mecanismos normales de control del organismo no logran controlar este conjunto de manifestaciones fenotípicas, las cuales, si quedan totalmente fuera de control, conducen a la muerte.

1.1. MECANISMOS DE ALTERACIÓN CELULAR QUE CONDUCEN AL CÁNCER

Se han descrito dos grandes mecanismos de alteración que conducen al cáncer, definido como una “enfermedad del genoma”: los oncogenes, que aceleran el crecimiento de la célula, y los genes supresores de tumores, que tienden a frenarlo. Cuando hay una mutación de dos o más de estos genes, se puede producir el cáncer. En la génesis del cáncer se describen dos procesos generales: la iniciación, causada por la mutación genética, y la progresión, con invasión de otros tejidos y metástasis a distancia.

Entre las principales alteraciones genéticas se encuentran amplificaciones, inserciones, deleciones, translocaciones, mutaciones sin sentido, de cambio de sentido o de cambio de la pauta de lectura, expresión aumentada del gen o disminución de la regulación del mismo. La teoría más aceptada plantea que un gen determinado sería modificado por un evento oncogénico (carcinógenos, virus, rayos UV, cambios epigenéticos...), y que este cambio produciría una alteración genética. La mayoría de las células dañadas se eliminan por el sistema de reparación normal del ADN, pero cuando este sistema falla la alteración se transmite como mutación a las células descendientes, las cuales adquieren propiedades tumorales específicas. Si las mutaciones no se reparan, su acumulación evita que los genes supresores inicien la apoptosis, de modo que la célula comienza a crecer fuera de control y se produce el daño precanceroso; se forma un tumor precoz y luego, después de muchas divisiones celulares, el tumor propiamente dicho. Este tumor puede adherirse a la lámina basal y causar su rotura, lo que da lugar al proceso de invasión y diseminación o metástasis^[1].

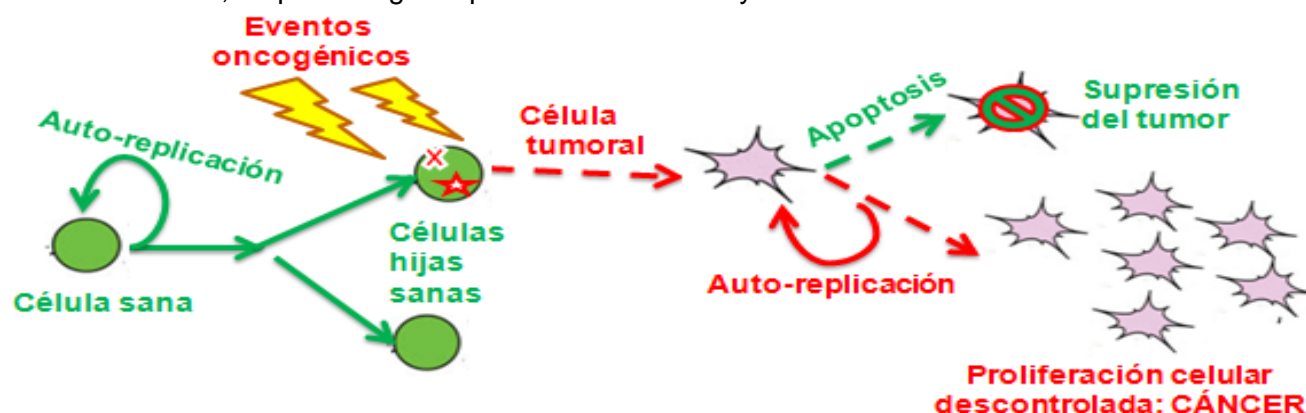


Figura 1. Esquema del proceso de iniciación del cáncer. Fuente: elaboración propia.

1.2. CLASIFICACIÓN

Para hablar un lenguaje internacional común, se han desarrollado distintos métodos de clasificación y etapificación de los tumores. En la actualidad, la localización anatómica sigue siendo la base y, en algunos tumores, se usa el grado de diferenciación histológica. La clasificación más difundida es la TNM, que se basa en el tamaño del tumor primario, la infiltración de ganglios linfáticos regionales y la presencia de metástasis^[2]. En el futuro, es probable que el pronóstico esté dado por los biomarcadores tumorales o secuencias de ADN indicadoras de un estado biológico.

2. CARCINOMAS DE TIROIDES

2.1. HISTOLOGÍA DEL TIROIDES

La glándula tiroides es el mayor órgano endocrino en humanos y se sitúa en el cuello, sobre la tráquea. Posee una estructura en lóbulos que están separados por tejido conectivo, por el cual transcurren los vasos sanguíneos, a los que se liberan las hormonas ya procesadas. Los lóbulos contienen a los folículos o unidades funcionales del tiroides, que están formados por las células foliculares, formando un epitelio simple cúbico, y por el coloide. Entre los folículos se encuentran otras células denominadas células C o parafoliculares. Las células foliculares son células epiteliales, y son responsables de la captación de yodo y la síntesis de hormonas tiroideas, T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina). Por su parte, las células C liberan calcitonina. El coloide ocupa el interior del folículo y está formado mayoritariamente por tiroglobulina, proteína producida por las propias células foliculares que sirve de precursor para la síntesis de las hormonas tiroideas T3 y T4^[3].

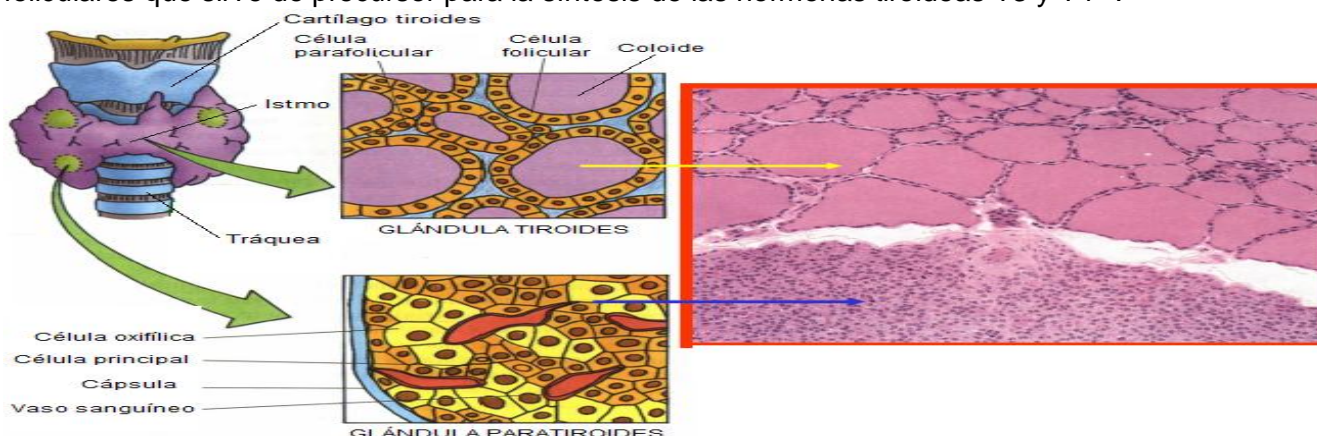


Figura 2. Histología general del tiroides. Fuente: adaptado de "Histología y Embriología del ser humano. Bases celulares y Moleculares", Eynard A.R., Valentich M.A. & Rovasio R.A. Ed. Médica Panamericana.

2.2. CLASIFICACIÓN DE LOS CARCINOMAS DE TIROIDES

Los nódulos del tiroides pueden ser nódulos hiperplásicos, adenomas benignos o lesiones malignas. Pueden derivar tanto de las células foliculares como de las células C. Atendiendo a sus características histológicas y citológicas, los carcinomas de tiroides se subdividen en dos grandes grupos^[4]:

- ❑ Carcinomas foliculares de tiroides, derivados del epitelio folicular. Este grupo representa más del 95% de los tumores de tiroides. Incluye los siguientes tipos histológicos:
 - Carcinomas tiroideos papilares (PTCs), son los más frecuentes (80-85%). Se trata de carcinomas bien diferenciados, con arquitectura papilar y rasgos nucleares característicos, con propensión a metástasis linfática. El 70% tienen buen pronóstico.
 - Carcinomas tiroideos foliculares (FTCs), representan el 5-10% de los cánceres de tiroides. Se trata de carcinomas bien diferenciados, hipercelulares, con patrones microfoliculares, invasión vascular o capsular y propensión a metástasis sanguínea. La supervivencia a los 10 años en los mínimamente invasivos es del 95% y en los ampliamente invasivos del 50%.
 - Carcinomas tiroideos pobremente diferenciados (PDTCs), constituyen el 5-10% del total de cánceres de tiroides. Son carcinomas poco diferenciados, que a menudo se solapan con PTC y FTC, con una agresividad intermedia. La supervivencia a los 5, 10 y 15 años es del 50%, 34% y 0% respectivamente.
 - Carcinomas tiroideos anaplásicos (ATCs), representan un 2-3% de los cánceres de tiroides. Se trata de carcinomas indiferenciados, que pueden ocurrir *de novo* o derivar de PTC, FTC o PDTC, y son extremadamente invasivos y metastásicos. Es un carcinoma altamente letal. El 95% fallecen en los 6 primeros meses desde el diagnóstico por compromiso de estructuras cervicales vitales.
- ❑ Carcinomas medulares de tiroides, derivados de las células C parafoliculares del tiroides. Este grupo de tumores en el tiroides es minoritario (3-5%). Presenta una agresividad moderada, pero alta propensión de metástasis linfática. Son de pronóstico variable.

La agresividad y letalidad de estos tumores se correlaciona inversamente con el grado de diferenciación de los mismos, de manera que los tumores bien diferenciados, los cuales incluyen tanto a los PTCs como a los FTCs, son los menos agresivos. Existen evidencias histopatogenéticas que revelan que carcinomas bien diferenciados, ya sean de histotipo papilar o de histotipo folicular, con un curso clínico *a priori* indolente o bueno, pueden progresar a carcinomas agresivos pobremente diferenciados o indiferenciados^[5].

2.3. CARCINOMAS PAPILARES BIEN DIFERENCIADOS DE TIROIDES (PTCs)

Los PTCs, los cuales constituyen el tipo de cáncer de tiroides más frecuente, son generalmente lesiones de curso clínico indolente, con baja tasa de crecimiento y escaso potencial metastásico vía sanguínea, que responden habitualmente a la cirugía asociada a tratamiento hormonal sustitutivo y al yodo radiactivo (I^{131}) y presentan un pronóstico favorable (más del 95% de supervivencia de los pacientes tras 10 años). Existe, sin embargo, un pequeño pero significativo porcentaje de PTCs (5-10%) que se comportan agresivamente, invaden localmente tejidos del cuello, recidivan frecuentemente, desarrollan metástasis a distancia y en muchos casos dejan de responder al yodo radiactivo^[6]. Por este motivo, se precisan urgentemente herramientas pronósticas más precisas para predecir la diseminación de estas lesiones a sitios distantes en las fases tempranas de diagnóstico.

Aunque en los últimos 25 años ha mejorado sustancialmente nuestro conocimiento sobre las bases moleculares del cáncer de tiroides de origen folicular, y muy en particular de las alteraciones genéticas que son relevantes en el desarrollo y comportamiento de los PTCs, siguen existiendo aspectos controvertidos en la patobiología de los carcinomas papilares. Los mecanismos bioquímico-moleculares que rigen la transformación de un PTC de curso indolente en un PTC de curso agresivo, la aparición de recurrencias durante el seguimiento del paciente y la adquisición por parte de las células del tumor primario de propiedades metastásicas no están claros, por lo que precisan ser investigados más en profundidad.

2.3.1. PRINCIPALES HISTOTIPOS DE CARCINOMAS PAPILARES DE TIROIDES (PTCs)

Los principales subtipos histológicos de carcinomas papilares de tiroides son los siguientes^[7]:

- ❑ El carcinoma papilar de tiroides clásico (CL-PTC) es el tipo más común. Es un tumor de células foliculares con una serie de rasgos nucleares característicos: agrandamiento, superposición/solapamiento, cromatina clara, irregularidad del contorno, pseudoinclusiones y hendiduras nucleares.
- ❑ La variante folicular (FV-PTC) es un subtipo común (15-20% de los PTCs). En comparación con el CL-PTC, tiene mayor frecuencia de encapsulación, menor tasa de metástasis a ganglios linfáticos regionales y una ligera mayor tasa de invasión vascular y metástasis a distancia. Algunos rasgos característicos son el agrandamiento y la irregularidad del contorno nuclear, folículos irregulares y alargados, papilas abortivas, núcleos distribuidos irregularmente y sin polaridad, focos de fibrosis, coloide denso y células gigantes multinucleadas en la luz folicular.
- ❑ La variante mixta (Mx-PTC) combina características de carcinoma papilar de las variantes clásica y folicular, presentando un equilibrio entre papilas y folículos.

2.4. MOTIVACIÓN DEL TRABAJO

En países desarrollados donde hay suficiente yodo en la dieta, los carcinomas papilares de tiroides comprenden más del 80% de los tumores malignos epiteliales del tiroides. La edad ≥ 45 años, el tamaño tumoral > 5 cm, la extensión extra-tiroidea, los focos de progresión/desdiferenciación y las metástasis a distancia, particularmente óseas, ocurrentes en un pequeño porcentaje de toda la población de PTCs (~10%), representan los principales factores pronósticos asociados a un curso clínico desfavorable. Durante la progresión de la enfermedad de local a metastásica, las células tumorales cambian su perfil genómico para adquirir características agresivas adaptativas.

Debido a la baja frecuencia de PTCs con metástasis a distancia, se conoce muy poco sobre las alteraciones genéticas que ocurren durante la expansión a sitios distantes de estos tumores. El hecho de contar con una serie que presenta estas características, correctamente clasificada por un

equipo experimentado de patólogos, y con un tamaño muestral aceptable (33 pacientes), hace que este trabajo resulte especialmente interesante y relevante para este campo.

3. IMPORTANCIA DE LA REGIÓN PROMOTORA DE *TERT*

3.1. REGIONES PROMOTORAS

Los genes pueden dividirse en dos regiones funcionalmente significativas: las secuencias de control que no se transcriben o UTRs y las secuencias transcritas, las cuales van a dar lugar a los ARN mensajeros y, por ende, al producto proteico codificado por el gen correspondiente. El promotor de un gen es una región de control, situada aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción, en la que dicho gen contiene una serie de secuencias cortas de nucleótidos reconocidas por ciertos factores de transcripción especializados capaces de unirse a ellas y controlar el proceso de transcripción de dicho gen. Un único factor de transcripción puede afectar simultáneamente a la expresión de una gran cohorte de genes, cada uno de los cuales porta las secuencias de reconocimiento para este factor en su promotor. En el caso del cáncer, un único factor de transcripción alterado, actuando pleiotrópicamente, podría orquestar la expresión simultánea de un conjunto de genes, que juntos desencadenarían el fenotipo de cáncer.

3.2. LOS TELÓMEROS Y LA TELOMERASA

Los telómeros son complejos nucleoproteicos esenciales para la estabilidad genómica, compuestos por repeticiones de secuencias de ADN localizadas en los extremos de los cromosomas, cuya función es proteger a éstos frente a la degradación que tiene lugar, de forma natural, durante la replicación de las moléculas lineales de ADN tras completarse cada ciclo de replicación, así como impedir las fusiones espontáneas entre extremos de cromosomas^[8].

Las células somáticas normales, maduras, diferenciadas, carentes de actividad telomerasa debido al silenciamiento epigenético de *TERT*, sufren un acortamiento progresivo del ADN telomérico con cada división celular (15-25 nucleótidos). Se ha postulado que los telómeros podrían funcionar a modo de “reloj biológico”, reflejando el historial de las divisiones que cada célula ha experimentado a lo largo de su existencia. Transcurridas 60-70 divisiones, el acortamiento de los telómeros es tan crítico que la propia maquinaria de reparación del ADN de las células lo interpreta como roturas de doble cadena del ADN e induce una parada del ciclo celular y muerte por senescencia. Este proceso evita la proliferación celular ilimitada, por lo que actúa como un potente supresor de tumores.

La superación de la barrera de la senescencia mediada por la estabilización de los telómeros es por tanto necesaria para lograr la proliferación celular infinita. La telomerasa juega un papel determinante en ese sentido. La telomerasa es una ribonucleoproteína, concretamente una ADN polimerasa dependiente de ARN, cuya función enzimática es la de añadir *de novo* secuencias teloméricas altamente repetitivas de bases nitrogenadas (TTAGGG) para así poder mantener una longitud telomérica estable a lo largo de la historia replicativa de determinados tipos celulares^[9].

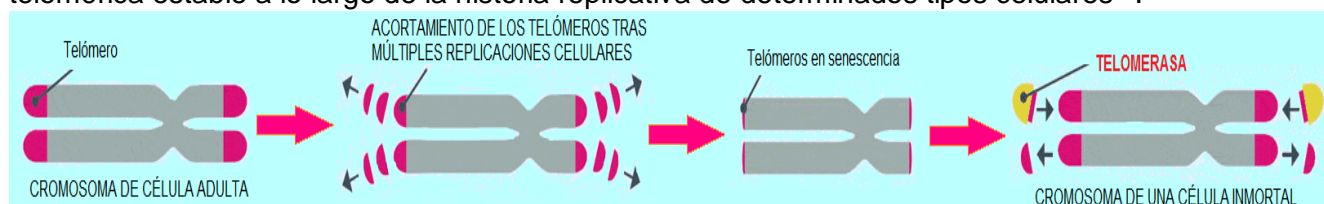


Figura 3. Esquema sobre los telómeros y la inmortalidad celular. Adaptado de “National Institute of Aging”

La telomerasa se expresa durante el desarrollo embrionario, restringiéndose en el adulto a determinados compartimentos celulares tales como las células madre adultas, los órganos hematopoyéticos y las células reproductoras^[10]. La activación de la telomerasa es suficiente para conferir un potencial replicativo ilimitado a las células, y, de hecho, es un evento frecuente durante la transformación tumoral. En el 85-95% de los cánceres la telomerasa deja de estar reprimida y se activa, lo que sugiere que la activación de esta ribonucleoproteína y la estabilización de los telómeros juegan un papel importante en el desarrollo del tumor. Por el contrario, los tumores negativos para la actividad telomerasa podrían mantener sus telómeros mediante un mecanismo alternativo,

telomerasa-independiente, designado como ALT (alargamiento alternativo de los telómeros), el cual parece mantener la longitud de los mismos a través de recombinaciones basadas en intercambios intercromosomales^[11].

