

FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN *BRAF*^{V600E}, EL PATRÓN DE METILACIÓN EN *RASSF1A* Y LA EXPRESIÓN DE NIS EN CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

JAIRO ALONSO CUERVO MARTÍNEZ

Trabajo de grado para optar al título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas
con énfasis en genética

Tutor

Alonso Martínez, *Ph.D*

Comité tutorial

Natalia Olaya Morales. *MD. PhD.*

Carlos Mario Muñetón Peña. *MSc.*

Nicolás Pineda Trujillo. *MSc. PhD*

**UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
CORPORACIÓN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
GRUPO BACTERIAS & CÁNCER
MEDELLÍN
2018**

*A todas las personas que participaron
en la realización de este trabajo.*

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes que participaron en el proyecto.

A mi familia por su compañía incondicional y constante, por el apoyo oportuno y sobre todo por la motivación a continuar con mi formación profesional.

Al Instituto Nacional de Cancerología por la financiación del proyecto, la disposición de las instalaciones y los equipos utilizados.

A la Universidad de Antioquia y en su representación a la Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas por participar la realización de mis estudios.

A mi tutor Alonso Martínez por depositar en mi tanta confianza y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su asesoría, por las enseñanzas impartidas y por los consejos ofrecidos.

A mi comité tutorial, Carlos Muñetón y Nicolás Pineda por todas las asesorías ofrecidas; especialmente a Natalia Olaya, por sembrar en mí la semilla de la investigación, por su apoyo constante, por acompañarme con paciencia durante todos los obstáculos presentados.

Al doctor Alfredo Romero del INC y Beatriz Vieco del departamento de patología del Hospital San Vicente Fundación, porque la participación de ustedes fue fundamental en este trabajo, además de permitirme compartir sus espacios durante mi formación.

A Karime Osorio por sus valiosos aportes al trabajo y su valiosa amistad.

Al personal de la sección de Microbiología y Micología de la Facultad de Medicina, por todas las actividades académicas y sociales que fueron importantes durante este proceso.

A mis amigos de maestría, a Yaneth y Gerardo, por acompañarme y apoyarme en los momentos difíciles de este proceso.

SIGLAS

a.a:	Amino ácido
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ACAF:	Aspirado Con Aguja Fina
APC:	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
BRAF:	<i>B-type Raf Kinase</i>
CAP:	<i>College american of pathologic</i>
CMT:	Carcinoma Medular de Tiroides
CT:	Cáncer de Tiroides
CPT:	Carcinoma Papilar de Tiroides
DE:	Desviación Estándar
EDTA:	Etilen-Diamino-Tetra-Acetato
FAP:	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FFEP:	Fijado en Formalina y Embebido en Parafinas
GAP:	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP:	<i>Guanosine diphosphate</i>
GEF:	<i>Guanine nucleotide exchange factors</i>
GST:	Gen Supresor de Tumor
GTP:	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HVR:	<i>Hypervariable region</i>
H&E:	Hematoxilina-Eosina
I:	Yodo
¹³¹I:	Radioyodo I131
IARC:	<i>International Agency for Reseach on Cancer</i>
INC:	Instituto Nacional de Cancerología
LOH:	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
MAPK:	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MEN:	<i>Multiple Endocrine Neoplasia</i>
MMP-12:	<i>Matrix Metalloproteinase-12</i>
MSP:	<i>Methylation-specific PCR</i>
NIS:	<i>sodium/iodide symporter</i>
OMS:	Organización Mundial de la Salud
pb:	Pares de Bases
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR:	<i>Quantitative PCR</i>
RASSF1A:	Ras association domain family 1 isoform A
RBD:	<i>RAS-binding domain</i>
Ref:	Referencia
REM:	<i>Ras Exchange Motif</i>

RET: *REarranged during Transfection*
RET/PTC: *REarranged during Transfection / Papillary Thyroid Carcinoma*
SH3: *Src homology 3*
Sos: *Son of sevenless*
TBE: *Tris-Borato EDTA*
Tg: *Tiroglobulina*
TSH: *Thyroid-Stimulating Hormone*
TSHR: *Thyroid-Stimulating Hormone Receptor*
RR: *Riesgo Relativo*
VFCPT: *Variante Folicular del Carcinoma Papilar de Tiroides*
WHO: *World Health Organization*

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
SIGLAS.....	4
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS.....	9
1. RESUMEN	10
2. ABSTRACT	11
3. MARCO TEÓRICO	12
3.1 Anatomía de la tiroides	12
3.2 Taxonomía básica de las lesiones de la tiroides	13
3.3 Tumores de células foliculares	13
3.3.1 Carcinomas diferenciados	13
3.3.1.1 CPT	13
3.3.1.1a La variante folicular.....	15
3.3.1.1b La variante de células altas.....	15
3.3.1.1c La variante columnar	15
3.3.1.1d La variante esclerosis difusa.....	16
3.3.1.1e La variante sólida	16
3.3.1.1f La variante oncocítica.....	16
3.3.1.1g Los microcarcinomas.....	16
3.3.1.1h El <i>patrón combinado</i>	16
3.3.1.2 CFT	16
3.4 Factores de riesgo en CPT	17
3.5 Alteración en la vía de señalización de las MAPK	19
3.6 Importancia de la variante patogénica <i>BRAF</i>^{V600E} y CPT	23
3.7 Variante patogénica <i>BRAF</i>^{V600E} y otras alteraciones moleculares	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. HIPÓTESIS	34
7. OBJETIVOS	34
7.1. Objetivo general	34

7.2. Objetivos específicos.....	34
8. METODOLOGÍA.....	35
8.1. Tipo de estudio	35
8.2. Cálculo del tamaño de muestra.....	35
8.3. Criterios de inclusión	35
8.3. Criterios de exclusión	35
8.4. Fuente de datos	35
8.5. Recolección de datos.....	35
8.6. Plan de análisis molecular	36
8.6.1. Extracción de ADN genómico.....	36
8.6.2. Cuantificación del ADN.....	37
8.6.3. Amplificación del gen β - globina.....	37
8.6.4. Detección de la variante patogénica $BRAF^{V600E}$	37
8.6.5. Análisis de la variante patogénica $BRAF^{V600E}$ por secuenciación.....	38
8.6.6. Conversión con bisulfito de sodio.....	38
8.6.7. Análisis bioinformático de la secuencia promotora del gen <i>RASSF1A</i>	38
8.7.8. Inmunohistoquímica para el transportador <i>NIS</i>	39
8.8. Plan de análisis estadístico	40
9. RESULTADOS	41
9.1. Caracterización demográfica e histológica.....	41
9.2. Variante patogénica $BRAF^{V600E}$	44
9.3. Metilación del promotor del gen <i>RASSF1A</i>	47
9. DISCUSIÓN.....	53
10. CONCLUSIONES.....	62
11. RECOMENDACIONES	64
12. BIBLIOGRAFÍA.....	65
13. ANEXOS	81
13.1 Resultado de análisis de mutación del <i>Cobas 4800 V600 mutation test</i>	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE LOS TIPOS DE LESIONES NEOPLÁSICAS EN TIROIDES.	13
FIGURA 2. ESQUEMA ESTRUCTURA PROTEINA RAS..	20
FIGURA 3. ESQUEMA DE ACTIVACIÓN DE RAS	21
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA PROTEÍNA B-RAF.	22
FIGURA 5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN MAPK EN CÉLULAS FOLICULARES.	24
FIGURA 6. PORCENTAJE DE PRESENCIA DE LA VARIANTE PATOGENICA BRAF ^{V600E} EN DIFERENTES POBLACIONES DEL MUNDO	45
FIGURA 7. RESULTADO DE ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN PARA BRAF ^{V600E}	47
FIGURA 8. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE MSP	48
FIGURA 9. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NIS POR IHQ.	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Estratificación del riesgo de las variantes histológicas del CPT. Tomado y adaptado de Garavito et al. (3).....	14
Tabla 2.	Distribución de las características histológicas del CPT con BRAFV600E reportados en diferentes estudios en el mundo.....	26
Tabla 3.	Iniciadores seleccionados para evaluar el patrón de metilación en el gen RASSF1A.....	39
Tabla 4.	Características demográficas y patológicas de los pacientes con Carcinoma Papilar de Tiroides.....	41
Tabla 5.	Distribución de las características anatomo-patológicas por sexo y edad....	43
Tabla 6.	Frecuencias y riesgos relativos (RR) de las variantes histológicas más frecuentes y características histológicas.....	45
Tabla 7.	Análisis de riesgo relativo (RR) entre la presencia de BRAF-V600E y factores demográficos.....	44
Tabla 8.	Análisis de asociación entre la presencia de BRAF-V600E con las características histológicas.....	46
Tabla 9.	Análisis de riesgo relativo (RR) entre el patrón de metilación del gen RASSF1A y factores demográficos.....	47
Tabla 10.	Análisis de asociación entre el patrón de metilación del gen RASSF1A con las características histológicas.....	49
Tabla 11.	Características de expresión del transportador NIS.....	50
Tabla 12.	Análisis de riesgo relativo (RR) entre la localización del transportador NIS y factores demográficos.....	51
Tabla 13.	Análisis de asociación entre la localización de la expresión del transportador NIS con las características histológicas.....	52

1. RESUMEN

El carcinoma papilar de tiroides (CPT) es la neoplasia endocrina más frecuente; actualmente es un problema de salud pública debido al aumento en la incidencia en todo el mundo durante las últimas décadas. Algunos aspectos clínicos, histológicos y moleculares se asocian con fenotipos agresivos de la enfermedad, metástasis, fracaso en el tratamiento y recaída. En Colombia, no hay estudios que analicen estos factores y la asociación entre ellos. El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de la variante patogénica *BRAF*^{V600E}, el patrón de metilación del gen *RASSF1A* y la expresión del transportador NIS en CPT y su asociación con características tumorales en muestras diagnosticadas en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) entre 2006 y 2012. Estudio descriptivo de cohorte transversal con 301 pacientes con diagnóstico de CPT; se confirmó el diagnóstico, las características histológicas de los tumores y datos demográficos de los pacientes. Se seleccionaron bloques de tejido tumoral y normal de cada paciente para análisis molecular. La variante denominada patrón combinado se identificó como el de mayor frecuencia y se asoció con características de invasión y metástasis. La frecuencia de *BRAF*^{V600E} fue de 70.4% y se asocia con el patrón combinado ($p=0.0075$), tumores grandes ($p=0.0084$), invasión de la cápsula tiroides ($p=0.0483$) y extensión extra tiroidea ($p=0.0305$). El porcentaje de metilación de *RASSF1A* en las muestras fue de 14% y 34.5% mostraron hemimetilación; y no se encontró asociado con la presencia de *BRAF*^{V600E} ($p=0.62$). NIS se expresó con mayor frecuencia en citoplasma (53.8%) y la asociación con *BRAF*^{V600E} o con el patrón de metilación de *RASSF1A* no fue estadísticamente significativa ($p=0.48$ y $p=0.90$, respectivamente). La presencia de patrón combinado y *BRAF*^{V600E} confieren a los CPT características de mal pronóstico, independientemente del tamaño tumoral; además, la expresión citoplasmática de NIS estaría asociada con la resistencia al tratamiento. Estas pruebas moleculares deben considerarse de gran utilidad para el diagnóstico y manejo de pacientes y permitirán diseñar tratamientos eficaces y personalizados.

Palabras clave: Carcinoma papilar de tiroides, *BRAF*^{V600E}, metilación, *RASSF1A*, NIS.

2. ABSTRACT

Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most frequent endocrine neoplasm; currently, it is a public health issue due to an increase at the incidence around the world during the last decades. Some clinical, histological and molecular aspects are associated with aggressive phenotypes of the disease, metastasis, resistance to treatment and relapse. In Colombia, there are no studies that analyze these factors and the association between them. The objective of this study was to determine the frequency of the pathogenic variant *BRAF*^{V600E}, the methylation pattern of the *RASSF1A* gene and the expression of the NIS in PTC and its association with tumor characteristics in samples diagnosed at the National Cancer Institute (NCI) between 2006 and 2012. Transverse cohort descriptive study with 301 patients diagnosed with PTC; the diagnosis, the histological characteristics of the tumors and demographic data of the patients were confirmed. Blocks of tumor and normal tissue of each patient were selected for molecular analysis. The so-called variant combined pattern was identified as the greater frequency and was associated with invasion and metastasis characteristics. The *BRAF*^{V600E} frequency was 70.4% and was associated with the combined pattern ($p=0.0075$), large tumors ($p=0.0084$), thyroid capsule invasion ($p=0.0483$) and extra thyroid extension ($p=0.0305$). The methylation percentage of *RASSF1A* at the samples was 14% and 34.5% showed hemimethylated; and it not found associated with the presence *BRAF*^{V600E} ($p=0.62$). The NIS was more frequently expressed at the cytoplasm (53.8%) and the association with *BRAF*^{V600E} or the *RASSF1A* methylation pattern was not statistically significant ($p=0.48$ and $p=0.90$, respectively). The combined pattern presence and *BRAF*^{V600E} confer bad prognostic characteristics to the PTC, regardless of the tumor size; In addition, the cytoplasmic expression of the NIS will be associated with treatment resistance. These molecular tests should be considered very useful for the diagnosis and management of men and women, and will allow to design efficient and personalized treatments

Key words: Papillary thyroid carcinoma, *BRAF*^{V600E}, methylation, *RASSF1A*, NIS.

3. MARCO TEÓRICO

El cáncer de tiroides (CT) puede originarse a partir de las células foliculares o células C (1–6) y cada una genera un tipo de tumor diferente (6,7); es la neoplasia endocrina más frecuente en el mundo con un aumento en la incidencia durante las últimas décadas por la inclusión de los denominados microcarcinomas - tumores <10mm de diámetro (1,8–11). Según la IARC (*International Agency for Research on Cancer*, por sus siglas en inglés) en su informe Glocoban-2012, en el mundo se registraron 298.102 casos nuevos en ambos sexos, de estos 229.923 (77.12%) se diagnosticaron en mujeres (12). En Colombia, según los registros de incidencia de cáncer del Instituto Nacional de Cancerología (INC), en 2008 se presentaron 271 casos nuevos, de los cuales 232 (85.6%) fueron en mujeres (13) y para el 2014 la incidencia de la enfermedad fue de 475 casos nuevos, de los cuales 412 (86.7%) fueron diagnosticados en mujeres (14). La enfermedad afecta principalmente a personas entre los 20 a 50 años de edad (11,15,16).

3.1 Anatomía de la tiroides

La tiroides es la mayor glándula endocrina del organismo, está localizada en la parte frontal del cuello a la altura de las vértebras C5 y T1, delante del cartílago tiroideo entre la unión de la laringe y la tráquea (17); el polo inferior llega hasta el 5º o 6º anillo de la tráquea, el polo superior está en contacto con el tercio inferior de la lámina del tiroides. Es un órgano delgado y se compone de dos lóbulos laterales, unidos en la parte inferior por el istmo, lo anterior le confiere forma de mariposa; el istmo se extiende a través de la tráquea por debajo del cartílago cricoides (17). Cada lóbulo mide entre 2 a 4 cm de espesor / 4 cm de largo / 1.5 cm de ancho. Un tercio de la población presenta una prolongación que se extiende en sentido ascendente por encima del istmo y ligeramente hacia la izquierda de la línea media, llamado lóbulo piramidal. En la parte posterior e inferior de cada lóbulo se localizan el par de glándulas paratiroides (17).

La tiroides está conformada por: las células foliculares presentes en los folículos tiroideos y son las encargadas de la producción del coloide, el medio en donde se sintetizan las hormonas tiroxina (T₄) y triyodotironina (T₃); y por las células parafoliculares o células C encargadas de la producción de calcitonina (17). La cantidad de yodo - I – absorbido por la tiroides es el resultado del estímulo de la Hormona Estimulante de la Tiroides - TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) producida en la pituitaria.

3.2 Taxonomía básica de las lesiones de la tiroides

La detección de las lesiones de la tiroides se hace con base en la ultrasonografía (18). Según la Organización Mundial de la Salud - WHO (*World Health Organization*) las lesiones de tiroides se clasifican de acuerdo con las características anatómicas y patológicas en dos grupos: los tumores de células foliculares y los de células C (parafoliculares). El primer grupo se discrimina a su vez en: 1) carcinomas diferenciados, 2) carcinomas pobremente diferenciados y 3) carcinomas indiferenciados como anaplásicos e insulares. El segundo grupo comprende los carcinomas medulares (6) (Figura 1), y cada uno de ellos a su vez se subdividen en variantes histológicas (1,7).

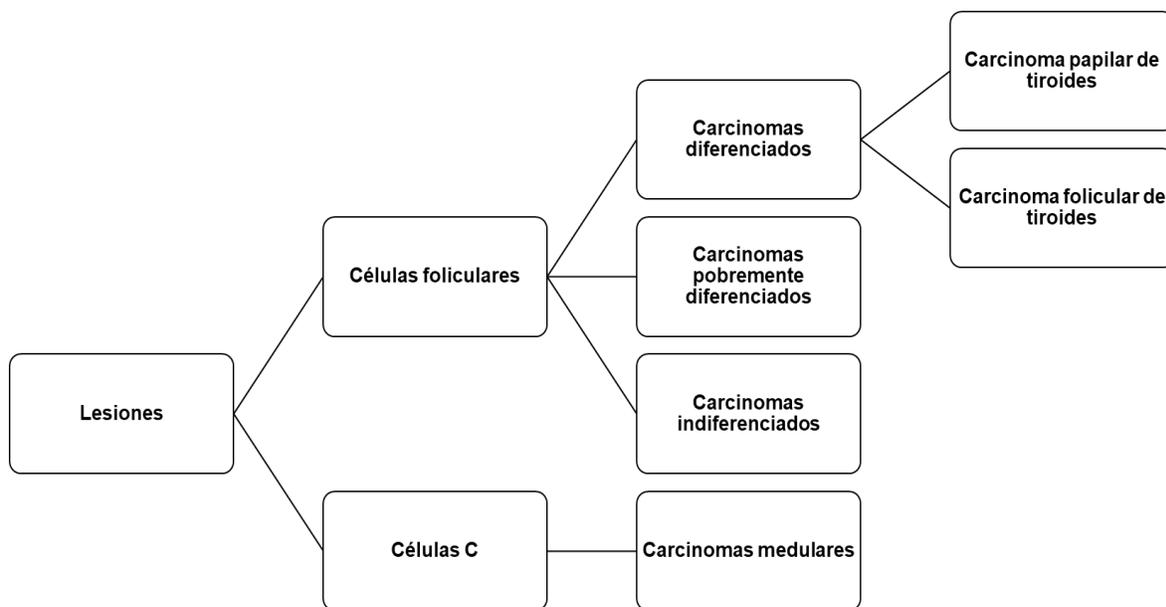


Figura 1. Esquema de los tipos de lesiones neoplásicas en tiroides.

3.3 Tumores de células foliculares

3.3.1 Carcinomas diferenciados: se caracterizan porque histológicamente las células tumorales se parecen a las normales, son de crecimiento lento, no afectan la supervivencia, se detectan por inmuno-análisis de la tiroglobulina (Tg) (19) e incluye los CPT y CFT.

3.3.1.1 CPT es el tipo histológico más frecuente (entre el 70-90% de los CT) (1,4,7,10,20–22), están conformados por células de tamaño uniforme y con características nucleares importantes para el diagnóstico y que hacen parte de la clasificación en tumores de alto y bajo riesgo (11,23), entre otras, núcleo de aspecto vacío (vidrio esmerilado), a veces se observan

cuerpos de psammona (calcificaciones laminares concéntricas derivadas de células neoplásicas necróticas); por lo general no está encapsulado, presenta papilas (células cónica), y son sólidos aunque en ocasiones presentan patrón mixto; entre el 20-80% de los casos son multicéntricos (20). La mayor incidencia de CPT se presenta en mujeres en la cuarta década de vida y se relaciona con la expresión de receptores de estrógeno (2,23). En niños, el 70% de casos son CPT y se asocian con la exposición a la radiación (8).

En el INC se llegó al consenso de agrupar las variantes histológicas en las categorías de: mayor agresividad, mejor pronóstico y sin diferencia (Tabla 1) (3).

Tabla 1. Estratificación del riesgo de las variantes histológicas del CPT.
Tomado y adaptado de Garavito et al. (3).

Comportamiento biológico comparativo con la variante clásica	
	Variante histológica
Mayor agresividad	Esclerosis difusa Folicular. Subtipo difuso Células altas Columnar Trabecular Desdiferenciado: cáncer pobremente diferenciado con componente de cáncer papilar Células claras
Mejor pronóstico	Tumores encapsulados Microcarcinomas Microtumor papilar
Sin diferencia	Folicular Sólido Oncocítica Estroma nodular exuberante similar a fascistis nodular Macrofolicular <i>Wathin like</i> Cribiforme-morular Con estroma lipomatoso
Características histológicas de mal pronóstico	Atipia nuclear Necrosis tumoral Extensión extratiroidea Compromiso de la cápsula iroides Invasión vascular arterial o venosa* Metástasis ganglionares Invasión a tejidos periganglionares

*La invasión vascular en comparación con la invasión de la cápsula del tumor tiene un peor pronóstico, ya que incrementa el riesgo a enfermedad metastásica temprana

A continuación se describirán las variantes histológicas del **CPT**.

3.3.1.1a La variante folicular es la más frecuente, algunos estudios reportan que hasta el 80% de todos los CPT son de este tipo (1,22,24–26). En Colombia, un estudio realizado en el INC reportó que el 23.4% de CPT diagnosticados correspondían a esta variante (23). Se presenta con mayor frecuencia en personas de 45 años o más, sin presentar asociación con la edad (26). Para su diagnóstico se tiene en cuenta que las modificaciones sean generalizadas y no focalizadas(25); y se hace con base en las características nucleares, los núcleos deben ser claros, vacíos, con hendiduras, sin polaridad y algunas veces con pseudo-inclusiones (27). La variante folicular se divide en los subtipos infiltrativo o difuso, encapsulado y macrofolicular; para estos, además de las características nucleares es relevante la invasión vascular y capsular (24,25).

El **subtipo infiltrativo o difuso** se caracteriza por invadir un lóbulo o toda la tiroides con crecimiento difuso similar a un bocio multinodular (7,25). El tumor carece de cápsula bien definida, no existe delimitación entre este y el parénquima adyacente; y se asocia con invasión vascular (80%), metástasis ganglionar (80%) y diseminación extra tiroidea (70%) (7). Se considera agresivo por este fenotipo invasivo (7,28–30). El **subtipo macrofolicular** presenta encapsulación incompleta con invasión al parénquima tiroideo y con fibrosis (7,25); Chan *et al*, establecieron los criterios para su diagnóstico (29). El **subtipo encapsulado** es el más frecuente de los tres (7), tiene cápsula que envuelve la totalidad del tumor, con o sin invasión vascular o de la cápsula del tiroides (25,29); características como núcleos ovoides, pérdida de polaridad de los núcleos que rodean el folículo y un patrón de cromatina clara (29) son importantes para diferenciarlos de los adenomas foliculares (20).

