



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Presencia de la mutación *BRAFV600E* en nódulos tiroideos, y su relación con el diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

Ángela Milena Martín Ríos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Morfología
Maestría en Genética Humana
Bogotá D.C., Colombia
2015

Presencia de la mutación *BRAFV600E* en nódulos tiroideos, y su relación con el diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

Angela Milena Martín Ríos

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Genética Humana

Directora:
Doctora Clara Eugenia Arteaga Díaz
Codirector:
Doctor Juan Manuel Arteaga Díaz

Línea de Investigación:
Genética del Cáncer
Grupo de Investigación:
Genética Clínica

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Morfología
Maestría en Genética Humana
Bogotá, Colombia
2016

A Dios.

A mis padres, a David, a Andrés, a Laura y a mi abuelita.
Gracias a ellos, estoy aquí.

A Melinda Cárdenas.
Por culpa de ella, estoy aquí.

Agradecimientos

A cada uno de los pacientes que ingresó a este estudio.

A la Doctora Clara Arteaga, por depositar su confianza en mi persona.

Al Doctor Juan Alberto Peralta, médico endocrinólogo, quien logró iniciar el reclutamiento de pacientes del estudio.

A Diana Mayorga, MSc, por su excelente guía durante mi travesía en el laboratorio, y por su aporte de la muestra celular HT-29.

Al Doctor Alejandro Velez, médico patólogo, por su participación, y por compartir su experiencia y conocimiento.

A la enfermera Liliana Paez, de Cediul IPS, por su colaboración en la consecución de este proyecto, y por el apoyo brindado durante mi estadía en Barranquilla.

A los Doctores Luz García y Eduardo DeNúbila, radiólogos, por su participación y gran entusiasmo en el desarrollo de este proyecto.

Al grupo de Epidemiología de la EPS Coomeva sede Caribe, por su apoyo en la realización de este proyecto.

A Verónica, Lina, Victor, Samantha y Catalina, por estar ahí presentes como incansables compañeros de lucha.

A Rocío Urueña, Liliana Viatela, Daniel Fernandez y Ana María Álvarez, por el tiempo que me brindaron incondicionalmente.

A los Doctores Harvy Velasco y Luis Alfredo Umaña, por su ejemplo de disciplina e insistencia en seguir adelante.

A todos aquellos que de una u otra forma me motivaron a llevar a cabo esta empresa.

A quienes olvidé mencionar aquí.

Y por supuesto, a Maya, la gata siamesa.

VII Presencia de la mutación BRAFV600E en nódulos tiroideos, y su relación con el
I diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

Resumen

El propósito de este estudio fue el determinar el estado de la mutación BRAFV600E en muestras de aspirado de nódulo tiroideo, mediante el uso de las técnicas de PCR en tiempo real y secuenciación. Se incluyeron 220 muestras de 181 pacientes provenientes de las ciudades de Medellín, Barranquilla y Bogotá. Se describieron las características clínicopatológicas de la población (sexo, edad, antecedente de cáncer tiroideo, antecedente de enfermedad tiroidea, tamaño del nódulo). Se realizó la correlación entre el estado de la mutación BRAFV600E y el diagnóstico de citología de ACAF y patología de pieza quirúrgica de las muestras disponibles. 16 muestras (7.2%) fueron positivas para BRAFV600E, de las cuales 10 fueron benignas por ACAF, 4 malignas (dos carcinomas papilares, dos carcinomas foliculares), 1 indeterminado, y 1 sin diagnóstico disponible. De 11 muestras detectadas por PCR, 3 fueron confirmadas también por secuenciación. En las muestras catalogadas como malignas por ACAF, no se dispuso de la totalidad de los resultados de patología de la pieza quirúrgica, por lo que no se calculó sensibilidad ni especificidad de las pruebas. Se encontraron dos muestras con mutación K601E. Se concluye que las técnicas evaluadas son adecuadas para la detección de la mutación BRAFV600E, sin embargo, se requiere obtener el resultado de patología para determinar la exactitud de las pruebas.

Palabras clave: Aspiración con aguja fina, nódulo tiroideo, carcinoma papilar de tiroides, Proto oncogén BRAF Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, análisis de secuenciación de ADN.

Abstract

The objective of this study was to determine the mutational status of BRAFV600E in FNA samples, using Real Time PCR and Sanger sequencing. 220 samples from 181 patients were included, from Medellin, Barranquilla and Bogota cities. Clinical and pathological features from the population sample were described (sex, age, thyroid cancer history, previous thyroid disease, nodule size). Correlation between mutational status of BRAFV600E and FNA cytology, and between mutational status and histopathology result were done. 16 FNA samples (7.2%) were BRAFV600E positive, 10 FNA samples were benign, 4 were malignant (two papillary carcinoma, two follicular carcinoma), 1 was indeterminate, and 1 has no available cytology result. From 11 positive samples detected by PCR, 3 were confirmed by sequencing. The histopathology confirmation of the whole amount of samples with malignant classification by FNA were not available, and sensitivity and specificity could not be calculated. Two samples were BRAFK601E mutation carriers. The evaluated techniques are adequate to detect BRAFV600E mutation, however, histology results must be evaluated in order to estimate the accuracy of these techniques.

Keywords: Fine needle aspiration biopsy, Papillary Thyroid cancer, Thyroid nodule, BRAF proto oncogene, Real Time Polimerase Chain Reaction, DNA Sequence analysis.