3.3. LA TELOMERASA Y *TERT*

La telomerasa es una ribonucleoproteína compuesta por una estructura proteica que presenta la actividad catalítica de polimerasa en reverso de ADN (el componente TERT, del inglés *Telomeric End Reverse Transcriptase*), y un fragmento de ARN de secuencia complementaria a las repeticiones teloméricas que se van a añadir, que la telomerasa utiliza a modo de molde sobre el que copiar los fragmentos que añadirá a las repeticiones preexistentes (el denominado componente Terc, del inglés *Telomerase RNA Component*)^[12].

El gen *TERT* codifica para la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), subunidad catalítica del complejo de la telomerasa, clave en el control de la actividad de esta última. La activación y el silenciamiento de la telomerasa generalmente resulta de la transcripción activa o represiva de *TERT*. La actividad enzimática de la telomerasa se correlaciona pues con la expresión de *TERT*.

3.4. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS Y RELACIÓN CON EL PROMOTOR DE *TERT*

El potencial replicativo ilimitado es un rasgo característico de las células tumorales. Como consecuencia de la alta tasa de proliferación, la longitud de las repeticiones teloméricas tiende a acortarse muy rápidamente en las células tumorales. Por su parte, la telomerasa es un complejo nucleoproteico que protege a los telómeros de la erosión, antagonizando por ello los procesos celulares de apoptosis y senescencia replicativa. Por esta razón, el funcionamiento anormal de la telomerasa ha sido descrito como una característica común en varios tipos de cánceres. La actividad de la telomerasa depende principalmente de la expresión de su subunidad catalítica limitante, denominada TERT. De hecho, las mutaciones en el promotor de *TERT* son las mutaciones no codificantes más prevalentes en el cáncer^[13].

En diversos estudios *in vitro* se ha descrito que las células somáticas cuando presentan mutaciones en el promotor de *TERT* son incapaces de silenciar la expresión de dicho gen, de manera que tienen un incremento de la actividad telomerasa y por tanto poseen telómeros aberrantemente largos. Por ello, las mutaciones en el promotor de *TERT* se consideran suficientes para sobreponerse a la barrera proliferativa impuesta por el acortamiento de los telómeros, pudiendo gracias a ello promover la inmortalización de células cancerosas incipientes^[14].

Recientemente se han descrito mutaciones heterocigotas en el promotor del gen *TERT* con alta frecuencia en diferentes tipos de tumores sólidos. Varios estudios han mostrado que la expresión aberrante de *TERT* y el incremento de la actividad telomerasa contribuyen no solamente a la proliferación celular sostenida, sino también a enfermedades agresivas y pobres resultados en muchos tipos de tumores humanos. Tales mutaciones se asocian significativamente con avanzada edad de los pacientes^[15].

En varios tumores humanos, preferentemente en aquellos localizados en tejidos con baja tasa de auto-renovación, incluyendo los carcinomas de tiroides, las mutaciones en el promotor de *TERT* se han encontrado principalmente en dos zonas calientes en las posiciones -124 pb (chr5:1,295,228 G>A, de ahora en adelante denominada C228T) y -146 pb (chr5:1,295,250 G>A, de ahora en adelante denominada C250T) aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen. Dado que se ha constatado que ambas mutaciones aumentan la transcripción de *TERT* e incrementan la actividad de la telomerasa, se les ha atribuido potencial oncogénico. En líneas celulares tumorales que portan las mutaciones C228T y C250T se ha observado un incremento de la actividad transcripcional del promotor de *TERT* de 2 a 6 veces^[16]. Se postula que esto es debido a que estas mutaciones generan nuevos sitios de unión para factores de transcripción pertenecientes a la familia ETS (*E-26 Transformation-Specific*), resultando en la unión de distintos factores ETS, destacando ETS1 y GABPA, los cuales son reclutados específicamente por el alelo mutado de *TERT*, conduciendo al reclutamiento de la ADN polimerasa II y desencadenando la reactivación específica de la telomerasa^[17].

En cuanto a los carcinomas de tiroides, se ha descrito que la frecuencia de mutaciones en el promotor de *TERT* es bastante baja en los tumores bien diferenciados (7.5-30%), pero se incrementa significativamente en los carcinomas pobremente diferenciados e indiferenciados, hasta un 50% del total de casos, indicando una fuerte asociación de estas mutaciones con la agresividad y la diseminación metastásica de los tumores de tiroides^[18].

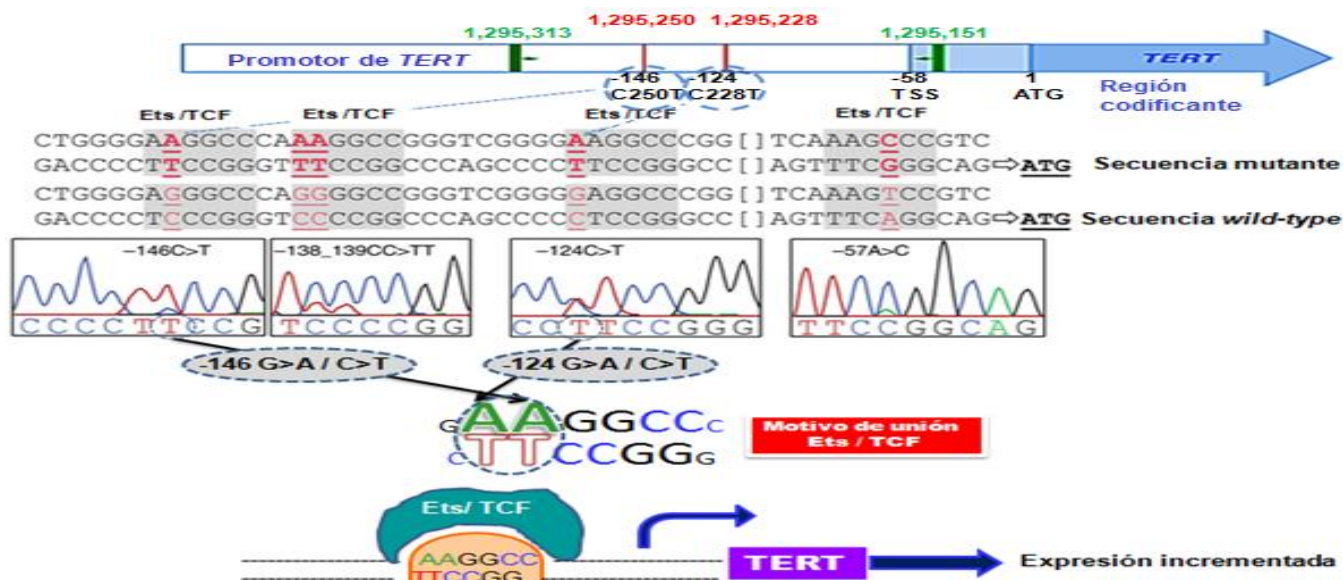


Figura 4. Esquema de las mutaciones más frecuentes en el promotor de *TERT*. Como resultado, se generan *de novo* motivos de unión para factores de transcripción de la familia ETS, los cuales se unen al promotor de *TERT* y aumentan su expresión. La consecuencia final es la reactivación de la actividad telomerasa. Fuente: elaboración propia.

3.4.1. POSIBLE RELACIÓN DE MUTACIONES EN *TERT* CON OTRAS ALTERACIONES MOLECULARES Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS AGRESIVAS EN CARCINOMAS DE TIROIDES

La alteración genética más frecuente en los carcinomas papilares de tiroides es la mutación en *BRAF* V600E, la cual, a través de la activación constitutiva de la vía de las proteínas kinasa activadas por mitógenos (MAPK), desempeña una función importante en la tumorigénesis de los PTCs^[19]. En un estudio realizado en una cohorte de 257 pacientes norteamericanos con carcinoma papilar de tiroides^[20] se encontró una asociación significativa entre las mutaciones en el promotor de *TERT* y la mutación V600E de *BRAF*. Se ha propuesto que la asociación de ambos eventos genéticos tendría una relevancia biológica importante, confiriendo a las células tumorales una ventaja de supervivencia única. Como ya se ha descrito, las mutaciones en el promotor de *TERT* crean sitios de unión para factores de transcripción de la familia ETS, y estos factores ETS son dianas de la ruta de señalización de las MAPK, concretamente numerosos factores ETS son fosforilados por la MAPK kinasa ERK. De esta manera, la coexistencia de ambas mutaciones generaría un mecanismo único en el cual la vía de las MAPK, activada constitutivamente por la mutación V600E, promueve la sobre-regulación del gen *TERT* generando e incrementando la interacción de los factores ETS con el promotor de *TERT*. Este efecto sinérgico de ambas mutaciones podría ser un importante mecanismo promotor de la tumorigénesis y agresividad del cáncer de tiroides. De hecho, se ha observado que muchos tumores de tipo PTC que albergan mutaciones tanto en el promotor de *TERT* como en *BRAF* V600E contienen características de tumores anaplásicos, lo cual conduce a hipotetizar que la coexistencia de mutaciones en *TERT* y *BRAF* podría ser un mecanismo genético clave en la conversión de un tumor papilar a anaplásico^[20].

Por otro lado, la vía de señalización PI3K-AKT también se ha encontrado alterada en carcinomas de tiroides. La activación anormal de esta vía conduce a una respuesta proliferativa y anti-apoptótica que se relaciona con el desarrollo de múltiples tipos de cáncer. La señalización por Akt inactiva varios factores proapoptóticos como BAD, procaspasa-9 y factores de transcripción FKHR. Otros factores de transcripción que incrementan la expresión de genes anti-apoptóticos son activados por Akt, incluyendo CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMP-cíclico), mediante fosforilación directa, NF- κ B e HIF-1 α . La mutación en cualquiera de los componentes de la vía PI3K-AKT presenta mayor prevalencia en los FTCs que en los PTCs, y se ha visto que incrementa la invasividad y tendencia a la metástasis de los tumores que la portan^[21].

OBJETIVOS

El fin último del proyecto es dilucidar si se pueden utilizar las mutaciones de *TERT* como biomarcadores pronósticos en la rutina clínico-asistencial. Si permiten anticipar la evolución del paciente (recurrencias, metástasis, supervivencia), la progresión tumoral (desdiferenciación, migración, invasión) y la respuesta/resistencia a la terapia.

Con este fin, se plantean los siguientes objetivos:

1. Analizar la prevalencia de mutaciones en la región promotora del gen *TERT* en una cohorte de 99 muestras de carcinomas papilares de tiroides, tanto de tumor primario como de metástasis en ganglios linfáticos y/o a distancia, pertenecientes a un total de 33 pacientes.
2. Precisar el carácter clonal o subclonal de las mutaciones C228T y C250T.
3. Determinar si las mutaciones en la región promotora de *TERT* son condición necesaria y suficiente para la diseminación del tumor primario a los ganglios linfáticos.
4. Valorar la implicación de las mutaciones en el promotor de *TERT* en las metástasis a distancia.
5. Evaluar si las mutaciones de *TERT* se asocian significativamente con alguno de los subtipos reconocidos de carcinomas papilares (PTC-variante clásica, PTC-variante folicular, PTC-mixto).
6. Determinar mediante estudios de correlación clínico-patológicos-moleculares si las mutaciones en la región promotora de *TERT*:
 - Se asocian a multifocalidad tumoral;
 - Se asocian con mayor riesgo de desdiferenciación y progresión a carcinoma pobremente diferenciado;
 - Se asocian con invasión y metástasis;
 - Coexisten con otras alteraciones moleculares (mutaciones en *Ras*, *PIK3CA*, *BRAF*...) presentes en mayor o menor medida en los PTCs;
 - Modifican "per se" el curso clínico y supervivencia del paciente;
 - Cooperan con otras alteraciones genéticas en el curso clínico desfavorable de algunos pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO - MATERIAL BIOLÓGICO

En el estudio se ha analizado una cohorte de 99 muestras, embebidas en parafina y fijadas con formaldehído, obtenidas de 33 pacientes diagnosticados de Carcinoma Papilar de Tiroides (PTC) con metástasis en ganglios linfáticos (LNMs) y/o en órganos a distancia (DMs).

Las muestras tisulares seleccionadas para el estudio en los 33 casos genotipados, se obtuvieron después de un examen microscópico exhaustivo, por parte de la Directora del Trabajo de Fin de Master (especialista en Anatomía Patológica), de todos los bloques de parafina existentes para cada caso, en los archivos de los Departamentos de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Central de Asturias (España) y del Hospital de Yale – New Haven – Universidad de Yale (USA). Los 33 PTCs caracterizados se aglutinan, en base a criterios morfológicos y estructurales^[22], en tres grandes grupos que representan los histotipos más comunes (90%) de PTC [Tabla 1]:

- 1) Carcinomas Papilares Clásicos/Convencionales (CL-PTC), constituido por tumores compuestos en un 90% por estructuras papilares con un fino eje conectivo-vascular revestido por células tumorales con núcleos distintivos de PTC [Figura 5A].
- 2) Carcinomas Papilares Variante Folicular (FV-PTC), compuesto por tumores en los que las células tumorales, con núcleos diagnósticos de PTC, análogos a los de la variante clásica (CL-PTC), adoptan un patrón de crecimiento folicular en el 90% del tumor [Figura 5B].
- 3) Carcinomas Papilares Mixtos (Mx-PTC), integrado por tumores que muestran un equilibrio entre papilas y folículos o bien un ligero predominio de un patrón de crecimiento respecto del otro, con núcleos inequívocamente papilares en ambos componentes [Figura 5C].

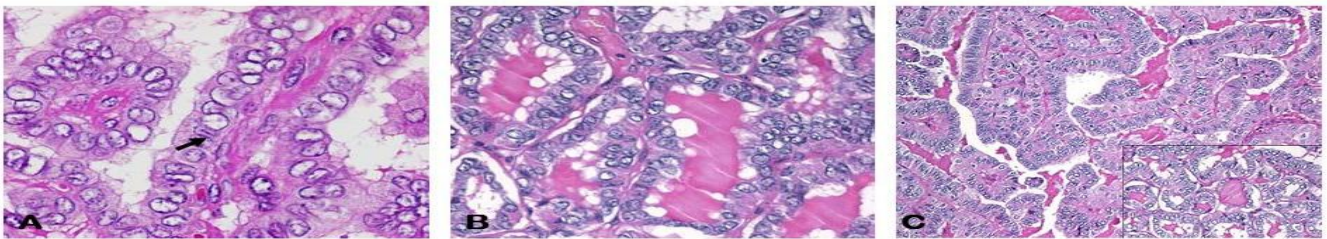


Figura 5. Principales histotipos de PTCs: (A) CL-PTC; (B) FV-PTC; (C) Mx-PTC.

Tabla 1. Muestras tumorales analizadas en 33 pacientes diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides con metástasis en ganglios linfáticos y/ o a distancia.

Histotipo Carcinoma Papilar de Tiroides (PTC)	Nº tumores analizados (%)	Áreas genotipadas con diferente apariencia microscópica en el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos regionales (LNMs) y/ o metástasis a distancia (DMs) *	Nº de muestras genotipadas en cada categoría de PTC (%)
Carcinoma Papilar Clásico (CL-PTC)	9 (27,3)	10 áreas tumor primario (Pt) 13 áreas metástasis en ganglios linfáticos (LNM)	23 (23,2)
Variante Folicular Carcinoma Papilar (FV-PTC)	11 (33,3)	15 áreas tumor primario (Pt) 15 áreas metástasis en ganglios linfáticos (LNM) 4 áreas metástasis a distancia (DM)	34 (34,3)
Carcinoma Papilar Mixto (Mx-PTC)	13 (39,4)	18 áreas tumor primario (Pt) 23 áreas metástasis en ganglios linfáticos (LNM) 1 área metástasis a distancia (DM)	42 (42,4)
TOTAL	33	43 áreas tumor primario + 51 áreas metástasis ganglios linfáticos + 5 áreas metástasis a distancia	99 (100)

Abreviaturas: Pt, tumor primario; LNMs, metástasis en ganglios linfáticos; DMs, metástasis a distancia; Nº, número.

* En 10 PTCs (1 CL-PTC, 4 FV-PTCs y 5 Mx-PTCs) se analizaron diferentes áreas dentro del tumor primario. En 15 pacientes se caracterizó más de una LNM o LNM+MD (4 CL-PTC, 5 FV-PTCs y 6 Mx-PTCs)

- En 10 PTCs se han investigado cambios focales en el patrón de crecimiento mayoritario o predominante del tumor primario.
- En 14 casos se ha analizado más de una metástasis en ganglios linfáticos (LNMs).
- En 5 pacientes se ha caracterizado más de un área en el tumor primario y más de una metástasis en ganglio linfático.
- En 5 casos se han podido genotipar las metástasis a distancia (DMs).

No es infrecuente encontrar en pacientes diagnosticados de FV-PTC metástasis en ganglios linfáticos que adoptan un patrón de crecimiento típicamente papilar o incluso un fenotipo más agresivo, pobremente diferenciado/*insular-like*. De igual modo las metástasis en ganglios linfáticos de los Mx-PTCs pueden adoptar patrones de crecimiento muy variados (papilar, folicular, sólido o *insular-like*).