3.3.1.1b La variante de células altas es poco frecuente, hasta el 11% de los casos (31), se caracteriza por que las células tumorales son de dos a tres veces más altas que las normales. El diagnóstico histológico es difícil y se ve afectado por el plano de la sección observado (1,20,21). Las células presentan abundante citoplasma eosinófilo, los núcleos son similares a la variante clásica con numerosas hendiduras y pseudo-inclusiones (1,20,31), con frecuencia hay necrosis, alta actividad mitótica y diseminación extra tiroidea; se considera de peor pronóstico y es más frecuente en hombres mayores (1,4,21,23,31).

3.3.1.1c La variante columnar es poco frecuente, <10% de los casos (6). El tumor está compuesto de células pseudoestratificadas, algunas con vacuolas supra-nucleares o sub-nucleares (1,20), el núcleo se observa hiper cromático y en ocasiones presenta inmunoreactividad variable a la Tg (1,4,6,20); con frecuencia

hace metástasis loco-regional y a distancia que se confunde con metástasis de tumores del tracto gastrointestinal o pulmón (1,6,20).

3.3.1.1d La variante esclerosante difusa tiene desarrollo difuso en uno o ambos lóbulos, usualmente sin formación de masas sólidas, se observan numerosos cuerpos de psammona, infiltración densa y fibrosis estromal, se presenta con frecuencia en pacientes jóvenes (20), se disemina fácilmente a regiones intra-tiroideas y metástasis a nódulos linfáticos y pulmón (4).

3.3.1.1e La variante sólida tiene crecimiento sólido/trabecular/insular >70% del tumor, se caracteriza por presentar redes sólidas típicas de carcinoma con características nucleares de CPT (32), sin focos de necrosis, con mínima o nula actividad mitótica y sin mutaciones en *p53* (1,20). Un tercio de estos tumores hacen invasión vascular y extra tiroidea, se asocia con metástasis linfoide; son tumores típicos de niños expuestos a radiación (1,20,32).

3.3.1.1f La variante oncocítica presenta características histológicas y genéticas diferentes al carcinoma oncocítico (1,4). Para algunos autores el comportamiento biológico y/o el potencial de agresividad de esta variante y la variante folicular es similar (1,4). Las células se observan poligonales, aunque en ocasiones se perciben columnares, con citoplasma eosinófilo granular abundante con numerosas mitocondrias y núcleo claro con hendiduras y pseudo-inclusiones (1,20).

3.3.1.1g Los microcarcinomas son tumores que miden <10mm, presentan cualquier variante histología del CPT y se asocian con características histológicas de riesgo porque a pesar de su tamaño reducido, producen enfermedad con fenotipos agresivos (23,33,34); por ejemplo, Park *et al*, reportaron porcentajes de extensión extra tiroidea y metástasis a ganglio linfático (52.5% y 32.9% respectivamente) en microcarcinomas (35), resultados similares a los reportados por otros autores (23,36,37). Estudios recientes consideran que el diagnóstico de los microcarcinomas explica el incremento en la incidencia de la enfermedad en las últimas décadas.

3.3.1.1h El patrón combinado se caracteriza por la presencia de dos o más variantes histológicas en un mismo tumor, representada cada una con mínimo 30% de células tumorales, esta variante tiene fenotipo agresivo por presentar características de riesgo como invasión de la cápsula tiroides, extensión extra tiroidea y metástasis (23).

3.3.1.2 CFT se caracterizan porque las células presenta un patrón folicular sin la presencia de papilas (18,20), se asocia con bocio, más frecuente en

mujeres (proporción 3.3:1), y en personas >45 años de edad (18,20). El CFT en la mayoría de los casos evoluciona a estadios más agresivos como metástasis a ganglio linfático y a distancia principalmente a pulmón y hueso, por lo que es considerado más agresivo en comparación con el CPT. Estudios recientes demostraron que pacientes con CFT encapsulados presentaron mejor sobrevida, comparada con pacientes que tenían tumores que hacían invasión vascular o a la cápsula (25,29). El CFT se clasifica en las variantes de células de Hürtle, células claras e insular; estos no se describirán en el presente trabajo.

Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico se hace con base en los reportes de patología y no se recurre a los análisis genéticos e inmunohistoquímicos (IHQ) complementarios, razón por la que este es subjetivo.

3.4 Factores de riesgo en CPT

Entre los factores de riesgo para desarrollar CT están la alta concentración de yodo (I) en la dieta, las hormonas (19,38,39), los nódulos tipo quiste o coloide, la exposición a la radiación, la tiroiditis linfocítica y la historia familiar (36,39). Estudios demuestran que la incidencia de CPT es mayor en regiones geográficas con dietas ricas en I, en comparación con aquellas regiones donde es la concentración de I menor (22,36,39,40); Guan *et al*, asociaron las dietas ricas en I con tumores con características histológicas agresivas - extensión extra tiroidea y metástasis a ganglio linfático - (22). La alta concentración de I en las células foliculares generarían procesos de oxidación que inducen daños o afectan los mecanismos de reparación del ADN (40). Otros estudios demostraron que el bajo consumo o la deficiencia de I se asocia con CFT, (22,39) hipotiroidismo y bocio (22,40). Algunos autores demostraron que individuos con enfermedades benignas de tiroides tienen 80 veces más riesgo de desarrollar CPT (41,42); mientras que otros no reportan esta asociación (23).

Algunos autores plantean que las hormonas femeninas tienen un papel en la patogénesis de la enfermedad (2,38); se sabe por ejemplo que durante la pubertad aumenta el riesgo de desarrollar CT y este riesgo disminuye con la menopausia (43). Un estudio realizado en mujeres embarazadas encontró que niveles elevados de estrógenos y gonadotropina coriónica se asocian con el desarrollo de CPT, porque los estrógenos se unen a los receptores alfa y beta e inducen la proliferación e invasión de las células foliculares (23,39). Adicionalmente, los estrógenos en general, incrementan los niveles de la TSH y la producción elevada de esta promueve el crecimiento de la glándula (43). El riesgo a desarrollar CT es más alto en mujeres multíparas que en nulíparas (43); por tanto la regulación entre TSH y

estrógenos es importante en el desarrollo de la enfermedad. Recientemente, se encontró que factores asociados con procesos hormonales como el uso de anticonceptivos orales, la terapia hormonal, lactancia, edad de la menarquia y del primer nacimiento no representan riesgo para el desarrollo de CT (43).

Los nódulos tiroideos son palpables hasta en el 20% de la población asintomática, en una proporción de 3:1 (mujeres : hombres, respectivamente); y se postula que la frecuencia de los nódulos por sexos y la incidencia de CPT se asocia con factores hormonales (39). Algunos estudios reportan mayor frecuencia de detección de nódulos en la población general al realizar exploración con técnicas más sensibles (1,2,8,11,16,33,35,39); y son más habituales los nódulos múltiples que los únicos (1,33,35). En ocasiones, estos producen gran cantidad de hormona tiroidea causando hipertiroidismo, este último asociado con cáncer (1,33,35); sin embargo, Davies *et al*, no encontró asociación entre CPT y la presencia de enfermedades benignas como la tiroiditis de Hashimoto o bocio (23).

La radiación ionizante es un factor de riesgo para el desarrollo de CT, este fue el tumor sólido más común desarrollado por los sobrevivientes de las bombas atómicas en la segunda guerra mundial (44). El proto-oncogen *RET* (*REarranged during Transfection*), codifica una proteína de la familia de los receptores de membrana con actividad tirosina quinasa (45), implicada en procesos de diferenciación y proliferación celular. La radiación rompe el ADN y genera reordenamientos inter-cromosomales como *RET/PTC - REarranged during Transfection / Papillary Thyroid Carcinoma* (46), estos consisten en la fusión del dominio tirosina quinasa de *RET* con un dominio 5' de otros genes que sirve de promotor para la expresión constitutiva de *RET* (10,15,16,34,47). Existen tres isoformas principales de reordenamientos *RET/PTC*, de los cuales *RET/PTC1* y *RET/PTC3* son los más frecuentes, este último más común en tumores agresivos (45,48,49).

Estudios previos reportaron que después del accidente de Chernobyl aumentó la prevalencia de *RET/PTC3* en la población expuesta (44,50). Pacientes < 15 años expuesto a radiación desarrollan la forma agresiva del cáncer, con invasión de tráquea, laringe y esófago, además se asocia con metástasis a distancia y variantes histológicas de riesgo (44,50). Recientemente, con el accidente de Fukushima I – Japón en 2011, se observó mayor incidencia de CT en niños que en adultos expuestos (44). El sexo femenino tiene mayor riesgo de presentar reordenamientos debido a la variación hormonal que aumenta la proliferación celular y la posibilidad de frecuencia de rompimiento de cromátides hermanas (46).

Otro factor de riesgo para el desarrollo de CT es la agregación familiar. La neoplasia endocrina múltiple - MEN (*Multiple Endocrine Neoplasia*) es un síndrome hereditario

ocasionado por mutaciones en *RET* y se trasmite de manera autosómica dominante. El síndrome compromete el sistema endocrino (principalmente glándula tiroides, paratiroides y suprarrenal), incrementando la producción de hormonas y causando variedad de síntomas. Existen dos síndromes MEN diferentes – MEN1 y MEN2. Los pacientes con MEN1 desarrollan tumores en las glándulas paratiroides, la hipófisis y el páncreas. Los pacientes con MEN2 tienen riesgo alto de padecer Carcinoma Medular de Tiroides (CMT). El síndrome MEN2 se divide en tres subtipos clínicos MEN2a, MEN2b y CMT-F. MEN2a se asocia con CT, aproximadamente el 80% de los pacientes desarrollan el subtipo CMT, la enfermedad se presenta durante la niñez o adultez temprana, generalmente tiene tumor en ambos lóbulos del tiroides. MEN2b también está asociado con CMT pero en menos frecuencia de fenotipo agresivo.

Otro síndrome con agregación familiar y que se asocia con CPT es la Poliposis Adenomatosa Familiar - FAP (*Familial adenomatous polyposis*). La enfermedad se hereda de forma autosómica dominante asociada a mutaciones en el gen *APC* (*Adenomatous polyposis coli*); se caracteriza por la aparición de pólipos adenomatosos en el colon y el recto a edad temprana y con riesgo de desarrollar cáncer colorrectal cercano al 100%. Algunos estudios demostraron que pacientes con CPT y FAP presentaban reordenamiento *RET/PCT₁*.

En la actualidad, la biología molecular permite adquirir y ampliar conocimientos sobre la génesis, el desarrollo, comportamiento y patogenicidad de la enfermedad. Algunos autores reportan que alrededor del 70% de las alteraciones genéticas en CPT ocurren en genes involucrados en la vía de señalización MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), por ejemplo, mutaciones puntuales en *BRAF* (V600E) (9,11,16,18,34,36,37,48,51–65). Esta es la alteración genética más común en las células foliculares (9,11,16,18,34–37,48,51–57,59–62,64–66) y su alta frecuencia y especificidad demuestran la importancia en la patogénesis del CPT (5,56,64). En la carcinogénesis del CT también están involucrados otros eventos genéticos que incluyen la inactivación de genes supresores de tumor (GST) por eventos epigenéticos (64,67–70), y la activación de otros oncogenes.

3.5 Alteración en la vía de señalización de las MAPK

La mayoría de tumores presentan alteración de una o varias vías de señalización. En CPT la ruta que con mayor frecuencia se encuentra alterada es la vía de las MAPK (9,10,16,71). Los cambios más frecuentes incluyen variantes patogénicas en los genes *RAS* y *BRAF*, o reordenamientos con el gen *RET*. Los cambios son mutuamente excluyentes y una sola alteración es suficiente para iniciar la transformación, adquirir la capacidad de malignidad y tumorigénesis (10). La vía

MAPK es una cascada de señalización de transducción intracelular involucrada en crecimiento, proliferación, diferenciación y apoptosis celular, entre otros. La membrana celular tiene receptores con actividad tirosina-quinasa; estos se caracterizan por tener tres dominios: uno extracelular de unión al ligando, otro transmembrana y uno intracelular con actividad tirosina-quinasa. Estos receptores se activan por factores mitogénicos extracelulares (factores de crecimiento, hormonas o citoquinas) que causan autofosforilación de los residuos de tirosina del receptor (5,52,72).

Las Ras quininas pertenecen a una superfamilia de proteínas G pequeñas, monoméricas, con actividad GTPasa intrínseca, se ubican en la cara interna de la membrana citoplasmática y están unidas a GTP (Ras-GTP, forma activa) ó a GDP (Ras-GDP, forma inactiva). Existen más de 150 miembros altamente conservados en estructura y con función similar, en mamíferos se encuentran 3 formas, K-Ras, H-Ras y N-Ras (11,72). Las proteínas Ras se diferencian por el motivo CAAX ubicado en el C-terminal de la región hipervariable - HVR (*Hypervariable region*) (donde la Cisteína esta conservada en todas las formas de la proteína, A es un amino-ácido (a.a) alifático y X es un a.a cualquiera) (73). La HVR regula las modificaciones postraduccionales que definen el tráfico y localización de estas proteínas en la célula (74). Adicionalmente, Ras tiene dos regiones denominadas interruptores I y II, que sirven de unión con proteínas activadoras GTPasas - GAPs (*GTPase activating proteins*) e interacción con proteínas de intercambio de nucleótidos de guanina - GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*) respectivamente (75–77). Los interruptores se encuentran cerca al fosfato y del GTP y su conformación es dependiente de la unión de Ras con GTP o GDP (Ver figura 2).

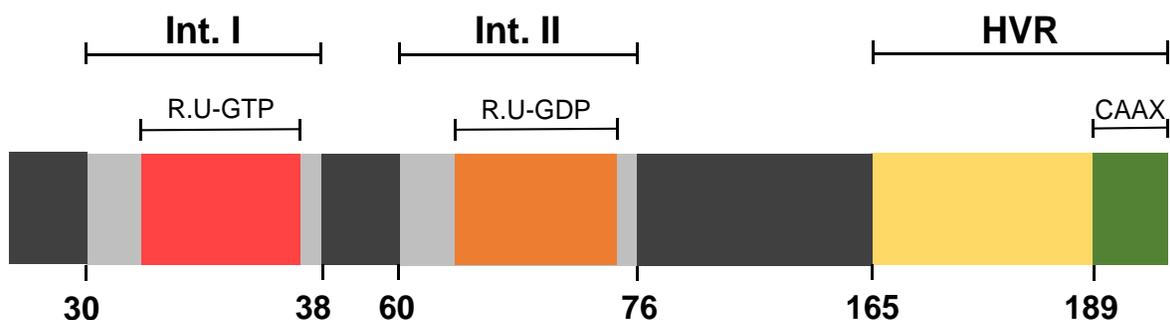


Figura 2. Esquema estructura proteína Ras. Int: Interruptor. HVR: Hypervariable region. R-U-GTP: Región de unión con GTP. R-U-GDP: Región de Unión con GDP.

Para la activación de Ras se requieren de otras proteínas que facilitan la hidrólisis de Ras-GTP o el intercambio GDP/GTP (78,79). Las proteínas activadoras de Ras son las GEF, estas aumentan la velocidad de intercambio GDP/GTP al generar un cambio alostérico en los interruptores I y II, permitiendo la unión de proteínas

efectoras (80–82). La principal proteína GEF es Sos (*Son of sevenless*), esta tiene dos dominios conservados el motivo de intercambio de Ras: REM (*Ras Exchange Motif*) y la región con actividad catalítica (CDC25); adicionalmente, en el extremo C-terminal tiene una región rica en prolina que se une al dominio SH3 (*Src homology 3*) de la proteína adaptadora Grb2 (83–85) para formar el complejo Sos-Grb2.

El complejo Sos-Grb2 se localiza en el citoplasma, y al activarse el receptor de tirosina-quinasa, este complejo se traslada a la membrana plasmática donde Grb2 con el dominio SH2 interactúa con el receptor en los residuos fosforilados, así Sos estaría más cerca de Ras y lo activa estimulando el intercambio de GDP por GTP mediante el dominio con actividad de intercambio de nucleótidos de guanina (82,86–89) (Figura 3).

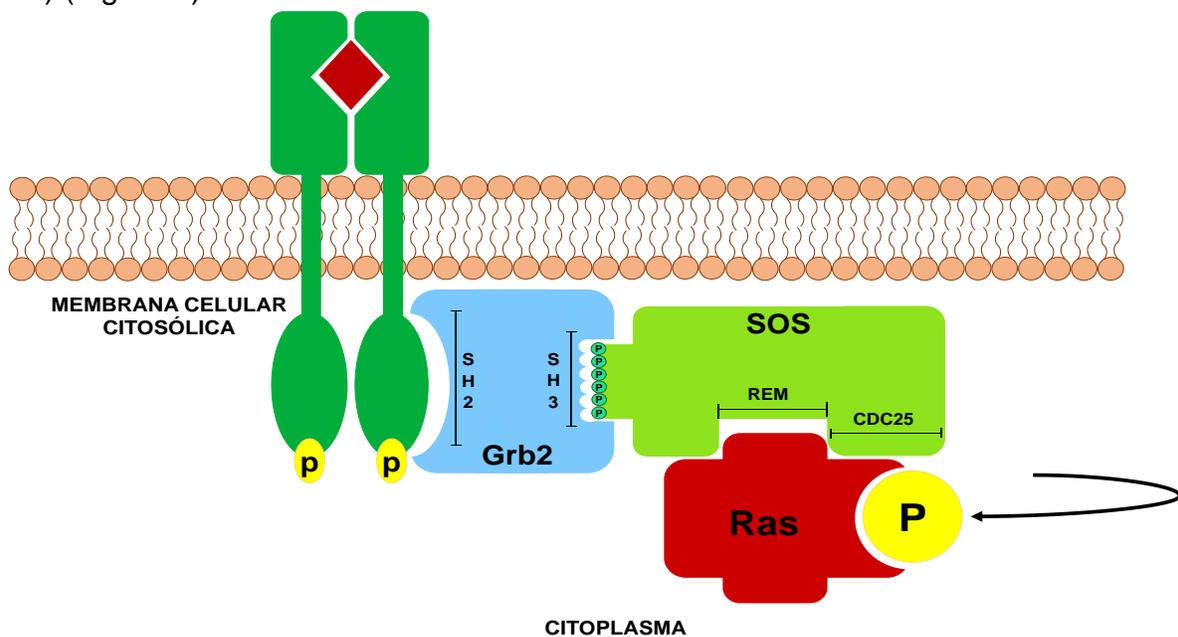


Figura 3. Esquema de activación de Ras por proteínas activadoras en respuesta a la dimerización de los receptores tirosina-quinasa en la membrana de las células foliculares.

Ras activada inicia la cascada de señalización de Raf, esta pertenece a la familia de las seronina/treonina quinasa y se presenta en diferentes isoformas A-Raf, B-Raf y C-Raf o Raf-1. B-Raf es codificada por el gen *BRAF* (*B-type Raf Kinase*) localizado en el cromosoma 7q34, codifica una proteína de 766 a.a, es un potente activador de las MAPK quinasa (52,71) y se expresa en diferentes tejidos incluidas las células foliculares de la tiroides (71). Las proteínas Raf son altamente conservadas y están conformadas por tres regiones importantes: la CR1 en donde se encuentra el dominio RBD (*Ras-binding domain*) y un dominio rico en cisteína, la CR2 que compone el dominio regulador N-terminal y la CR3 que tiene un dominio catalítico quinasa C-terminal y varios sitios de fosforilación (11).

En el citoplasma, B-Raf se acopla con la proteína dimérica 14-3-3 por medio de los sitios de fosforilación altamente conservados S365 y S729, esta unión inactiva a B-Raf porque oculta el segmento de activación y bloquea el dominio RDB (Figura 4). Cuando se forma el complejo Ras-GTP, B-Raf inactiva migra hacia la cara interna de la membrana citoplasmática donde se acumula. Allí, la proteína 14-3-3 se desfosforila, B-raf se libera y expone el dominio RDB, donde se unirá Ras-GTP. Esta unión permite la fosforilación de los sitios de activación T599 y S602 de CR1, estos una vez fosforilados impiden la interacción entre el loop de activación y el loop P, de esta forma se activa la proteína (Figura 4).

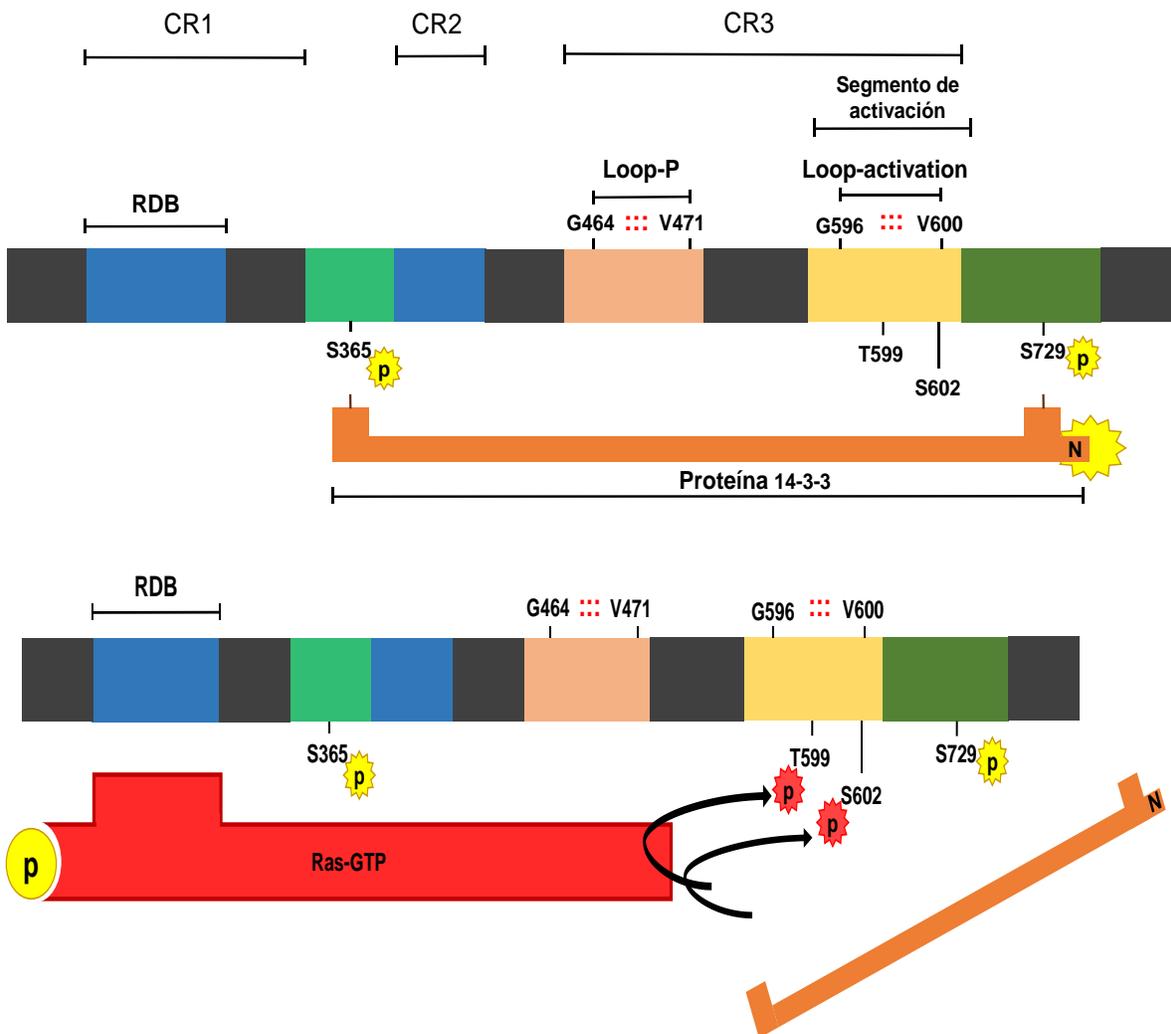


Figura 4. Esquema de la proteína B-Raf. (Arriba) Proteína inactiva y los sitios de acoplamiento con la proteína 14-3-3. (Abajo) Estructura de la proteína B-Raf desacoplada de la proteína 14-3-3 exponiendo los sitios de fosforilación para su activación por acoplamiento con RAS-GTP.