Contenido

	Pág.
Introducción	1
1. Capítulo 1 – Nódulo tiroideo	3
1.1 Definición	3
1.2 Epidemiología.....	3
1.3 Incidentalomas.....	4
Figura 1.1	5
1.4 Enfoque diagnóstico del nódulo tiroideo.....	5
1.4.1 Riesgo de malignidad de un nódulo solitario vs. múltiples nódulos.....	8
1.4.2 Incidentalomas.....	8
1.5 Ultrasonografía del nódulo tiroideo.....	9
1.6 Aspirado con aguja fina del nódulo tiroideo.....	10
1.6.1 Core needle aspiration (Biopsia por punción con aguja gruesa).....	12
1.7 El Sistema Bethesda para el reporte citopatológico de tiroides.....	12
2. Capítulo 2 – Carcinoma de Tiroides	15
2.1 Epidemiología.....	15
2.2 Presentación y factores de riesgo.....	16
2.3 Clasificación de las neoplasias tiroideas.....	17
2.4 Carcinoma papilar de tiroides	19
2.5 Marcadores moleculares.....	20
2.5.1 Inmunohistoquímica en cáncer de tiroides.....	21
2.5.2 Marcadores genéticos en cáncer de tiroides.....	21
2.5.3 Otros marcadores.....	23
3. Capítulo 3 – El Gen <i>BRAF</i> y su aplicación en Carcinoma Papilar de Tiroides	25
3.1 Vía MAP Kinasa ⁷⁶	25
3.2 <i>BRAF</i>	26
3.3 <i>BRAF</i> ^{FV600E} y otras mutaciones.....	27
3.4 Mecanismos patogénicos de la mutación BRAFV600E.....	28
3.4.1 Estructura molecular.....	28
3.4.2 Vías de señalización y Hormona tiroidea.....	29
3.4.3 Modelo murino.....	29
3.4.4 Características histológicas.....	30
3.5 BRAFV600E como factor pronóstico en carcinoma papilar de tiroides.....	31
3.6 Microcarcinomas.....	32

3.7	Diagnóstico del carcinoma de tiroides mediante la detección de la mutación <i>BRAF^{V600E}</i>	32
4.	Capítulo 4 - Metodología	35
4.1	Objetivo general.....	35
4.2	Objetivos específicos.....	35
4.3	Tipo de estudio.....	35
4.4	Tamaño de muestra.....	36
4.5	Obtención de la muestra.....	36
4.5.1	Criterios de inclusión.....	36
4.6	Registro de pacientes.....	37
4.7	Toma de la muestra.....	37
4.8	Extracción de ADN	37
4.9	Detección de la mutación BRAFV600E mediante PCR en tiempo real – curva melting 38	
4.9.1	Selección de sondas y primers.....	38
4.9.2	Características de la reacción.....	39
4.9.3	Curva de calibración.....	39
a.	Cálculo de la masa de ADN por genoma.....	40
b.	Cálculo de la masa de ADN que contiene el número de copias de interés y la concentración de ADN necesario.	40
4.10	Secuenciación de fragmentos	41
4.11	Reportes de citología de nódulo tiroideo.	42
4.12	Reporte de patología de tiroidectomía.....	42
4.13	Análisis estadístico.	42
5.	Capítulo 5 - Resultados	45
5.1	Ensayo de límite de detección.....	45
5.2	Características de la población analizada	47
5.3	Relación entre la presencia de la mutación BRAFV600E y el diagnóstico citológico de ACAF tiroideo.	49
5.3.1	ACAF y características ecográficas.....	49
5.3.2	Lectura de citología	49
5.3.3	Extracción de ADN de aspirado tiroideo.....	51
5.3.4	Detección de la mutación BRAFV600E en aspirado tiroideo.	53
5.3.5	Relación entre el estado de la mutación y el diagnóstico citológico.	56
6.	Capítulo 6 - Discusión	59
6.1	Acerca de la población estudiada	59
6.2	BRAFK601E	61
6.3	Carcinoma de tiroides en la población pediátrica	62
6.4	Otras consideraciones.....	62
7.	Conclusiones y recomendaciones	65
7.1	Conclusiones.....	65
7.2	Recomendaciones y perspectivas.....	65

Lista de figuras

	Página
Figura 1.1. Incidencia de carcinoma de tiroides de acuerdo con el tamaño tumoral ¹⁹ .	5
Figura 1.2. Algoritmo de la ATA para el manejo de nódulo tiroideo ⁵ .	6
Figura 2.1. Incidencia del carcinoma de tiroides de 1975 a 2004 en población estadounidense ¹⁹ .	16
Figura 2.2. Clasificación de las neoplasias tiroideas malignas.	18
Figura 2.3. Izquierda. Aspecto histológico del carcinoma papilar de tiroides. Derecha. Imagen de “Little Orphan Annie”	20
Figura 5.1. Curvas de eficiencia. ADN wild type.	45
Figura 5.2. Curvas de eficiencia ADN HT-29.	46
Figura 5.3. Curvas melting comparativas entre una muestra control negativo (sangre periférica donante sano, en azul) y una muestra control positivo heterocigoto (Línea celular HT-29, en rojo)	46
Figura 5.4. Distribución de pacientes con enfermedad tiroidea previa.	48
Figura 5.5. Porcentaje de pacientes según el número de nódulos tiroideos evaluados por ecografía.	48
Figura 5.6. Porcentaje de pacientes según resultado de citología de ACAF.	51
Figura 5.7. Dos imágenes (A y B) de curvas de extracción de ADN de aspirado de nódulo tiroideo, obtenido mediante kit Qiagen, cada una con concentraciones diferentes.	52
Figura 5.8. Curva melting del paciente BQ-32, con mutación BRAFV600E. Se observan dos picos de temperatura, uno a 60°C y otro a 64°C.	53
Figura 5.9. Curva melting del paciente BQ-7, wild type. Se observa un único pico de temperatura a 64°C.	53

Figura 5.10. A la derecha, secuenciación del paciente BQ-32, que muestra dos señales de fluorescencia de timina y adenina en la posición 1799 del gen BRAF, que corresponde a una mutación c.1799T>A, o V600E. A la izquierda, secuenciación del paciente BQ-88, que muestra una señal de fluorescencia de adenina en la posición 1799 del gen BRAF, que corresponde al estado *wild type* del gen *BRAF*. 54

Figura 5.11. Barras de frecuencias del estado mutacional de las muestras según resultado de citología (incluye las muestras con y sin reporte de Bethesda). 54

Figura 5.12. Secuenciación de la muestra 30, donde se evidencia una señal de guanina en la posición 1801 (c.1801A>G, K601E). 56