El estadiaje tumoral pre-quirúrgico y post-quirúrgico de todos los pacientes investigados se realizó de acuerdo con los criterios establecidos por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC)^[22]. Los pacientes fueron tratados siguiendo protocolos médico-quirúrgicos estandarizados. En todos los casos se realizó tiroidectomía total o *cuasi* total y linfadenectomía cervical más ablación/supresión de remanentes tiroideos con I¹³¹ y supresión de TSH. Después de una revisión de la Historia Clínica y del examen microscópico exhaustivo de todas las muestras tisulares existentes en cada uno de los casos genotipados, disponemos de información clínico-patológica y de seguimiento de relevancia pronóstica en el manejo clínico de los pacientes con PTCs (sexo, edad al diagnóstico, tamaño del tumor, subtipo histológico, multifocalidad tumoral dentro del tumor primario, presencia de focos de células altas dentro del tumor primario o las metástasis, existencia en el frente de avance del tumor de un patrón de crecimiento sólido-nodular-infiltrativo, presencia de extensión extratiroidea, presencia de invasión vascular, presencia de metástasis en ganglios linfáticos y/o a distancia al diagnóstico o durante el seguimiento, desarrollo de recurrencias durante el seguimiento, estadio tumoral al diagnóstico y estatus del paciente en el momento de revisión de la historia clínica) [Tabla 2], información que vamos a correlacionar con los resultados del estudio genómico en *TERT*, *BRAF*, *N-K* y *H-RAS* y *PIK3CA*.

Tabla 2. Características clínico-patológicas con significación pronóstica en el manejo clínico de los 33 pacientes analizados en el estudio.

Características Clínico Patológicas	Carcinoma Papilar Clásico (CL-PTC) (n = 9)	Variante Folicular Carcinoma Papilar (FV-PTC) (n = 11)	Carcinoma Papilar Mixto (Mx-PTC) (n = 13)	Fisher 2 colas P values [†]	Total (n = 33)
Focos de células altas	3 (33)	1 (9)	5 (38)	0.228	9 (27)
Áreas infiltrativas de patrón sólido, en nidos, insular-like	2 (22)	7 (64)	9 (69)	0.085	18 (55)
Edad media (años)	44 (41)	34 (23)	49 (36)	0.196	43 (38)
Ratio mujer / varón	6/3 (67/ 33)	6/5 (55/45)	9/4 (69/31)	0.815	21/12 (64/36)
Tamaño tumoral medio (cm)	4.2	3.2	4.4	0.821	4.1
Multifocalidad tumoral	6 (67)	8 (73)	5 (38)	0.226	19 (58)
Extensión extratiroidea	4 (44)	6 (55)	6 (46)	0.828	16 (48)
Invasión Vascular	2 (22)	6 (55)	3 (23)	0.219	11 (33)
Metástasis en ganglios linfáticos al diagnóstico y/o durante el seguimien	9 (100)	9 (82)	13 (100)	0.172	31 (94)
Metástasis en ganglios linfáticos al diagnóstico	8 (89)	8 (73)	13 (100)	0.114	29 (88)
Metástasis en ganglios linfáticos durante el seguimiento	3 (33)	2 (18)	6 (46)	0.370	11 (33)
Metástasis a distancia al diagnóstico y/o durante el seguimiento	3 (33)	5 (45)	4 (31)	0.815	12 (36)
Metástasis a distancia al diagnóstico	0 (0)	1 (9)	1(8)	1	2 (6)
Metástasis a distancia durante el seguimiento	3 (33)	4 (36)	4 (31)	0.999	11 (33)
Recurrencia tumoral	4 (44)	5 (45)	7 (54)	0.828	16 (48)
Estadio Tumoral al Diagnóstico (AJCC /UICC)	9	11	13	0.192	33
estadio I	5 (56)	8 (73)	4 (31)		17 (52)
estadio II	1 (11)	1 (9)	1 (8)		3 (9)
estadio III	3 (33)	1 (9)	8 (62)		12 (36)
estadio IV	0 (0)	1 (9)	0 (0)		1 (3)
Estadio tumoral III / IV	3 (33)	2 (18)	8 (62)	0.082	13 (39)
Seguimiento medio del paciente (meses)	147 (233)	168 (134)	151 (115)	0.914	155 (142)
Estatus del paciente (vivo / muerto)	7/2 (78/22)	7/4 (64/36)	10/3 (77/23)	0.538	24/9 (73/27)
vivo sin evidencia de enfermedad tumoral	5 (56)	7 (64)	7 (54)		19 (58)
vivo con enfermedad tumoral	2 (22)	0 (0)	3 (23)		5 (15)
muerto a causa de la enfermedad tumoral	2 (22)	4 (36)	3 (23)		9 (27)

Abreviaturas: AJCC/UICC, American Join Committee on Cancer/International Union Against Cancer. (*) Los números entre paréntesis indican porcentajes o rangos intercuartil. Los valores de P (test exacto de Fisher de dos colas, ANOVA, χ^2) indican si las características clínico-patológicas de los 33 casos incluidos en el estudio muestran un patrón de distribución heterogéneo en los tres tipos histológicos analizados.

El parámetro recurrencia viene determinado por captación de nuevo de I¹³¹, incremento en la concentración de tiroglobulina en suero y/o biopsia positiva, en pacientes libres de enfermedad durante al menos 4 meses (no enfermedad palpable, concentraciones de tiroglobulina en suero indetectable, escaneo/rastreo con I¹³¹ negativo). Aquellos pacientes que en el transcurso del seguimiento clínico presentaban captación persistente de I¹³¹, tiroglobulina sérica elevada de forma

ininterrumpida o signos evidentes de persistencia tumoral mediante escaneo con I^{131} o ultrasonografía de alta resolución del cuello fueron considerados a efectos de los estudios de supervivencia como pacientes vivos con enfermedad. En ninguno de los pacientes existe historia previa de exposición a radiación ionizante.

La historia natural de las tres categorías de PTCs incluidas en el estudio concuerda con el comportamiento descrito en la literatura para cada uno de los tipos histológicos. La Tabla 2 muestra una comparación a tres bandas (“*three-way comparison*”) de los tres histotipos, y como podemos observar no existen diferencias significativas en cuanto a ninguno de los parámetros analizados. La existencia de nidos sólidos, infiltrativos, rodeados de una prominente reacción desmoplásica en el frente de avance del tumor o la presencia de focos con un patrón de crecimiento *insular-like* es sin embargo algo más frecuente en las variantes folicular (FV-PTC) y mixta (Mx-PTC) (64% y 69% respectivamente $p=0.085$). En la Figura 6 podemos observar que no existen diferencias significativas en lo que respecta a la supervivencia y recurrencia tumoral entre los tres grupos.

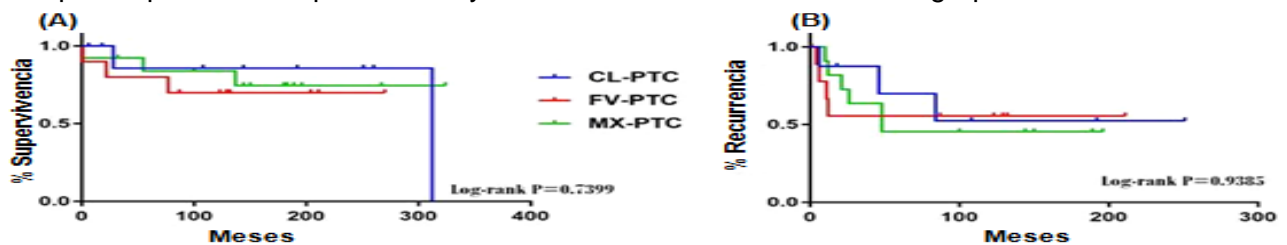


Figura 6. Curvas de Kaplan-Meier para los parámetros de supervivencia (A) y recurrencia (B) en función del histotipo.

Si clasificamos los pacientes en función del estadio al diagnóstico observamos que dicho parámetro, como era de esperar, sí que estratifica adecuadamente el riesgo de muerte por la enfermedad, tanto si consideramos los cuatro estadios propuestos por el Comité Conjunto Americano contra el Cáncer (AJCC), (Log-rank $p<0.0001$) como si agrupamos los pacientes en estadios I/II y III/IV (Log-rank $p=0.0028$) [Figura 7].

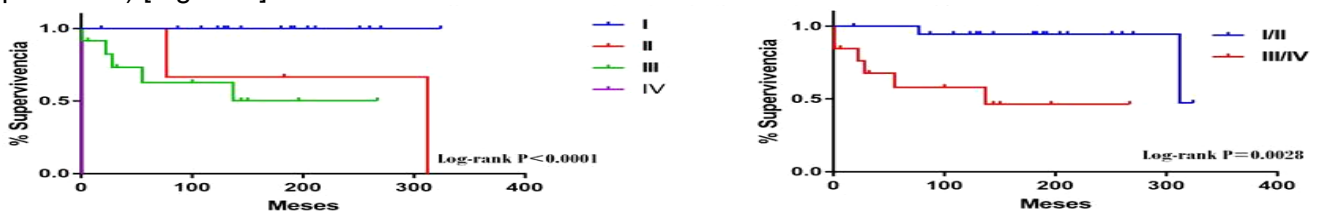


Figura 7. Curvas de Kaplan-Meier para el parámetro de supervivencia en función del estadio al diagnóstico.

2. MÉTODOS

En un intento de definir, establecer el impacto que las mutaciones activantes en la región promotora de *TERT* tienen en la diseminación linfática, curso clínico y supervivencia de los pacientes con carcinomas papilares con metastásis en ganglios linfáticos y/o a distancia he analizado la casuística descrita mediante PCR y secuenciación directa tipo Sanger. Paralelamente, he completado el análisis de mutaciones puntuales activantes en *BRAF* exón-15 y *N-, K- y H-RAS* exones 1 y 2, mediante PCR-“Single Strand Conformational Polymorphism” (SSCP) y secuenciación de “*mobility shifts*” en 11 casos que no habían sido incluidos en un estudio previo de dichos genes.

2.1. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Las secciones de cada una de las 99 muestras tumorales, teñidas con hematoxilina-eosina, fueron examinadas al microscopio para determinar el porcentaje de células tumorales comprendidas en la muestra. Este trabajo, el cual solo puede ser llevado a cabo por un anatomopatólogo, lo realizó la Dra. García-Rostán. En aquellos casos en los que había tiroides tumoral u otros contaminantes (tejido linfoide, fibrosis, etc.), que podían introducir un sesgo en los resultados, se rehicieron los bloques para separar componentes e incrementar el número de células tumorales en el área a genotipar. El porcentaje de células tumorales presente en las áreas analizadas ha sido en todos los casos del 85-90%. Dependiendo del tamaño de la biopsia y características de la sección histológica, se cortaron con un microtomo HM355S (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) las micras consideradas

necesarias (30-150 μ m) para obtener una cantidad suficiente de ADN y no saturar las columnas del kit de extracción. El tejido cortado se recogió en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL, cierre seguro y baja retención de ADN (Sarstedt, Hildesheim, Germany). Para desparafinar el tejido se realizó un lavado con xileno (Química Clínica Aplicada S.A., España) a 65°C, seguido de una hidratación con una solución de etanol 80%-xileno 20% y un pase final por etanol 100% (Ethanol Absolute Molecular Biology Grade, Merck-Millipore, Germany). A continuación se dejaron secar a temperatura ambiente durante ~90 minutos para permitir la evaporación de todo el alcohol de la muestra.

Una vez libres de parafina, las muestras se procesaron con el kit comercial "GeneJET FFPE DNA Purification kit" (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Básicamente, el protocolo presenta los siguientes pasos:

1. Incubación con el buffer de digestión y proteínasa K, en agitación a 10 rpm y 65°C, durante el tiempo necesario, para desintegrar el tejido y digerir completamente las proteínas presentes en el mismo.
2. Calentamiento de la muestra a 90°C durante 40 minutos para eliminar los posibles entrecruzamientos del ADN por el formaldehído utilizado para fijar el tejido procesado por los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospitales para su ulterior diagnóstico.
3. Tratamiento de la muestra con 10 μ L de RNasa para digerir enzimáticamente el ARN que pudiera estar presente en la misma y eliminarlo posteriormente, durante la fase de lavado.
4. Transferencia de la muestra digerida, mezclada con el buffer de unión, a la columna comercial. Dicha solución facilita la unión del ADN a la membrana de la columna.
5. Lavado del ADN unido a la membrana con dos soluciones sucesivas, denominadas buffer de lavado 1 y 2, consistentes fundamentalmente en etanol. Esta fase tiene por objeto eliminar los posibles contaminantes presentes en la muestra (ARN, proteínas...).
6. Elución del ADN atrapado en la membrana con un buffer de elución, consistente en agua libre de nucleasas.

El ADN genómico obtenido es congelado hasta el momento de su uso. Previamente se determina la concentración, pureza y calidad, información que nos va a orientar en la preparación de las diluciones de trabajo.

2.2. CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN GENÓMICO

Conocer la cantidad, pureza y calidad del ADN genómico obtenido es fundamental para los pasos posteriores del trabajo. La utilización de ADN de concentración desconocida o de calidad pobre puede ocasionar problemas a lo largo de los experimentos. Por este motivo, todos los ADNs utilizados en el estudio fueron evaluados mediante dos procedimientos distintos:

A) ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO EN UN NANODROP

Para determinar la concentración de los ADNs y conocer los ratios de absorbancia de luz ultravioleta A260/280 y A260/230, indicativos de la pureza del ADN, se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). El ratio A260/280 mide la posible contaminación de la muestra con proteínas, así como la presencia de ARN. El ratio A260/230 evalúa el nivel de sales presentes en la muestra. Una absorbancia fuerte a 230 nm puede indicar la presencia de compuestos orgánicos, urea, EDTA o sales caotrópicas.

B) ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%

Para poder visualizar la calidad y el grado de degradación del ADN extraído, se analizaron las 99 muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (Seakem LE Agarose, Lonza, Portsmouth, NH, USA), preparados con TBE 1X (dilución 1:10 de solución tampón 10X filtrada, estéril, libre de DNasas, RNasas y proteasas, compuesta por 1M Tris, 0.9M Acido Borico y 0.01 M EDTA - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y teñidos con bromuro de etidio (Ethidium Bromide Solution 10 mg/mL, Invitrogen - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se cargaron 3 μ L de cada muestra junto con 2 μ L de tampón de carga (6X Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Este último, además de proporcionar densidad a la muestra para que caiga al fondo del pocillo, nos permite, gracias a los colorantes que incluye (Orange G \rightarrow ~40-50 bp y Xylene Cyanol \rightarrow 3030 bp en TBE), visualizar el nivel de migración de la misma. Para definir el tamaño de los fragmentos del ADN extraído se

procedió a cargar también un patrón de tamaños moleculares de 100 bp-1Kb (100 bp DNA ladder, exACTGene Fisher BioReagents, Wilmington, DE, USA).

Las muestras se dejaron correr durante ~3 horas en una cubeta de electroforesis horizontal (Owl™ A5 Large Gel System with Built-In Recirculation, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) con TBE 1X a 80V (Fuente de alimentación Owl™ EC-300XL, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Finalizada la electroforesis, se visualizaron los geles en el equipo Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), provisto de un filtro para bromuro de etidio. Este último se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia al exponerlo a luz ultravioleta.

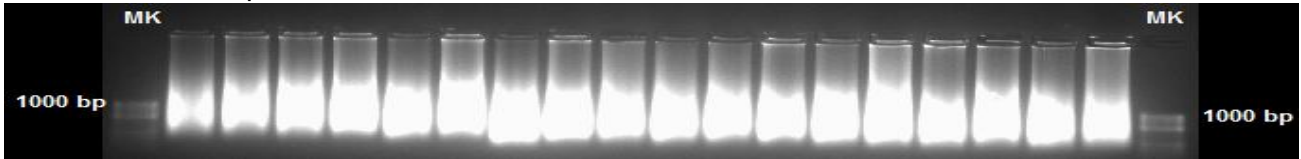


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de algunos ADNs madre obtenidos. Se cargaron 3µL de marcador (en la imagen MK, 100 bp DNA Ladder, exACTGene) flanqueando a las muestras, de las cuales se cargaron 3µL.

2.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de síntesis de ácidos nucleicos *in vitro*, mediante la cual es posible replicar exponencialmente un segmento específico de ADN^[23]. Por cada ciclo de amplificación se consigue el doble de cantidad de ADN que se ha sintetizado en el ciclo previo, de manera que el resultado final es una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (aproximadamente se obtienen 2^n moléculas, siendo n el número de ciclos de amplificación). La técnica requiere oligonucleótidos que flanquean al fragmento de ADN que se quiere amplificar, y repetidos ciclos llevados a cabo por un termociclador (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) con un programa específico, que consta de las siguientes etapas:

1. Una fase inicial de desnaturalización a alta temperatura, durante la cual la doble cadena de ADN se separa completamente y da lugar a dos cadenas simples.
2. Una serie de ciclos que se repiten un número determinado de veces y que consisten en la desnaturalización de las moléculas de ADN molde, el anillamiento de los oligos *Forward* (en sentido 5'-3') y *Reverse* (en sentido 3'-5') a las secuencias complementarias en el ADN molde, lo cual es posible gracias a que la temperatura disminuye, y la extensión de los oligos anillados con el ADN molde por medio de la acción de una Taq polimerasa termoestable.
3. Elongación final de las nuevas cadenas de ADN, de 10 minutos de duración, en la que se pretende que las cadenas en síntesis terminen de replicarse.

La optimización del número de ciclos es la mejor manera de evitar la amplificación de productos inespecíficos. El número de ciclos dependerá principalmente de la concentración y calidad del ADN de partida. En general, la amplificación de ADN de muestras embebidas en parafina es menos eficiente que la de ADNs obtenidos de otro tipo de muestras y para compensar se incrementa ligeramente el número de ciclos.