Las proteínas Mek 1/2 son efectores corriente debajo de B-Raf. B-Raf activada induce la fosforilación en los residuos S2, S217 y S221 de las proteínas Mek, activándolas. Estas van a fosforilar a las proteínas Erk 1/2 en los residuos T202 y

Y204 para su activación. Erk activadas se translocan al núcleo y regulan diferentes factores de transcripción implicados en proliferación celular, supervivencia, carcinogénesis, apoptosis y diferenciación celular.

En el gen *BRAF* hay reportadas diferentes variantes patogénicas, una de ellas es la transición del nucleótido 1799 que sustituye la adenina por timina, este cambio genera la sustitución del a.a valina por glutamato en el codón 600 (*BRAF^{V600E}*), la variante patogénica activa constitutivamente la proteína B-Raf, aumentando más de 400 veces su actividad (11,15,67,68,90), esta mutación somática, es hasta el momento el evento más importante en la iniciación de la tumorigénesis del CPT (15,34,52,54,59,64,71). La Figura 5 muestra la cascada de señalización MAPK y las implicaciones de la variante patogénica *BRAF^{V600E}*.

Estudios reportan la presencia de la variante patogénica en tumores bien y pobremente diferenciados (34,59), además se demostró que no es de línea germinal (16,67,70). Otra variante patogénica en este gen es la sustitución de A>G en el nucleótido 1801, esta transición genera el cambio de lisina por ácido glutámico en el codón 601 (*BRAF^{K601E}*) (5,59). Esta variante patogénica se encuentra en el 2% de la variante folicular y se considera que tiene un valor pronóstico (26,57). Otra alteración que involucra el gen es la translocación *AKAP9/BRAF*, que se presenta con frecuencia en personas expuestas a la radiación (59).

3.6 Importancia de la variante patogénica *BRAF^{V600E}* y CPT

La variante patogénica *BRAF^{V600E}* se reporta con mayor frecuencia en adultos que en niños, en estos últimos, se asocia principalmente con exposición a la radiación. Diferentes estudios demostraron asociación entre la presencia de la variante patogénica y la variante histológicas del CPT. Tang *et al*, asociaron la variante patogénica en el 77% con la variante células altas, el 60% con la clásica y hasta el 12% con la variante folicular y con los microcarcinomas, sugiriendo que la variante patogénica es un evento temprano en la carcinogénesis del CPT (11,18,36,58,59,62,71,91–93). Varios estudios determinaron que la variante folicular y los microcarcinomas con la variante patogénica y no están encapsulados son considerados de mal pronóstico (9,36,58,64,93).

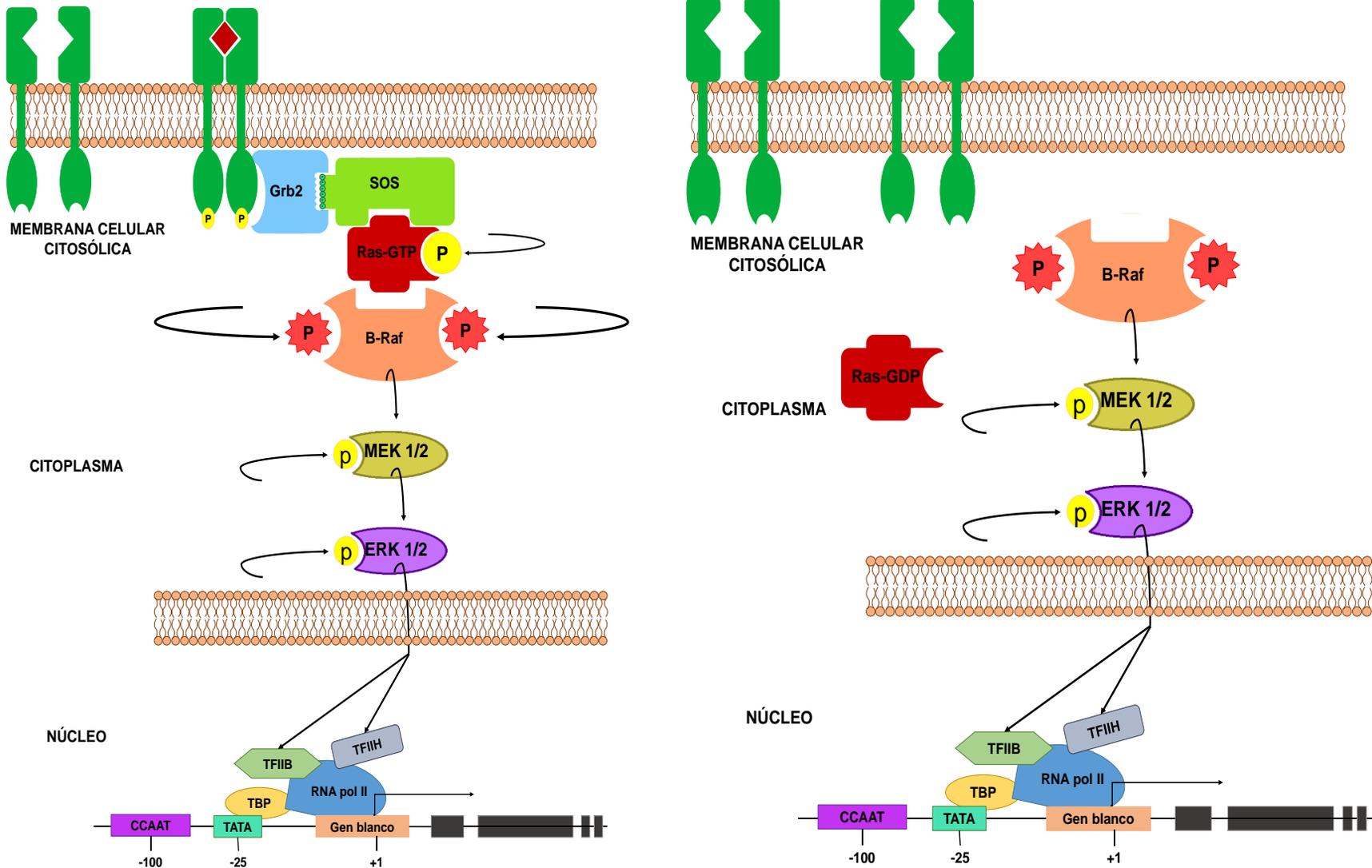


Figura 5. Vía de señalización MAPK en células foliculares. Se muestra el esquema de la vía de señalización en células normales (izquierda) y en células con la variante patológica BRAF^{V600E} (Derecha).

Diferentes estudios asocian la presencia de $BRAF^{V600E}$ con extensión extra tiroidea, metástasis a ganglio linfático, estadios avanzados del tumor y recurrencia de la enfermedad (9,36,37,58,64). Krimbell *et al*, determinaron que los tumores portadores de la variante patogénica son más agresivos, multifocales y hacen metástasis intraglandular (58). Tavares *et al*, no encontraron asociación entre la variante patogénica y la edad, el sexo y las características histológicas (15). La Tabla 2 presenta la asociación entre la presencia de $BRAF^{V600E}$ con factores demográficos y características histológicas reportadas en algunos estudios.

El uso de $BRAF^{V600E}$ como biomarcador específico no está establecido aún, estudios demostraron que la mayoría de ACAF indeterminados son variante folicular y esta no se asocia con frecuencia a la variante patogénica (53), algunos autores reportaron que al analizar biopsias indeterminadas, encontraron que entre el 15-39% eran portadores de $BRAF^{V600E}$, por esta razón consideran que la detección de la variante patogénica es un marcador específico asociado al subtipo tumoral (59,94,95). Por lo tanto, la detección de la variante patogénica en muestras de CT, se debe analizar como un complemento al diagnóstico que permita determinar el tratamiento adecuado al paciente, y no como una prueba aislada de los resultados histo-patológicos (5).

3.7 Variante patogénica $BRAF^{V600E}$ y otras alteraciones moleculares

La variante patogénica $BRAF^{V600E}$ es importante en la diferenciación y proliferación celular (5,9,34,36,48,60,65). Algunos autores sugieren que la mutación confiere a los tumores características invasoras porque favorece la expresión de genes implicados en la degradación de la matriz extracelular como *MMP-12* (*Matrix Metalloproteinase-12*) (5,11,34,36,48). Otros demuestran que actúa sobre genes de restauración de matriz celular favoreciendo la localización tumoral fuera de la cápsula de la tiroides (9,68).

Una implicación importante de $BRAF^{V600E}$ en las alteraciones celulares se asocia con el transportador de yodo - NIS (*Na⁺/I-Symporter*). NIS es una glicoproteína transmembranal de 643 a.a, codificada por el gen *hNIS* ubicado en el cromosoma 19p13. NIS regula el transporte activo de I desde la membrana basolateral hacia el citoplasma del folículo tiroideo en respuesta a la TSH mediante la vía de señalización AMPc (96–98), como constituyente esencial en la biosíntesis de las hormonas tiroideas T₃ y T₄ (99,100). El I es captado del torrente sanguíneo por NIS hacia el citoplasma de la célula folicular, de allí es transportado al coloide en el interior del folículo tiroideo por la proteína pendrina. Simultáneamente, se transporta al coloide la molécula Tg desde el retículo endoplasmático.

Tabla 2. Distribución de las características histológicas del CPT con BRAFV600E reportados en diferentes estudios en el mundo

VARIANTE PATOGENICA BRAFV600E										
PAÍS	CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS			CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS (%)						Ref.
	Edad	Sexo (%)		Invasión cápsula tiroides	Invasión extra tiroidea	Metástasis ganglionar	Metástasis extra ganglionar	Multifocalidad	Vascularidad	
		Femenino	Masculino							
Portugal	46.7	45.0	55.0	-	26.0	26.0	-	26.0	25.0	178
EE.UU	45.6	33.0	27.0	-	26.0	37.0	1.0	35.0	-	191
Corea	45.1	82.4	17.6	-	66.7	48.0	1.0	-	-	175
	47.3	-	-	48.3	-	67.2	-	-	-	173
Italia	42.0	37.9	-	-	-	37.2	30.0	37.6	-	24
		36.4	45.9	50.8		64.1	-	52	-	37
España	53.5	-	14.2	-	64.0	32.0	3.5	14.2	-	62
Filipinas	-	27.0	64.0	-	-	-	54.0	-	-	179
China	43.0	66.2	74.2	73.7	-	65.1	-	69.4	-	172
	40.6	77.5	22.5	-	61.2	57.5	-	30.0	-	176
Taiwan	-	70.2	29.8	-	55.3	36.1	0	59.5	-	92
Brasil	36.8	65.9	57.1	-	68.6	71.2	66.7	-	-	194
Argentina	47.7	60	40	50	20	30	10	10		192
Japón	50.6	38.5	37.3	38.2	39.4	27.5	25.0	-	-	193
Colombia	50.5	69.8	74.3	73.7	76.7	71.9	72.1	67.2	71.3	

En el coloide ocurre la oxidación del I, este proceso consiste en el acoplamiento del I con los residuos de tirosilo de las moléculas de Tg catalizado por peróxido de hidrogeno (TPO) (99). El acoplamiento genera monómeros de hormonas inactivas. La hormona se activa al formar trímeros – T₃ - o tetrámeros – T₄. Finalmente, las hormonas activas salen del coloide mediante vesículas al torrente sanguíneo en respuesta a factores hormonales (99).

La terapia con radioyodo I131 (¹³¹I) elimina las células neoplásicas remanentes después del tratamiento quirúrgico debido a la capacidad captadora de I de las células foliculares (101,102). El CPT es sensible al tratamiento con ¹³¹I; sin embargo, algunos estudios muestran que hasta el 30% de los carcinomas diferenciados son resistentes (103–105). La resistencia se asocia con la reducción en la captación de I por la célula tumoral por medio de un mecanismo desconocido (106).

Varios estudios muestran sobreexpresión de *hNIS* en CPT o en nódulos benignos al compararlo con tejido normal (100,105,107,108); sin embargo, en estas células la proteína se localiza predominantemente en el citoplasma (62,109,110); Zhang *et al*, demostraron que la expresión citoplasmática de NIS se asocia con el fracaso en la terapia debido a la localización incorrecta de NIS (96). Actualmente, los estudios se centran en la expresión diferencial de NIS según el tipo de lesión, por ejemplo, en la variante oncocítica, la acumulación de mitocondrias dificulta la detección de la expresión de NIS por IHQ (109), en adenomas o en la enfermedad de Hashimoto se localiza, principalmente, en la membrana basolateral (109).

La mayoría de las proteínas sufren modificaciones postraduccionales como la adición de carbohidratos, antes de alcanzar su localización final (109). Algunos autores demostraron que en CPT, no se encuentran proteínas completamente glicosiladas, la proteína NIS se encuentra parcialmente glicosilada y se localiza en citoplasma (109,111). Los resultados permiten suponer que las alteraciones de localización de NIS se debe a modificaciones a nivel transcripcional y postranscripcional (106,109,112). En términos generales, los estudios de expresión de la proteína NIS son controversiales (100,105,107,109,113–117), sin embargo, los resultados no indica si la proteína es funcional o no por estar en una localización diferente a la habitual (100). Un estudio reciente mostró niveles altos de la proteína NIS y bajos niveles de ARNm de NIS en CPT que en tejido normal (96), esto explicaría la sobreexpresión de NIS en el citoplasma y apoyan la hipótesis de alteración en los mecanismos postraduccionales que no permiten la ubicación correcta de la proteína. Los resultados sugieren que la localización de NIS en los compartimentos intracelulares es la causa de la disminución o inhibición en el transporte de I (100).

Además de la concentración de I y la localización de NIS en la membrana basolateral del folículo, se requieren de otros factores que influyen en la transcripción y función de NIS (106,112). La TSH y TSHR (*Thyroid-Stimulating Hormone Receptor*) son dos proteínas que estimulan de transcripción y translocación de NIS. Riedel *et al*, observaron que en ausencia de TSH, NIS se expresaba y localizaba en citoplasma, mientras que en presencia de TSH, se ubicaba en la membrana basolateral; concluyeron que la TSH regula la transcripción de *NIS*, condiciona la captación de I y participa en la dirección sub-celular de NIS (118), Zhang *et al*, confirmaron estos resultados, ellos demostraron que en CPT las concentraciones altas de TSH y TSHR mejora la expresión de *hNIS*, lo que implicaría mayor absorción de ¹³¹I durante la terapia (96,97). Por otra parte, Bruno *et al*, demostraron que la inhibición de TSH generaba disminución en la expresión de *hNIS*, pero no de TSHR (119); varios autores observaron que en CT hay reducción en la expresión de *hNIS*, sin afectar la expresión de TSHR (55,112,120).

En los tumores con *BRAF*^{V600E} se espera que capten I ávidamente por la proliferación celular continua; sin embargo, estos expresan y localizan la proteína NIS generalmente en el citoplasma: por esta razón no se obtienen los resultados esperados en el tratamiento y hay recaídas (55,62,91,121). Algunos autores mencionan que *BRAF*^{V600E} regula la expresión de *hNIS* por una vía diferente a MAPK (106); así mismo, Riesco-Eizaguirre *et al*, mostraron que la mutación inhibe la expresión de *hNIS* regulando la expresión de TGFβ1 (62,106). Recientemente, un estudio mostró la sobreexpresión de *hNIS* por estimulación de TSH en CPT portadores de *BRAF*^{V600E}, aunque los niveles de SP1 y PAX8 (factores que regulan la transcripción de *NIS*) se mantienen constantes sin mostrar diferencias entre el tejido normal y el tumoral (106).

Otros autores proponen que la disminución en la captación de ¹³¹I se debe a eventos epigenéticos. Choi *et al*, señalan que la metilación del promotor es la causa de la disminución en la expresión de *hNIS* (106). Otros autores reportaron hipermetilación en el promotor de *hNIS* en líneas celulares de CT, y demostraron la restauración de la expresión al tratar las células con agentes desmetilantes (122–125). No hay reportes acerca del patrón de metilación de *hNIS* en CPT (106). En CT con *BRAF*^{V600E} se observó aumento en el patrón de metilación de *hNIS* (106).

Estudios previos determinaron la expresión de las proteínas responsables de la metilación celular DNMT1, DNMT3a y DNMT1b, y observaron los niveles de DNMT1 estaban incrementados en CPT con *BRAF*^{V600E}; sin embargo, esta no cataliza la metilación *de novo*, por lo que no explicaría el incremento en la metilación del promotor de *hNIS* (126–129). Un estudio llevado a cabo en células tumorales murinas reveló que *BRAF*^{V600E} aumenta la expresión de metiltransferasas que modifican el promotor *hNIS* reduciendo su expresión (62). Son necesarios más

estudios acerca de la influencia de la mutación en el silenciamiento epigenético de *hNIS* (106). Posiblemente, el análisis mutacional de *BRAF* y el patrón de metilación de *hNIS* se podrían utilizar como pronóstico posquirúrgico en pacientes con CPT.

Hay reportes sobre la presencia de *BRAF*^{V600E} y la asociación con la metilación de GST como *TIMP3*, *SLC5A8*, *RARβ2* y *RASSF1A* (47,64,67–70,90). *RASSF1* se ubica en el cromosoma 3p21.2, está compuesto de 8 exones, codifica proteínas efectoras Ras (130) y es miembro de una familia de seis proteínas. *RASSF1* tiene dos promotores diferentes y sufre *splicing* alternativo generando 8 transcritos *RASSF1A-RASSF1H* (130), *RASSF1A* es capaz de reducir la formación de colonias e inhibir la formación de cáncer *in vitro* e *in vivo* (130,131) que le confiere su actividad como Gen Supresor de Tumor (GST). Adicionalmente, *RASSF1A* se acopla a tres proteínas de unión a microtúbulos para regular la mitosis y la apoptosis en respuesta a estímulos mitogénicos o pro-apoptóticos, y retiene a las ciclinas A y D1 para detener el ciclo celular (130). *RASSF1A* se encuentra metilado en diferentes tipos de cáncer incluyendo CT, como el nasofaríngeo (67%), mama (62%), riñón (56%), pulmón de células no pequeña (30-40%) y ovario (30-40%) (131–134).

La frecuencia de metilación en CT es controversial. Algunos estudios no encontraron asociación significativa entre metilación y el riesgo a desarrollar CPT (69,135,136); mientras que otros correlacionan la metilación con formas agresivas del tumor - carcinomas indiferenciados y CMT (69,136,137). Algunos encontraron porcentaje elevado de silenciamiento de *RASSFF1A* en las variantes menos agresivas de CPT (131,134); simultáneamente, un meta-análisis encontró asociación entre la metilación y el riesgo de desarrollar CFT con metástasis a distancia y estadios avanzados del tumor (138), coincidiendo con los resultados de Xing *et al*, quienes determinan que la inactivación epigenética de *RASSF1A* es importante en la formación de adenomas benignos y progresión hacia CFT cuando no se detecta la mutación *BRAF*^{V600E} (90,136), Faam *et al*, reportaron que los eventos epigenéticos son más frecuentes en CFT que en CPT (67); sin embargo, es posible que en un mismo tumor co-existan mutaciones puntuales y alteraciones epigenéticas (131).

Nakamura *et al*, plantean que el silenciamiento de *RASSF1A* es un evento frecuente en estadios tempranos del desarrollo del CT (136,139). Con base en el incremento gradual de los porcentajes de metilación de *RASSF1A* desde estadios benignos hasta malignos, Mohammadi-Asl *et al* plantean que la tumorigénesis de CT se inicia con los adenomas y terminan en los carcinomas y la metilación ocurre desde las primeras etapas (140); sin embargo, Schagdarsurengin *et al*, observaron que la hipermetilación es un evento poco frecuente en CPT y CMT en comparación con los

adenomas foliculares y bocio (137); finalmente, en los subtipos indiferenciados la metilación ocurre en los estadios avanzados (131). Estudios recientes muestran que el patrón de metilación de *RASSF1A* no se asocia con metástasis o con la clasificación TNM (tamaño, extensión a ganglios linfáticos, metástasis), pero si con la edad (137,138). Por el contrario, otros encuentran asociación con metástasis a distancia (132) y no con las características clínico patológicas o los datos sociodemográficos (140).

Para que la actividad funcional de un GST se pierda es necesario el silenciamiento de ambos alelos; sin embargo, en diferentes estudios no se observa el silenciamiento completo. Dammann *et al*, proponen que *RASSF1A* pertenece al grupo de GST haploinsuficientes, es decir, la inactivación de un solo alelo favorece la carcinogénesis (131,133,134,138,141).

La asociación entre *BRAF*^{V600E} con el patrón de metilación de *RASSF1A* es controversial. Recientemente los estudios demostraron que existe una asociación mutuamente excluyente (90,135–137,139,142). Mientras otros plantean que es posible la coexistencia de ambas en el mismo tumor (131).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CT es el tumor endocrino más frecuente en el mundo, afecta a personas de todas las edades particularmente a mujeres entre los 40 y 45 años. Según la IARC, en 2012 se presentaron 229.923 casos nuevos en ellas, se ubicó en la octava posición de los cánceres que las afectan después del cáncer de mama, ovario y gástrico. En Colombia el panorama es similar, el mismo año se registraron en el INC 398 casos nuevos en mujeres, se ubicó en la quinta posición, después del de mama y gástrico. La incidencia está incrementando por la implementación de técnicas de diagnóstico más sensibles que permiten la detección de los microcarcinomas; por lo anterior, el CT es considerado un problema de salud pública.

El subtipo tumoral de CT más común es el CPT, que tiene buen pronóstico, es tratable y con frecuencia curable. El 5% de las personas adultas presentan nódulos tiroideos; y de estos entre el 5-8 % son malignos, por lo que desde el principio se requiere hacer una detección adecuada. Las células tumorales obtenidas por aspiración con aguja fina (ACAF) permiten estratificar el riesgo de la neoplasia, esto unido a la identificación de biomarcadores implicados en la patogenicidad de la enfermedad, sería útil para la toma de la mejor decisión para los pacientes.