Figura 5.13. Secuenciación de la muestra 130, donde se evidencia una variante K601E, y una variante V600V, en la que se produce un cambio de una guanina por una timina (c.1800G>T, COSM1578949). 56

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1.1. Diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo ⁷ . Tomado con autorización.	7
Tabla 1.2. Factores de riesgo de malignidad de un nódulo tiroideo.	7
Tabla 1.3. Desempeño diagnóstico de cada característica ecográfica en la diferenciación de nódulos tiroideos benignos y malignos en nódulos no seleccionados ³¹ . Tomado con autorización.	9
Tabla 1.4. Guías revisadas de la Asociación Americana del Tiroides, que indican las características clínicas y ecográficas de nódulos con el tamaño recomendado para ACAF ⁵ . Tomado con autorización.	11
Tabla 1.5. Categorías del Sistema Bethesda y su riesgo de malignidad ⁴⁵ . Modificado con autorización.	13
Tabla 2.1. Prevalencia de las principales alteraciones genéticas en carcinoma diferenciado y anaplásico de tiroides. ¹ Con autorización.	22
Tabla 4.1. Secuencias de primers y sondas empleados en RT-PCR Melting curve Gen <i>BRAF</i> (GenBank ID NG_007873.3).	39
Tabla 4.2. Condiciones de amplificación de la reacción de PCR en tiempo real.	39
Tabla 4.3. Cálculo de concentración de ADN por número de copias.	40
Tabla 4.4. Diluciones para ADN wild type.	41
Tabla 4.5. Diluciones para ADN células HT-29.	41
Tabla 5.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes.	47
Tabla 5.2. Frecuencias según resultados de citología	50

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Término
ACAF	Aspirado con aguja fina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATA	American Thyroid Association – Asociación Americana del Tiroides
AKAP9	Proteína 9 de anclaje a Kinasa A
AKT	Proteína Kinasa de serina/treonina RAC-alfa
BRAF	Homólogo B1 del oncogén del sarcoma murino viral V-RAF
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CCDC6	Coiled-Coil Domain Containing 6
CNB	Core needle aspiration – aspirado con aguja gruesa
CR	Regiones conservadas
Cre	Recombinasa Cre
CTNNB1	Catenina beta 1
Ctr1	Proteína kinasa de serina/treonina 1 (Drosophila)
DAPK	Proteína kinasa asociado a muerte
ERK	Kinasa regulada por señal extracelular
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia de Förster
GDP	Guanosina difosfato
GNAS	Proteína alfa G estimulante de la Adenilato Ciclasa
GRB2	Proteína 2 ligada al receptor de factor de crecimiento
GTP	Guanosina trifosfato
HBME-1	Anticuerpo antimesotelioma
Ki-67	Anticuerpo marcador de proliferación
KSR1	Kinasa supresora de RAS 1
MAPK	Mitogen activation protein kinase – proteína kinasa de activación por mitógeno
MASA	Minisatellite associated sequence amplification
MEK	Proteína kinasa kinasa activada por mitógeno
miRNA	MicroARN
mRNA	ARN mensajero
NCOA4	Coactivador 4 de receptor nuclear
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NIS	Cotransportador Sodio – Yodo

Abreviatura	Término
NTRK1	Receptor de tirosina kinasa neurotrópica tipo 1
PAX8	Paired box gene 8
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET	Tomografía por emisión de positrones
PIK3	Fosfoinositol 3 kinasa
PKA	Proteína kinasa A
PP2A	Proteína fosfatasa 2
PPARG	Receptor gamma activado proliferador de peroxisoma
PTC	Carcinoma papilar de tiroides
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
RARB2	Receptor beta 2 de ácido retinoico
RAS	Homólogo del oncogén del sarcoma murino viral Kirsten
RET	Rearranged during transfection gene
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RKIP	Proteína inhibidora de RAF kinasa
SH2	Src homology 2
SLC5A8	Cotransportador Sodio/monocarboxilato, portador de solutos familia 5, miembro 8
SOS	Son of sevenless
Tg	Tiroglobulina
TIMP3	Inhibidor 3 de metaloproteinasas
TP53	Proteína tumoral p53
TPO	Thyroid peroxidase – Peroxidasa tiroidea
TSH	Hormona estimulante del tiroides
TSHR	Receptor de hormona estimulante del tiroides
TRHB	Receptor de hormona tiroidea beta
VEGF	Factor de crecimiento endothelial vascular

Lista de Símbolos

Abreviatura Término

<i>A</i>	<i>Adenina</i>
<i>C</i>	<i>Citosina</i>
<i>G</i>	<i>Guanina</i>
<i>T</i>	<i>Timina</i>

Nomenclatura de aminoácidos

<i>A</i>	<i>Alanina</i>
<i>R</i>	<i>Arginina</i>
<i>N</i>	<i>Asparagina</i>
<i>D</i>	<i>Ácido aspártico</i>
<i>C</i>	<i>Cisteina</i>
<i>E</i>	<i>Glutamato</i>
<i>Q</i>	<i>Glutamina</i>
<i>G</i>	<i>Glicina</i>
<i>H</i>	<i>Histidina</i>
<i>I</i>	<i>Isoleucina</i>
<i>L</i>	<i>Leucina</i>
<i>K</i>	<i>Lisina</i>
<i>M</i>	<i>Metionina</i>
<i>F</i>	<i>Fenilalanina</i>
<i>P</i>	<i>Prolina</i>
<i>S</i>	<i>Serina</i>
<i>T</i>	<i>Treonina</i>
<i>W</i>	<i>Triptófano</i>
<i>Y</i>	<i>Tirosina</i>
<i>V</i>	<i>Valina</i>

<i>Abreviatura</i>	<i>Término</i>
<i>A</i>	<i>Adenina</i>

Introducción

El carcinoma de tiroides es la neoplasia endocrina más frecuente, con una incidencia de 9 a 12/100.000 individuos por año, y con una mortalidad de 0.4 – 2.8/100.000 en mujeres y de 0.2-1.2/100.000 en hombres.¹ El tipo histológico más frecuente es el papilar, que es derivado de células epiteliales tiroideas, y se encuentra en el 80% a 90% de los casos de carcinoma bien diferenciado de tiroides.