En cuanto al procedimiento experimental, la reacción de PCR se lleva a cabo en tubos eppendorf especiales de 0.2 mL (Tubos de pared delgada, estériles, libres de RNasas, DNasas, DNA y pirógenos, Molecular BioProducts, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), en los que se mezclan los siguientes componentes:

- Buffer de reacción 10X libre de $MgCl_2$ [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 20mM $(NH_4)_2SO_4$] (Biotools, B & M Labs, España) diluido a 1X en el volumen final de PCR elegido. Es el encargado de regular el pH de la reacción, el cual afecta la actividad y fidelidad de la enzima.
- Cloruro de magnesio 50 mM (Biotools, B & M Labs, España). Factor crucial que afecta al funcionamiento de la enzima Taq ADN polimerasa. Su carencia puede inactivar la enzima y su exceso reduce la fidelidad de la enzima y puede incrementar las uniones inespecíficas. Por tales razones resulta imprescindible determinar la concentración óptima de esta sal, generalmente en el rango de 1.5 a 3.0 mM.
- Oligos *Forward* y *Reverse* (Sigma Aldrich Biotechnology, Gillingham, UK). Consisten en oligonucleótidos con un tamaño entre 18 y 30 pb, los cuales se unen al ADN molde de cadena

sencilla y delimitan la región del genoma que va a ser amplificada por la polimerasa. Su concentración óptima es de 0.25-0.5 μM .

- Deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, 100mM, Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Son los nucleótidos que va a ir incorporando la ADN polimerasa a las cadenas de ácido nucleico en síntesis, por lo que los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) deben estar equilibrados. La concentración óptima de dNTPs en la reacción se sitúa en torno a 0.2mM.
- ADN polimerasa 1U/ μL (Biotools, B & M Labs, España). Es la enzima que cataliza la síntesis de las nuevas moléculas de ADN. Su concentración óptima es de 40mU/ μL .
- Diluciones de cada ADN madre, con una concentración de ácido nucleico de $\sim 20\text{ng}/\mu\text{L}$.
- Agua libre de nucleasas (Invitrogen™ Ambion™ Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)- Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), hasta completar el volumen final de reacción (en mi caso 30 μL).

En cada reacción de PCR se incluyen dos controles negativos con todos los componentes citados anteriormente excepto el ADN. El control 1 se cierra una vez distribuido el mix con los reactivos en los diferentes tubos de PCR (29 μL), inmediatamente antes de empezar a cargar los ADNs y el control 2 una vez cargados todos los ADNs. Si amplifica el control 1 es que alguno de los reactivos está contaminado y si amplifica el control 2 es que al cerrar los tubos se ha arrastrado ADN en el guante y hemos podido no solo contaminar el blanco 2 sino haber contaminado también alguna muestra con el ADN de otra muestra. Una vez preparados correctamente todos los tubos, se someten a la reacción de PCR en el termociclador, siguiendo el programa de ciclos y temperaturas adecuado para cada gen.

En este estudio se ha amplificado mediante PCR una región del promotor de *TERT* de 145 pares de bases, que incluye las zonas calientes de mutación C228T (124 pb por delante del inicio de la transcripción) y C250T (146 pb por delante del inicio de la transcripción). Se utilizaron 20-30 ng de ADN genómico y los cebadores “Tert-Forward” y “Tert-Reverse”, diseñados por la Directora del Trabajo y disponibles bajo petición. Las concentraciones óptimas de MgCl_2 y de oligos (2mM y 0.5 μM respectivamente) se establecieron mediante un protocolo de PCR en gradiente con un ADN de parafina de buena calidad [Ver procedimiento en apartado 2.3.1]. La amplificación comprende una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95°C, y 45 ciclos de amplificación (desnaturalización durante 60 segundos a 95°C, anillamiento durante 60 segundos a 60°C y extensión durante 60 segundos a 72°C), seguidos de una fase de extensión final de 10 minutos a 72°C.

La eficiencia de las amplificaciones se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 3:1 HRB (High Resolution Blend agarosa—Amresco, Solon, OH, USA) preparados al 2% con tampón TBE 1X y teñidos con bromuro de etidio. Las muestras se dejaron correr durante $\sim 20\text{--}30$ minutos en una cubeta de electroforesis horizontal (Owl™ A5 Large Gel System with Built-In Recirculation, Thermo Fisher Scientific) con TBE 1X a 120V (Fuente de alimentación Owl™ EC-300XL, Thermo Scientific). Finalizadas las electroforesis, se visualizaban los productos de PCR en el equipo Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para comprobar que el tamaño de los amplicones se correspondía con el esperado, en el primer pocillo de los geles, en paralelo a las muestras, se cargaba un marcador de tamaño de ADN/peso molecular de 100 bp–1Kb (O'GeneRuler™ Ready-to-use 100bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). En la electroforesis se constataba además que los dos controles estaban limpios, no presentaban banda de igual tamaño a las muestras de ADN amplificadas (145 bp).

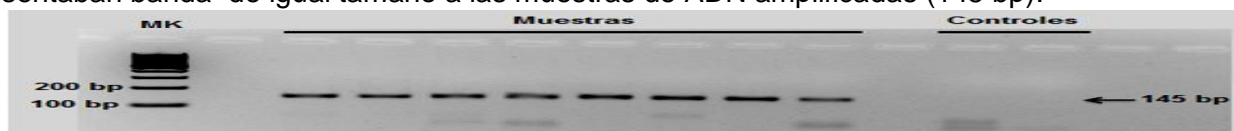


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR generados al amplificar la región promotora de *TERT* (amplicón de 145 pb). Se cargaron 3 μL de marcador (MK, O'Gene Ruler, Thermo Scientific) y 3 μL de cada muestra.

2.3.1. GRADIENTE DE OPTIMIZACIÓN DE LA PCR

Cuando se va a comenzar a trabajar con unos oligos nuevos, lo primero que debe hacerse es un gradiente de optimización de la reacción de PCR, con el fin de establecer cuáles son las condiciones idóneas de reacción para esos cebadores. El procedimiento consiste en amplificar una misma muestra de ADN, de buena calidad y concentración, siguiendo todas las combinaciones posibles de los siguientes factores:

- Concentración de MgCl₂: se evalúan las concentraciones de este compuesto en un rango de 1.5mM a 4.0mM, buscando las condiciones que más favorecen la actuación de la polimerasa.
- Temperatura de anillamiento: se testan las temperaturas de 55°C a 67°C, para determinar cuál es la temperatura a la que mejor anillan los oligonucleótidos con la región del genoma que se desea amplificar.
- Concentración de oligos: se ensayan dos concentraciones de cebadores diferentes, 0.25µM y 0.5µM, buscando que haya suficientes oligos pero que tampoco saturen la reacción, puesto que un exceso de éstos podría inhibir a la polimerasa.

Se realizaron tantas reacciones de PCR como combinaciones posibles de todos estos factores existían, se corrieron en un gel de agarosa al 2% como se ha descrito anteriormente, y se seleccionaron el conjunto de las condiciones de reacción que generan el mejor producto de PCR.

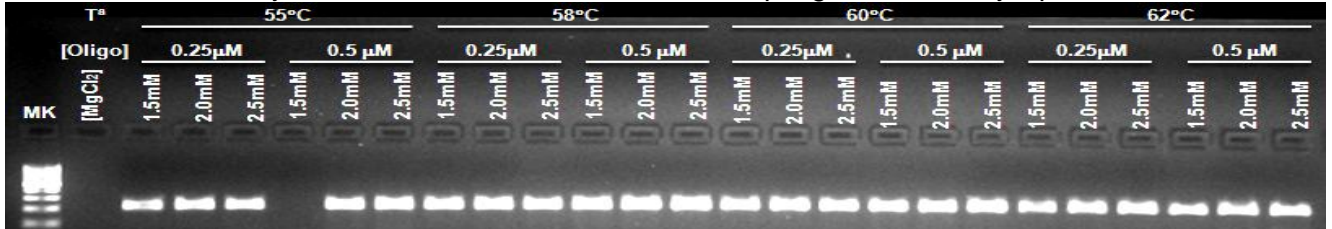


Figura 10. Fragmento de un gradiente de optimización de PCR realizado para una región promotora de interés. Se puede apreciar cómo la eficiencia máxima de la reacción de PCR se alcanza a una temperatura de 58°C, con una concentración de oligos de 0.5µM y una concentración de MgCl₂ de 2.5mM.

A continuación, se incluyen las condiciones de amplificación por PCR de *BRAF* exón-15 y *H-, K- y N-Ras* exones 1 y 2 en los 11 casos que he analizado, que no habían sido incluidos en un estudio previo de dichos genes [véase Tabla 3].

Tabla 3. Condiciones de amplificación por PCR de *BRAF* exón 15 y *H-, K- y N-RAS* exones 1 y 2.

Gen y región codificante a amplificar	Secuencia de oligos / cebadores	Tamaño amplicon bp	T° anillamiento °C	[oligos] µM	[MgCl2] mM
<i>BRAF</i> exón 15	[+]5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA- 3' [-]5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA- 3'	226	60	0,25	1,5
<i>H-RAS</i> exón 1	[+]5'-CAGGCCCCCTGAGGAGCGATG- 3' [-]5'-TTCGTCCACAAAATGTTCT- 3'	110	60	0,5	1,75
<i>H-RAS</i> exón 2	[+]5'-TCCTGCAGGATTCTACC GG- 3' [-]5'-GGTTACCTGTA CTGGTGG A- 3'	195	55	0,5	2
<i>K-RAS</i> exón 1	[+]5'-GACTGAATATAAACTTGTGG- 3' [-]5'-CTGTATCAAAGAATGGTCCT- 3'	163	55	0,5	2,5
<i>K-RAS</i> exón 2	[+]5'-TTCCTACAGGAAGCAAGTAG- 3' [-]5'-CCACCTATAATGGTGAATATCT- 3'	161	55	0,5	2,5
<i>N-RAS</i> exón 1	[+]5'-GACTGAGTACAACTGGTGG- 3' [-]5'-GGGCCTCACCTCTATGGTG- 3'	118	55	0,5	2
<i>N-RAS</i> exón 2	[+]5'-GGTGAACCTGTTTGTGG A- 3' [-]5'-ATACACAGAGGAAGCCTTCG- 3'	103	55	0,5	4

2.4. SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLIMORPHISM)

La técnica de SSCP (Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla) se basa en el principio de que la movilidad electroforética de cualquier partícula en un gel es sensible tanto a su tamaño como a su forma. Bajo condiciones no desnaturizantes, una molécula de ADN de cadena sencilla tiene una conformación plegada o estructura secundaria que viene determinada por interacciones moleculares, y, por ende, por su secuencia. De esta manera, las moléculas de ADN de cadena sencilla que difieren en al menos un único nucleótido en una secuencia de cientos de bases adquieren diferentes estructuras secundarias, lo cual resulta en una movilidad alterada en la electroforesis en gel no desnaturizante^[24].

El protocolo para detectar mutaciones por SSCP, en una región del genoma amplificada por PCR, es el siguiente:

1. Amplificación de la región de interés mediante PCR seguida de cuantificación y estimación visual de la cantidad del producto obtenido para determinar la cantidad del mismo que se va a utilizar en la SSCP.
2. Desnaturización de 30-40 ng de producto de PCR, calentándolo a 95°C durante 5 minutos en presencia de 2.5 volúmenes de *stop solution* (100% formamida, 5.0M NaOH, 1% azul de

bromofenol y 1% xilen-cianol). De esta manera, se elimina el carácter de doble cadena del ADN, obteniéndose cadenas sencillas.

3. Enfriamiento en hielo de las muestras, provocando la aparición de estructuras secundarias de cadena única plegadas, estructuras tridimensionales que dependen de la secuencia primaria de los ácidos nucleicos, que migran a diferente velocidad al ser sometidas a una electroforesis en gel no desnaturizante de acrilamida.
4. Cargado de las muestras en un gel preparado con una acrilamida especial conocida como MDE (Mutation Detection Enhancement gel matrix, Lonza, Rockland, ME, USA), que consiste en una fórmula similar a la poli-acrilamida, especialmente sensible en la detección de cambios conformacionales en el ADN. El stock de MDE, a una concentración 2X, se diluye en agua desionizada y TBE 0.5X para alcanzar diferentes concentraciones finales (0.8X, 1X, 1.5X,...). La concentración del gel se establece, para cada región del genoma a analizar, comparando el patrón de migración de una muestra de ADN "*wild type*" y una muestra mutada, utilizando simultáneamente diferentes temperaturas de electroforesis y voltajes.
5. Electroforesis en gel de acrilamida con unos parámetros de temperatura y voltaje ajustados para cada gen específico.
6. Tinción de los geles en oscuridad con el colorante SYBR Gold (SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain 10,000X Concentrate in DMSO – Invitrogen - life technologies, Waltham, MA, USA) diluido 1:10000 en TE 1X (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 7.5), para detectar los distintos conformeros presentes en los mismos, que habrán migrado diferencialmente en función de su estructura, y, por tanto, de su secuencia.
7. Visualización de los geles en un equipo Gel Doc™ XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).
8. Corte de las bandas que presentan un patrón de migración diferente al *wild type* y resuspensión de las mismas en tampón TE 1X.
9. Amplificación por PCR del ADN contenido en las bandas cortadas.
10. Purificación de los productos de PCR resultantes [procedimiento apartado 3.5] y secuenciación directa Sanger [procedimiento apartado 3.6].

En la Tabla 4, a continuación, se incluyen condiciones de SSCP de *BRAF* exon15, *H-*, *K-* y *N-RAS* exones 1 y 2.

Tabla 4. Condiciones de SSCP.

Gen y exón	Concentración gel MDE	Voltaje (V)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
<i>BRAF</i> exón 15	0.8X	180	10	10-12
<i>H-Ras</i> exón 1	1X	300	18	4-6
<i>H-Ras</i> exón 2	0.8X	400	18	4-6
<i>K-Ras</i> exón 1	0.8X	400	18	3.30-4
<i>K-Ras</i> exón 2	0.8X	180	10	11-12
<i>N-Ras</i> exón 1	0.8X	300	18	7
<i>N-Ras</i> exón 2	0.8X	400	18	4-6

2.5. PURIFICACIÓN DE ADN

Tras obtener el producto de PCR con la región génica de interés amplificada se lleva a cabo una purificación del mismo mediante un kit comercial (Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit", GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA, USA), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. De manera sucinta, el proceso de purificación presenta cinco etapas principales:

1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (Seakem LE Agarose, Lonza, Portsmouth, NH, USA) de los productos de PCR, con el fin de separar el producto de interés de oligos no consumidos durante la PCR o de productos inespecíficos generados durante dicha reacción.
2. Visualización en un transiluminador de las bandas y corte de las mismas con un bisturí.
3. Unión del ADN a la membrana de la columna de purificación. Se disuelve la banda de agarosa con el producto de PCR en un reactivo de unión (fundamentalmente isopropanol) durante 30 minutos en un bloque seco (Grant QBD2, Grant Instruments, Cambridge, England) a 60°C. Se transfiere a una columna de purificación y se centrifuga a 13.000 rpm 1 minuto para permitir la unión del ADN a la membrana de la columna.

4. Lavado del ADN. Se lava la columna con el buffer de lavado (etanol) para eliminar todo aquello que no se ha unido a la membrana, es decir, todo lo que no sea el ADN, presente en el producto de PCR (dNTPs, oligos, sales...).
5. Elución del ADN atrapado en la membrana. Se introduce la columna en un tubo de microcentrífuga de 2mL (Sarstedt, Hildesheim, Germany), se añade tampón de elución a la membrana (diferentes volúmenes de dH₂O dependiendo de la intensidad de la banda purificada en cada caso) y se centrifuga a 13000 rpm 1 minuto. El ADN que se encontraba unido a la membrana se libera y es recogido en el tubo en el que se había introducido la columna de purificación. De esta manera, tendremos el amplicón de interés purificado, libre de los oligos no consumidos en la PCR o de bandas inespecíficas generadas durante la reacción.

Los productos de PCR purificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con el fin de evaluar la intensidad de la banda de ADN. Dependiendo de dicha intensidad, se decide si ese ADN se puede enviar a secuenciar o no y se estima qué cantidad de ADN se debe tomar para la reacción de secuenciación.

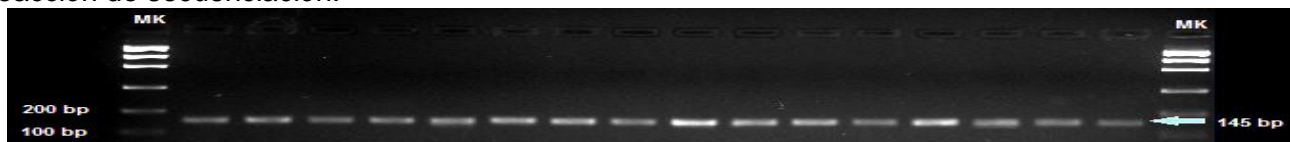


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos purificados de TERT, flanqueados por un marcador de tamaño molecular.

2.6. SECUENCIACIÓN DIRECTA MEDIANTE EL MÉTODO DE SANGER

El método de secuenciación enzimática de Sanger^[25] se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos que carecen del grupo –OH en el carbono 3', los cuales sirven como terminadores de la reacción, es decir, cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, se detiene la elongación de dicha cadena. Finalmente, esta reacción se resuelve mediante electroforesis capilar.

Para la reacción de secuenciación se emplearon los productos de PCR purificados, y el oligonucleótido correspondiente: Tert-Seq Forward, Tert-Seq Reverse o ambos. Las reacciones de secuenciación, llevadas a cabo por la empresa portuguesa StabVida, se realizaron con el kit "ABI Prism BigDye Terminator" (PerkinElmer), y los fragmentos fueron corridos en un analizador genético ABI Prism 3700 (PerkinElmer). El cromatograma resultante de la secuenciación se analizó mediante el software informático Chromas Lite (Technelysium Inc.). Todas las mutaciones fueron confirmadas por al menos 2 secuencias correspondientes a 2 productos de PCR distintos.