Existen diferentes técnicas moleculares que identifican genes con alteraciones puntuales, por ejemplo, por PCR alelo-específica es posible identificar la variante patogénica V600E en el proto-oncogen *BRAF* (*BRAF^{V600E}*), asociada con fenotipos agresivos de la enfermedad. Diferentes estudios determinaron la frecuencia de esta en distintas poblaciones del mundo; sin embargo, se desconoce la frecuencia en pacientes colombianos y su asociación con características histológicas del tumor.

RASSF1A es un GST, su inactivación puede ocurrir por hipermetilación de las islas CpG de su promotor, y esta se asocia con la patogénesis de diferentes cánceres; algunos estudios muestran que esta alteración es exclusiva de subtipos histológicos en CT como carcinomas indiferenciados o CMT. En Colombia no hay estudios sobre la asociación entre metilación y la presencia de *BRAF^{V600E}* y/o las características histológicas tumorales.

El transportador NIS es una glicoproteína de membrana que regula el ingreso del I a las células de la tiroides. Después de la tiroidectomía el principal tratamiento es radioterapia con ¹³¹I, pero se requiere de una correcta síntesis y expresión de NIS para obtener resultados satisfactorios; sin embargo, algunos estudios reportan que en CPT con *BRAF^{V600E}*, se inhiben la expresión de NIS.

Con base en lo anterior se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es la frecuencia de *BRAF*^{V600E}, el patrón de metilación del gen *RASSF1A* y el grado de expresión de la proteína NIS en CPT y su asociación con las características histológicas?

5. JUSTIFICACIÓN

El CT presenta un aumento en la incidencia y actualmente es considerado como un problema de salud pública en el mundo; el subtipo histológico más frecuente es el CPT que representa aproximadamente el 80% de todos los tumores. Diferentes estudios han evaluado genes candidatos implicados en la patogénesis para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad; sin embargo, estos resultados en muchos casos son contradictorios. En Colombia no hay estudios similares que permitan verificar el modelo de desarrollo de este tipo de cáncer para hacer extrapolación de los resultados obtenidos en un acervo genético diferente al caucásico y de esta forma aportar al diseño de metodologías para el diagnóstico temprano, pronóstico asertivo y tratamiento adecuado.

Por lo general, después del diagnóstico de CT los pacientes son sometidos a la tiroidectomía, esto implica tratamiento farmacológico de por vida, y algunos de ellos reciben tratamiento con ^{131}I ; sin embargo, algunos pacientes no muestran el resultado esperado. Por tanto, la inclusión de análisis moleculares, permitirá la identificación de tumores con predisposición a desarrollar fenotipos agresivos – invasión y/o metástasis – y a predecir la respuesta a la radioterapia.

Con los resultados obtenidos contribuiremos a comprender el estado actual y las características de la enfermedad en población colombiana, compararla con otras y permitirían diseñar herramientas experimentales que en el futuro podrían utilizarse para llegar a un diagnóstico certero y precoz en el beneficio del paciente.

6. HIPÓTESIS

Existe asociación entre la presencia de alteraciones moleculares en los genes *BRAF*, *RASSF1A*, y la expresión del transportador NIS con el desarrollo de fenotipos agresivos de carcinoma papilar de tiroides (CPT) en un grupo de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología E.S.E (INC) Bogotá-Colombia.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Determinar la frecuencia de la mutación *BRAF*^{V600E}, el patrón de metilación del gen *RASSF1A* y la expresión del transportador NIS en carcinoma papilar de tiroides (CPT) y su asociación con las características histológicas asociadas al tumor de muestras diagnosticadas en el Instituto Nacional de Cancerología entre 2006 y 2012.

7.2. Objetivos específicos

- Describir las características demográficas e histopatológicas de los pacientes diagnosticados con CPT.
- Establecer la frecuencia de la variante patogénica *BRAF*^{V600E} en muestras con CPT.
- Determinar el patrón de metilación del promotor del gen *RASSF1A* en muestras con CPT.
- Establecer la frecuencia de expresión del transportador NIS en muestras con CPT.
- Explorar la asociación entre los hallazgos genéticos y las características histopatológicas.

8. METODOLOGÍA

8.1. Tipo de estudio

Estudio transversal de tipo descriptivo.

8.2. Cálculo del tamaño de muestra

El tamaño muestral se calculó utilizando un método normal asintótico, con prevalencia estimada del 44%, confianza del 95% y potencia del 80%. Con base en lo anterior se determinó un tamaño de muestra de 301.

8.3. Criterios de inclusión

- Pacientes diagnosticados con carcinoma papilar de tiroides (CPT) entre 2006 y 2012 en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) o que el diagnóstico fue revisado y confirmado por patólogos de la institución.
- Disponibilidad de material biológico - tejido normal y tumoral Fijado en Formalina y Embebido en Parafina (FFEP).

8.3. Criterios de exclusión

- Tumor de origen metastásico.

8.4. Fuente de datos

Los datos demográficos de los pacientes se obtuvieron de las historias clínicas archivadas en el sistema de información MED del INC y de las pruebas moleculares realizadas a los tejidos FFEP almacenados en el registro de patología oncológica del INC.

8.5. Recolección de datos

En las historias clínicas de los pacientes seleccionados se realizó búsqueda de los datos demográficos (edad y sexo), los grupos etarios se formaron a partir de la edad de riesgo determinada por la OMS, pacientes mayores y menores de 55 años (143); y de las características histológicas de los CPT (invasión de la cápsula tiroides, extensión extra tiroidea, invasión linfático, invasión vascular venosa, metástasis ganglionar, metástasis a ganglio linfático, multifocalidad y tamaño). Con respecto a la característica – invasión de la cápsula tiroides - hace menos de una década se consideraba que la glándula tiroides presentaba cápsula, una capa delgada de tejido

conectivo, incompleta, no homogénea (144,145); sin embargo, no hay evidencia embriológica anatómica o histológica que demuestren la verdadera existencia de esta. Para determinar la extensión extra tiroidea se considera a partir de la invasión al músculo esquelético (144). No obstante, esta característica se analizó en este estudio porque durante el periodo de selección de las muestras para el estudio se contemplaba la existencia de la cápsula tiroidea para determinar invasión o no.

Con base en el tamaño los tumores se categorizaron en:

- Carcinomas: tumores > 10 mm y con o sin características de fenotipos agresivos (invasión y/o metástasis).
- Microcarcinomas: tumores < 10 mm, con características de riesgo. En los casos multifocales, la sumatoria de los diámetros de todos los focos no debería superar los 10mm.
- Microtumores: tumores < 10 mm, sin características de riesgo. En los casos multifocales, la sumatoria de los diámetros de todos los focos no debería superar los 10mm.

La información se almacenó en una base de datos diseñada para este fin. El reporte de patología se confirmó por microscopia de tejido fijado en lámina y coloreado con Hematoxilina-Eosina (H&E) por dos expertos, independientemente. La clasificación de las variantes histológicas se realizó según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Colegio Americanos de Patólogos - CAP (*College American of Pathologic*). De cada uno de los casos se seleccionaron dos bloques de tejido FFEP uno con mayor cantidad de tejido tumorales y el con tejido normal para obtener cortes histológicos y extraer ADN genómico para realizar los análisis moleculares.

El protocolo de investigación fue aprobado por los Comités de Ética del INC y del Instituto de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina - Universidad de Antioquia.

8.6. Plan de análisis molecular

8.6.1. Extracción de ADN genómico

En tubos Eppendorf de 1.5 ml se depositaron tres cortes de 10 µm de cada tejido FFEP por separado, siguiendo protocolos establecidos para evitar la contaminación cruzada. Para remover la parafina, los tejidos se sometieron a lavado con 1 ml de xileno dos veces, posteriormente, para deshidratar el tejido y eliminar el exceso de xileno se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 100%. Finalmente, el etanol se

descartó y los tubos se secaron a 37°C para eliminar el exceso de etanol. La extracción de ADN se realizó mediante protocolo estandarizado con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1; el botón obtenido se disolvió en 20 µl de buffer Tris-EDTA. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

8.6.2. Cuantificación del ADN

El ADN se cuantificó utilizando un NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante y se almacenó hasta su uso.

8.6.3. Amplificación del gen β - globina

Cien muestras se seleccionaron mediante muestreo aleatorio simple para analizar la calidad del ADN extraído. Un fragmento de 209 pares de bases (pb) del gen β -globina se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los iniciadores reportados por Saiki *et al.*: BGPCO3 (5' – ACACA ACTGTGTTCACTAGC – 3') y BGPCO5 (5' GAAACCCAAGAGTCTTCTCT – 3') (146). La mezcla de PCR contenía: 5 µl del ADN, 5 µl de Buffer 5X (Applied Biosystems, USA), 1.5 µl de MgCl₂, 0.625 µl de cada dNTP's, 0.25 µl de cada iniciador, y 0.1 µL de Taq Polimerasa (Applied Biosystems, USA), en un volumen final de 25 µl con H₂O estéril libre de nucleasas.

Las condiciones de los ciclos de PCR consistían en: un paso de denaturación inicial a 94°C por 4 min; seguido de 40 ciclos de amplificación que consistían en denaturación a 94°C durante 1 min, alineación a 55°C durante 2 min, extensión a 72°C durante 1.5 min y finalmente una extensión a 72°C durante 4 min. Como control positivo se utilizó ADN extraído a partir de linfocitos de sangre periférica y como control negativo se utilizó mezcla de PCR sin ADN. Los amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% preparado con buffer TBE 1X y teñidos con Sybr Safe (Invitrogen, USA), el corrido se realizó a 120v durante 60 min en buffer TBE 1X y se revelaron con luz UV utilizando foto-documentador.

8.6.4. Detección de la variante patogénica $BRAF^{V600E}$

Para determinar la presencia de la mutación $BRAF^{V600E}$ se analizaron los ADN de las muestras tumorales seleccionadas, tres µl de ADN a una concentración de 10 ng/µL se amplificaron mediante qPCR, utilizando el estuche comercial *Cobas 4800 V600 mutation test* (Roche Molecular Systems Inc, Germany); este detecta la transversión (A-T) en el nucleótido 1799 del exón 15 del gen y amplifican un fragmento de 116 pb. Los ciclos de amplificación y detección de la variante

patogénica se realizaron automáticamente con el software *cobas*[®] 4800 System (Roche Molecular Systems Inc, Germany); los resultados de estos ensayos informan presencia o ausencia de la mutación únicamente.

8.6.5. Análisis de la variante patogénica *BRAF*^{V600E} por secuenciación

Mediante muestreo aleatorio simple, se seleccionaron 30 muestras para confirmar el resultado de detección de la variante patogénica *BRAF*^{V600E}, mediante secuenciación directa. Por PCR se amplificó un fragmento de la región codificante del exón 15 de *BRAF* utilizando los iniciadores reportados por Fukushima *et al*: sentido (5'-GCTTGCTCTGATAGGAAAATGAG-3') y anti sentido (5'-GTAACCTCAGCAGCATCTCAGG-3') (147). La mezcla de PCR contenía: 50 ng del ADN, 10 µl de Buffer 5X (Applied Biosystems, USA), 2.5 µl de MgCl₂, 1.5 µl de cada dNTP's, 1 µl de cada iniciador, y 0.5 µL de Taq Polimerasa (Applied Biosystems, USA), en un volumen final de 50 µl con H₂O estéril libre de nucleasas.

Las condiciones de los ciclos de PCR consistían en: un paso de denaturación inicial a 94°C por 4 min; seguido de 30 ciclos de amplificación que consistían en denaturación a 94°C durante 30 seg, alineación a 58°C durante 30 seg, extensión a 72°C durante 30 seg y finalmente una extensión a 72°C durante 2 min. Los productos de PCR se purificaron usando ExoSAP-IT[™] PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA), los fragmentos purificados se secuenciaron utilizando el kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) con el ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

8.6.6. Conversión con bisulfito de sodio

Entre 400 a 500 ng de ADN se utilizaron para la conversión con bisulfito por medio del estuche comercial *EZ DNA Methylation-Gold*[™] Kit (Zymo Research, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones del ciclo utilizado para la conversión consistían en un paso inicial a 98°C por 10 min, seguido de uno a 64°C por 2.5 horas y finalmente uno a 4°C hasta por 20 horas. Después de la conversión el ADN se disolvió en 10 µl de buffer de elusión.

8.6.7. Análisis bioinformático de la secuencia promotora del gen *RASSF1A*

En la base de datos methprimerDB (<http://medgen.ugent.be/methprimerdb/>) se buscaron iniciadores que flanquearan la región del promotor del gen *RASSF1A* y se seleccionaron los que amplificaban fragmentos menores de 200 pb (Tabla 3). Por

medio de las secuencias de *RASSF1A* NG_023270.1 se comprobó la ubicación y que amplificaran islas CpG.

Tabla 3. Iniciadores seleccionados para evaluar el patrón de metilación en el gen *RASSF1A*.

	<i>Forward (5' - 3')</i>	<i>Reverse (3' - 5')</i>	T (°C)	Fb
No Metilado	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTAG	CACTAACAAACACAAACCAAAC	60	169
Metilado	GGGTTTTGCGAGAGCGC	GCTAACAAACGCGAACCG	64.4	169

8.6.8. PCR para análisis de metilación

Para amplificar la región promotora del gen *RASSF1A* se realizó PCR específica para metilación (MSP). La mezcla de la PCR contenía: 2 µl del ADN convertido, 2.5 µl de Buffer 5X (Applied Biosystems, USA), 0.75 µl de MgCl₂ 2mM, 0.2 µl dNTP's, 0.25 µl de cada iniciador (secuencia metilada y no metilada) 0.2 mM, 0.5 de Taq Polimerasa (Applied Biosystems, USA), en un volumen final de 11 µl con H₂O estéril libre de nucleasas.

Las condiciones de los ciclos de PCR consistían en: un paso de denaturación inicial a 95°C por 15 min; seguido de 40 ciclos de amplificación que consistían en denaturación a 94°C durante 40 seg, alineación a 60°C (no metilados) y 64.4°C (no metilados) durante 90 seg, extensión a 72°C durante 60 seg. Posteriormente, la extensión adicional a 72°C durante 7 min. Como controles positivos se utilizaron el set *Human Methylated & Non-methylated DNA* (Zymo Research, USA), como control negativo se utilizó H₂O estéril libre de nucleasas en lugar de ADN.

Los amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% preparado con buffer TBE 1X y teñidos con Sybr Safe (Invitrogen, USA), el corrido se realizó a 120v durante 60 min en buffer TBE 1X y se revelaron con luz UV utilizando fotodocumentador.

8.7.8. Inmunohistoquímica para el transportador NIS

A partir de los tejidos FFEP con tejido tumoral seleccionados para cada uno de los casos se obtuvieron cortes histológicos de 3 µm sobre lámina cargada. Se utilizó el anticuerpo Anti-Sodium Iodide Symporter antibody [SPM186, isotipo IgG1] (Abcam-UK) que reconoce los a.a 625-643 del transportador. El análisis se hizo mediante

IHQ indirecta siguiendo un protocolo estandarizado en el Departamento de Patología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Antioquia. Las láminas se desparafinaron en horno toda la noche. Al día siguiente el exceso de parafina se retiró mediante cuatro pasos seriados en xileno y luego en etanol al 100%, 95% y 70%; después se incubaron a 100°C por una hora en buffer citrato recuperador de antígeno; transcurrido este tiempo se agregó peróxido de hidrógeno al 6% para bloquear la peroxidasa endógena. Las láminas se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1/20) y a continuación con el secundario (1/200) en cámara húmeda, cada uno por una hora. Finalmente, la reacción se reveló con diaminobencidina. Como control positivo se utilizó tejido de tiroides normal y como control negativo se utilizó tejido de tiroides normal omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. Dos patólogos, independientemente, evaluaron la expresión de NIS con base en los siguientes parámetros: localización de la proteína (citoplasma o membrana basolateral) y variante histológica representada.

8.8. Plan de análisis estadístico

Los datos se registraron en una tabla en Excel 2010® y exportados al software de análisis epidemiológico Epidat 3.1®. La normalidad de la muestra se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov para conocer la distribución de las variables cuantitativas. El análisis univariado de estas se realizó mediante el cálculo de medidas de tendencia central y de dispersión; para las variables cualitativas se determinaron las frecuencias absolutas y relativas.

Un análisis bivariado se realizó para explorar la asociación entre las variables independientes (presencia de la variante patogénica *BRAF*^{V600E} o el patrón de metilación de *RASSF1A*) y las variables respuesta (características clínicas de los pacientes e histopatológicas de los tumores) por medio del cálculo de riesgos relativos (RR). Así mismo, se exploró la asociación entre la ubicación de expresión de la proteína NIS (variable independiente), con la variante patogénica *BRAF*^{V600E} y recaída (variables respuesta). Para todas las pruebas de hipótesis se consideró significativo que el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) no pasara por uno o un valor de *p* menor a 0.05.

9. RESULTADOS

9.1. Caracterización demográfica e histológica

Se analizaron los datos de 301 pacientes diagnosticados con CPT en el INC entre 2006 y 2012. La edad promedio de diagnóstico fue 49 años (DE \pm 14.03, rango: 12-82), presentándose frecuentemente en individuos menores de 55 años con el 59.8% (189/301), y 266 de los casos (88.4%) fueron en mujeres.

Al analizar las características histológicas de los tumores se observó que muchos eran multifocales 45% de los casos (135/301); el 86.7% (261/301) eran carcinomas -diámetro > 10 mm-; el 83.2% (237/301) presentaban invasión de la cápsula tiroides; el 65.5% (186/301) extensión extra tiroidea y el 61.9% (153/301) metástasis a nódulos linfáticos (Tabla 4).

Tabla 4. Características demográficas y patológicas de los pacientes con Carcinoma Papilar de Tiroides.

Factor Asociado	Frecuencia	
	n	%
Sexo		
Mujeres	266	88.6
Hombres	35	11.4
Grupos de edad		
< 55 años	180	59.8
\geq 55 años	121	40.2
Tamaño del tumor		
Mirotumor	13	4.3
Microcarcinoma	27	8.9
Carcinoma	261	86.7
Características histológicas		
Invasión cápsula tiroides (n=285)	237	83.1
Extensión extratiroidea (n=284)	186	65.4
Metástasis a ganglio linfático (n=247)	153	61.9
Metástasis extraganglionar (n=244)	104	42.6
Invasión linfática (n=187)	70	37.4
Invasión venosa (n=185)	43	23.2
Multifocalidad	135	53.2

La variante histológica del CPT que se encontró con mayor frecuencia fue el patrón combinado, un comportamiento histológico que registramos y se define como: “tumor compuesto por dos o más variantes histológicas, representada cada una de ella por lo menos con 30% de células tumorales del total de células cancerosas que conforman la lesión. Los tumores con patrón combinado entonces están conformados por un subtipo predominante, que corresponde a la variante histológica con mayor porcentaje de células cancerosas; subtipo secundario, que corresponde a la variante histológica que siga en porcentaje de células cancerosas, en algunos casos, puede presentarse subtipo terciario, que cumpliría con el mismo criterio de clasificación basados en el porcentaje de células cancerosas” (23) (Figura 6).

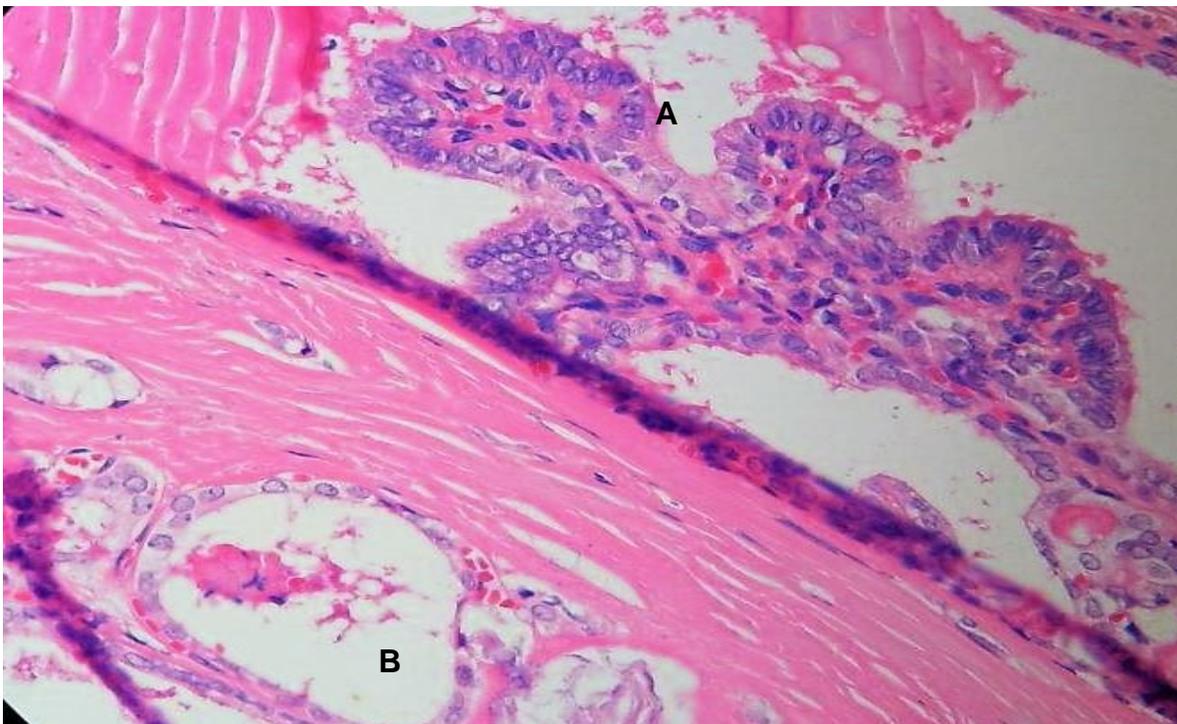


Figura 6. Patrón combinado. La mayoría de los casos de carcinoma papilar de tiroides no son una variante pura; por lo general, un tumor está compuesto por al menos dos variantes histológicas. El subtipo predominante corresponde a la variante más extendida (A. V. clásica), seguido por el subtipo secundario (B. VFCPT). H&E. 400X.

El patrón combinado se encontró en el 54.5% (164/301) de los casos, seguido por la variante folicular (VFCPT) con 21.6% (65/301) y la variante clásica con 19.6% (59/301). Las variantes que conformaban el patrón combinado con más frecuencia fueron: como subtipo predominante las variantes clásica (90.6%) y VFCPT (4.18%); y como subtipo secundario la VFCPT (90.9%) y la variante sólida (2.89%); la distribución de las otras variantes histológicas se presenta en la Tabla 5. La

distribución de las variantes histológicas se analizó según el sexo del paciente y se encontraron variantes exclusivas de mujeres como la de células claras, columnar, esclerosante difusa, *Fascitis like*, macrofolicular y sólida. La clasificación pro grupos etarios mostró que aunque la enfermedad se presenta a cualquier edad, hay variantes más frecuentes en el grupo de edad <55 años (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de las características anatómo-patológicas por sexo y edad.