La manifestación del carcinoma de tiroides más frecuente es el nódulo tiroideo, que usualmente es detectado en la consulta médica general como una masa indolora dependiente del tiroides. La prevalencia del nódulo tiroideo es del 4% al 7% de la población, y ha ido aumentando progresivamente, debido al incremento en la detección de nódulos tiroideos de forma incidental (incidentalomas) y a la mejora en las técnicas de imágenes diagnósticas.

El abordaje inicial de los pacientes con nódulo tiroideo se realiza mediante la biopsia aspiración con aguja fina (ACAF). Hasta el 15% de las lecturas de citología son reportadas como Atipias de significado indeterminado o Lesión folicular de significado indeterminado, las cuales tienen un potencial maligno del 5% al 20%.

Estos pacientes suelen ser observados, y se les realiza un nuevo ACAF en tiempo prudencial, o son llevados a cirugía en caso de presentar factores de riesgo. El diagnóstico histológico de cáncer en estos pacientes posterior a cirugía es del 10 al 20%². La tiroidectomía en manos expertas es un procedimiento seguro, pero las complicaciones de esta cirugía son significativas^{3,4}.

Por ello, los esfuerzos en la investigación de la patología molecular y el tratamiento del carcinoma de tiroides se han enfocado en desarrollar técnicas complementarias al ACAF que permitan mejorar la exactitud en la detección de cáncer tiroideo, como son el uso de marcadores moleculares en inmunohistoquímica, y la detección de mutaciones frecuentemente asociadas con carcinoma de tiroides, como es la mutación *BRAF^{V600E}*.

La mutación *BRAF^{V600E}* es la más frecuentemente asociada con carcinoma papilar de tiroides, encontrándose en el 60% de los casos, y en la variante papilar de células altas hasta en el 80% de los casos. Se asocia con factores de mal pronóstico, como extensión a nódulos linfáticos y a tejidos extratiroides, mayor riesgo de recurrencia, y baja captación de yodo radiactivo.

Se han desarrollado técnicas de detección de esta mutación a partir de muestras de ACAF de nódulo tiroideo, encontrándose una especificidad del 100% y un valor predictivo positivo cercano al 97% para el diagnóstico de carcinoma papilar. Este tipo de pruebas pueden proporcionar una ayuda valiosa en el enfoque diagnóstico de los pacientes con citologías indeterminadas.

1. Capítulo 1 – Nódulo tiroideo

1.1 Definición

El nódulo tiroideo, de acuerdo con la definición de la Asociación Americana del Tiroides (ATA), son todas aquellas lesiones individuales dentro de la glándula tiroides, que son radiológicamente diferentes al parénquima tiroideo⁵. Dentro de esta definición se incluyen aquellas masas que no son palpables y son descubiertas mediante estudios radiológicos. Por otro lado, hay masas tiroideas que, siendo palpables al examen físico, no presentan diferencias radiológicas en su estructura respecto al tiroides normal circundante, por lo que a éstas lesiones no se les cataloga dentro de la definición de nódulo tiroideo⁶.

1.2 Epidemiología

Los nódulos tiroideos son lesiones muy comunes, si bien no siempre son detectadas durante la vida del paciente⁷. Se ha demostrado en estudios de tiroides extraídas mediante autopsia⁸, que la mitad de los individuos por encima de los 50 años pueden tener nódulos tiroideos, con una frecuencia similar entre nódulos benignos y malignos. Según datos de Colombia, en 1961, Pelayo y Correa reportaron la presencia de nódulo tiroideo en 40% de todos los sujetos de autopsia –fallecidos por cualquier causa- en una zona de bocio endémico en Cali⁹. Por otro lado, Otero y Martin reportaron la presencia de nódulos tiroideos en 35,9% de 1000 autopsias realizadas en el Instituto Nacional de Cancerología en Bogotá. Del total de nódulos reportados en este estudio, 20% resultaron malignos¹⁰.

El nódulo tiroideo es más frecuente en mujeres que en hombres (4:1), y su incidencia aumenta progresivamente conforme avanza la edad. Se cree que la influencia hormonal de estrógenos y progesterona es la causa del aumento de incidencia del nódulo tiroideo en mujeres¹¹. Otros factores asociados con el desarrollo de nódulo tiroideo son el embarazo¹², el tabaquismo (el tiocianato es inhibidor competitivo de la absorción de yodo) y la deficiencia de yodo en la ingesta¹³.

La incidencia anual de nódulos tiroideos en la población en Estados Unidos es del 0.1% por año mediante palpación¹⁴, con una probabilidad del 10% de cada persona, de desarrollar un nódulo tiroideo a lo largo de la vida¹¹. No hay datos de incidencia de nódulos tiroideos en la población colombiana. Este tipo de lesiones pueden ser halladas al examen físico del paciente mediante palpación en un 4 a 7%¹¹, con una prevalencia del 5% en mujeres y del 1% en hombres⁵. Se considera que la palpación es el método menos sensible para detectar nódulos

tiroideos, y usualmente estos nódulos son palpables si tienen por lo menos 1 cm de diámetro¹⁵. Las masas descubiertas por estudios radiológicos se les denomina incidentalomas, y pueden encontrarse hasta en un 20-76% de la población¹¹.

1.3 Incidentalomas

El incidentaloma se define como un nódulo tiroideo insospechado, asintomático, que ha sido encontrado en un examen radiológico diagnóstico realizado por motivos diferentes al de enfermedad tiroidea, o durante una operación no relacionada con la glándula tiroides^{16,17}. El nódulo tiroideo se puede detectar mediante múltiples técnicas diagnósticas, como tomografía, PET scan (tomografía por emisión de positrones), y ultrasonografía para otro tipo de enfermedades, así como puede ser detectado durante intervenciones quirúrgicas como paratiroidectomía, endarterectomía, entre otros. Un incidentaloma puede ser detectado en el 16% de las tomografías cervicales y torácicas, en el 1,6% de PET scans, en el 40 a 67% de ecografías¹⁶, y en el 40% de las paratiroidectomías¹⁷.