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el software informático SPSS versión 22.0 (SPSS Inc.). Las mutaciones en *TERT* fueron codificadas como "sí" o "no" para análisis categórico de los datos. Los 33 pacientes analizados fueron investigados de acuerdo a: tipo histológico de PTC, edad, sexo, tamaño del tumor, multifocalidad del tumor, extensión extra-tiroidal, invasión vascular, metástasis a ganglios linfáticos en el diagnóstico y/o durante el seguimiento, metástasis distante en el diagnóstico y/o durante el seguimiento, recurrencia del tumor, estadio patológico y estado del paciente.

El test de Fisher de dos colas y el test de χ^2 se usaron para evaluar las asociaciones putativas entre genotipos alterados y características clínico-patológicas cualitativas. Los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Se asumió una tendencia para una correlación cuando los valores de p se encontraban en el rango 0.05-0.20. Los test de Kolmogorov-Smirnov y de Shapiro-Wilk constataron la distribución normal de todas las variables continuas excepto el seguimiento clínico medio del paciente. Para la comparación entre grupos en el caso de variables continuas, se utilizó el test de ANOVA con la excepción del seguimiento clínico medio de los pacientes, que dada su distribución no normal se aplicó el test de Kruskal-Wallis. La recurrencia tumoral y supervivencia tumoral fueron analizadas mediante curvas de Kaplan-Meier y tests Log-rank^[26].

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LA REGIÓN PROMOTORA DE TERT

La prevalencia total de mutaciones en el promotor de *TERT* fue de 42.4% (14/33 pacientes). La mutación C228T (c.1-124 C>T) se observó en 11 casos (78.6%) y la C250T (c.1-146 C>T) en 3 (21.4%). En lo que respecta a la distribución por histotipos, la variante mixta de PTC es la que reveló mayor número de mutaciones (7/13 – 53.8%). En las variantes Folicular (FV-PTC) y Clásica (CL-PTC) la frecuencia de mutaciones fue de 36.4% (4/11) y 33.3% (3/9) respectivamente [Tabla 5].

Tabla 5. Pacientes en los que se han encontrado mutaciones en la región promotora de *TERT*, clasificados por histotipos.

HISTOTIPOS PTCs	Nº de pacientes	MUTACIONES EN EL PROMOTOR DE TERT		
		C228T	C250T	TOTAL
Carcinoma papilar de tiroides clásico (CL-PTC)	9/33 (27.3%)	2/9 (22.2%)	1/9 (11.1%)	3/9 (33.3%)
Carcinoma papilar de tiroides folicular (FV-PTC)	11/33 (33.3%)	3/11 (27.3%)	1/11 (9.1%)	4/11 (36.4%)
Carcinoma papilar de tiroides tipo mixto (Mx-PTC)	13/33 (39.4%)	6/13 (46.1%)	1/13 (7.7%)	7/13 (54%)
TOTAL	33 (100.0%)	11/33 (33.3%)	3/33 (9.1%)	14 (42.4%)

Abreviaturas: Pt, tumor primario; LNM, metástasis en ganglios linfáticos; DM, metástasis a distancia.

(*) Entre paréntesis se muestran las frecuencias relativas en cada caso, respecto al número de pacientes de cada grupo.

En la Figura 12, a continuación, se muestra la distribución de mutaciones en las 99 áreas genotipadas en los 3 grupos de PTCs.

Histotipo	CL-PTC									FV-PTC										Mx-PTC													
	Nº Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Áreas analizadas	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt	Pt
	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM	LNM
	DM																																

Figura 12. Distribución de las mutaciones en el promotor de *TERT* en las 99 áreas genotipadas, estratificadas en los tres grupos de PTCs. Abreviaturas: Pt, tumor primario; LNM, metástasis ganglio linfático; DM, metástasis a distancia; CL-PTC, variante clásica carcinoma papilar; FV-PTC, variante folicular carcinoma papilar; Mx-PTC, variante mixta carcinoma papilar. C228T C250T

No existe asociación estadísticamente significativa entre las mutaciones de *TERT* C228T y C250T y alguno de los tres subtipos histológicos de PTC analizados (p=0.613 Fisher de colas).

1.1. CARÁCTER CLONAL O SUBCLONAL DE LAS MUTACIONES C228T Y C250T

- De los 10 casos [1 CL-PTC, 4 FV-PTC, 5 Mx-PTC] en que se investigaron cambios focales en el patrón de crecimiento mayoritario o predominante en el tumor primario, 5 (50%) [100% CL-PTC, 25% FV-PTC, 60% Mx-PTC] resultaron estar mutados. La mutación mostraba carácter clonal en 3 (60%) casos [100% CL-PTC, 100% FV-PTC, 33% Mx-PTC] y subclonal en 2 (40%) casos [67% Mx-PTC].
- De los 14 casos [4 CL-PTC, 4 FV-PTC, 6 Mx-PTC] en que se investigaron más de una metástasis en ganglios linfáticos, 4 (29%) [50% CL-PTC, 0% FV-PTC, 33% Mx-PTC] resultaron estar mutados. La mutación presentaba carácter clonal en 2 (50%) de los casos [100% CL-PTC] y subclonal, con un bajo porcentaje de alelos mutados, en los otros 2 (50%) [100% Mx-PTC].
- De los 5 casos [1 CL-PTC, 1 FV-PTC, 3 Mx-PTC] en que se investigaron más de un área en el tumor primario y más de una metástasis en ganglios linfáticos, 2 (40%) [100% CL-PTC, 0% FV-PTC, 33% Mx-PTC] resultaron estar mutados. La mutación solo presentaba carácter clonal en 1 (50%) [100% CL-PTC].
- De los 6 casos [1 CL-PTC, 2 FV-PTC, 3 Mx-PTC] en que se investigaron más de un área en el tumor primario y más de una metástasis (local y/o a distancia), 3 (50%) [100% CL-PTC, 50%

FV-PTC, 33.3% Mx-PTC] resultaron estar mutados. La mutación presentaba carácter clonal en 2 (67%) de los casos [100% CL-PTC, 100% FVPTC] y subclonal en 1 (33%) [100% Mx-PTC]

- De los 14 casos mutados en *TERT* [11 (79%) C228T y 3 (21%) C250T], el 50% resultaron ser clonales [55% C228T y 33% C250T] y el otro 50% subclonal [45% C228T y 67% C250T].
- Si tenemos en cuenta la distribución de las mutaciones C228T y C250T por histotipos y su carácter clonal/subclonal nos encontramos que en el 100% de los CL-PTC mutados en *TERT* la mutación era clonal independientemente de que se localizase 124 o 146 pares de bases “upstream” (C228T y C250T respectivamente) del inicio de la transcripción. En el caso de los FV-PTC la mutación era clonal en el 50% de los tumores [67% C228T y 0% C250T]. Entre los Mx-PTC el evento mutacional resultó clonal en el 29% de los casos [33% C228T y 0% C250T].

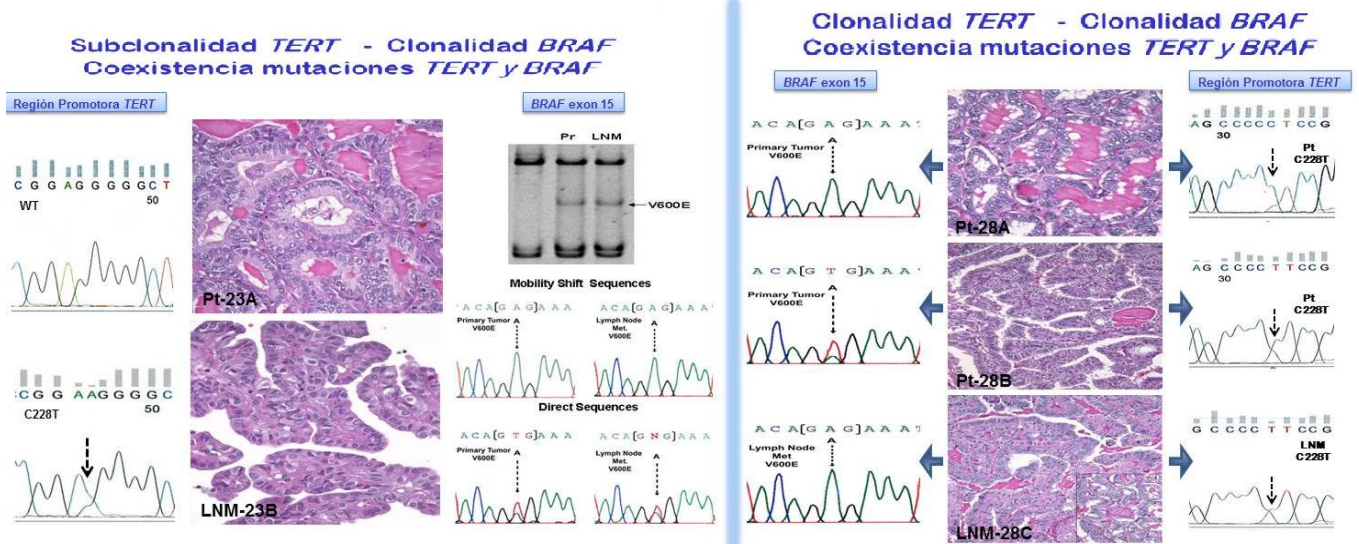


Figura 13. Clonalidad y subclonalidad de las mutaciones en la región promotora de *TERT*. Coexistencia con alteraciones genéticas en *BRAF*. Se muestra el resultado de la secuenciación directa de *TERT*, la sección histológica correspondiente a partir de la cual se ha obtenido el material genético analizado y el resultado de la SSCP+secuenciación directa en el caso de *BRAF*.

1.2. RELACIÓN ENTRE MUTACIONES EN LA REGIÓN PROMOTORA DE *TERT* Y DISEMINACIÓN A GANGLIOS LINFÁTICOS

Excluidos los 3 pacientes en los que únicamente se analizó el tumor primario y la metástasis a distancia [3 FV-PTC] se constató que *TERT* estaba mutado en un total de 11 (37%) pacientes con tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos [ver Tabla 6].

En 8 (73%) pacientes [3 CL-PTC, 1 FV-PTC, 4 Mx-PTC] la mutación de *TERT* segregaba con las células metastásicas encontrándose al menos en una de las áreas de metástasis en ganglios linfáticos analizada. Dos (18%) PTCs, ambos de histotipo Mx-PTC en el tumor primario y CL-PTC en la metástasis en ganglios linfáticos, presentaban la mutación en la metástasis en ganglios linfáticos pero no en el tumor primario. Solamente se detectó un caso de histotipo Mx-PTC en el que la mutación estaba presente únicamente en una de las áreas de tumor primario genotipadas y no segregaba con las células metastásica al ganglio linfático caracterizado.

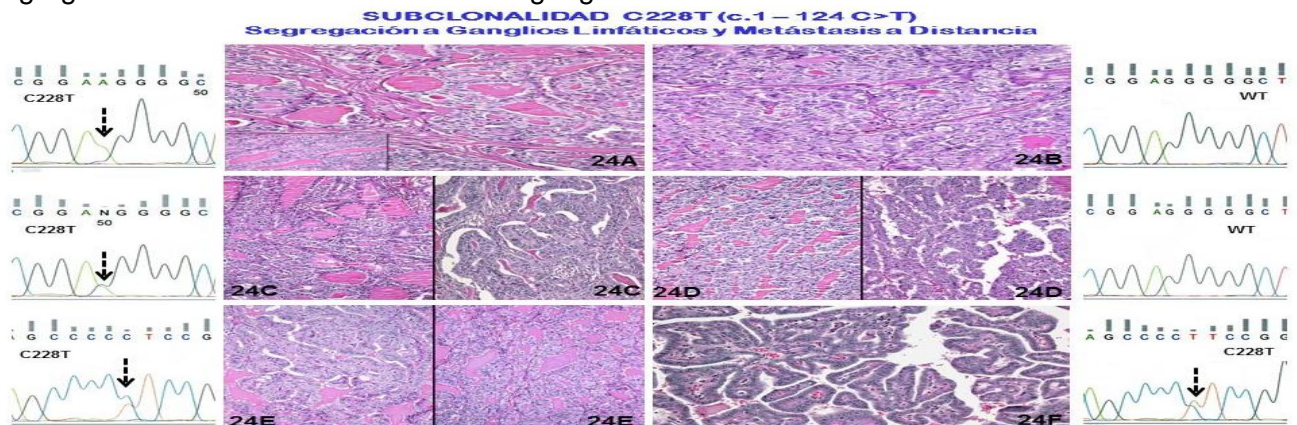


Figura 14. Segregación a ganglios linfáticos y metástasis a distancia de la mutación C228T en la región promotora de *TERT*. Se muestra un caso del cual se analizaron seis secciones histológicas: dos tumores primarios (24A y 24B), tres metástasis en ganglios linfáticos (24C, 24D y 24E) y una metástasis a distancia (24F).

Si tenemos en cuenta los tres subgrupos de PTCs analizados observamos que en el 100% de los CL-PTC y FV-PTC mutados en *TERT*, en los que se analizó el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos, la mutación segregaba con las células metastásicas a los ganglios linfáticos caracterizados. Por lo que respecta a los 7 Mx-PTC mutados en *TERT*, en los que se analizó el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos, en el 57% de los casos la mutación segregaba a alguno de los ganglios linfáticos analizados, en el 29% la mutación se originaba *de novo* en los ganglios linfáticos y en el 14% se restringía al tumor primario.

Si consideramos exclusivamente aquellos casos mutados en los que se analizó más de una metástasis en ganglio linfático [2 CL-PTC y 2 Mx-PTC] observamos que mientras en el 100% de los CL-PTC la mutación segregaba a todos los ganglios linfáticos en los Mx-PTC solo segregaba a alguna de las metástasis.

Si tenemos en cuenta el tipo de mutación constatamos que la mutación C228T, presente en el 82% de los casos mutados en los que se analizó el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos, segregaba a todos los ganglios linfáticos analizados en el 56% de los casos, a alguno de los ganglios linfáticos en el 11% de los casos, se originaba *de novo* en el 22% de los casos y se circunscribía al tumor primario en el 11% restante. La mutación C250T, presente en el 18% de los casos mutados en los que se analizó el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos, segregaba en la mitad de los casos a todos los ganglios linfáticos metastásicos caracterizados.

Si consideramos el fenotipo/histotipo de las 15 metástasis en ganglios linfáticos en los 11 casos mutados en *TERT*, en los que se analizó el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos, observamos que independientemente del histotipo del tumor primario los ganglios mutados presentaban un histotipo papilar clásico (12/14 – 86%) o mixto (folicular–papilar) de predominio papilar clásico (2/14 – 14%). El único caso en el que la mutación del tumor primario no segregaba a la metástasis en ganglio linfático, esta última mostraba un fenotipo mixto de predominio folicular. Se observó una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de mutación en *TERT* y el histotipo/patrón arquitectural de la metástasis en ganglio linfático ($p=0.0262$)

Como se muestra en la Tabla 7 (estudio de correlación clínico-patológico-molecular) las mutaciones de *TERT* por si solas muestran una tendencia a la asociación con el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos durante el seguimiento clínico de los pacientes ($p=0.136$ Fisher dos colas). Tendencia que se convierte en una correlación estadísticamente significativa cuando consideramos la presencia de mutaciones en *TERT* más *BRAF*^{V600E} ($p=0.033$) o la presencia de mutaciones en *TERT* más otras alteraciones genéticas (*BRAF*^{V600E} y/o *RAS* y/o *PIK3CA* y/o *P16*) ($p=0.0494$ Fisher dos colas).

1.3. IMPLICACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL PROMOTOR DE *TERT* EN METÁSTASIS A DISTANCIA

La región promotora de *TERT* resultó estar mutada en el 100% (5/5) de los casos analizados con metástasis a distancia [hueso o riñón]. La mutación C228T estaba presente en 4 (80%) casos. En 3 (60%) de los pacientes la mutación segregaba con las células metastásicas del tumor primario. En 2 (40%) pacientes parecía originarse *de novo*, en la metástasis a distancia.

Si consideramos el fenotipo/patrón arquitectural de la metástasis a distancia, a diferencia de lo que observamos en las metástasis en ganglios linfáticos, el 80% (4/5) de las metástasis a distancia con mutación en *TERT* muestran un fenotipo de FV-PTC.

2. COEXISTENCIA DE MUTACIONES EN OTROS GENES

Para determinar la existencia de posibles mutaciones activantes en *BRAF*, *H-*, *K-*, y/o *N-Ras* en los tumores primarios y correspondientes metástasis en ganglios linfáticos y/o a distancia de 11 pacientes [4 CL-PTC, 5 FV-PTC, 2 Mx-PTC] [32 muestras/áreas tisulares], no incluidos en un estudio previo^[27] llevado a cabo por el grupo de la directora de este trabajo en el extranjero, se recurrió al *screening* de mutaciones por PCR–SSCP–secuenciación de “mobility shifts”. Ninguno de los 11 casos reveló mutaciones en *H-*, *K-* o *N-Ras* exones 1 y 2. En el caso de *BRAF* se constataron 4 casos mutados en el loop de activación del gen [50% CL-PTC y 100% Mx-PTC], consistentes todos ellos en el cambio de una timina por una adenina en el nucleótido 1799, que se traduce en el cambio del aminoácido valina por ácido glutámico en el codón 600. La activación oncogénica de *BRAF*

resultado ser un evento clonal, pues estaba presente en todas las áreas analizadas dentro del tumor primario y en las diferentes metástasis en ganglios linfáticos y/o a distancia investigadas. En la Figura 15 se muestra el patrón de migración por SSCP de algunos de los genes analizados.