Factor Asociado	Sexo				Grupos de edad				
	Mujeres		Hombres		< 55 años		≥ 55 años		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Tamaño tumoral									
Carcinoma (>10mm)	230	86.5	31	88,5	157	52.1	104	34.5	
Microcarcinoma (<10mm)	24	9	3	8,5	15	4.9	12	3.9	
Microtumor (<10mm)	12	4.5	1	3	8	2.6	5	1.6	
Variante histológica									
Células altas	5	83.3	1	16.7	1	0.33	5	1.66	
Células claras	1	100	0	0	0	0	1	0.33	
Clásica	48	79.6	12	20.4	43	14.2	16	5.32	
Columnar	1	100	0	0	0	0	1	0.33	
Esclerosante difusa	1	100	0	0	1	0.33	0	0	
<i>Fascitis like</i>	1	100	0	0	1	0.33	0	0	
Folicular	63	96.9	2	3.1	35	11.63	30	9.97	
Patrón combinado	144	87.8	20	12.2	96	31.89	68	22.5	
Macrofolicular	1	100	0	0	1	0.33	0	0	
Sólida	1	100	0	0	1	0.33	0	0	
Características histológicas									
Invasión cápsula tiroides (n=237)	214	90.2	23	9.8	143	60.3	94	39.6	
Extensión extratiroidea (n=186)	167	89.7	19	10.3	108	58.1	78	41.9	
Metástasis nódulos linfoides (n=153)	130	84.9	23	15.1	107	69.9	46	30	
Metástasis extra ganglionar (n=104)	88	84.6	16	15.4	70	67.3	34	32.6	
Invasión linfoide (n=70)	58	82.8	12	24.8	49	70,0	21	30	
Invasión venosa (n=43)	35	81.3	8	18.7	31	72.1	12	27.9	
Multifocalidad (n=135)	118	87.4	17	12.6	76	56.3	59	43.7	

n: Corresponde al número de muestras con tenían evaluación (presencia o ausencia) de esta característica.

Las variantes histológicas más frecuentes - patrón combinado, clásica y VFCPT - se seleccionaron para determinar el riesgo relativo (RR) con cada característica histológica. En general la VFCPT tiene menor riesgo de desarrollar cualquiera de las características histológicas de riesgo; la variante clásica tiene menor probabilidad de desarrollar invasión de la cápsula tiroidea (RR=0.77, $p=0.0001$) e extensión extra tiroidea (RR=0.67, $p=0.0001$); por el contrario, el patrón combinado presentó valores estadísticamente significativos para desarrollar todas las características histológicas (Tabla 6).

9.2. Variante patogénica *BRAF*^{V600E}

La presencia de *BRAF*^{V600E} se encontró en el 70.4% (212/301) de las muestras analizadas (Figura 6).

El porcentaje de hombres con la mutación es más alto que el de mujeres; sin embargo, los análisis de RR no mostraron ninguna asociación (RR= 0.93; $p= 0.58$) La presencia de la variante patogénica se analizó con relación a la edad. Los pacientes ≥ 55 años tienen un incremento en el riesgo de presentar la mutación de 1.26 veces al compararlos con los < 55 años (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de riesgo relativo (RR) entre la presencia de *BRAF*-V600E y factores demográficos.

Factor Asociado	<i>BRAF</i> -V600E				RR	(IC 95%)	<i>p</i>
	Presente		Ausente				
	n	%	n	%			
Sexo							
Mujeres (n=266)	186	69.8	80	30.2	0.93	0.76-2.25	0.58
Hombres (n=35)	26	74.3	10	25.7			
Edad							
Mayores de 55 años (n=168)	130	77.4	38	22.6	1.26	1.07-1.47	0.0026
Menores de 55 años (n=132)	81	61.4	52	38.6			

Tabla 6. Frecuencias y riesgos relativos (RR) de las variantes histológicas más frecuentes y características histológicas.

Factor Asociado	Patrón clásico					Variante folicular					Patrón combinado				
	n	%	RR	(IC 95%)	p	n	%	RR	(IC 95%)	p	n	%	RR	(IC 95%)	p
Invasión cápsula tiroidea	62	14.8	0.77	(0.65-0.90)	0.0001	89	21.2	0.89	(0.70-0.91)	0.0002	268	64	1.34	(1.22-1.48)	0
Invasión linfática	20	19.6	0.79	(0.53-1.21)	0.3477	14	13.7	0.47	(0.28-0.79)	0.0026	68	66.7	1.71	(1.23-2.39)	0.0016
Invasión venosa	17	20.5	0.87	(0.54-1.39)	0.6763	12	14.5	0.52	(0.29-0.91)	0.0231	54	65	1.68	(1.14-2.48)	0.0096
Extensión extratiroidea	46	14	0.67	(0.53-0.84)	0.0001	63	19.3	0.72	(0.60-0.88)	0.0003	218	66.7	1.54	(1.33-1.78)	0
Metástasis a ganglio linfático	55	21.2	1.08	(0.09-1.29)	0.489	38	14.6	0.64	(0.49-0.83)	0.0001	167	64.2	1.24	(1.06-1.46)	0.0067
Metástasis extraganglionar	30	19.2	0.97	(0.70-1.33)	0.9732	19	12.2	0.53	(0.35-0.81)	0.0018	107	68.6	1.54	(1.17-2.02)	0.0016

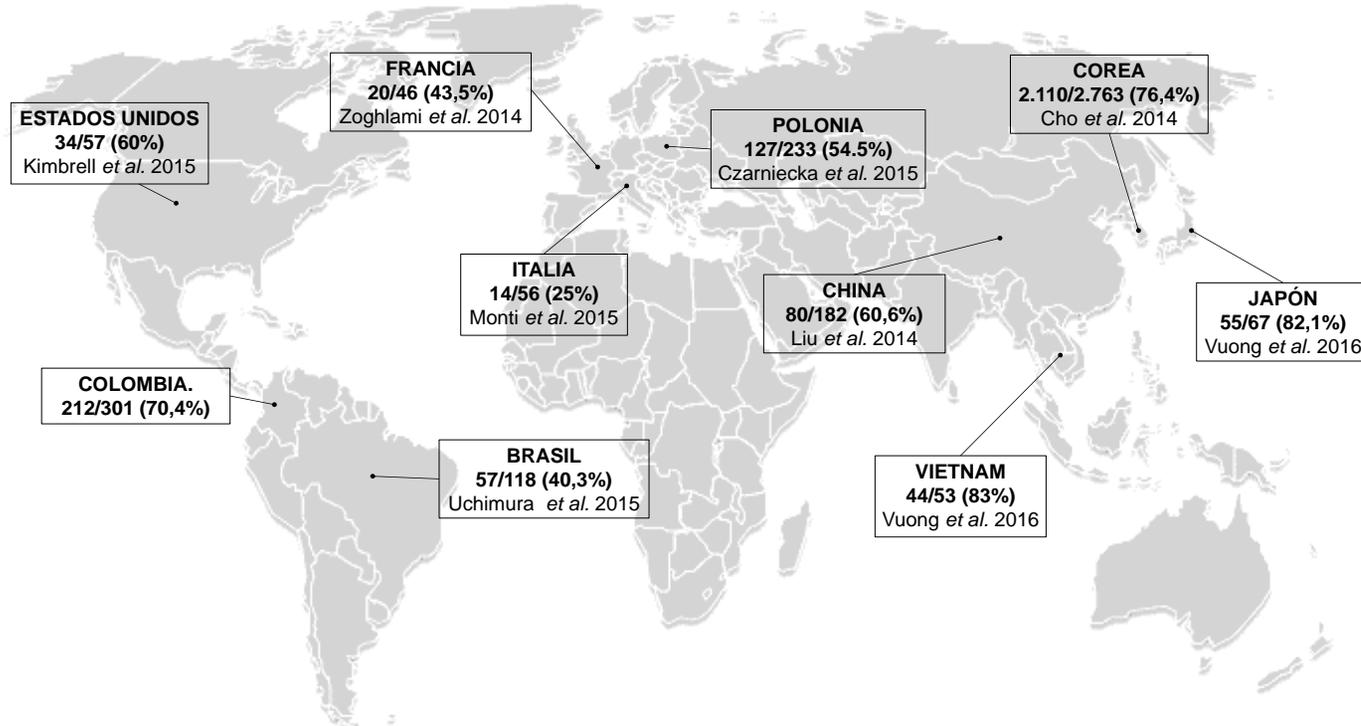


Figura 7. Porcentaje de presencia de la variante patogénica $BRAF^{V600E}$ en diferentes poblaciones del mundo, incluida el presente estudio.

Al explorar la asociación entre $BRAF^{V600E}$ y las características histológicas se encontró que la probabilidad de desarrollar carcinoma es 1.14 veces mayor si el tumor adquirió la mutación en comparación con los que no; por el contrario, la probabilidad de desarrollar microcarcinomas es 54% menor entre los tumores portadores de la mutación que los no portadores.

La presencia de la mutación se asoció con el patrón combinado (RR= 1.39; IC (95%)= 1.06-1.31; $p=0.0075$) y aumenta el riesgo en 1.39 veces de desarrollar esta variante histológica. Los análisis de asociación entre la mutación y las características histológicas mostraron que la presencia de ésta aumenta el riesgo en 1.07 veces (IC (95%)= 0.98 -1.18; $p=0.0483$) y 1.11 (IC (95%)= 0.98 -1.23; $p=0.0305$) de presentar invasión de la cápsula tiroidea y extensión extra tiroidea respectivamente, las demás características no mostraron asociación (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de asociación entre la presencia de $BRAF-V600E$ con las características histológicas.

Factor Asociado	$BRAF-V600E$				RR	(IC 95%)	p
	Presente		Ausente				
	n	%	n	%			
Tamaño tumoral							
Carcinoma (n=261)	191	73.1	70	26.9	1.14	1.01-1.28	0.0084
Microcarcinoma (n=27)	14	51.8	13	48.2	0.46	0.22-0.93	0.0285
Microtumor (n=13)	7	53.8	6	46.2	0.36	0.12-1.03	0.0497
Variante histológica							
Células altas (n=6)	5	83.4	1	16.6	2.11	0.25-1.17	0.4784
Células claras (n=1)	0	0	1	100	0.25*	0.03-1.93	0.1561
Clásica (n=60)	37	63.8	21	36.2	0.74	0.46-1.20	0.2321
Columnar (n=1)	0	0	1	100	0.25*	0.03-1.93	0.1561
Esclerosante difusa (n=1)	0	0	1	100	0.25*	0.03-1.93	0.1561
<i>Fascitis like</i> (n=1)	0	0	1	100	0.25*	0.03-1.93	0.1561
Folicular (n=65)	42	64.6	23	35.4	0.77	0.49-1.20	0.2627
Patrón combinado (n=166)	128	77.1	38	22.2	1.39	1.06-1.31	0.0075
Macrofolicular (n=1)	0	0	1	100	0.25*	0.03-1.93	0.1561
Sólida (n=1)	0	0	1	100	0.25*	0.03-1.93	0.1561
Características histológicas							
Invasión cápsula tiroidea (n=236)	174	73.7	62	26.3	1.07	0.98-1.18	0.0403
Extensión extratiroidea (n=185)	142	76.7	43	23.3	1.11	0.98-1.23	0.0305
Metástasis a ganglio linfático (n=153)	110	71.9	43	28.1	0.99	0.80-1.23	0.9801
Metástasis extra ganglionar (n=104)	75	72.1	29	27.9	1.04	0.75-1.45	0.7837
Invasión linfática (n=70)	52	72.9	19	27.1	1.17	0.76-1.80	0.443
Invasión venosa (n=43)	30	69.8	13	30.2	1.08	0.60-1.91	0.7899
Multifocalidad (n=134)	90	67.2	44	32.8	0.84	0.66-1.07	0.1832

*Se adicionó 1 a todas las frecuencias para el cálculo del RR

n: Corresponde al número de muestras con tenían evaluación (presencia o ausencia) de esta característica.

Por muestreo aleatorio simple, se seleccionaron 30 casos para confirmar los resultados de $BRAF^{V600E}$ mediante secuenciación. Se encontró concordancia del 100% en muestras negativas y del 96.6% (29/30) en muestras positivas para $BRAF^{V600E}$ (Figura 8). En una muestra se detectó $BRAF^{V600E}$ mediante PCR alelo específico, pero no fue detectada por secuenciación, corresponde a un microcarcinoma variante patrón clásico.

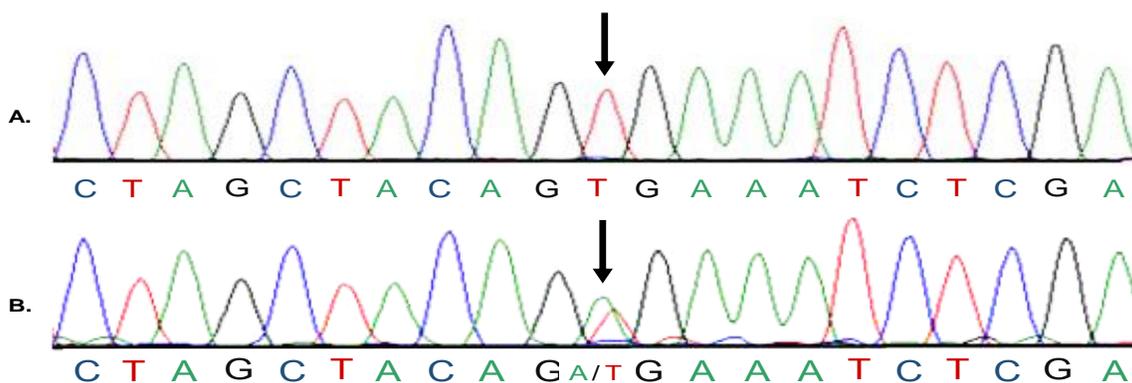


Figura 8. Resultado de análisis de secuenciación para $BRAF^{V600E}$. **A.** Secuencia de muestra de tumor negativo para la mutación. **B.** Secuencia de muestra de tumor positivo para la mutación.

9.3. Metilación del promotor del gen *RASSF1A*

El patrón de metilación del promotor del gen *RASSF1A* se determinó en las muestras analizadas. En 14% (42/301) de estas se identificó esta alteración epigenética, fue más frecuente en mujeres y en pacientes ≥ 55 años; sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de riesgo relativo (RR) entre el patrón de metilación del gen *RASSF1A* y factores demográficos.

Factor Asociado	Patrón de metilación				RR	(IC 95%)	p
	Metilado		No metilado				
	n	%	n	%			
Sexo							
Mujeres (n=266)	106	39.8	160	60.2	1.16	0.71-1.88	0.5262
Hombres (n=35)	12	34.3	23	65.7			
Edad							
55 años o más (n=168)	67	39.9	101	60.1	1.04	0.78-1.38	0.7865
Menores de 55 años (n=133)	51	38.3	82	61.7			

La frecuencia de tumores hemimetilados y no metilados se calculó, los resultados mostraron que el 34.5% (104/301) y el 51.5% (155/301) de los tumores presentaron hemimetilación o no metilación del promotor, respectivamente. La figura 9 muestra los resultados de amplificación de la MSP utilizando iniciadores no metilado (panel superior) y metilado (panel inferior) de 10 muestras. Se observó amplificación en los carriles 2, 3, 4, 7 y 10 con los iniciadores específicos para ADN no metilado y metilado.

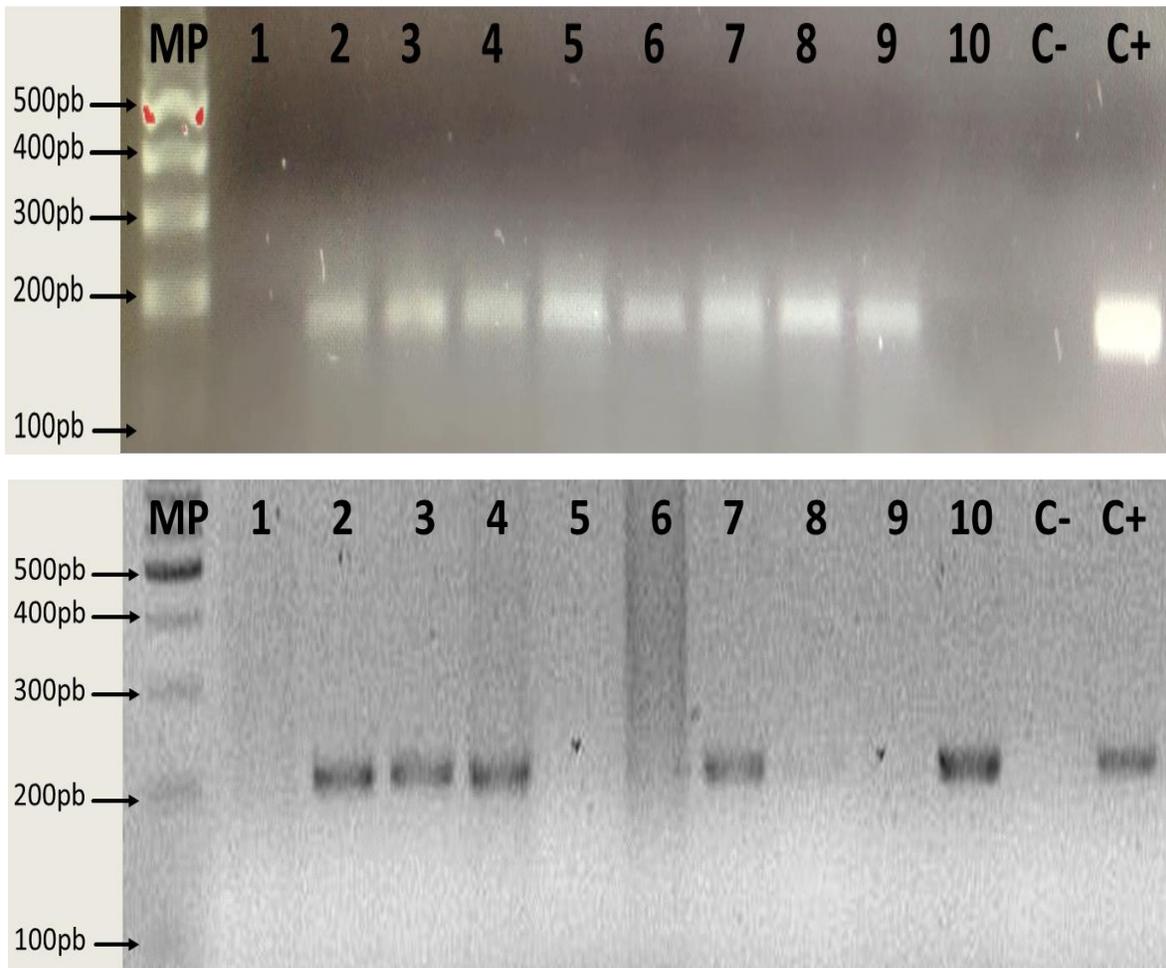


Figura 9. Electroforesis de productos de MSP utilizando iniciadores específicos para ADN no metilado (arriba) y metilado (abajo). MP: Marcador de peso. Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10: Muestras (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X). C+: Control positivo. C-: Control negativo.

La exploración de asociación entre el patrón de metilación y las características histológicas evidenció que la probabilidad de desarrollar metástasis a ganglios linfáticos es 34% menor en los tumores metilados (Tabla 10). Adicionalmente, se exploró la asociación entre la presencia de *BRAF*^{V600E} y el patrón de metilación de *RASSF1A*, los resultados no mostraron asociación significativa (RR= 1.08; IC (95%)= 0.78-1.48; $p= 0.62$).

Tabla 10. Análisis de asociación entre el patrón de metilación del gen *RASSF1A* y las características histológicas.

Factor Asociado	Patrón de metilación				RR	(IC 95%)	p
	Metilado		No metilado				
	n	%	n	%			
Tamaño tumoral							
Carcinoma (n=261)	97	37.2	164	62.8	0.7	0.50-0.98	0.0643
Microcarcinoma (n=27)	14	51.9	13	48.1	1.36	0.92-2.02	0.1582
Microtumor (n=13)	7	53.8	6	46.2	1.34	0.79-2.27	0.3178
Variante histológica							
Células altas (n=6)	2	33.3	4	66.7	0.84	0.27-2.65	0.7661
Células claras (n=1)	0	0	1	100	0.84*	0.16-4.21	0.8304
Clásica (n=60)	23	39	36	61	0.99	0.69-1.41	0.9693
Columnar (n=1)	1	100	0	0	1.70*	0.75-3.84	0.3303
Esclerosante difusa (n=1)	1	100	0	0	1.70*	0.75-3.84	0.3303
<i>Fascitis like</i> (n=1)	0	0	1	100	0.84	0.16-4.21	0.8304
Folicular (n=65)	23	35.4	42	64.6	0.87	0.61-1.26	0.4764
Patrón combinado (n=164)	65	39.6	99	60.4	1.02	0.77-1.35	0.8668
Macrofolicular (n=1)	1	100	0	0	1.70*	0.75-3.84	0.3303
Sólida (n=1)	1	100	0	0	1.70*	0.75-3.84	0.3303
Características histológicas							
Invasión cápsula tiroides (n=236)	91	38.4	146	61.6	0.91	0.65-1.26	0.5815
Extensión extratiroidea (n=185)	69	37.1	117	62.9	0.87	0.65-1.15	0.3412
Metástasis a ganglio linfático (n=153)	48	31.4	105	68.6	0.66	0.49-0.88	0.0047
Metástasis extra ganglionar (n=104)	39	37.5	65	62.5	0.93	0.69-1.26	0.6602
Invasión linfática (n=70)	25	35.7	45	64.3	0.88	0.62-1.26	0.495
Invasión venosa (n=43)	20	46.5	23	53.5	1.22	0.85-1.74	0.289
Multifocalidad (n=134)	54	40	81	60	1.1	0.80-1.51	0.5269

*Se adicionó 1 a todas las frecuencias para el cálculo del RR

9.4. Expresión del transportador NIS

En las muestras estudiadas se determinó la localización de expresión NIS. La expresión correcta de la proteína – membrana basolateral- se evidenció en el 46.2% (139/301), por el contrario, la expresión errada de NIS –citoplasmática- se evidenció en el 53.8% (162/301) de las muestras (Tabla 11).

Tabla 11. Características de expresión del transportador NIS.

Factor Asociado	Citoplasmática		Basolateral	
	n	%	n	%
Localización	162	53.8	139	46.2

La figura 9 muestra resultados representativos al evaluar tejido normal y tumoral. El control positivo (tejido normal) mostró patrón de tinción granular sobre la membrana basolateral de los folículos (A), todos los tejidos tumorales (C-D) mostraron tinción homogénea no granular en el citoplasma. Igualmente, se observó diferencias en los niveles de expresión al comparar las muestras tumorales (C-D).