Los incidentalomas explican en parte el aumento de la incidencia de carcinoma de tiroides⁷. Las técnicas radiológicas con resolución mejorada aumentan la probabilidad de encontrar nódulos incidentales; por ejemplo, la ultrasonografía de alta resolución permite detectar nódulos tan pequeños como 1 a 2 mm¹⁸.

Davies y Randolph en su revisión⁷, consideran que el aumento de la incidencia del carcinoma de tiroides secundario al fenómeno de los incidentalomas es un problema, debido básicamente a tres aspectos:

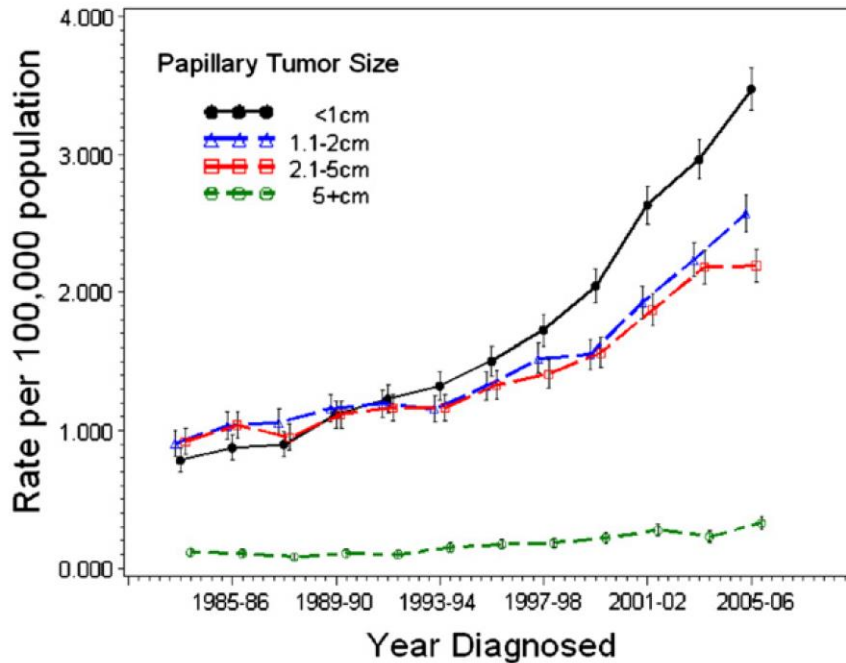
- Los pacientes serán expuestos a procedimientos que podrían causarles daño, y que finalmente serían innecesarios.
- Los pacientes con hallazgos incidentales serán rotulados como “pacientes con cáncer”, lo que conlleva a la ansiedad por el diagnóstico, la evaluación de sobrevida, y los costos en salud derivados.
- Estos pacientes con hallazgos incidentales afectan la validez de los estudios que investigan y tratan de mitigar los riesgos de mortalidad y recurrencia de cáncer de tiroides, puesto que aportan resultados falsamente favorables.

El estudio realizado por Cramer et al¹⁹ evalúa las posibles causas del aumento de la incidencia del carcinoma de tiroides en la población estadounidense. La figura 1.1 muestra la incidencia del cáncer papilar de tiroides estratificado por tamaño tumoral. A pesar de que es evidente que hay un aumento de la incidencia de los tumores de menos de un centímetro, los autores consideran que, estadísticamente, no se puede explicar el aumento general de la incidencia de carcinoma de tiroides solamente por el aumento en la incidencia de incidentalomas, y es necesario evaluar otras causas.

Es por esto que el hallazgo de un nódulo o una masa tiroidea, en el contexto clínico, suscita siempre la sospecha de malignidad y, por tanto, la diferenciación entre nódulos benignos y

cáncer es de importancia crítica. Es necesario establecer qué nódulos requieren seguimiento, cuáles requieren tratamiento, y qué tan agresivo debe ser éste.

Figura 1.1. Incidencia de carcinoma de tiroides de acuerdo con el tamaño tumoral¹⁹. Tomado con autorización.