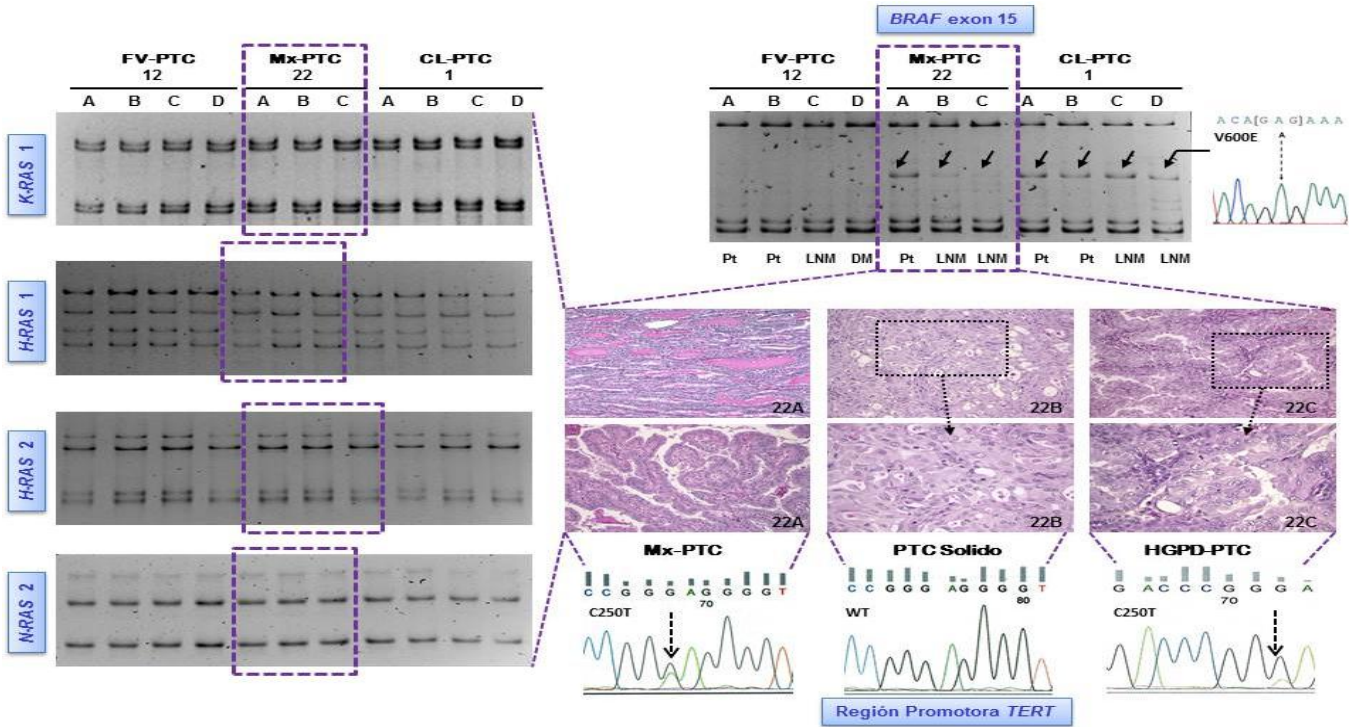


Figura 15. Patrones de migración por SSCP de algunos de los genes analizados.

Los datos sobre el estatus mutacional de *BRAF*, *H*-, *K*-, *N*-*Ras* y *PIK3CA* en de los restantes 22 casos incluidos en este estudio han sido extraídos de un artículo publicado por la directora de este trabajo^[27]. En la Figura 16 y en la Tabla 6 se ha compilado la información de dicho artículo con los resultados de este trabajo para ilustrar la coexistencia de mutaciones en *TERT* con otras alteraciones genéticas. En el 71% de los casos mutados en *TERT* se observa también activación oncogénica de *BRAF* (V600E) ($p=0.296$). El 64% de los casos que portaban la mutación C228T y el 67% de los casos que portaban la mutación C250T estaban mutados en *BRAF*. La coexistencia de mutaciones en *TERT* y *RAS* resultó ser excepcional. Sólo se encontró un caso mutado en ambos genes (7%). Dos de los PTCs mutados en *TERT* [2 Mx-PTC] (14%) estaban además mutados en *BRAF* y *RAS* o *BRAF* y *PIK3CA*.

Tabla 6. Patrón de mutación en 14 pacientes con PTCs. Conversión oncogénica de *TERT* y otras alteraciones genéticas concomitantes.

Histotipos de PTCs	Número de caso	Caso			Patrón de crecimiento	Focos de células altas	Estatus genético			
		Áreas analizadas					<i>TERT</i>	<i>BRAF</i>	<i>Ras</i>	<i>PIK3CA</i>
Carcinoma de tiroides papilar clásico (CL-PTCs)	1	1A	Pt	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		1B	Pt	HGPD-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		1C	LNM	HGPD-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
	6	6A	Pt	CL-PTC	No	C250T	V800E	WT	WT	
		6B	LNM	CL-PTC	No	C250T	V800E	WT	WT	
		6C	LNM	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
	9	9A	Pt	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		9B	LNM	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		9C	LNM	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
Carcinoma de tiroides papilar variante folicular (FV-PTCs)	12	12A	Pr	FV-PTC	No	C228T	WT	WT	WT	
		12B	Pr	FV-PTC	No	C228T	WT	WT	WT	
		12C	LNM	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
	10	10A	DM	FV-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		10B	Pt	FV-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		10C	Pt	FV-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
	19	19A	Pt	FV-PTC	No	C228T	WT	WT	WT	
		19B	DM	FV-PTC	No	C228T	WT	WT	WT	
20	20A	Pt	FV-PTC-S	No	WT	WT	WT	WT		
	20M	DM	FV-PTC	No	C250T	WT	G61R (n-Ras)	WT		
Carcinoma de tiroides papilar tipo mixto (Mx-PTCs)	21	21A	Pt	Mx-PTC	Sí	C228T	V800E	WT	WT	
		21B	LNM	CL-PTC	Sí	C228T	V800E	WT	WT	
	22	22A	Pt	Mx-PTC	Sí	C250T	V800E	WT	WT	
		22B	LNM	Sólido	Sí	WT	V800E	WT	WT	
		22C	LNM	CL-PTC	Sí	C250T	V800E	WT	WT	
	23	23A	Pt	Mx-PTC	No	WT	V800E	WT	WT	
		23B	LNM	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		23C	Pt	Mx-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
	24	24A	Pt	Mx-PTC	No	C228T	V800E	WT	WT	
		24B	Pt	Sólido	No	WT	V800E	WT	WT	
		24C	LNM	Mx-PTC	No	C228T	V800E	G13S+G12D (k-Ras)	WT	
	24	24D	LNM	Mx-PTC	No	C228T	V800E	G13S (k-Ras)	WT	
		24E	LNM	Mx-PTC	No	WT	V800E	G13S+G12D (k-Ras)	WT	
		24F	DM	CL-PTC	Sí	C228T	V80E	G12D (k-Ras)	WT	
	25	25A	Pt	Mx-PTC	No	WT	WT	WT	WT	
25B		LNM	CL-PTC	No	C228T	WT	WT	WT		
25C		Pt	FV-PTC	Sí	C228T	V800E	WT	E545Q		
28	28A	Pt	CL-PTC	Sí	C228T	V800E	WT	WT		
	28B	Pt	CL-PTC	Sí	C228T	V800E	WT	WT		
	28C	LNM	CL-PTC	No	C228T	V800E	WT	E545Q		
31	31A	Pt	FV-PTC	No	C228T	WT	WT	WT		
	31B	Pt	FV-PTC	No	WT	WT	WT	WT		
	31C	LNM	Mx-PTC	No	WT	WT	WT	WT		

Abreviaturas: WT, wild-type; Pt, tumor primario; LNM, metástasis en ganglios linfáticos; DM, metástasis a distancia; HGPD-PTC, carcinoma papilar con alto grado de pobremente diferenciado; CL-PTC-S, carcinoma papilar de tiroides clásico con áreas entremezcladas de patrón de crecimiento sólido; FV-PTC-S, carcinoma papilar de tiroides variante folicular con áreas entremezcladas de patrón de crecimiento sólido; Mx-PTC(CL), carcinoma papilar de tiroides mixto con ligera predominancia de arquitectura papilar; Mx-PTC(FV), carcinoma papilar de tiroides mixto con ligera predominancia de patrón de crecimiento folicular.

Histotipo	CL-PTC									FV-PTC										Mx-PTC												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
TERT C228T																																
TERT C250T																																
BRAF V600E																																
RAS mutado																																
PIK-3CA mutado																																

Figura 16. Concordancia de mutaciones en el promotor de *TERT* y otras alteraciones genéticas prevalentes (*BRAF*, *Ras* y *PIK-3CA*) en carcinomas de tiroides. Cada celda representa un paciente. Las celdas coloreadas denotan estatus mutante, mientras que las celdas blancas representan estatus wild-type.

3. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICOS-MOLECULARES

Para evaluar el impacto clínico de los patrones de mutación observados en esta serie de PTCs, se correlacionaron las mutaciones en la región promotora de *TERT* con las características clínico-patológicas de relevancia pronóstica recogidas en la Tabla 2. Con el objeto de ver si la coexistencia de otras alteraciones genéticas incrementaba el poder de asociación de *TERT* con alguno de los parámetros pronósticos o en realidad no tenía ningún efecto potenciador, se evaluó también la posible asociación de *TERT* más *BRAF*, *TERT* más *Ras* y *TERT* más otras alteraciones genéticas con los parámetros incluidos en la Tabla 2. Los resultados de tal estudio se muestran en la Tabla 7. Se han incluido únicamente aquellos valores numéricos estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$ test de Fisher de dos colas) y las tendencias a la asociación ($p < 0.16$ test de Fisher de dos colas).

Tabla 7. Estudio estadístico de correlación clínico-patológica-molecular.

Parámetros Clínico-Patológicos de Relevancia Pronóstica	Alteraciones Genéticas			
	TERT	TERT C228T	TERT + BRAF	TERT + other
Edad ≥ 45	0.00160	0.061	0.00439	0.00147
Sexo varón	0.06559	0.05183	n.s.	n.s.
Multifocalidad tumoral	0.00566	0.02397	0.01914	0.056868
Invasión Vascular	0.13614	0.117	n.s.	n.s.
Focos Carcinoma papilar alto grado pobremente diferenciado - AFIP Focos insular-like - Progresion / Desdiferenciación	0.0366	0.070	n.s.	n.s.
Metástasis en ganglios linfáticos al diagnóstico	0.02446	n.s.	n.s.	0.07258
Metástasis en ganglios linfáticos durante seguimiento	0.13614	n.s.	0.03341	0.04941
Recurrencias Tumorales	0.16632	n.s.	n.s.	0.14107
Estatus del paciente	0.00008	0.05584	0.00951	0.00142
Estadio al diagnóstico	0.00939	0.02635	0.00669	0.00205
Estadio al diagnóstico III/IV	0.02862	0.00918	0.01349	0.02593
Estadio al final del seguimiento	0.00042	0.01358	0.00081	0.00038
Estadio al final del seguimiento III/IV	0.00036	0.01043	0.00029	0.00008

Abreviatura; n.s., p no significativa. Valores p en azul tendencia a la asociación. Valores p rojo asociación estadísticamente significativa. Celdas sombreadas en verde \rightarrow Correlación inversa

3.1. PAPEL DE LAS MUTACIONES DE TERT EN EL CURSO CLÍNICO Y SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

Se encontró una correlación estadísticamente significativa ($p=0.00008$) entre las mutaciones en *TERT* y el estatus del paciente (Tabla 8). De acuerdo con lo que ocurre en la práctica clínica entre los 33 pacientes estudiados, había casi el doble de mujeres que de hombres (21 frente a 12), sin embargo los hombres con mutaciones en *TERT* eran mucho más propensos a fallecer a causa de la enfermedad (6 frente a 3). Asimismo, Todos los pacientes de este estudio que fallecieron a causa del carcinoma papilar de tiroides presentaban la mutación en el promotor de *TERT*.

Tabla 8. Correlación entre el estatus del promotor y el estatus del paciente estratificado por sexos

	Estatus promotor de <i>TERT</i>		Estado del paciente			Total
			DOD	NED	AWD	
Hombres	Estatus promotor de <i>TERT</i>	WT	0	4	0	4
		MUTADO	6	1	1	8
	Total		6	5	1	12
Mujeres	Estatus promotor de <i>TERT</i>	WT	0	11	4	15
		MUTADO	3	3	0	6
	Total		3	14	4	21
Total	Estatus promotor de <i>TERT</i>	WT	0	15	4	19
		MUTADO	9	4	1	14
	Total		9	19	5	33

Abreviaturas: DOD, muerte a causa de la enfermedad; NED, no evidencia de la enfermedad; AWD, vivo con la enfermedad

Los análisis de Kaplan-Meier revelaron una correlación muy significativa entre la probabilidad de recurrencia tumoral en el transcurso del seguimiento y la existencia de mutaciones en la región promotora de *TERT* (Log-rank test $p=0.0085$). Asociación que no se potenciaba con la coexistencia de mutaciones en *BRAF* (Log-rank test $p=0.0948$) o la existencia de alteraciones en otros genes (*BRAF*, *RAS*, *PIK3CA*) (Log-rank test $p=0.0192$) [Figura 17].

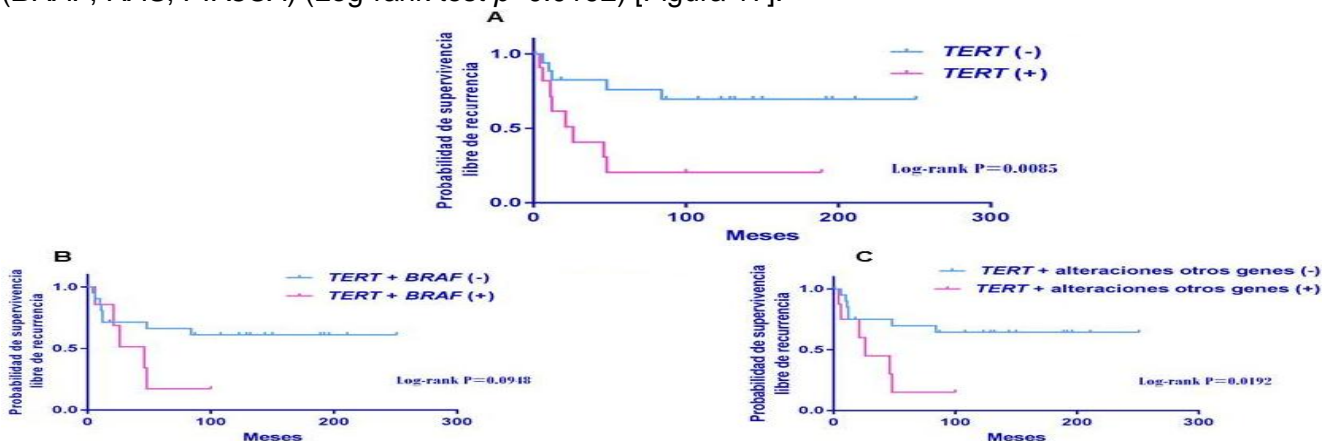


Figura 17. Análisis del impacto del patrón mutacional en la recurrencia de los 33 pacientes con seguimiento a largo plazo mediante estimación de Kaplan-Meier. (A) Estimación de la recurrencia de acuerdo al estatus mutacional del promotor de *TERT*. (B) Estimación de la recurrencia considerando la coexistencia de mutaciones en *TERT* y *BRAF*. (C) Estimación de la recurrencia considerando la coexistencia de *TERT* con alteraciones genéticas en otros genes.

De igual forma los análisis de Kaplan-Meier revelaron una correlación muy significativa entre la supervivencia de los pacientes y la mutación en la región promotora de *TERT* [Figura 18], de modo que en aquellos pacientes con alteraciones genéticas en el promotor de *TERT* la tasa de supervivencia se veía considerablemente reducida.

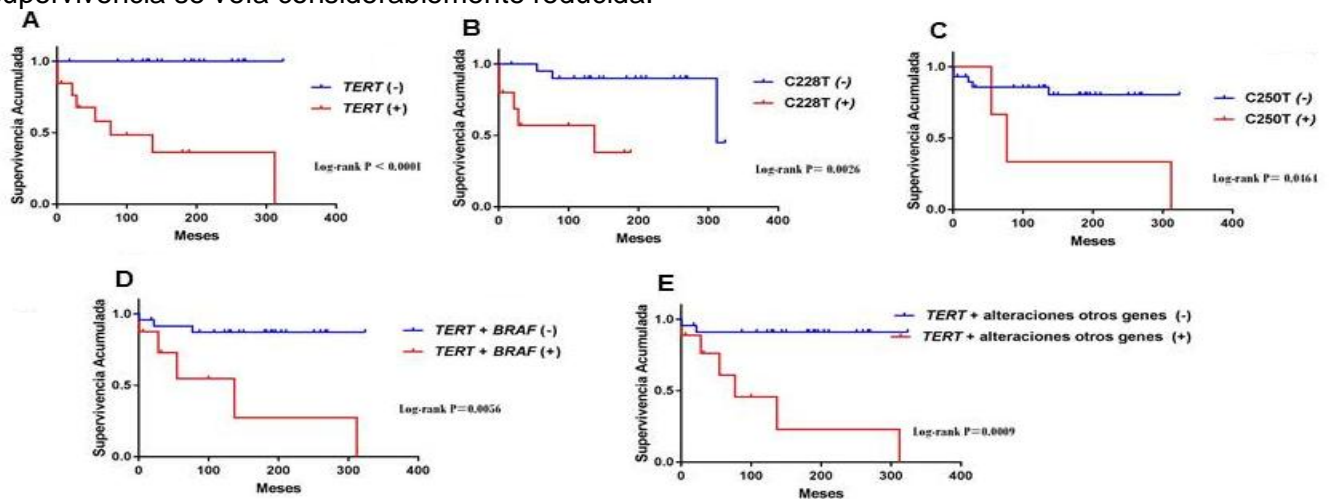


Figura 18. Análisis de Kaplan-Meier que correlacionan la supervivencia de los pacientes con: (A) el estatus mutacional de *TERT*; (B) la mutación C228T de *TERT*; (C) la mutación C250T de *TERT*; (D) la coexistencia de alteraciones genéticas en *TERT*+*BRAF*; (E) la coexistencia de mutaciones en *TERT*+otros genes.