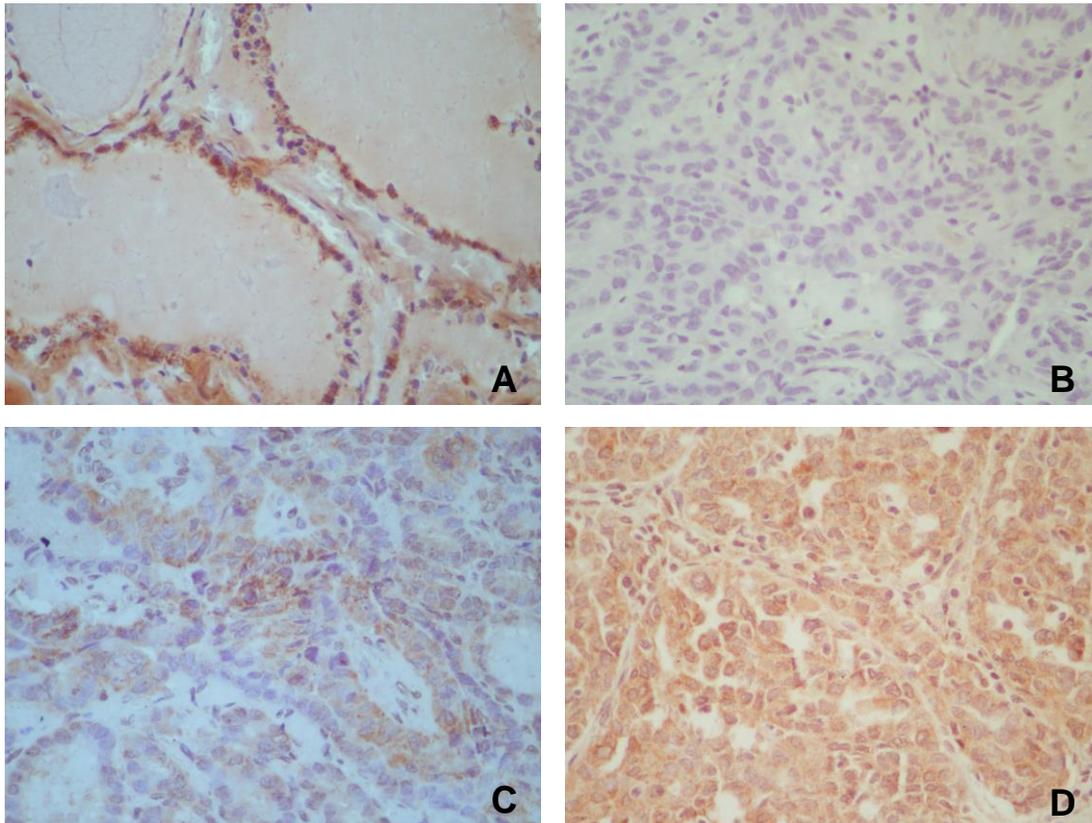


Figura 9. Evaluación de la expresión de la proteína NIS por IHQ. A: control positivo. B: control negativo. C-D: muestras tumorales (400X)

Al analizar la asociación entre la localización de la expresión de la proteína con datos demográficos no se encontró ningún tipo de asociación (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de riesgo relativo (RR) entre la localización del transportador NIS y factores demográficos.

Factor Asociado	Localización				RR	(IC 95%)	p
	Citoplasmática		Basolateral				
	n	%	n	%			
Sexo							
Mujeres (n=266)	139	52.3	127	47.7	0.79	0.60-1.03	0.1333
Hombres (n=35)	23	65.7	12	34.3			
Edad							
55 años o más (n=168)	92	54.8	76	45.2	1.04	0.84-1.28	0.7127
Menores de 55 años (n=133)	70	52.6	63	47.4			

Para el análisis de asociación entre la expresión de la proteína y las características histológicas del tumor, solo se tuvo en cuenta el tamaño tumoral y la variante histológica (Tabla 13), se logra ver una tendencia a que la variante clásica se asocia con la expresión aberrante de NIS.

Se exploró la asociación entre la expresión errada de NIS con la presencia de *BRAF*^{V600E} (RR= 1.05; IC (95%)= 0.90-1.24; *p*= 0.48) y con la metilación en *RASSF1A* (RR= 1.01; IC (95%)= 0.76-1.34; *p*= 0.90), sin encontrar asociación con estas alteraciones moleculares.

Tabla 13. Análisis de asociación entre la localización de la expresión del transportador NIS y las características histológicas.

Factor Asociado	Localización				RR	(IC 95%)	p
	Citoplasmática		Basolateral				
	n	%	n	%			
Tamaño tumoral							
Carcinoma (n=261)	139	53.3	122	46.7	0.9	0.69-1.23	0.6162
Microcarcinoma (n=27)	16	59.3	11	40.7	1.1	0.79-1.54	0.5524
Microtumor (n=13)	7	53.8	6	46.2	1	0.59-1.67	0.9985
Variante histológica							
Células altas (n=6)	3	50	3	50	0.92	0.41-2.07	0.8496
Células claras (n=1)	1	100	0	0	1.24*	0.55-2.78	0.6525
Clásica (n=60)	38	64.4	21	35.6	1.25	1.00-1.57	0.0689
Columnar (n=1)	0	0	1	100	0.61*	0.12-3.07	0.47
Esclerosante difusa (n=1)	1	100	0	0	1.24*	0.55-2.78	0.6525
<i>Fascitis like</i> (n=1)	0	0	1	100	0.61*	0.12-3.07	0.47
Folicular (n=65)	33	50.8	32	49.2	0.92	0.71-1.21	0.5773
Patrón combinado (n=164)	84	51.2	80	48.8	0.89	0.73-1.10	0.322
Macrofolicular (n=1)	1	100	0	0	1.24*	0.55-2.78	0.6525
Sólida (n=1)	0	0	1	100	0.61*	0.12-3.07	0.47

*Se adicionó 1 a todas las frecuencias para el cálculo del RR

n: Corresponde al número de muestras con tenían evaluación (presencia o ausencia) de esta característica.

9. DISCUSIÓN

El CT es el cáncer endocrino más frecuente en el mundo, de estos, el tipo papilar es el más común y se caracteriza por ser generalmente de buen pronóstico. Existen diferentes factores de riesgo asociados con el desarrollo de la enfermedad que activan vías de señalización en las células foliculares o modifican genes implicados en estas rutas, resultando en la transformación maligna de las células. En los últimos decenios diferentes estudios permitieron articular vías metabólicas conocidas implicadas en el riesgo y desarrollo de la enfermedad, así como características propias de los tumores que les confieren fenotipos agresivos y riesgo a presentar recaída. En Colombia son pocas las publicaciones realizadas acerca de la biología molecular de la enfermedad; en este estudio exploramos algunas alteraciones moleculares que estarían implicadas en desarrollo de la enfermedad y asociadas con las características demográficas de los pacientes e histológicas de los tumores.

Este es el primer reporte en el país que estudia la asociación entre las características histológicas de los CPT y las alteraciones moleculares en los genes *BRAF*, *RASSF1A* y la expresión de la proteína NIS, y es extrapolable a la población colombiana por el número de muestras analizadas. Los resultados obtenidos pueden utilizarse para caracterizar la enfermedad y diseñar a largo plazo, estrategias que permitan un diagnóstico precoz y tratamientos individualizados.

La edad promedio de los pacientes al momento del diagnóstico fue de 49 años (DE \pm 14.03, rango: 12-82), similar a la registrada en estudios anteriores (1,2,4,23,71,148–150), la enfermedad es más frecuente en mujeres. La diferencia entre mujeres y hombres afectados, está relacionada con la exposición a diferentes factores de riesgo. Por ejemplo, las hormonas femeninas tienen un papel importante en la predisposición al desarrollo de CPT, los estrógenos incrementan los niveles de la hormona TSH que promueve el crecimiento de la glándula tiroidea (43); la variación de esta durante y con el número de embarazos aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad (38,43,151); así mismo, en las células foliculares se encuentran receptores de progesterona que participan en la diferenciación celular (151).

Durante la recolección de datos y confirmación del diagnóstico, analizamos algunos rasgos de interés en las muestra para describir las características histológicas que presentaba cada variante histológica diagnosticada; sin embargo, las variantes clasificadas como de alto riesgo como la variante sólida, esclerosis difusa o células altas, esta caracterización fue limitada porque se presentaron en poca frecuencia, en concordancia con los resultados de otros estudios (4,6,21,23,28,31,149,152).

Chan J *et al*, propone algunos criterios para sub-clasificar la VFCPT en los subtipos difuso, infiltrativo y encapsulado (29), los dos primeros considerados fenotipos agresivos (25,28). El análisis de distribución de las variantes histológicas en el presente estudio determinó que la VFCPT es la segunda más frecuente, por lo que se debe hacer un diagnóstico detallado en estos tumores, porque el mal diagnóstico tiene consecuencias en el paciente con relación a la calidad de vida y en las instituciones de salud al aumentar los costos de tratamiento.

La OMS en la clasificación de los tumores de tiroides (20), no define los *tumores híbridos*, estos fueron descritos por primera vez por Baloch *et al*, como lesiones solitarias y encapsuladas -similar al CFT- pero con características nucleares del CPT; es poco frecuente encontrarlos de manera multifocal o haciendo metástasis ganglionar (153). Castro *et al*, proponen el origen de estos tumores de la siguiente manera: los CPT son diploides y con rearrreglos entre los genes *RET*, los CFT son aneuploides y con mutaciones en el gen *RAS*; no obstante, las vías metabólicas de *RET* interactúan con la de *RAS* en las células foliculares y desencadenan la tumorigénesis (154). Cameselle *et al*, por su parte, no está de acuerdo con la existencia de estos tumores porque las lesiones de CFT y CPT tienen orígenes disímiles y se asocian con mutaciones diferentes y excluyentes (155).

En este trabajo, identificamos un comportamiento histológico inusual que denominamos *patrón combinado* (23). Los CPT con este patrón presentaron asociación significativa con metástasis, y la mitad eran multifocales; esto difiere de la definición de tumores híbridos. El patrón combinado es agresivo y debería considerarse esta variante histológica en el diagnóstico de la enfermedad.

En Colombia, los estudios de asociación entre la presencia de alteraciones moleculares –mutaciones, metilación, etc. - con las características histológicas de los CPT son pocos. Uno evaluó la frecuencia de la variante patogénica *BRAF*^{V600E} con las características histológicas; sin embargo, el número de muestras analizadas es reducido (n=24), lo que no permite generalizar las asociaciones; sin embargo, en ese estudio se reportó una frecuencia de mutación del 66%, similar a la reportada en la literatura (156). Otros cuatro evalúan polimorfismos asociados con el riesgo de desarrollar CT (157–160). Esta investigación es el primer registro que se tiene en el país acerca de la frecuencia de alteraciones moleculares en CPT y su asociación con las características histológicas.

Biológicamente, la vía molecular que se altera y da origen a la variante patogénica *BRAF*^{V600E} en melanomas y células foliculares es MAPK (94,161–166), por esta razón, utilizamos un estuche comercial que funciona con base en PCR-alelo específica diseñado para el diagnóstico en melanomas. Ahn *et al*, reportaron mayor

sensibilidad (>99%) y especificidad (88%) utilizando el estuche comercial *Cobas 4800 V600 mutation test* para detectar la variante patogénica *BRAF*^{V600E} en muestras con reducidas cantidades de ADN extraídas de tejidos FFEP en comparación con la secuenciación (167). El estuche comercial solo muestra los resultados del análisis molecular en términos de la presencia o ausencia de la variante molecular (Anexo 1), y no permite conocer las condiciones de amplificación. Hay estudios donde exploran la utilización de ACAF, microcarcinomas e incluso muestras de sangre, para análisis molecular del gen *BRAF* (9,35,53,58,60,68,90,127,168–171). Sullivan *et al*, determinaron que la secuenciación detecta variantes patogénicas en muestras hasta con el 5% de células tumorales; sin embargo, concluyen que los análisis moleculares no podrían hacerse en algunos microcarcinomas o muestras obtenidas por ACAF, debido a la reducida cantidad de células tumorales presentes allí (172).

Los porcentajes de detección de *BRAF*^{V600E} en el mundo son diferentes (Figura 2), con la utilización del estuche comercial en este estudio encontramos que el porcentaje registrado fue alto, 70.4%, en comparación con los registrados para Francia o Italia, 43.4% y 44% respectivamente (173,174), pero por debajo de países como Japón y Corea con porcentajes de 82.1% y 76.4% respectivamente (175,176). La confirmación de la presencia de *BRAF*^{V600E} mediante secuenciación, mostró discordancia en una muestra que corresponde a un microcarcinoma variante clásica; Ahn *et al*, reportaron mayor sensibilidad en la detección de *BRAF*^{V600E} utilizando PCR alelo específica en comparación con la secuenciación (167), similar a lo encontrado en este estudio. Debido a que se trata de una muestra pequeña, la concentración de ADN mutado es reducida y probablemente su concentración no alcanzó el mínimo requerido para ser detectado por secuenciación y esta sea la causa por la que se obtuvo este resultado.

Algunos estudios demuestran que una dieta con alta concentración de I es un factor de riesgo para el desarrollo de CPT con *BRAF*^{V600E} (22,177,178), porque el I afecta los mecanismos de reparación del ADN, favoreciendo la aparición de alteraciones moleculares. Sin embargo, Frasca *et al*, no consideran que la concentración de I en la sal, sea un factor de riesgo para presentar la variante patogénica (36). En Colombia el CT ocupa el noveno puesto en incidencia (12,179) y la sal es yodada; adicionalmente, la figura 6 muestra que en regiones con altos consumos de sal, como Japón y Corea las frecuencias de *BRAF*^{V600E} son altas; sin embargo, es necesario más estudios que permitan determinar el papel de esta como factor de riesgo para la aparición de variantes patogénicas *BRAF* en nuestra población.

Al igual que otros estudios, encontramos asociación entre la presencia de la variante patogénica *BRAF*^{V600E} y personas mayores de 55 años de edad

(24,34,37,62,163,177,178,180–184); además, no encontramos asociación entre la variante patogénica y el sexo (24,92,127,183).

Los análisis de asociación entre la variante patogénica y las variantes histológicas mostró solo asociación significativa con el patrón combinado ($p=0.0075$). El análisis de los tumores con patrón combinado conformado por la variante clásica y VFCPT mostró que el 77.4% portaban $BRAF^{V600E}$, indicando que la mutación se asocia con fenotipo agresivo y tiene un papel en la desdiferenciación de las células.

Otros autores muestran asociación entre la variante patogénica y las variantes histológicas de células altas, clásica (34,36,58,139,183,185–187) y VFCPT (18,58,59); en este estudio no encontramos asociación significativa con estas variantes histológicas aun cuando el porcentaje de tumores con este diagnóstico y portadores de la variante patogénica fue superior al 63%. Los subtipos infiltrativo y difuso de la VFCPT se asocian con características histológicas de riesgo; sin embargo, los resultados de este estudio no permiten determinar si los tumores con patrón combinado que estaban conformados por VFCPT y cualquier otra variante histológica y que además fueran portadores de $BRAF^{V600E}$ presentaban alguno de los subtipos infiltrativo o difuso.

El análisis de asociación entre la presencia de la variante patogénica y el tamaño del tumor mostró que $BRAF^{V600E}$ está más frecuentemente en los carcinomas y disminuyen el riesgo de desarrollar microcarcinomas. Oler *et al*, registran asociación significativa entre la presencia de la variante patogénica y tumores > 10 mm, y baja frecuencia de microcarcinomas $BRAF^{V600E}$ positivo (188). Diferentes estudios registran que la alteración molecular les confiere a los microcarcinomas características de riesgo como invasión extra tiroidea, multifocalidad y metástasis linfoide, similar a los tumores > 10 mm (35,37,189–191).

En este estudio, el porcentaje de microcarcinomas con $BRAF^{V600E}$ positivo fue de 51.8%, similar a lo reportado en otras series (34,55,185,192); sugiriendo que la adquisición de la variante patogénica es un evento temprano en la carcinogénesis de los CPT (35,71,182), además, estos resultados sugieren que los microcarcinomas deben ser tratados como tumores con riesgo de desarrollar características histológicas de fenotipos agresivos.

Los análisis estadísticos mostraron asociación significativa entre la presencia de $BRAF^{V600E}$ y la invasión de la cápsula tiroidea ($p=0.0403$) y la invasión extratiroidea ($p=0.0305$), similar a lo reportado en otros estudios (36,37,62,165,178,182,186,188,193,194). Estas son dos características histológicas de tumores en estadios avanzados y se asocian con procesos de invasión y migración de células cancerígenas. Li *et al*, determinaron que la variante

patogénica *BRAF*^{V600E} promueve la expresión de genes implicados en la degradación de la matriz extracelular (64,68), lo que aumentaría la probabilidad de metástasis y de recaídas (59), por lo tanto, se pensaría que la mayoría de los pacientes examinados en esta serie tienen tumores con riesgo de presentar recaídas.

Algunos autores consideran que la multifocalidad es un factor de mal pronóstico porque se asocia con recaída (195) y micro metástasis intra-glandular, características que se presentan con frecuencia en tumores agresivos (187,189,190,196). Los resultados no mostraron asociación entre multifocalidad y la variante patogénica y esta y los microcarcinomas. La ausencia de asociación es por la forma en que se evaluó y diagnosticó los microcarcinomas (sumatoria de los diámetros de las lesiones para determinar el tamaño del tumor), y no se analizó cada una independientemente.

Algunos autores consideran que *BRAF*^{V600E} debe ser utilizado como factor pronóstico de agresividad en CPT; sin embargo, son necesarios más estudios que permitan determinar el papel como biomarcador (68,90), por ejemplo, algunos demuestran que inhibiendo la fosforilación de ERK en CPT portadores de *BRAF*^{V600E} se aumenta la respuesta al tratamiento con ¹³¹I, esos resultados muestran que la activación constitutiva de ERK es uno de los mecanismos principales en la diferenciación de la célula durante la carcinogénesis (97,200), y el análisis de la presencia de *BRAF*^{V600E} permitiría diseñar tratamientos eficaces para estos casos. La utilización del análisis de *BRAF*^{V600E} es un complemento del diagnóstico de la enfermedad.

Algunos autores reportan asociación entre la presencia de *BRAF*^{V600E} con enfermedades benignas de tiroides (bocio, tiroiditis de Hashimoto, hipotiroidismo, hipertiroidismo, etc.) (90), en este estudio no se encontró asociación.

La MSP es una técnica de alta sensibilidad, que detecta secuencias específicas de ADN metilado, requiere menos inversión de tiempo, dinero y detecta y amplifica ADN en concentraciones de hasta 10% (136,201).

El patrón metilado del promotor del gen *RASSF1A* se ha encontrado en otros tipos de cánceres sólidos como pulmón, mama, carcinoma nasofaríngeo, riñón y ovario (132–134). En CT *RASSF1A* se ha encontrado metilado en carcinoma medular e indiferenciado (69,131,134–137,140). Los porcentajes de metilación son controversiales. Algunos autores observaron hipermetilación del promotor en lesiones benignas y reportan incremento gradual de esta durante el progreso de adenoma a carcinoma en tumores tiroideos (90,137); Xing *et al*, menciona que la metilación es un evento temprano durante la tumorigénesis, frecuentemente en

neoplasias benignas como los adenomas (136), y se propone que hace parte de la secuencia adenoma – carcinoma (137,140). Al comparar los porcentajes de metilación de los adenomas con los de CPT, encuentran porcentajes bajos de hipermetilación; otros por el contrario encontraron porcentajes altos de hipermetilación en CPT (139,140,202). Recientemente se reportó que los porcentajes de metilación son >30% en CPT (131,138) y del 60% en CFT (136,138). En este estudio el gen *RASSF1A* se encontró metilado en el 39.2% de los tumores, de estos la mitad son patrón combinado; posiblemente, la inactivación epigenética de *RASSF1A* no tienen importancia en la progresión una vez el tumor se ha establecido.

Schagdarsurengin *et al*, reportan altas frecuencias de metilación en pacientes > 50 años de edad y argumentan que el silenciamiento de GST, hace más susceptible a personas mayores de desarrollar CT (137). En este estudio no se encontró ninguna asociación al analizar el patrón de metilación de *RASSF1A* y las características demográficas de los pacientes, resultados similares a lo reportado en estudios anteriores (140).

No se encontró asociación entre la metilación de *RASSF1A* y las variantes histológicas, los estudios publicados no muestran análisis al respecto; se podría proponer que la metilación de *RASSF1A* no tienen participación en la diferenciación celular durante la carcinogénesis; sin embargo, se requieren diseñar estudios que permitan confirmar esta hipótesis. En términos generales, se puede observar una tendencia de los CPT a la no metilación de *RASSF1A*.

Algunos autores concluyen que la metilación de *RASSF1A* se asocia con aumento en el riesgo a desarrollar metástasis a distancia y estadios avanzados del tumor (132,138); mientras que otros afirman que no hay asociación entre el patrón de metilación y las características histológicas (137). En este estudio, no se encontró asociación significativa entre la metilación y las características histológicas de los tumores. Específicamente, el resultado de asociación entre *RASSF1A* metilado y el tamaño del tumor (Tabla 8) puede ser producto de un artefacto estadístico generado al momento de la clasificación de los microcarcinomas, para ello, se tuvo en cuenta la sumatoria de los diámetros en lesiones multifocales y no como lesiones independientes; esto implica que la frecuencia de microcarcinomas es más elevada, probablemente asociada con metilación y concorde con el hecho que la hipermetilación es un evento temprano que favorece la proliferación (131,136,203).

Este estudio reporta para el gen *RASSF1A* bajas frecuencias de metilación para ambos alelos (39.2%) pero altas frecuencias de hemimetilación (78.8%), sobre todo en tumores agresivos; Dammann *et al*, proponen que *RASSF1A* pertenece al grupo

de GST haploinsuficientes, es decir, requiere la inactivación de un solo alelo para promover la carcinogénesis. El silenciamiento de GST, requiere de la inactivación de los dos alelos según la hipótesis Knudson de los “two-hit” (204), o de eventos moleculares como la pérdida de heterocigosidad (LOH= *Loss Of Heterozygosity*); Varios autores afirman que la inactivación epigenética y LOH de *RASSF1A* es un evento común, mientras que las mutaciones del gen son poco frecuentes (131,134,138,141). Diferentes estudios concluyen que la presencia de *BRAF*^{V600E} y la metilación de *RASSF1A* son eventos mutuamente excluyentes en CT, pero ambos contribuyen a la activación de la vía de señalización MAPK (90,135–137,139,142); en este estudio no se observó asociación entre estos dos eventos genéticos (RR: 1.08. IC (95%): 0.78-1.48. $p=0.62$).