1.4 Enfoque diagnóstico del nódulo tiroideo

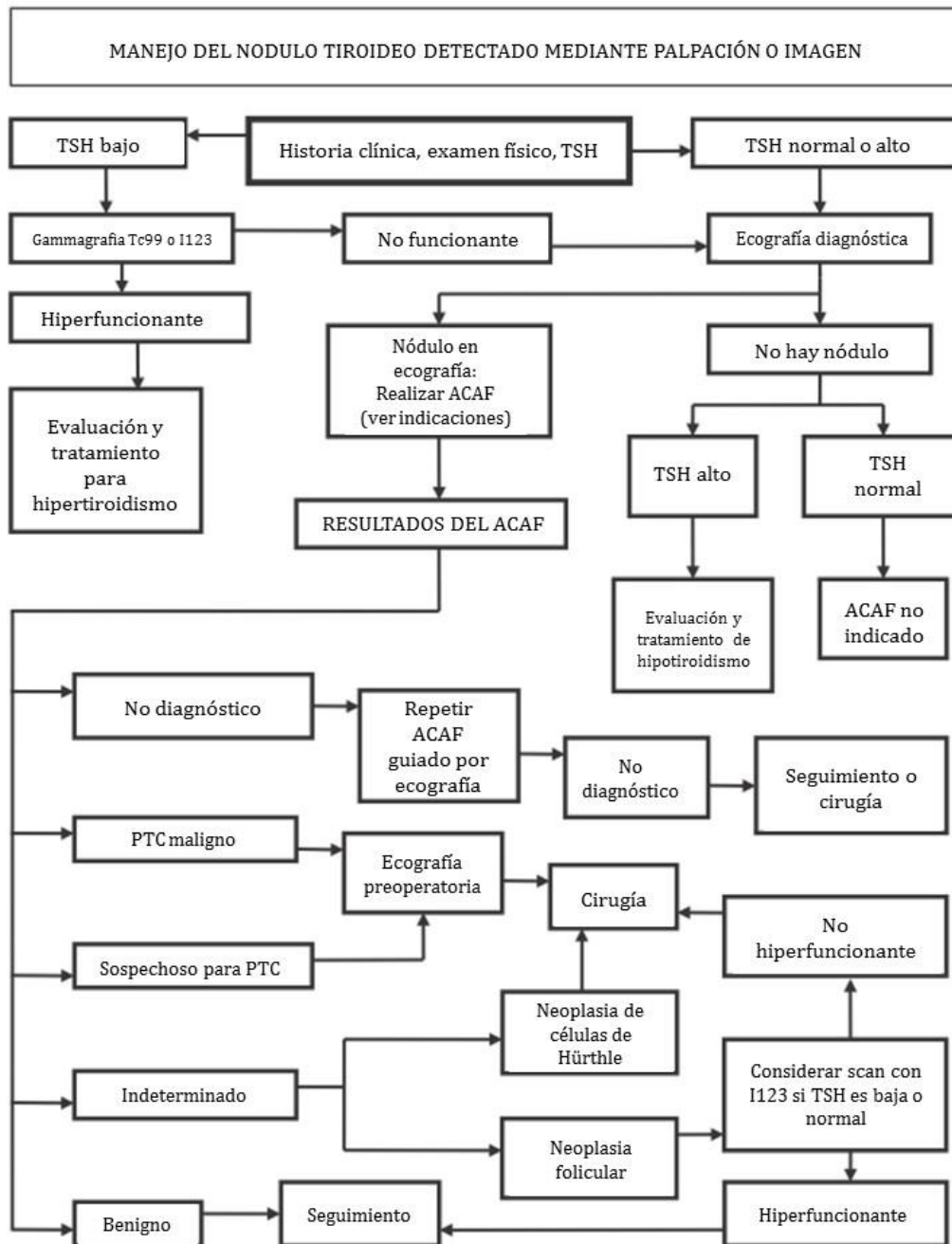
Independientemente de la forma en que se diagnostica el nódulo tiroideo, es decir, ya sea mediante palpación o método diagnóstico, el primer paso para la evaluación del nódulo es la historia clínica y el examen físico. El algoritmo que provee la ATA (ver figura 1.2) es a la fecha el enfoque recomendado hacia el diagnóstico del paciente con nódulo tiroideo⁵.

La historia personal de hipertiroidismo o hipotiroidismo, o los síntomas que los sugieran, así como una masa que aumente de tamaño rápidamente y se acompañe de dolor a la palpación, son hallazgos que inclinan la impresión diagnóstica hacia un comportamiento benigno², puesto que puede haber lesiones benignas que presenten hemorragia en su interior y crezcan. Sin embargo, una masa indolora que crezca rápidamente sugiere malignidad, así como la presencia de adenopatías y cambios en la voz o en la deglución⁵. Una masa fija y dura puede ser compatible con un proceso maligno, pero también puede encontrarse en pacientes con tiroiditis de Hashimoto⁷.

Todo paciente que presente un nódulo, debe tener mediciones de Hormona Estimulante del Tiroides (TSH). El riesgo de malignidad aumenta en aquellos pacientes con TSH normal²⁰. Los

pacientes con TSH elevada deben ser llevados a gammagrafía con Tc⁹⁹ o I¹²³, con el fin de determinar si el nódulo es hiperfuncionante o no. En el caso de ser hiperfuncionante, no requiere evaluación adicional, puesto que estos nódulos son raras veces malignos¹⁷.

Figura 1.2. Algoritmo de la ATA para el manejo de nódulo tiroideo⁵. Adaptado con autorización.



Una vez obtenida la historia clínica y el examen físico, se evalúan los diferentes diagnósticos diferenciales a plantearse ante la presencia de un nódulo tiroideo (Tabla 1), entre los cuales se encuentra la patología maligna. En la tabla 2 se resume los factores de riesgo que hacen pensar que un nódulo tiroideo tiene alto potencial maligno.

Tabla 1.1. Diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo ⁷. Tomado con autorización.

Benigno	Maligno
Bocio multinodular	Carcinoma papilar (88%)
Tiroiditis de Hashimoto	Carcinoma folicular (9%)
Quiste simple o hemorrágico	Tipo célula de Hürthle (oxifílica)
Adenoma folicular	Carcinoma medular (<2%)
Tiroiditis subaguda	Carcinoma anaplásico (<2%)
	Linfoma tiroideo primario (raro)
	Metástasis de mama, células renales, otros (raro)

Tabla 1.2. Factores de riesgo de malignidad de un nódulo tiroideo.

Historia clínica
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Edad menor de 20 años (riesgo aumentado de malignidad dos veces mayor).²¹ ▪ Edad mayor de 70 años²¹ ▪ Sexo masculino²¹ ▪ Radiación: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Irradiación del cuello durante la niñez o la adolescencia^{5,21} ▪ Irradiación corporal total por trasplante de médula ósea⁵ ▪ Exposición a radiación ionizante por lluvia en la niñez o la adolescencia^{5,21} ▪ Crecimiento rápido del nódulo^{5,21} ▪ Cambios en el habla⁵, la respiración o alteraciones de la deglución de aparición reciente²¹ ▪ Deficiencia de Yodo (carcinoma folicular) ▪ Familiar en primer grado con antecedente de carcinoma papilar de tiroides (riesgo de tres a cinco veces mayor si es uno de los padres, o mayor de seis veces si es un hermano) o carcinoma medular de tiroides (hasta 4000 veces si es uno de los padres)²² ▪ Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 en un familiar de primer grado^{5,21} ▪ Otras enfermedades familiares: Poliposis adenomatosa familiar del colon (Síndrome de Gardner), Síndrome de Cowden, Complejo Carney; en familiares de primer grado^{5,21}
Examen físico
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nódulos de más de 4 cm (19.3% de riesgo de malignidad)²¹ ▪ Nódulo de consistencia firme e irregular²¹ ▪ Nódulo fijo a tejidos subyacentes o circundantes^{5,21} ▪ Parálisis de cuerdas vocales⁵ (Valor predictivo positivo del 100%)²¹ ▪ Adenopatías regionales⁵ (valor predictivo positivo de 100% en ganglios mayores a 1 cm)²¹

El tamaño del nódulo no es predictor independiente de malignidad^{17,23}. Sin embargo, la recomendación de la ATA para realizar aspirado con aguja fina del nódulo es que sea mayor de 10 mm, y si es menor, que tenga características que sugieran malignidad⁵. Esto, debido a que la ultrasonografía es un procedimiento operador dependiente, y los nódulos menores de 10

mm son difíciles de puncionar. En el caso de nódulos de gran tamaño, un estudio llevado a cabo por McCoy et al²⁴, mostró que la incidencia de cáncer en nódulos mayores a 4 cm es del 26%.