La asociación entre mutaciones en la región promotora de *TERT* y mayor riesgo de muerte por la enfermedad se mantenía al considerar por separado las mutaciones en C228T (Log-rank test $p=0.0026$) y C250T (Log-rank test $p=0.0161$)

La coexistencia de mutaciones en *TERT* y *BRAF* o la concurrencia de mutaciones en *TERT* y alteraciones en otros genes (*BRAF*, *RAS*, *PIK3CA*) no incrementaba el riesgo de muerte por el tumor.

Teniendo en cuenta el tamaño muestral y la frecuencia observada de alteraciones genéticas en otros genes en la misma cohorte, sólo se evaluó el impacto en la supervivencia y recurrencia tumoral de la coexistencia de mutaciones en *TERT* y *BRAF* y la concurrencia de mutaciones en *TERT* y alteraciones en otros genes (*BRAF*, *RAS*, *PIK3CA*).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE MUTACIONES EN LA REGIÓN PROMOTORA DE *TERT*

Existen discrepancias significativas acerca de la frecuencia global de mutaciones en el promotor de *TERT* en los distintos tipos de carcinomas de tiroides, si bien es cierto que tal frecuencia es bastante baja en los carcinomas bien diferenciados (7.5-30% dependiendo de la serie analizada), incrementándose significativamente en los carcinomas pobremente diferenciados e indiferenciados, llegando a alcanzar una frecuencia del 50%. La frecuencia global de alteraciones genéticas en el promotor de *TERT* encontradas en este trabajo es del 42.3%. Esta frecuencia es ligeramente superior a las encontradas en otros trabajos previos^[15,18], pero esto podría explicarse en parte porque, de los 33 casos analizados en esta serie, 19 de ellos presentaban focos de desdiferenciación, indicativos de progresión a carcinomas pobremente diferenciados, en los cuales la frecuencia de alteraciones genéticas en *TERT* se incrementa. Esto subrayaría el papel de *TERT* en el proceso de transformación de los PTCs a carcinomas menos diferenciados y, por tanto, más agresivos, concordando con el resto de resultados obtenidos en este trabajo.

La mutación C228T resultó ser la más frecuente (83.3% del total de mutaciones detectadas), mientras que la mutación C250T presentó unas frecuencias menores (16.7% del total de mutaciones detectadas). Esto coincide con lo descrito en otros trabajos, donde la mutación C228T es más prevalente^[28]. Además, se vio que las mutaciones eran mutuamente excluyentes, lo cual tiene sentido porque son mutaciones redundantes, es decir, presentan el mismo efecto biológico.

La frecuencia de mutaciones en los tumores primarios y en las metástasis en ganglios linfáticos son semejantes, no encontrándose diferencias significativas. Sin embargo, la mutación en la región promotora de *TERT* en las metástasis a distancia aparece en el total de casos analizados, lo que sugiere cierto significado biológico en la diseminación a otros órganos.

1.1. CARÁCTER CLONAL O SUBCLONAL DE LAS MUTACIONES C228T Y C250T

Las mutaciones de *TERT* resultaron ser subclonales en la mitad de los tumores analizados. De acuerdo al modelo de evolución clonal, propuesto por Peter Nowell en 1976^[29], los tumores se originan desde una única célula mutada, acumulando mutaciones adicionales durante su desarrollo como consecuencia de la inestabilidad genómica asociada a la progresión, malignización y desdiferenciación tumoral. Inestabilidad provocada por otras mutaciones en genes implicados en la reparación del ADN, en vías de señalización clave, tales como la vía P53 o de las MAPK o PI3K-AKT, o por la influencia del microentorno tumoral (inflamación). Tales cambios provocan que surjan subpoblaciones adicionales, cada una de las cuales tiene la capacidad de dividirse y continuar mutando, adquiriendo otras alteraciones genéticas posteriores, como puede ser el caso de *TERT*. Esta heterogeneidad podría permitir la

de subclones que posean una ventaja evolutiva sobre los otros, dentro del microentorno del tumor, y estos subclones podrían llegar a ser dominantes en el tumor con el paso del tiempo.

Podría ocurrir que solamente una pequeña subpoblación de células tumorales fuera positiva para la mutación en *TERT*, de manera que la frecuencia de mutaciones quedaría por debajo del umbral de detección de las técnicas utilizadas en este trabajo para el análisis mutacional. Para poder detectar eventos subclonales, sería conveniente emplear una técnica con mayor sensibilidad, o realizar un mapeado genético intratumoral, microdisecionando diferentes áreas dentro del tumor primario, recurrencias, y metástasis en ganglios linfáticos y/o a distancia, permitiendo así incrementar la frecuencia del porcentaje de alelos mutados en áreas concretas del tumor, de manera que serían detectables. Esto podría ser de interés, puesto que no se ha publicado hasta la fecha ningún artículo que aborde la subclonalidad de mutaciones en el promotor de *TERT* y sus consecuencias en el desarrollo del proceso oncogénico.

En la totalidad de los CL-PTCs mutados en *TERT* la mutación fue clonal, lo que podría relacionar esta variante de PTC con un estadio más avanzado del proceso tumoral, en el que la alteración en *TERT* ya se ha convertido en dominante en el tumor. Esto es consistente con el hecho de que las metástasis en ganglios linfáticos se asocien significativamente con el histotipo clásico de PTC.

1.2. RELACIÓN ENTRE MUTACIONES EN LA REGIÓN PROMOTORA DE *TERT* Y DISEMINACIÓN A GANGLIOS LINFÁTICOS

Aunque se ha observado que las mutaciones en la región promotora de *TERT*, cuando están presentes en el tumor primario, segregan de manera significativa con la diseminación a ganglios linfáticos, no se trata de una condición necesaria para la expansión de las células tumorales a los nódulos linfáticos. De los 30 (91%) pacientes con metástasis en ganglios linfáticos analizados 20 (67%) resultaron ser *wild-type*. Sorprendentemente, se constató una correlación inversa, estadísticamente significativa, entre las mutaciones en el promotor de *TERT* y la existencia de metástasis en ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico ($p=0.024$) y una tendencia a la asociación con las metástasis en ganglios linfáticos desarrolladas en el transcurso del seguimiento clínico de los pacientes ($p=0.136$). Este resultado parece sugerir que, en determinados casos, las mutaciones en el promotor de *TERT* podrían ser adquiridas en fases más avanzadas de la progresión tumoral, probablemente como consecuencia de la inestabilidad genómica producida por otras alteraciones genéticas previas. Argumentación congruente con el hecho de observar una asociación, estadísticamente significativa, entre el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos en el transcurso del seguimiento clínico de los pacientes y la existencia de mutaciones en *TERT* y *BRAF* ($p=0.033$). La activación oncogénica de *BRAF* es un evento temprano en la carcinogénesis folicular tiroidea. También se constató una correlación entre el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos en el transcurso del seguimiento clínico de los pacientes y la presencia de mutaciones en *TERT* y alteraciones en otros genes (*BRAF*, *RAS*, *PIK3CA*) ($p=0.049$).

En un trabajo reciente de Gandolfi *et al.*^[5], en el que no se diferencia entre metástasis en ganglios linfáticos al diagnóstico y metástasis en ganglios linfáticos desarrolladas durante el seguimiento clínico, se concluye que las mutaciones en el promotor de *TERT* no se asocian con el desarrollo de metástasis a ganglios linfáticos. En nuestro caso si tratamos conjuntamente las metástasis en ganglios linfáticos al diagnóstico y durante el seguimiento tampoco observamos correlación alguna con las mutaciones de *TERT*. De hecho se aprecia una tendencia a la correlación inversa ($p=0.172$).

1.3. IMPLICACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL PROMOTOR DE *TERT* EN METÁSTASIS A DISTANCIA

Las metástasis a distancia son poco frecuentes en los PTCs (4-14%)^[30] pero se asocian, particularmente la óseas, con un pronóstico ominoso, ocasionando indefectiblemente la muerte del paciente aun cuando sean capaces de concentrar 1^{131} . En este estudio, en el que la prevalencia de metástasis a distancia en la cohorte analizada se ajusta a la descrita en la literatura^[30], se han detectado mutaciones en el promotor de *TERT* en todas las muestras de metástasis a distancia investigadas. Aunque estos resultados parecen indicar un papel importante de *TERT* en la invasividad del tumor, deben ser tomados con cautela debido al reducido número de metástasis a distancia genotipadas ($n=5$). Sería interesante conseguir más casos con muestras de metástasis a distancia para ver si al incrementar el tamaño muestral se mantiene la tendencia observada de las células metastásicas a presentar mutaciones en el promotor de *TERT*.

En el 60% de los pacientes con metástasis a distancia, positivas para la mutación en *TERT*, se ha detectado la misma mutación en el tumor primario, lo que indica cierta concordancia en cuanto a las alteraciones genéticas. En el 40% restante, la mutación en la telomerasa estaba ausente en el tumor primario y parecía originarse *de novo* en la metástasis a distancia. Esto sugiere que los tumores primarios podrían reflejar las alteraciones somáticas que resultan clave en la metástasis, aunque es sabido que durante la progresión de carcinoma local a metastásico las células tumorales cambian su perfil genómico para adquirir características adaptativas agresivas, siendo el potencial de replicación ilimitado y la inmortalidad celular, ambas conferidas por la telomerasa, dos de los principales rasgos de las células cancerosas. De esta manera, las mutaciones en el promotor de *TERT* podrían ser adquiridas en fases intermedias o avanzadas de la progresión tumoral, constituyendo un evento genético principal durante la adquisición de potencial metastásico en cáncer de tiroides. En cualquier caso, las mutaciones en el promotor de *TERT* han mostrado una alta prevalencia en los PTCs con metástasis a distancia, lo cual concuerda con otros resultados publicados sobre este tema^[5,30].

1.4. ASOCIACIÓN DE LAS MUTACIONES DE *TERT* CON SUBTIPOS DE CARCINOMAS PAPILARES

En la cohorte analizada la variante mixta (Mx-PTC) es la que mayor porcentaje de tumores mutados presenta, aunque no existe una asociación estadísticamente significativa. Si tenemos en cuenta en fenotipo/patrón arquitectural de las áreas analizadas, curiosamente la variante clásica es la que mayor número de mutaciones en *TERT* presenta, a pesar de ser el histotipo tumoral con menor número de casos en este estudio. De las 99 muestras analizadas 31 resultaron mutadas [17 (55%) CL-PTC, 9 (29%) FV-PTC, 5 (16%) Mx-PTC] y 68 resultaron *wild type* [24 (35%) CL-PTC, 30 (44%) FV-PTC, 8 (12%) Mx-PTC, 6 (9%) PDC-like]. De facto se observó una tendencia a la asociación con la existencia de un fenotipo/patrón arquitectural clásico en la muestra genotipada ($p=0.09$). De igual forma si consideramos el fenotipo/histotipo de las 15 metástasis en ganglios linfáticos en los 11 casos mutados en *TERT*, en los que se analizó el tumor primario y metástasis en ganglios linfáticos, observamos que independientemente del histotipo del tumor primario los ganglios mutados presentaban un histotipo papilar clásico (12/14 – 86%) o mixto de predominio papilar clásico (2/14 – 14%). El único caso en el que la mutación del tumor primario no segregaba a la metástasis en ganglio linfático, esta última mostraba un fenotipo mixto de predominio folicular. Se observó pues también una asociación estadísticamente significativa entre la existencia de mutación en *TERT* y el histotipo/patrón arquitectural de la metástasis en ganglio linfático ($p=0.0262$). Esto podría achacarse a su cooperación con otras alteraciones moleculares que son significativamente frecuentes en este tipo de PTCs, como es el caso de la mutación *BRAF*^{V600E}, cuya prevalencia es mayor en los PTCs clásicos^[27], y al hecho de que en CL-PTCs las mutaciones en *TERT* sean siempre de carácter clonal.

2. COEXISTENCIA CON OTRAS ALTERACIONES MOLECULARES

Las mutaciones en el promotor de *TERT* resultaron ser bastante más frecuentes en aquellos casos con mutaciones en *BRAF* que en aquellos casos sin mutación en dicha kinasa (64% vs 36%) aunque la correlación no alcanza significación estadística ($p=0.29$). Esto es consistente con otros resultados publicados en artículos previos, en los cuales el tamaño muestral era mayor^[31,32,33]. De acuerdo con estos resultados, la presencia de alteraciones genéticas en el promotor de *TERT* en células con la mutación V600E de *BRAF* parece tener relevancia biológica, puesto que sería capaz de conferir a las células tumorales una ventaja de supervivencia única frente a las células vecinas. En la serie analizada, las células con mutaciones en *TERT* y *BRAF* parecen ser algo más propensas que las células con mutaciones sólo en *TERT* a permear los vasos linfáticos y dar metástasis en ganglios linfáticos durante el seguimiento clínico del paciente [$p=0.033$ vs $p=0.136$]. Atendiendo a la frecuencia de cada una de estas mutaciones en la serie analizada, la alteración en *BRAF* constituiría el evento oncogénico inicial, mediante el cual se activa de manera constitutiva la vía de las MAPK, desencadenando un incremento en la proliferación celular. Esta característica confiere a las células tumorales una ventaja biológica frente a las células sanas, lo que causa que se vayan haciendo mayoritarias en la población de células foliculares del tiroides. No obstante, se ha descrito que la expresión sostenida de *BRAF*^{V600E} conduce al arresto del ciclo celular por medio de senescencia inducida por un oncogén, tratándose de un proceso fisiológico protector frente a los tumores^[34]. Es en este punto cuando, debido a la inestabilidad genómica de las células tumorales producida por *BRAF*^{V600E}, entran en juego las mutaciones en *TERT*. Las células en este estadio presentan una predisposición incrementada a adquirir defectos genéticos adicionales^[35], y en este escenario una mutación en *TERT* supone una enorme ventaja biológica, puesto que permite el alargamiento de los telómeros y la salida del estado de senescencia replicativa, a lo cual se suma sinérgicamente la activación constitutiva de la vía de las MAPK, causada por *BRAF*^{V600E}, de modo que las células tumorales llegadas a este punto son inmortales debido a la activación de la telomerasa y proliferan descontroladamente por la activación constitutiva de *BRAF*, que además fosforila a los factores de transcripción ETS, que aumentan la transcripción del gen *TERT* mutado. Por tanto, se propone que la mutación en la región promotora de *TERT* sería un evento oncogénico posterior a la mutación en *BRAF*, que contribuiría a la agresividad del PTC y, posiblemente, a su desdiferenciación hacia otros carcinomas más agresivos. De hecho, en los casos en los que *BRAF* estaba mutado sin coexistir con otras alteraciones genéticas no se afectaba significativamente ni el curso clínico ni la supervivencia de los pacientes. No obstante, esta hipótesis requiere investigaciones futuras, dado el tamaño muestral reducido de este estudio y dentro de éste, el pequeño número de casos positivos sólo para mutaciones en el promotor de *TERT*.

3. ESTUDIOS DE CORRELACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICOS-MOLECULARES

3.1. ASOCIACIÓN A MULTIFOCALIDAD TUMORAL

Aunque se considera que la multifocalidad se asocia a peor pronóstico, riesgo incrementado de recurrencia y mayor mortalidad a causa de la enfermedad^[36,30], no es la primera vez que se observa una correlación inversa entre su existencia y alteraciones genéticas relevantes en la biología de los PTCs^[27]. Esta aparente incongruencia puede obedecer al hecho de que entre un 30% y un 60% de los PTCs multifocales se originan por transformación sincrona o metácrona de diferentes grupos de células foliculares, dentro del mismo lóbulo tiroideo o en ambos lóbulos tiroideos, es decir en realidad se trata de múltiples tumores que no necesariamente portan todos la misma alteración genética. En el 68% (13/19) de los PTCs multifocales incluidos en la serie analizada se genotipó una sola área de tumor primario, lo que pudiera en cierto modo subyacer a la correlación inversa encontrada entre multifocalidad y mutaciones de *TERT*, aún cuando *TERT* mutado se asocia significativamente con otros parámetros clínico-patológicos de mal pronóstico, agresividad. De hecho, la frecuencia de mutación en *TERT* se duplica cuando en PTCs multifocales se analizan 2 áreas diferentes (6 casos) (33% vs 15%).

3.2. ASOCIACIÓN CON MAYOR RIESGO DE DESDIFERENCIACIÓN

En los casos con *TERT* mutado es más frecuente encontrar focos de desdiferenciación intratumoral ($p=0.036$), sugiriendo que podrían tener alguna implicación en mayor riesgo de transición a carcinomas pobremente diferenciados. Hasta el momento, se ha descrito que la activación de la vía de las MAPK a través de alteraciones genéticas en sus efectores conduce principalmente al desarrollo de PTCs, mientras que la activación vía mutaciones genéticas de la ruta de RAS-PI3K-AKT determina el desarrollo mayoritariamente de FTCs, ambos tumores bien diferenciados de origen folicular. Cualquier mutación en estas dos rutas celulares es un evento temprano, de iniciación del tumor en la carcinogénesis folicular tiroidea^[21]. Cuando las alteraciones genéticas se acumulan e intensifican la señalización de estas dos vías, los PTCs y FTCs pueden progresar a carcinomas pobremente diferenciados o indiferenciados. Estas alteraciones genéticas posteriores son eventos tardíos en el proceso de carcinogénesis, y dentro de ellas se podrían encontrar las mutaciones en la región promotora de *TERT*, que se producirían en fases más avanzadas del cáncer, tras algún evento mutacional inicial, y promoverían la progresión y desdiferenciación del tumor.

3.3. ASOCIACIÓN CON INVASIÓN Y METÁSTASIS

Se ha observado que, en general, las mutaciones en la región promotora de *TERT* en el tumor primario segregan en las metástasis, tanto a ganglios linfáticos como a regiones distantes, aunque no se han encontrado evidencias estadísticamente significativas que pongan de manifiesto que las alteraciones en el promotor de *TERT* sean condición necesaria para la invasión de otros tejidos.