El complejo proteico que capta y transporta I al interior de las células foliculares es esencial en la yodo terapia para eliminar las células neoplásicas remanente del tratamiento quirúrgico. Estudios anteriores reportan alteraciones en la expresión de NIS (205). Arturi *et al*, reportaron que las alteraciones en NIS son propias de los tumores primarios y no se deben a alteraciones adicionales en las células metastásicas durante la dediferenciación (205). En CT se evidencia disminución en la acumulación de ¹³¹I por la reducción en la expresión de NIS, lo que significa, resistencia a la radioterapia y fracaso en el tratamiento, por lo que es necesario comprender el mecanismo molecular para disminuir la resistencia a la terapia (106). El CPT es sensible al tratamiento con ¹³¹I; sin embargo, algunos estudios muestran que entre el 20-30% de los carcinomas diferenciados son resistentes (103–105).

En este estudio se analizó la frecuencia de expresión y localización de la proteína NIS por IHQ. Los resultados de expresión de la proteína son controversiales, mientras que algunos reportan disminución o pérdida de la expresión (107), otros reportan sobre expresión en CPT en comparación con el de tejido normal o nódulos benignos (100,105,107,109,113–117). La glicosilación de las proteínas, entre otras funciones, determinan la localización de la misma (109), en este caso, dirige a NIS hacia la membrana basolateral de las células foliculares. Estudios previos en CPT analizaron la expresión de NIS por western blot y encontraron que se encuentra parcialmente glicosilada en la membrana basolateral, independientemente de si presenta o no expresión citoplasmática; esta última podría corresponder a la proteína inmadura y su tinción no está relacionada con la actividad de la proteína, frecuente en tumores tiroideos (109); por tanto, las alteraciones en la expresión de NIS se debe a modificaciones a nivel transcripcional y postranscripcional (109).

En este estudio, los tejidos que expresaron NIS sobre la membrana basolateral mostraron la mayor intensidad, mientras que los tejidos con expresión citoplasmática mostraron la menor intensidad pero mayor cantidad (sobre

expresión), que podrían corresponder a formas inmaduras de la proteína debido a alteraciones en los mecanismos de regulación a nivel traduccional y que generan una localización errada de NIS (112), y esta es una de las principales razones por las que se encuentra en altos niveles de expresión citoplasmática en las células tumorales (96). Encontramos que la expresión errada de NIS fue más frecuente en carcinomas – tumores >10mm (85,8%), por lo que se podría pensar que las alteraciones en la expresión de la proteína corresponde a un evento tardío en la carcinogénesis del CPT; sin embargo, son requeridos más ensayos para corroborar esta hipótesis.

Peyrottes *et al*, mencionan que la tinción citoplasmática dificulta la evaluación de los resultados de IHQ en discernir la inmunoreactividad de la membrana basolateral (109) y que las diferencias en la intensidad de la expresión, podrían deberse a variaciones en la concentración del anticuerpo primario (109); en este estudio, la mayoría de tumores con tinción citoplasmática mostró intensidad baja que no interfería con la identificación de la membrana basolateral y proteínas NIS que se encontrara allí ubicada, en los casos que la presentaran.

La disminución en la captación de I se debe principalmente a la localización de la proteína en la célula más que a la ausencia de su actividad (100). Recientemente, Choi *et al*, mencionaron que además de la localización correcta de NIS –membrana basolateral- se requiere de estimulación por parte de la TSH y polarización celular (106,112). La TSH no solo controla la transcripción y biosíntesis de NIS en las células foliculares, además regula el metabolismo del I mediante la vía de señalización AMPc; recientemente se demostró que la estimulación con TSH aumenta la captación de ¹³¹I *in vivo* e *in vitro* así como la expresión de NIS (96,98), además es requerido para la translocación a la superficie de la membrana basolateral sin interferir en su función; en ausencia de TSH, NIS se observó en citoplasma (96,118). Bruno *et al*, demostraron que la inhibición de TSH disminuye los niveles de ARNm de NIS pero no los de TSHR (*Thyroid-Stimulating Hormone Receptor*) (119). Algunos autores concluyen que aumentar las concentraciones de TSH y TSHR podría mejorar la expresión de NIS y regular la translocación correcta de esta proteína dentro de la célula, y así aumentar la adsorción de ¹³¹I (96,97). Otros autores proponen en CPT con *BRAF*^{V600E}, es posible inhibir la fosforilación de ERK para regular la expresión de NIS y TSHR (97,206).

Estos son algunos mecanismos identificados para la regulación en la expresión de NIS; sin embargo, se requieren más estudios que permitan identificar el papel de *BRAF*^{V600E} sobre la inactividad de NIS; recientemente, diferentes estudios mostraron asociación entre la presencia de *BRAF*^{V600E} y silenciamiento en la expresión de NIS por metilación del promotor (106,122–125), consideramos que se

requieren más estudios que permitan comprobar esta hipótesis, dado que el problema en la captación de I no se debe a inhibición o reducción en la expresión de NIS, sino a los mecanismos postraduccionales de la proteína. La evaluación de la expresión de NIS sería útil en el manejo y enfoque terapéutico de los pacientes con CPT, para predecir la presencia o posible desarrollo de metástasis. En este estudio no se encontró asociación entre la presencia de *BRAF*^{V600E} o la metilación en *RASSF1A* con la expresión citoplasmática de NIS.

10. CONCLUSIONES

- Este es el primer reporte en población colombiana que estudia la asociación entre características histológicas de CPT y alteraciones moleculares en los genes *BRAF*, *RASSF1A* y la expresión de la proteína NIS. Con estos resultados se estratificó el comportamiento de los tumores CPT diagnosticados y tratados en el INC.
- En el diagnóstico de la enfermedad debe incluirse los subtipos de la variante folicular del CPT porque hay diferencias importantes en el comportamiento del tumor y el tratamiento requerido depende del este subtipo tumoral.
- El patrón combinado se postula incluirlos en el diagnóstico del CPT porque esta variante se asocia con características histológicas y moleculares de fenotipos agresivos y resistentes al tratamiento.
- Los microcarcinomas se asocian con invasión extra tiroidea, metástasis, multifocalidad y la mayoría presentan la mutación *BRAF*^{V600E} lo anterior implica que su manejo y tratamiento debe ser similar al de tumores agresivos.
- En este estudio no se evidenció asociación entre la multifocalidad y microcarcinomas con la presencia de *BRAF*^{V600E}; la manera en que se clasificaron los microcarcinomas puede ser la causa de no encontrar asociación entre estas características.
- Muestras con metilación parcial de *RASSF1A* se encontró en alta frecuencia; sin embargo, la metodología utilizada para este análisis, no permitió comprobar si corresponde a esta o a contaminación con células normales.
- La proteína NIS se acumula con mayor frecuencia en el citoplasma de las células tumorales, porque estas sufre modificaciones que le impiden ubicarse sobre la membrana basolateral de la célula, esta sería la principal causa de resistencia al tratamiento con I⁻¹³¹.
- La IHQ para NIS es excelente para implementarla y que sea considerada para determinar el pronóstico al tratamiento.
- Algunos autores plantean que la presencia de *BRAF*^{V600E} aumentan la actividad de metil-transferasas que explicaría la resistencia al tratamiento con I⁻¹³¹. Los resultados de este estudio permiten negar este postulado debido a que la resistencia al tratamiento se debe a una ubicación errada de la proteína NIS y no a la ausencia de la misma.
- No se encontró asociación entre la presencia de *BRAF*^{V600E} ni el patrón de metilación en *RASSF1A* con la expresión citoplasmática de NIS; sin

embargo, estos análisis deben ser considerados dentro del diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

11. RECOMENDACIONES

- Es necesario conocer la influencia de la concentración de yodo en la dieta, como factor de riesgo para desarrollar CPT con la mutación *BRAF*^{V600E}. En Colombia la sal es yodada y se desconoce la frecuencia y cantidad de uso en el consumo diario.
- Implementar estudios que confirmen la hipótesis de la metilación de *RASSF1A* como un evento temprano en la carcinogénesis del CT y postular este evento molecular como posible biomarcador.
- Explorar otras alteraciones cromosómicas como la pérdida de heterocigocidad del brazo corto del cromosoma 3 donde se ubica *RASSF1A*, que explicarían la baja frecuencia de silenciamiento del gen pero la alta frecuencia de fenotipos agresivos encontrados en este estudio.
- La hipermetilación de los genes difiere considerablemente en diferentes poblaciones del mundo, por eso es importante que en Colombia se lleven a cabo más estudios sobre metilación para cada tipo de cáncer.
- Se requieren estudios para confirmar la asociación entre la metilación con multifocalidad y microcarcinomas, y validar la utilización de *RASSF1A* metilado como marcador de pronóstico en enfermedades benignas de tiroides.
- Comprobar si la alta frecuencia de tumores con hemimetilación es porque *RASSF1A* es un GST haplo-insuficiente o por otras razones como contaminación de la muestra con células normales.
- Determinar si la sobre expresión de NIS es por activación permanente de la vía AMPc por la TSH en respuesta a la acumulación de I en sangre.
- Comprobar si las alteraciones en NIS es un evento tardío en la carcinogénesis de CPT por la alta frecuencia de presentación en tumores grandes.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: An overview. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2006. p. 1057–62.
2. Carling T, Udelsman R. Thyroid cancer. *Annu Rev Med*. 2014;65:125–37.
3. Garavito G, Llamas A, Cadena E, De los Reyes C, Hurtado G, Rojas L. Manejo multidisciplinario del cáncer diferenciado de tiroides en el Instituto Nacional de Cancerología. *Rev Col Cancerol*. 2010;14(2):65–77.
4. Girardi FM, Barra MB, Zettler CG. Variants of papillary thyroid carcinoma: Association with histopathological prognostic factors. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2013;79:730–44.
5. Lopes JP, Fonseca E. [BRAF gene mutation in the natural history of papillary thyroid carcinoma: diagnostic and prognostic implications]. *Acta Med. Port.* p. 855–68.
6. Lloyd R V., Buehler D, Khanafshar E. Papillary Thyroid Carcinoma Variants. *Head and Neck Pathology*. 2011;5(1):51–6.
7. Liu J, Singh B, Tallini G, Carlson DL, Katabi N, Shaha A, et al. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: A clinicopathologic study of a problematic entity. *Cancer*. 2006;107:1255–64.
8. Zhu C, Zheng T, Kilfoy BA, Han X, Ma S, Ba Y, et al. A birth cohort analysis of the incidence of papillary thyroid cancer in the United States, 1973-2004. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(10):1061–6.
9. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, Miccoli M, Lupi C, Sensi E, et al. Correlation between the BRAF V600E mutation and tumor invasiveness in papillary thyroid carcinomas smaller than 20 millimeters: Analysis of 1060 cases. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2010;95(9):4197–205.
10. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(12):1351–61.
11. Tang K-T, Lee C-H. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMA*. 2010;73(3):113–28.
12. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. yon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013.
13. Instituto Nacional de Cancerología-ESE. Anuario Estadístico 2008. Instituto Nacional de Cancerología. 2009;6:117.
14. Instituto Nacional de Cancerología-ESE. Anuario Estadístico 2014. Instituto Nacional de Cancerología. 2014;12:118.
15. Tavares C, Melo M, Cameselle Teijeiro JM, Soares P, Sobrinho-Simoes M. ENDOCRINE TUMOURS: Genetic predictors of thyroid cancer outcome. *Eur J Endocrinol [Internet]*. 2015;174(4):117–26. Available from: <http://www.eje-online.org/content/early/2015/10/28/EJE-15-0605.full.pdf#page=1&view=FitH>

16. Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Máximo V, Sobrinho-Simões M. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2007;51(5):643–53.
17. Policeni B a, Smoker WRK, Reede DL. Anatomy and embryology of the thyroid and parathyroid glands. *Seminars in ultrasound, CT, and MR* [Internet]. 2012;33(2):104–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22410358>
18. Yoon JH, Kwoon HJ, Kim EK, Moon HJ, Kwak JY. The follicular variant of papillary thyroid carcinoma: characteristics of preoperative ultrasonography and cytology. *Ultrasonography*. 2016;35(1):47–54.
19. Garavito G. Factores pronósticos para la recaída en pacientes con cáncer papilar de tiroides. *Rev Colomb Cancerol*. 2005. p. 21–30.
20. (IARC) IA for R on C. Tumors of the thyroid and parathyroid. RA D, RV L, PU H, Eng C, editors. Lyon-France; 2004. p. 49–134.
21. Abrosimov A, Shinkarkina A. A rare case of concurrent follicular and columnar cell variants of papillary thyroid carcinoma. *Arkh Patol*. 2013;75(3):31–3.
22. Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, et al. Association of high iodine intake with the T1799A BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(5):1612–7.
23. Romero A, Cuervo-Martínez J, Osorio-Arango L, Olaya N. Histological variants and prognostic factors of papillary thyroid carcinoma at the Colombian Instituto Nacional de Cancerología, 2006-2012. *Biomedica*. 2015;35:429–36.
24. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, et al. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(2):455–64.
25. Gupta S, Ajise O, Dultz L, Wang B, Nonaka D, Ogilvie J, et al. Follicular Variant of Papillary Thyroid Cancer: Encapsulated, Nonencapsulated, and Diffuse: Distinct Biologic and Clinical Entities. *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2012. p. 227–33.
26. Yang J, Gong Y, Yan S, Shi Q, Zhu J, Li Z, et al. Comparison of the clinicopathological behavior of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma and classical papillary thyroid carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Molecular and Clinical Oncology* [Internet]. 2015;753–64. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2015.540>
27. Chem KT, Rosai J. Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases. *The American journal of surgical pathology*. 1977;1(2):123–30.
28. Cha YJ, Chang HS, Hong SW. Diffuse follicular variant of papillary thyroid carcinoma in a 69-year-old man with extensive extrathyroidal extension: A case report. *Journal of Korean Medical Science*. 2013;28:480–4.
29. Chan J. Strict criteria should be applied in the diagnosis of encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(1):16–8.
30. D'Avanzo A, Treseler P, Ituarte PHG, Wong M, Streja L, Greenspan FS, et al. Follicular Thyroid Carcinoma: Histology and Prognosis. *Cancer*.

- 2004;100(6):1123–9.
31. Morris LGT, Shaha AR, Tuttle RM, Sikora AG, Ganly I. Tall-cell variant of papillary thyroid carcinoma: a matched-pair analysis of survival. *Thyroid*. 2010;20(2):153–8.
 32. Higuchi M, Hirokawa M, Suzuki A, Takada N, Yamao N, Kuma S, et al. Cytological features of solid variants of papillary thyroid carcinoma: a fine needle aspiration cytology study of 18 cases. *Cytopathology*. 2017;28(4):268–72.
 33. Asioli S, Odasso C, Macrì L, Palestini N, Bussolati G. Merits of the PMiT (papillary microtumor) terminology in the definition of a subset of incidental papillary microcarcinomas of the thyroid. *International journal of surgical pathology*. 2009;17(5):378–83.
 34. Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger M a. BRAF V600E mutation and its association with clinicopathological features of papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [Internet]. 2012;97(12):4559–70. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3513529&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Park YJ, Kim YA, Lee YJ, Kim SH, Park SY, Kim KW, et al. Papillary microcarcinoma in comparison with larger papillary thyroid carcinoma in BRAFV600E mutation, clinicopathological features, and immunohistochemical findings. *Head and Neck*. 2010;32(1):38–45.
 36. Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, et al. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2008;15(1):191–205.
 37. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Extensive clinical experience: Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007;92(11):4085–90.
 38. Khaled H, Al Lahloubi N, Rashad N. A review on thyroid cancer during pregnancy: Multitasking is required. *Journal of Advanced Research*. Cairo University; 2016;7(4):565–70.
 39. Rahbari R, Zhang L, Kebebew E. Thyroid cancer gender disparity. *Future oncology (London, England)*. 2010;6(11):1771–9.
 40. Teng W, Shan Z, Teng X, Guan H, Li Y, Teng D, et al. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *The New England journal of medicine*. 2006;354(26):2783–93.
 41. Repplinger D, Bargren A, Zhang Y-W, Adler JT, Haymart M, Chen H. Is Hashimoto's thyroiditis a risk factor for papillary thyroid cancer? *The Journal of surgical research*. 2008;150(1):49–52.
 42. Dvorkin S, Robertshtok E, Hirsch D, Strenov Y, Shimon I, Benbassat C. Differentiated thyroid cancer is associated with less aggressive disease and better outcome in patients with coexisting Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(6):2409–14.
 43. Cao Y, Wang Z, Gu J, Hu F, Qi Y, Yin Q, et al. Reproductive Factors but Not Hormonal Factors Associated with Thyroid Cancer Risk: A Systematic Review

- and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2015;2015(103515).
44. Kutanzi KR, Lumen A, Koturbash I, Miousse IR. Pediatric exposures to ionizing radiation: Carcinogenic considerations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2016;13(11).
 45. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjær S, Scott RP, Hanrahan S, Santoro M, et al. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(44):33577–87.
 46. Su X, Li Z, He C, Chen W, Fu X, Yang A. Radiation exposure, young age, and female gender are associated with high prevalence of RET/PTC1 and RET/PTC3 in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2014;7(13):16716–30.
 47. Eze OP, Starker LF, Carling T. The role of epigenetic alterations in papillary thyroid carcinogenesis. *Journal of thyroid research* [Internet]. 2011;2011:895470. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3134385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 48. Mesa CJ, Mirza M, Mitsutake N, Sartor M, Medvedovic M, Tomlinson C, et al. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res*. 2006;66(13):6521–9.
 49. Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C, Knauf JA, et al. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: Functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology*. 2006;147(2):1014–9.
 50. Nachalon Y, Katz O, Alkan U, Shvero J, Popovtzer A. Radiation-induced thyroid cancer: Gender-related disease characteristics and survival. *Annals of Otolaryngology, Rhinology and Laryngology*. 2016;125(3):242–6.
 51. Barollo S, Pezzani R, Cristiani A, Redaelli M, Zamboni L, Rubin B, et al. Prevalence, Tumorigenic Role, and Biochemical Implications of Rare BRAF Alterations. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* [Internet]. 2014;24(00):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24295088>
 52. Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(3):385–94.
 53. Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalent area. *Clinical Endocrinology*. 2006;65(5):660–6.
 54. Correia Rodrigues HG, De Pontes AAN, Fernando Adan L. Contribution of the BRAF oncogene in the pre-operative phase of thyroid carcinoma. *Oncology Letters*. 2013;6(1):191–6.
 55. Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, et al. Brief report: BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* [Internet]. 2007;92(7):2840–3. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17488796

56. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, Qian X, Oliveira A, Majerus JA, et al. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2006;15(3):136–43.
57. Kim WY, Ko YSS, Hwang TS, Han HS, Lim SD, Kim WS, et al. A case of multifocal papillary thyroid carcinoma consisting of one encapsulated follicular variant with BRAF K601E mutation and three conventional types with BRAF V600E mutation. *Korean Journal of Pathology*. 2013;47(3):293–8.
58. Kimbrell H, Sholl A, Ratnayaka S, Japa S, Lacey M, Carpio G, et al. BRAF Testing in Multifocal Papillary Thyroid Carcinoma. *BioMed Research International*. 2015;1(1):1–7.
59. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011;135(5):569–77.
60. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(6):2092–8.
61. Nucera C, Goldfarb M, Hodin R, Parangi S. Role of B-RafV600E in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-RafV600E. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2009. p. 152–61.
62. Riesco-Eizaguirre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabezas M, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(1):257–69.
63. Schulten H, Al-Maghrabi J, Al-Ghamdi K, Salama S, Al-Muhayawi S, Chaudhary A, et al. Mutational screening of RET, HRAS, KRAS, NRAS, BRAF, AKT1, and CTNNB1 in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer research [Internet]*. 2011;31(12):4179–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22199277>
64. Shi CL, Sun Y, Ding C, Lv YC, D QH. Correlation between the BRAF V600E mutation status and the clinicopathologic features of papillary thyroid carcinoma. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(3):7377–85.
65. Xing M. BRAF V600E mutation and papillary thyroid cancer. *JAMA*. 2013;310(5):535.
66. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, Viola D, Elisei R, Bendlova B, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA: the journal of the American Medical Association [Internet]*. 2013;309(14):1493–501. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3791140&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
67. Faam B, Ghaffari MA, Ghadiri A, Azizi F. Epigenetic modifications in human thyroid cancer. *Biomed Rep*. 2015;3(1):3–8.
68. Li J, Zhang S, Zheng S, Zhang D, Qiu X. The BRAF V600E mutation predicts

- poor survival outcome in patients with papillary thyroid carcinoma: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(12):22246–53.
69. Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Research*. 2002;62(13):3698–701.
 70. Schulten H, Alotibi R, Al-Ahmadi A, Ata M, Karim S, Huwait E, et al. Effect of BRAF mutational status on expression profiles in conventional papillary thyroid carcinomas. *BMC Genomics*. 2015;16(1).
 71. J. Pedro LOPES, E. FONSECA. MUTAÇÃO DO GENE BRAF NA HISTÓRIA NATURAL DO CARCINOMA PAPILAR DA TIREÓIDE Implicações Diagnósticas e Prognósticas. *Acta Med Port*. 2011;24(1):855–68.
 72. Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry Biokhimiia* [Internet]. 2000;65(1):2–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702637>
 73. Ellis CA, Clark G. The importance of being K-Ras. *Cellular Signalling*. 2000. p. 425–34.
 74. Hancock JF, Parton RG. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochemical Journal* [Internet]. 2005;389(Pt 1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1184533/>
 75. Ma J, Karplus M. Ligand-induced conformational changes in ras p21: a normal mode and energy minimization analysis. *Journal of molecular biology*. 1997;274:114–31.
 76. Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci*. 1998;3:d887–912.
 77. Trahey M, McCormick F. A cytoplasmic protein stimulates normal Nras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*. 1987;238(4826):542–5.
 78. Bourne H, Sanders D, McCormick F. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature*. 1990;348(6297):125–32.
 79. Rebollo A, Martínez-A C. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood* [Internet]. 1999;94(9):2971–80. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/94/9/2971.abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556179>
 80. Santos TM, Machado CR, Franco GR, Pena SDJ. Characterization and comparative functional analysis in yeast of a *Schistosoma mansoni* Rho1 GTPase gene. *Molecular and biochemical parasitology*. 2002;125(1-2):103–12.
 81. Wolfman A, Macara I. A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science*. 1990;248(4591):67–9.
 82. Boriack-Sjodin P, Margarit S, Bar-Sagi D, Kuriyan J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*. 1998;394(6691):337–43.
 83. Pham N, Cheglakov I, Koch CA, De Hoog CL, Moran MF, Rotin D. The guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF activates Ras in response to cAMP and cGMP. *Current Biology*. 2000;10(9):555–8.
 84. Fam NP, Fan WT, Wang Z, Zhang LJ, Chen H, Moran MF. Cloning and characterization of Ras-GRF2, a novel guanine nucleotide exchange factor for