1.4.1 Riesgo de malignidad de un nódulo solitario vs. múltiples nódulos

La enfermedad nodular tiroidea puede presentarse como un único nódulo o varios nódulos, por lo que se debe determinar el riesgo de malignidad en el caso de un paciente con dos o más nódulos tiroideos. Los estudios de Marqusee et al⁶ y Papini et al²⁵ demostraron que tanto los pacientes con un único nódulo tiroideo, como los pacientes con múltiples nódulos, tienen el mismo riesgo de malignidad.

Adicional a esto, en dos estudios se evaluó el riesgo de malignidad en nódulos tiroideos únicos o múltiples de 10 mm o más. En el estudio de Frates et al²⁶ se encontró que un nódulo dominante o solitario en una glándula por lo demás normal, conlleva un mayor riesgo de malignidad (14.8%), que aquel nódulo único que se encuentra en una glándula multinodular (8,1%), y la probabilidad de cáncer por nódulo disminuye conforme aumenta el número de nódulos (tres o más). Sin embargo, se encontró que el riesgo de malignidad era similar tanto para el grupo de pacientes con tiroides con un nódulo solitario, como para el grupo de pacientes con tiroides multinodular. Se encontraron resultados similares en el estudio de Barroeta et al²⁷.

El estudio de Frates et al también describe que en el grupo de pacientes con cáncer y tiroides con dos nódulos, en el 87% el cáncer se encuentra en el nódulo dominante. Al tener tres nódulos, en la mitad de los pacientes el cáncer se encontró en el nódulo dominante; y la probabilidad de encontrar cáncer en el nódulo dominante disminuyó conforme aumentaba el número de nódulos, lo que indica que la mayoría de los casos, el cáncer es unifocal, pero no siempre se encuentra en el nódulo dominante.

1.4.2 Incidentalomas

En general, los nódulos no palpables tienen el mismo riesgo de malignidad que los nódulos palpables que tengan el mismo tamaño⁵. El riesgo de malignidad de los incidentalomas depende del tipo de método diagnóstico utilizado¹⁷. En el caso de la tomografía, el riesgo de malignidad se encuentra entre el 3.9 y el 11.3%²⁸, sin embargo no es un método fiable en la evaluación del tamaño o número de nódulos¹⁶, además que no hay características confiables de los nódulos en la tomografía que permitan diferenciar un nódulo benigno de uno potencialmente maligno²⁹. Los incidentalomas detectados mediante ecografía tienen un riesgo de malignidad entre el 2 y el 15%, y los detectados mediante dúplex carotídeo tienen un riesgo del 7.4%¹⁶.

El PET scan es empleado en el seguimiento de pacientes con antecedente de diversos carcinomas. Éste método puede detectar nódulos tiroideos en el 1-2% de los casos, sin

embargo, el riesgo de malignidad es elevado (33%)²⁸ y el patrón de invasión es más agresivo⁵. El riesgo de malignidad se eleva entre 30-50% en el caso de nódulos con patrón de captación en solitario²⁸. En estos casos, deben evaluarse estos nódulos de forma inmediata.

1.5 Ultrasonografía del nódulo tiroideo

Todo nódulo tiroideo debe ser evaluado mediante ultrasonografía, que es el método de elección para la exploración de la glándula tiroides⁷, por la localización de éste órgano y facilidad de valoración mediante esta técnica, además de la adecuada visualización de otros órganos adyacentes¹⁷. Aunque los pacientes hayan tenido el diagnóstico de nódulo tiroideo mediante otro tipo de técnica radiológica, deben ser llevados a ecografía, ya que ésta provee información adicional que puede cambiar el manejo posterior¹⁷. La ecografía de tiroides no está indicada como un método de tamizaje, ni en pacientes con bajo riesgo de carcinoma de tiroides y con una tiroides normal a la palpación.³⁰

Múltiples estudios han evaluado la relación entre las características ecográficas de los nódulos tiroideos y su potencial maligno²⁵. Cada característica *per se* no es indicativa de malignidad³¹, pero sí permiten determinar cuáles nódulos tienen mayor probabilidad de ser malignos, y por consiguiente, cuáles nódulos requieren estudio posterior con aspirado con aguja fina⁷. Estas son la hipoeogenicidad, el aumento de la vascularidad, los márgenes infiltrativos irregulares, las microcalcificaciones, el halo ecográfico ausente, y la altura mayor que el ancho⁵. La tabla 1.3 resume varias de estas características ecográficas, junto con su sensibilidad y especificidad para la detección de cáncer tiroideo. La única característica ecográfica que se considera completamente benigna es el nódulo puramente quístico, y el patrón esponjiforme es 99,7% específico para benignidad^{5,32}.

Tabla 1.3. Desempeño diagnóstico de cada característica ecográfica en la diferenciación de nódulos tiroideos benignos y malignos en nódulos no seleccionados³¹. Tomado con autorización.