3.4. CURSO CLÍNICO Y SUPERVIVENCIA

Los análisis de supervivencia de Kaplan-Meier mostraron que la presencia de mutaciones en la región promotora de *TERT* se asocia con un incremento significativo de la mortalidad de los pacientes a causa de la enfermedad. Estos resultados coinciden con lo que hay publicado al respecto^[32]. De acuerdo con lo que ocurre en la práctica clínica entre los 33 pacientes estudiados, había casi el doble de mujeres que de hombres (21 frente a 12), sin embargo los hombres con mutaciones en *TERT* eran mucho más propensos a fallecer a causa de la enfermedad (6 vs 3, respectivamente). Esto pone de manifiesto que el carcinoma papilar de tiroides es más frecuente en mujeres que en hombres, pero en los varones tiene un comportamiento más agresivo y peores resultados. Todos los fallecidos eran positivos para la mutación en el promotor de *TERT*, lo que subraya su relación con una evolución clínica desfavorable. Tan solo un paciente varón con la mutación en el promotor de *TERT* está vivo sin evidencia de enfermedad. Curiosamente este era uno de los dos casos en los cuales la mutación en la telomerasa parece originarse *de novo* en la metástasis en ganglios linfáticos, lo que parece sugerir una probable subclonalidad de, de modo que posiblemente se habría acabado con las células tumorales portadoras de la mutación antes de llegar a convertirse en un evento predominante en la población tumoral.

Respecto a la recurrencia del tumor, la probabilidad de ésta aumenta significativamente cuando existen mutaciones en la región promotora de *TERT*. Este hecho es indicativo de que la mutación en

el promotor de la telomerasa es un evento tardío en el progreso oncogénico, ocurrente en la etapa de progresión del cáncer. Una vez que la mutación en *TERT* se produce en las células tumorales, rápidamente se convierte en una subpoblación mayoritaria dentro del tumor, confiriendo a éste características tales como la inmortalidad celular y la capacidad de invadir otros órganos. De esta manera, aunque se consiguiera atajar el tumor primario, con una pequeña subpoblación que hubiese logrado escapar al tratamiento el evento de recurrencia sería muy factible, puesto que se trata de células con características que les confieren una ventaja evolutiva respecto a las demás poblaciones.

3.5. COOPERACIÓN CON OTRAS ALTERACIONES EN CURSO CLÍNICO DESFAVORABLE

En el presente estudio solamente se ha evaluado la cooperación de *TERT* con *BRAF*, pues eran muy pocos los casos en los que se encontraba otra combinación de alteraciones genéticas, de manera que el tamaño muestral fuera suficientemente significativo. Aunque las mutaciones en *TERT* mostraban cierta tendencia a coexistir con las mutaciones en *BRAF*, tanto en tumores primarios como en metástasis, la acción conjunta de ambas alteraciones no reveló efectos añadidos en lo que se refiere a curso clínico desfavorable y mayor riesgo de muerte por la enfermedad. De hecho el impacto pronóstico, *per se*, de las mutaciones en *TERT* resultó ser de mayor magnitud. La repercusión de las mutaciones en *TERT* y *BRAF* en el curso clínico y supervivencia de los pacientes con PTCs resulta un tema controvertido. Mis resultados concuerdan con los reportados recientemente por Henderson *et al.*^[37], según los cuales son las mutaciones en el promotor de *TERT* y no las de *BRAF* las que condicionan la supervivencia. Por el contrario, Xing y colaboradores defienden que las mutaciones en el promotor de *TERT* tienen escasa significación pronóstica cuando se separan de la mutación en *BRAF* y se examinan solas, sugiriendo que la mutación en *TERT* requiere alteraciones genéticas adicionales que cooperen con ella para promover la agresividad de los PTCs^[38]. Las discrepancias en lo que respecta al papel de las mutaciones en *BRAF* como biomarcadores pronósticos en pacientes con PTCs también son considerables. Son varios los grupos de investigación que sostienen puntos de vista encontrados con Xing. Estudios en los que se demuestra que *BRAF* *per se* tiene un efecto muy limitado en el curso clínico desfavorable de los pacientes con PTC, desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos o a distancia, recurrencia y supervivencia^[27,39,40,41].

4. EVALUACIÓN DE *TERT* COMO BIOMARCADOR

El valor añadido más importante del presente trabajo es que se han analizado *in situ* las mutaciones en el promotor de *TERT* tanto en tumores primarios como en metástasis en ganglios linfáticos y a distancia. En la mayoría de trabajos publicados hasta la fecha se había estudiado el tumor primario y se habían hecho estudios de asociación clínico-patológico-moleculares atendiendo únicamente al historial del paciente, pero en el presente trabajo se han analizado las alteraciones moleculares en las metástasis, encontrando evidencias de que los pacientes con tumores con mutaciones en *TERT* tienen un decremento de la supervivencia en comparación con aquellos pacientes con tumores de tipo *wild-type* para *TERT*. La utilidad de las mutaciones de *TERT* como biomarcador pronóstico es particularmente relevante debido a la combinación de dos hechos principales: 1) solo un pequeño porcentaje de PTCs se comportan agresivamente y pueden convertirse en letales; 2) hay carencia de buenos indicadores pronósticos en carcinomas papilares avanzados, metastásicos, en la mayoría de los casos resistentes a I¹³¹.

A pesar del modesto número de pacientes, se han obtenido correlaciones muy interesantes, que ponen de manifiesto que *TERT* es una mutación prevalente, que segrega habitualmente con el tumor primario hacia las metástasis, que se relaciona con una evolución clínica desfavorable, progresión tumoral, agresividad y en definitiva peor pronóstico y menor supervivencia. Por esta razón, el estatus mutacional de *TERT* podría ser utilizado para individualizar las decisiones de tratamiento de un paciente, esto es, el tipo de cirugía al que se le somete, la decisión de proceder a la ablación con yodo radiactivo de remanes tumorales y la dosis de éste a administrar o la posibilidad de administrar terapias dirigidas. Asimismo, conocer si *TERT* está o no mutado puede ser amén de rentable muy conveniente y valioso para adecuar el seguimiento del paciente a su perfil genético, realizando más controles y más exhaustivos a aquellos pacientes positivos para la mutación, con el fin último de controlar la agresividad del tumor y mitigar los resultados desfavorables asociados a la mutación en la subunidad catalítica de la telomerasa.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo experimental permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. La prevalencia global de mutaciones en la región promotora del gen *TERT*, en la serie de carcinomas papilares de tiroides analizadas, es del 42.4%, siendo mucho más frecuente la mutación C228T que la mutación C250T. Mutaciones, que resultaron ser mutuamente excluyentes.
2. Las mutaciones en la región promotora de *TERT* no son condición necesaria para la diseminación del tumor primario a los ganglios linfáticos, si bien es cierto que segregaron desde el tumor primario hasta la metástasis linfática en la mayoría de los casos.
3. Las mutaciones en el promotor de *TERT* en las metástasis a distancia se encontraron con mucha frecuencia, aunque no son tampoco condición necesaria para la diseminación del tumor a órganos distantes.
4. Las mutaciones de *TERT* no se asocian significativamente con ninguno de los subtipos reconocidos de carcinomas papilares.
5. Las mutaciones en la región promotora de *TERT* modifican, *per se*, el curso clínico del paciente, asociándose a características más agresivas del tumor, mayor riesgo de recurrencia, estadios más avanzados y menor supervivencia.

En conjunto, todos estos datos permiten afirmar que *TERT* es buen biomarcador pronóstico de utilidad en la rutina clínico-asistencial, dado que permite anticipar el comportamiento agresivo de este tipo de cáncer, la evolución del paciente y la respuesta o resistencia a la terapia de fármacos dirigidos frente a alteraciones moleculares concretas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Con tales conclusiones, sería recomendable estudiar un mayor número de pacientes con historial clínico-patológico detallado para buscar correlaciones robustas que permitan establecer el valor pronóstico de las mutaciones en el promotor de *TERT* en distintos tipos de cáncer humano, así como comprobar en otra serie de tumores de tipo PTC los resultados obtenidos en este trabajo.

Asimismo, se plantea también realizar estudios de biología celular y molecular que permitan comprender el papel de la telomerasa en las células tumorales, puesto que parece ir más allá del incremento del potencial replicativo y la inmortalización celular, mostrando también un aumento de las capacidades metastásicas de las células tumorales circundantes. Sería muy interesante estudiar en cultivos celulares los efectos biológicos que tiene la mutación de *TERT* en el entorno tumoral y tratar de desarrollar posibles terapias inhibitorias de la telomerasa específicas frente a las células positivas para la mutación en el promotor de *TERT*.

Finalmente, resultaría extremadamente útil para la clínica evaluar si las mutaciones en la región promotora de *TERT* pueden detectarse en células tumorales circulantes, localizadas en fluidos biológicos como la sangre o la linfa. En caso afirmativo, este procedimiento representaría un avance considerable en el seguimiento de los pacientes con cáncer, puesto que un simple análisis de sangre permitiría determinar el estatus del promotor de *TERT* y, en función de esto, decidir sobre el tratamiento y seguimiento concreto de cada paciente. El fin último es la medicina traslacional personalizada, es decir, estudiar el cáncer como una enfermedad individual, personal, tratando de conocer las causas de la misma para elegir el mejor tratamiento en cada caso

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Hanahan D. & Weinberg, R. "The hallmarks of cancer" *Cell* 100, 57-70 (2000)
- [2] Greene, F.L. "TNM: Our language of cancer" *CA Cancer Journal for Clinicians* 54(3), 129-30 (2004)
- [3] Kondo T., Ezzat S. & Asa S. "Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia" *Nature Reviews Cancer* 6, 292-306 (2006)
- [4] Carling T. & Udelsman R. "Thyroid cancer" *Annual Review of Medicine* 65, 125–37 (2014)
- [5] Gandolfi G., Ragazzi M. & Frasoldati A. "TERT promoter mutations are associated with distant metastases in Papillary Thyroid Carcinoma" *European Society of Endocrinology* 172(4), 403-413 (2015)
- [6] Sosa J.A. & Udelsman R. "Papillary thyroid cancer" *Surgical Oncology Clinics of North America* 15(3), 585-601 (2006)
- [7] Lloyd V., Buehler D. & Khanafshar E. "Papillary thyroid carcinoma variants" *Head Neck Pathology* 5(1), 51-68 (2011)
- [8] Blackburn, E.H. "Structure and function of telomeres". *Nature* 350, 569-573 (1991)
- [9] De Lange, T. "How telomeres solve the end-protection problem". *Science* 326, 948-952 (2009)
- [10] Collins, K. & Mitchell, J.R. "Telomerase in the human organism". *Oncogene* 21, 564-579 (2002)
- [11] Blasco, M.A. & Hahn, W.C. "Evolving views of telomerase and cancer". *Trends Cell Biology* 13, 289-294 (2003)
- [12] Autexier C. & Greider C.W. "Boundary elements of the *Tetrahymena* telomerase RNA template and alignment domains". *Genes & Development* 9, 2227-2239 (1995)
- [13] Weinhold N., Jacobsen A., Schultz N., Sander C. & Lee W. "Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer". *Nature Genetics* 46:1160–1165 (2014)
- [14] Chiba K., Johnson J.Z., Vogan J.M., Wagner T., Boyle J.M. & Hockemeyer D. "Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing" *eLife* DOI: 10.7554/eLife.07918 (2015)
- [15] Vinagre J., Almeida A., Pópulo H., Batistta R. Lyra J., Pintto V., Coelho R., Celestino R., Prazeres H., Lima J., Melo M., Da Rocha A.G., Preto A., Castro P., Castro L., Pardal F., Lopes J.M., Santos L., Reis R.M., Cameselle-Teijeiro J., Sobrinho-Simoes M., Lima J., Máximo V. & Soares P. "Frequency of TERT promoter mutations in human cancers" *Nature Communications* 4:2185 DOI:10.1038/ncomms3185 (2013)
- [16] Huang F.W., Hodis E., Xu M.J., Kryukov G.V., Chin L. & Garraway L.A. "Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma" *Science* 339, 957-959 (2013).
- [17] Bell J.A., Rube H.T., Kreig A., Mancini A., Fouse S.D., Nagarajan R.P., Choi S., Hong C., He D., Pekmezci M., Wiencke J.K., Wrensch M.R., Chang S.M., Walsh K.M., Myong S. Song J.S. & Costello J.F. "The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer" *Science* 348(6238), 1036–1039 (2015)
- [18] Muzza M., Colombo C., Rossi S., Tosi D., Cirello V., Perrino M., De Leo S., Magnani E., Pignatti E., Vigo B., Simoni M., Bulfamante G., Vicentini L. & Fugazzola L. "Telomerase in differentiated thyroid cancer: promoter mutations, expresion and localization" *Molecular and Cellular Endocrinology*, 399, 288-295 (2014)
- [19] Xing M. "BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications" *Endocrinology Reviews* 28, 742-762 (2007)
- [20] Xiaoli L., Qu S., Liu r. Sheng C., Shi X. Zhu G., Murugan A.K., Guan H., Yu H., Wang Y., Sun H., Shan Z., Teng W. & Xing M. "TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99(6), 1130-1136 (2013)
- [21] Xing M. "Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer" *Nature Reviews Cancer* 13, 184-199 (2013)
- [22] Hermanek P. & Sobin L.H. "TNM Classification of malignant tumors". International Union Against Cancer. 6th edition, pp.33-35. *New York: Springer-Verlag* (2002)
- [23] Mullis K.B. & Faloona F.A. "Specific synthesis of ADN in vitro via a polymerase-catalized chain reaction" *Methods Enzymology*, 155, 335-350 (1987)

- [24] Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekiya T. "Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 86, 2766-2770 (1989).
- [25] Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors" *Journal of Molecular Biology* 94, 441-448 (1977)
- [26] Krousel-Wood M.A., Chambers R.B. & Muntner P. "Clinicians' Guide to Statistics for Medical Practice and Research" *Ochsner Journal* 6(2), 68-83 (2006)
- [27] Costa A.M., Herrero A., Fresno M.F., Heymann J., Álvarez J.A., Cameselle-Teijeiro J. & García Rostán G. "BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma" *Clinical Endocrinology* 68(4):61834 (2007)
- [28] Vinagre J., Pinto V., Celestino R., Reis M., Pópulo H., Boaventura P., Melo M., Catarino T., Lima J., Lopes J.M., Máximo V., Sobrinho-Simões M. & Soares P. "Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker?" *Virchows Archiv* 465, 119-133 (2014)
- [29] Nowell P.C. "The clonal evolution of tumor cell populations" *Science* 1, 194(4260):23-8 (1976)
- [30] Rosai J., Carcangiu M.L., & De Lellis R. "Tumors of the Thyroid Gland". In: *Atlas of Tumor Pathology (Series 3, Fascicle 5)*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, pp: 65-121 (1992)
- [31] Young S.S., Yang P.W., Tae S.H., Seol B.J., Seok K.C., Lyun O.Y., Wook K.S. & Hoon C.J. "Highly concordant key genetic alterations in primary tumors and matched distant metastases in differentiated thyroid cancer" *Thyroid* 5, 672-682 (2016)
- [32] Liu X., Qu S., Liu R., Sheng C., Shi X., Zhu G., Murugan A.K., Guan H., Yu H., Wang Y., Sun H., Shan Z., Teng W. & Xing M. "TERT promoter mutations and their association with BRAF V600E mutation and aggressive clinicopathological characteristics of thyroid cancer" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99(6), 1130-1136 (2014)
- [33] Melo M., da Rocha A.G., Vinagre J., Batista R., Peixoto J., Tavares C., Celestino R., Almeida A., Salgado C., Eloy C., Castro P., Prazeres H., Lima J., Amaro T., Lobo C., Martins M.J., Moura M., Cavaco B., Leite V., Cameselle-Teijeiro J.M., Carrilho F., Carneiro M., Máximo V., Sobrinho-Simões M. & Soares P. "TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99(5), 754-765 (2014)
- [34] Michaloglou C., Vredeveld L., Soengas M.S., Denoyelle C., Kuilman T., van der Horst C., Majoor D.M., Shay J.W., Mooi W.J. & Peeper D.S. "BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi" *Nature* 436, 720-724 (2005)
- [35] Kimura E.T., Nikiforova M.N., Zhu Z., Knauf J.A., Nikiforov Y.E. & Fagin J.A. "High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma". *Cancer Research* 63, 1454-1457 (2003)
- [36] Qu N., Zhang L., Ji Q., Zhu Y., Wang Z., Shen Q., Wang Y. & Li D. "Number of tumor foci predicts prognosis in papillary thyroid cancer" *BMC Cancer* 14, 9-14 (2014).
- [37] George J.R., Henderson Y.C., Williams M.D., Roberts D.B., Hei H., Lai S.Y., Clayman G.L. "Association of TERT Promoter Mutation, But Not BRAF Mutation, With Increased Mortality in PTC". *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100(12):1550-1559. doi: 10.1210/jc.2015-2690. (2015)
- [38] Xing M., Liu R., Murugan A.K., Zhu G., Zeiger M.A., Pai S. & Bishop J. "BRAF V600E and TERT promoter mutations cooperatively identify the most aggressive papillary thyroid cancer with highest recurrence" *Journal of Clinical Oncology* 32, 2718-2726 (2014)
- [39] Gandolfi G., Sancisi V., Piana S. & Ciarrocchi A. "Time to re-consider the meaning of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma" *International Journal of Cancer* 1,137(5):1001-1111 (2015)
- [40] Russo M., Malandrino P., Nicolosi M.L., Manusia M., Marturano I., Trovato M.A., Pellegriti G., Frasca F. & Vigneri R. "The BRAF(V600E) mutation influences the short- and medium-term outcomes of classic papillary thyroid cancer, but is not an independent predictor of unfavorable outcome." *Thyroid* 24(8),1267-1274 (2014)
- [41] Melo M., da Rocha A.G., Vinagre J., Sobrinho-Simões M. & Soares P. "Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma: added value in patient prognosis?" *Journal of Clinical Oncology* 20,33(6):667-668 (2015)