- Ras. *Molecular and cellular biology*. 1997;17(3):1396–406.
85. Smith CC, Nelson J, Aurelian L, Gober M, Goswami BB. Ras-GAP binding and phosphorylation by herpes simplex virus type 2 RR1 PK (ICP10) and activation of the Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth. *Journal of virology*. 2000;74(22):10417–29.
 86. Quilliam L, Rebhun J, Castro A. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;71:391–444.
 87. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*. 2000;103(2):227–38.
 88. Schlessinger J, Bar-Sagi D. Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:173–9.
 89. Schlessinger J. How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci*. 1993;18(8):273–5.
 90. Zhang B, Liu S, Zhang Z, Wei J, Qu Y, Wu K, et al. Analysis of BRAF(V600E) mutation and DNA methylation improves the diagnostics of thyroid fine needle aspiration biopsies. *Diagnostic pathology [Internet]*. 2014;9(1):45. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3944809&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 91. Beiša A, Beiša V, Stoškus M, Ostanevičiūtė E, Griškevičius L, Strupas K. The value of the repeated examination of BRAF V600E mutation status in diagnostics of papillary thyroid cancer. *Endokrynologia Polska*. 2016;67(1):35–40.
 92. Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, et al. No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan. *Clinical Endocrinology*. 2005;63(4):461–6.
 93. Sun J, Zhang J, Lu J, Gao J, Lu T, Ren X, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for detecting the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(11):15072–8.
 94. Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95:625–7.
 95. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma: An unusually high prevalence of ras mutations. *American Journal of Clinical Pathology*. 2003;120(1):71–7.
 96. Zhang R, Wang H, Zhao J, Yao J, Shang H, Zhu H, et al. Association between sodium iodide symporter and differentiated thyroid cancer: A meta-analysis of 9 studies. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(10):17986–94.
 97. Smith VE, Read ML, Turnell AS, Watkins RJ, Watkinson JC, Lewy GD, et al. A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer. *Journal of cell science [Internet]*. 2009;122(Pt 18):3393–402. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706688>
 98. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, et al. Increased

- expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1997;82(10):3331–6.
99. Vieja ADELA, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed MIA, Ginter CS, et al. Regulation , and Medical Significance. 2016;24(April):48–77.
 100. Wapnir I, van de Rijn M, Nowels K, Amenta P, Walton K, Montgomery K, et al. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1880–8.
 101. Schlumberger M, Lacroix L, Russo D, Filetti S, Bidart J-M. Defects in iodide metabolism in thyroid cancer and implications for the follow-up and treatment of patients. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(3):260–9.
 102. Wartofsky L, Van Nostrand D. Radioiodine treatment of well-differentiated thyroid cancer. *Endocrine*. 2012. p. 506–13.
 103. Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, Carpi A, Berti P, Materazzi G, et al. Dedifferentiated thyroid cancer: a therapeutic challenge. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* [Internet]. 2008;62(8):559–63. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332208002382>
 104. Ward LS, Santarosa PL, Granja F, Da Assumpção LVM, Savoldi M, Goldman GH. Low expression of sodium iodide symporter identifies aggressive thyroid tumors. *Cancer Letters*. 2003;200(1):85–91.
 105. Journal T, Endocrinology C, Copyright M, Endocrine T, Vol S. Printed in U.S.A. 2697. 2017;86(6):2697–700.
 106. Choi Y, Kim H, Kim Y, Park S, Chwae Y, Lee J, et al. B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Exp Mol Med*. 2014;46.
 107. Min JJ, Chung JK, Lee Y, Jeong J, Lee D, Jang J, et al. Relationship between expression of the sodium/iodide symporter and 131I uptake in recurrent lesions of differentiated thyroid carcinoma. *European Journal of Nuclear Medicine*. 2001;28(5):639–45.
 108. Wu X-C, Chen VW, Steele B, Roffers S, Klotz JB, Correa CN, et al. Cancer incidence in adolescents and young adults in the United States, 1992–1997. *Journal of Adolescent Health* [Internet]. 2003;32(6):405–15. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1054139X03000570>
 109. Peyrottes I, Navarro V, Ondo-Mendez A, Marcellin D, Bellanger L, Marsault R, et al. Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers. *European Journal of Endocrinology* [Internet]. 2009;160(2):215–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029227> \n <http://www.eje-online.org/content/160/2/215.full.pdf>
 110. Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, Marco GDE, Perri A, Cosmo CDI, et al. Characterized by a Defective Targeting to Cell Iodide Symporter Protein. 2017;87(September):352–7.
 111. Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F, Porra V, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, et al. Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in

- hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *The American journal of pathology* [Internet]. 2004;165(1):25–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215159>
112. Kogai T, Brent GA. The sodium iodide symporter (NIS): Regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics*. 2012;135(3):355–70.
 113. Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Schlumberger M, Filetti S. Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastases of papillary thyroid carcinomas. *European Journal of Endocrinology*. 2000;143(5):623–7.
 114. Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Hay ID, Morris JC. Immunohistochemical analysis of sodium iodide symporter expression in metastatic differentiated thyroid cancer: Correlation with radioiodine uptake. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2001;86(11):5627–32.
 115. Jung YH, Hah JH, Sung MW, Kim KH, Cho SY, Jeon YK. Reciprocal immunohistochemical expression of Sodium/iodide symporter and hexokinase i in primary thyroid tumors with synchronous cervical metastasis. *Laryngoscope*. 2009;119(3):541–8.
 116. Patel A, Jhiang S, Dogra S, Terrell R, Powers PA, Fenton C, et al. Differentiated thyroid carcinoma that express sodium-iodide symporter have a lower risk of recurrence for children and adolescents. *Pediatric Research*. 2002;52(5):737–44.
 117. Sodr  AKMB, Rubio IGS, Galr o ALR, Knobel M, Tomimori EK, Alves V a F, et al. Association of low sodium-iodide symporter messenger ribonucleic acid expression in malignant thyroid nodules with increased intracellular protein staining. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [Internet]. 2008;93(10):4141–5. Available from: <http://jcem.endojournals.org/cgi/content/abstract/jc.2007-0353v1>
 118. Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(24):21458–63.
 119. Bruno R, Ferretti E, Tosi E, Arturi F, Giannasio P, Mattei T, et al. Modulation of thyroid-specific gene expression in normal and nodular human thyroid tissues from adults: An in vivo effect of thyrotropin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(10):5692–7.
 120. Tanaka K, Otsuki T, Sonoo H, Yamamoto Y, Udagawa K, Kunisue H, et al. Semi-quantitative comparison of the differentiation markers and sodium iodide symporter messenger ribonucleic acids in papillary thyroid carcinomas using RT-PCR. *European Journal of Endocrinology*. 2000;142(4):340–6.
 121. Li X, Abdel-Mageed AB, Kandil E. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2012. p. 310–5.
 122. Galr o AL, Sodr  AK, Camargo RY, Friguglietti CU, Kulcsar MA, Lima EU, et al. Methylation levels of sodium-iodide symporter (NIS) promoter in benign and malignant thyroid tumors with reduced NIS expression. *Endocrine*. 2013;43(1):225–9.
 123. Li W, Venkataraman GM, Ain KB. Protein synthesis inhibitors, in synergy with 5-azacytidine, restore sodium/iodide symporter gene expression in human

- thyroid adenoma cell line, KAK-1, suggesting trans-active transcriptional repressor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007;92(3):1080–7.
124. Provenzano MJ, Fitzgerald MP, Krager K, Domann FE. Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC). *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2007;137(5):722–8.
 125. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: Relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1999;84(7):2449–57.
 126. Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, et al. DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis*. 2006;27(6):1160–8.
 127. Choi SY, Park H, Kang MK, Lee DK, Lee KD, Lee HS, et al. The relationship between the BRAF(V600E) mutation in papillary thyroid microcarcinoma and clinicopathologic factors. *World journal of surgical oncology* [Internet]. 2013;11(1):291. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3833185&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 128. Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair K-W, Yen R-WC, Schuebel KE, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* [Internet]. 2002;416(6880):552–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/416552a>
 129. Suzuki M, Sunaga N, Shames DS, Toyooka S, Gazdar AF, Minna JD. RNA Interference-Mediated Knockdown of DNA Methyltransferase 1 Leads to Promoter Demethylation and Gene Re-Expression in Human Lung and Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 2004;64(9):3137–43.
 130. Donninger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of cell science* [Internet]. 2007;120(Pt 18):3163–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878233>
 131. Santoro A, Pannone G, Carosi MA, Francesconi A, Pescarmona E, Russo GM, et al. BRAF mutation and RASSF1A expression in thyroid carcinoma of southern Italy. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2013;114(5):1174–82.
 132. Agathangelou a, Honorio S, Macartney DP, Martinez a, Dallol a, Rader J, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene*. 2001;20(12):1509–18.
 133. Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature genetics*. 2000;25(3):315–9.
 134. Pfeifer GP, Dammann R. Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Moscow)*. 2005;70(5):576–83.
 135. Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, Ostrow KL, Markova A, Papagerakis S, et al. Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RAR??2 and RASSF1A in thyroid cancer. *Epigenetics*. 2012;7(7):710–9.
 136. Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW, et al. Early

- Occurrence of RASSF1A Hypermethylation and Its Mutual Exclusion with BRAF Mutation in Thyroid Tumorigenesis. *Cancer Research*. 2004;64(5):1664–8.
137. Schagdarsurengin U, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C, Dammann R. CpG island methylation of tumor-related promoters occurs preferentially in undifferentiated carcinoma. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association* [Internet]. 2006;16(7):633–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889486>
 138. F. S, F. X, G. L, Z. Z, Y. M, F. Y, et al. RASSF1A promoter methylation is associated with increased risk of thyroid cancer: A meta-analysis. *OncoTargets and Therapy* [Internet]. 2017;10:247–57. Available from: <https://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=34365&nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18b&NEWS=N&AN=614020503>
 139. Nakamura N, Carney JA, Jin L, Kajita S, Pallares J, Zhang H, et al. RASSF1A and NORE1A methylation and BRAFV600E mutations in thyroid tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005;85(9):1065–75.
 140. Mohammadi-Asl J, Larijani B, Khorgami Z, Tavangar SM, Haghpanah V, Kheirollahi M, et al. Qualitative and quantitative promoter hypermethylation patterns of the P16, TSHR, RASSF1A and RAR??2 genes in papillary thyroid carcinoma. *Medical Oncology*. 2011;28(4):1123–8.
 141. Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Advances in cancer research* [Internet]. 1997;71:27–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111863>
 142. Hoque MO, Rosenbaum E, Westra WH, Xing M, Ladenson P, Zeiger MA, et al. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90(7):4011–8.
 143. Lloyd RV, Osamura R, Klöppe I G, Rosai J. *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*. 4th ed. 2017.
 144. Mete O, Rotstein L, Asa SL. Controversies in thyroid pathology: thyroid capsule invasion and extrathyroidal extension. *Ann.Surg Oncol*. p. 386–91.
 145. Rosai J, Kuhn E, Carcangiu ML. Pitfalls in thyroid tumour pathology. *Histopathology*. 2006;49(2):107–20.
 146. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich H a, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)*. 1985;230(4732):1350–4.
 147. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene*. 2003;22:6455–7.
 148. Kakudo K, Tang W, Ito Y, Mori I, Nakamura Y, Miyauchi A. Papillary carcinoma of the thyroid in Japan: subclassification of common type and identification of low risk group. *Journal of clinical pathology*. 2004;57:1041–6.
 149. Lin J, Hsueh C, Huang B. Papillary Thyroid Carcinoma with Different

- Histological Patterns. *Chang Gung Med J.* 2011;31(1):23–4.
150. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* p. 1447–63.
 151. Bertoni A, Brum I, Hillebrand A, Furlanetto T. Progesterone Upregulates Gene Expression in Normal Human Thyroid Follicular Cells. *Int J Endocrinol.* 2015;2015(864852).
 152. Romero A, Meza I. Carcinoma papilar de tiroides, variante esclerosante difusa: un subtipo histológico de difícil diagnóstico. *Rev Colomb Cancerol.* 2004. p. 240–4.
 153. Baloch ZW, LiVolsi VA. Follicular-patterned lesions of the thyroid: The bane of the pathologist. *American Journal of Clinical Pathology.* 2002;117(1):143–50.
 154. Castro P, Fonseca E, Magalhães J, Sobrinho-Simões M. Follicular, papillary, and “hybrid” carcinomas of the thyroid. *Endocrine pathology [Internet].* 2002;13(4):313–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12665649>
 155. Cameselle J, Sobrinho-Simoes M. Carcinoma papilar de la glándula tiroides. Problemas en el diagnóstico y controversias. *Rev Esp de Pat.* 2003. p. 373–82.
 156. Guzmán GE, Casas LÁ, David J, Celestino O, Internista M, Valle U, et al. Diabetes Mutación BRAF V600E en pacientes con cáncer de tiroides . *Fundación Clínica Valle del Lili : una serie de casos.* 2016;45–9.
 157. Estrada-Florez AP, Bohórquez ME, Sahasrabudhe R, Prieto R, Lott P, Duque CS, et al. Clinical features of Hispanic thyroid cancer cases and the role of known genetic variants on disease risk. *Medicine [Internet].* 2016;95(32):e4148. Available from: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84983375997&partnerID=40&md5=aee09604269259ec5b28c48609af0c4e> <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005792-201608090-00002> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4985291>
 158. Sahasrabudhe R, Estrada A, Lott P, Martin L, Polanco G, Velez A, et al. 8q24 rs6983267G variant is associated with increased thyroid cancer risk. 2015;22(5):841–9.
 159. Sahasrabudhe R, Stultz J, Williamson J, Lott P, Estrada A, Bohorquez M, et al. The HBP2 G534E variant is an unlikely cause of familial nonmedullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2016;101(3):1098–103.
 160. Bohórquez ME, Estrada AP, Stultz J, Sahasrabudhe R, Williamson J, Lott P, et al. The HBP2 G534E polymorphism does not increase nonmedullary thyroid cancer risk in Hispanics. *Endocrine Connections [Internet].* 2016;5:123–7. Available from: <http://www.endocrineconnections.org>
 161. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. 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 Res [Internet].* 2003;63(7):1454–7. Available from:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12670889
162. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* [Internet]. 2003;22(29):4578–80. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12881714 \n <http://www.nature.com/onc/journal/v22/n29/pdf/1206706a.pdf>
 163. Sobrinho-Simões M, Preto A, Rocha AS, Castro P, Máximo V, Fonseca E, et al. Molecular pathology of well-differentiated thyroid carcinomas. *Virchows Archiv*. 2005;447(5):787–93.
 164. Ascierto P a, Kirkwood JM, Grob J-J, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*. 2012;10(1):85.
 165. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(9):4393–7.
 166. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocrine pathology*. 2005;16(3):163–72.
 167. Ahn S, Lee J, Sung JY, Kang SY, Ha SY, Jang KT, et al. Comparison of three BRAF mutation tests in formalin-fixed paraffin embedded clinical samples. *Korean Journal of Pathology*. 2013;47(4):348–54.
 168. Cradic K, Milosevic D, Rosenberg A, Erickson L, McIver B, Grebe S. Mutant BRAF(T1799A) can be detected in the blood of papillary thyroid carcinoma patients and correlates with disease status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):5001–9.
 169. Kim B, Kim I, Lee B, Lee J, Kim I, Kim S, et al. Detection of plasma BRAF(V600E) mutation is associated with lung metastasis in papillary thyroid carcinomas. *Yonsei Med J*. 2015;56(3):634–40.
 170. Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, et al. The BRAF(T1796A) transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma. *International Journal of Oncology* [Internet]. 2004;25:1729–35. Available from: <Go to ISI>://WOS:000225391700028
 171. Xing M, Tufano RP, Tufaro AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004.
 172. Sullivan RJ, Flaherty KT. BRAF in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, Inhibition, and Resistance. *Journal of Skin Cancer*. 2011. p. 1–8.
 173. Monti E, Bovero M, Mortara L, Pera G, Zupo S, Gugiatti E, et al. BRAF Mutations in an Italian Regional Population: Implications for the Therapy of Thyroid Cancer. *International Journal of Endocrinology*. Hindawi Publishing Corporation; 2015;2015.
 174. Zoghlami A, Roussel F, Sabourin JC, Kuhn JM, Marie JP, Dehesdin D, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: Predictive value for long-term

- prognosis and radioiodine sensitivity. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases* [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2014;131(1):7–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anorl.2013.01.004>
175. Cho U, Oh WJ, Bae JS, Lee S, Lee YS, Park GS, et al. Clinicopathological features of rare BRAF mutations in Korean thyroid cancer patients. *Journal of Korean Medical Science*. 2014;29(8):1054–60.
 176. Vuong HG, Kondo T, Oishi N, Nakazawa T, Mochizuki K, Inoue T, et al. Genetic alterations of differentiated thyroid carcinoma in iodine-rich and iodine-deficient countries. *Cancer Medicine*. 2014;5(8):1883–9.
 177. Huang F., Fang W., Ye L, Zhang X., Shen LY, Han RL, et al. BRAF mutation correlates with recurrent papillary thyroid carcinoma in Chinese patients. *Curr Oncol*. 2014;21(6):e740–7.
 178. Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY. Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Medical Journal*. 2004;45(5):818–21.
 179. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int.J.Cancer*. p. -.
 180. Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, et al. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(9):3667–70.
 181. Liu S, Zhang B, Zhao Y, Chen P, Ji M, Hou P, et al. Association of BRAFV600E mutation with clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma: a study on a Chinese population. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(10):6922–8.
 182. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF Mutations in Thyroid Tumors Are Restricted to Papillary Carcinomas and Anaplastic or Poorly Differentiated Carcinomas Arising from Papillary Carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003;88(11):5399–404.
 183. Trovisco V, Soares P, Preto A, De Castro IV, Lima J, Castro P, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Archiv*. 2005;446(6):589–95.
 184. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Research*. 2003;63(15):4561–7.
 185. Nikiforova M, Kimura E, Gandhi M, Biddinger P, Knauf J, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5399–404.
 186. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2005. p. 245–62.
 187. Barbaro D, Simit U, Meucci G, Lapi P, Orsini P, Pasquini C. Thyroid papillary cancers: Microcarcinoma and carcinoma, incidental cancers and non-incidental cancers - Are they different diseases? *Clinical Endocrinology*.

- 2005;63(5):577–81.
188. Oler G, Cerutti JM. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: Correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer*. 2009;115(5):972–80.
 189. Roti E, degli Uberti EC, Bondanelli M, Braverman LE. Thyroid papillary microcarcinoma: A descriptive and meta-analysis study. *European Journal of Endocrinology*. 2008;159(6):659–73.
 190. Lee J, Rhee Y, Lee S, Ahn CW, Cha BS, Kim KR, et al. Frequent, aggressive behaviors of thyroid microcarcinomas in Korean patients. *Endocrine journal*. 2006;53(5):627–32.
 191. Page C, Biet A, Boute P, Cuvelier P, Strunski V. “Aggressive papillary” thyroid microcarcinoma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* [Internet]. 2009;266(12):1959–63. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00405-009-0952-5>
 192. He G, Zhao B, Zhang X, Gong R. Prognostic value of the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *Oncology Letters*. 2014;7(2):439–43.
 193. Vasko V, Hu S, Wu G, Xing J, Larin A, Savchenko V, et al. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(9):5265–9.
 194. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh Q-Y, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Annals of surgery*. 2007;246(3):466–70; discussion 470–1.
 195. Zafon C, Baena JA, Castellvi J, Obiols G, Monroy G, Mesa J. Differences in the Form of Presentation between Papillary Microcarcinomas and Papillary Carcinomas of Larger Size. *J.Thyroid Res*. 2010. p. 639156 – .
 196. Hay ID, Hutchinson ME, Gonzalez-Losada T, McIver B, Reinalda ME, Grant CS, et al. Papillary thyroid microcarcinoma: a study of 900 cases observed in a 60-year period. *Surgery*. p. 980–7.
 197. Ilera V, Dourisboure R, Colobraro A, Silva Croome MDC, Olstein G, Gauna A. Mutación V600E del oncogén BRAF en nódulos tiroideos en Argentina. *Medicina (Argentina)*. 2016;76(4):223–9.
 198. Ito Y, Yoshida H, Maruo R, Morita S, Takano T, Hirokawa M, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J*. 2009;56(1):89–97.
 199. da Silva RC, de Paula HSC, Leal CBQS, Cunha BCR, de Paula EC, Alencar RCG, et al. BRAF overexpression is associated with BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinomas. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14(2):5065–75.
 200. Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as drug targets. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009. p. 296–303.
 201. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 1996;93(18):9821–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.18.9821>

202. Jiang JL, Tian GL, Chen SJ, Xu L, Wang HQ. Promoter methylation of p16 and RASSF1A genes may contribute to the risk of papillary thyroid cancer: A meta-analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015;10(4):1549–55.
203. Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA. The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(12):4309–18.
204. Jones P a, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*. 1999;21(2):163–7.
205. Arturi F, Russo D, Schlumberger M, du Villard J a, Caillou B, Vigneri P, et al. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [Internet]. 1998;83(7):2493–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9661633>
206. Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenti U, Benezra M, Knauf JA, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008;93(11):4331–41.

13. ANEXOS

13.1 Resultado de análisis de mutación del *Cobas 4800 V600 mutation test*.

cobas® 4800			
BRAF V600 Mutation Analysis Report			
Start of Run:	15-FEB-20 15:48:58	DNA Isolation Kit ID #2:	AD1S077232E00DY
Instrument Name:	COBAS INC	Reagent Kit ID #1:	9A1S051729E005W
Instrument Serial No:	50797_30756	Reagent Lot / Exp Date:	S05172 / Oct-2014
Core Version:	2.0.0.1028	Reagent Kit ID #2:	9A1S051729E005W
BRAF AP Version:	1.0.0.1028	Operator:	Laboperator
DNA Isolation Kit ID #1:	AD1S077232E00DY		
RUN STATUS		VALID	

RUN NAME: 15-FEB-2015 15:48 BRAF

Controls

Position	Control Type	Kit#	Control Status	Flags	Accepted By
A01	Mutant Control	1	Valid		Laboperator
B01	Wildtype Control	1	Valid		Laboperator

Specimens

Position	Sample ID	Kit#	Test Result	Flags	Accepted By
C01	001	1	Mutation Detected		Laboperator
D01	002	1	Mutation Detected		Laboperator
E01	003	1	Mutation Detected		Laboperator
F01	004	1	Mutation Detected		Laboperator
G01	005	1	Mutation Detected		Laboperator
H01	006	1	Mutation Detected		Laboperator
A02	007	1	Mutation Detected		Laboperator
B02	008	1	Mutation Detected		Laboperator
C02	009	1	Mutation Not Detected		Laboperator
D02	010	1	Mutation Detected		Laboperator
E02	011	1	Mutation Detected		Laboperator
F02	012	1	Mutation Detected		Laboperator
G02	013	1	Mutation Detected		Laboperator
H02	014	1	Mutation Not Detected		Laboperator
A03	015	1	Invalid	R202,R203	Laboperator
B03	016	1	Mutation Not Detected		Laboperator
C03	017	1	Mutation Detected		Laboperator
D03	018	1	Mutation Detected		Laboperator
E03	019	1	Mutation Not Detected		Laboperator
F03	020	1	Mutation Detected		Laboperator