Característica	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Cociente de probabilidad positiva	Probabilidad post test (%) ^a	Cociente de probabilidad negativa	Probabilidad post test (%) ^a
Altura mayor que ancho	26.7	96.6	8.07	47.0	0.75	7.6
Ausencia de halo	56.4	72	2.02	18.1	0.60	6.2
Ausencia de elasticidad	87.9	86.2	6.39	41.3	0.13	1.4
Heterogeneidad	47.5	70.0	1.58	14.8	0.74	7.5
Hipoeogenicidad	62.7	62.3	1.66	15.4	0.62	6.3
Nódulo sólido	72.7	53.2	1.55	14.6	0.51	5.3
Microcalcificaciones	39.5	87.8	3.26	26.4	0.68	7.0
Nódulo solitario	53.0	60.2	1.33	12.8	0.77	7.8
Vascularización central	45.9	78.0	2.09	18.7	0.69	7.1
Márgenes irregulares	50.5	83.1	2.99	24.7	0.59	6.1

En la actualidad se está implementando la elastografía, que es la medición de la elasticidad tisular del nódulo tiroideo, como un método diagnóstico adicional para evaluar el riesgo de malignidad en nódulos tiroideos. Un metanálisis³³ reporta un valor predictivo negativo del 99% en el caso de los nódulos que son completamente blandos. Sin embargo, la evidencia no es suficiente y se requieren más estudios para determinar su utilidad³¹.

1.6 Aspirado con aguja fina del nódulo tiroideo

El 5 al 10% de los nódulos tiroideos, independientemente de su tamaño, son de origen maligno³⁴. Por consiguiente, y de acuerdo con los hallazgos ecográficos y el tamaño del nódulo (ver tabla 4), la ATA recomienda la realización de aspirado con aguja fina (ACAF) del nódulo tiroideo (Recomendación grado A)⁵. El ACAF del nódulo tiroideo es el método más confiable para el diagnóstico de cáncer de tiroides³⁵.

El procedimiento de biopsia Aspiración con Aguja Fija (ACAF) fue descrito por primera vez en 1948³⁶, y desde su introducción en 1970³⁷ ha permitido reducir el número de cirugías innecesarias mejorando la exactitud diagnóstica del cáncer de tiroides^{5,16,30,37,38}. El ACAF es el método más preciso y costo efectivo de evaluación de un nódulo tiroideo³⁶. Tiene una sensibilidad media de 83% (65-98%), una especificidad media de 92% (72-100%), un valor predictivo positivo del 75% (50-96), una tasa de falsos negativos de 5% y de falsos positivos en 5%³⁰. Se atribuye una alta tasa de falsos negativos y falsos positivos en algunos estudios a la baja calidad de los especímenes extraídos, por ejemplo, una muestra hemorrágica³⁶.

Es un procedimiento bien tolerado, y con un riesgo bajo de complicaciones. Dentro de éstas se encuentran sangrado intranodular limitado, dolor local irradiado a la oreja³⁶, y la formación de hematomas que suelen resolver en poco tiempo³⁹. Puede presentar en casos raros inflamación aguda o el desarrollo de una lesión quística³⁶. La complicación más importante es el sangrado intratiroideo con obstrucción de la vía aérea superior, si bien es muy raro que se presente³⁹. El ACAF puede realizarse con o sin guía ecográfica, pero siempre se prefiere la realización de un ACAF guiado por ecografía, pues esto reduce el número de especímenes inadecuados y de resultados falsos negativos²¹. Además, se reduce el riesgo de complicaciones, dado que se tiene una visión directa de la aguja, y se evita lesionar órganos como tráquea, arteria carótida, vena yugular, o nervio laríngeo³⁰.

La tabla 4 muestra las indicaciones para la realización del ACAF de acuerdo con las guías de la ATA.

Tabla 1.4. Guías revisadas de la Asociación Americana del Tiroides, que indican las características clínicas y ecográficas de nódulos con el tamaño recomendado para ACAF⁵. Tomado con autorización.

Características clínicas/ecográficas	Tamaño para ACAF (mm)
Historia de alto riesgo:	
Con características ecográficas malignas	>5 (Recomendación grado A)
Sin características ecográficas malignas	>5 (Recomendación grado I)
Nódulos linfáticos anormales	Todos los nódulos (Recomendación grado A)
Microcalcificaciones	≥ 10 (Recomendación grado B)
Nódulo sólido	
Hipoecoico	>10 (Recomendación grado B)
Iso o hiperecoico	≥10-15 (Recomendación grado C)
Nódulo mixto sólido y quístico	
Con características ecográficas malignas	≥10-15 (Recomendación grado B)
Sin características ecográficas malignas	≥20 (Recomendación grado C)
Espongiforme	≥20 (Recomendación grado C)
Quiste	No ACAF (Recomendación grado E)

De acuerdo con la tabla anterior, se considera que el tamaño mínimo recomendado para la realización de ACAF es de 10 mm. Se recomienda puncionar los nódulos de 5 o más mm siempre y cuando presenten características de malignidad en ecografía. Si el nódulo mide menos de 1 cm y no tiene características malignas, se debe sopesar el riesgo del procedimiento sobre el beneficio del paciente, puesto que la evidencia es insuficiente⁵. En nódulos mayores a 4 cm, McCoy et al²⁴ mostraron en su estudio que la tasa de falsos negativos en el ACAF es del 13%, y puede no diagnosticar lesiones foliculares en un 34%, por lo que consideran que el ACAF en estos nódulos no debe cambiar la conducta que es la cirugía para nódulos mayores a 4 cm, además que usualmente estos nódulos se asocian a dificultades en la deglución y el habla⁷.

El único caso en el que se contraindica la realización de ACAF es en los nódulos tiroideos con componente exclusivamente quístico, excepto para tratamiento. En el caso de detectarse un nódulo linfático, este nódulo debe ser aspirado también⁵.

En el caso de la tiroides con dos o más nódulos, el estudio de Frates et al.²⁶ reporta que en la mayoría de los casos, el cáncer es unifocal, pero no siempre se encuentra en el nódulo dominante, lo que sugiere que el puncionar solamente el nódulo dominante deja sin diagnosticar cáncer hasta en un tercio de los pacientes. En pacientes con dos nódulos mayores de 10 mm, el 15% de los cánceres no se habrían diagnosticado si sólo se hubiese puncionado el nódulo dominante, y en el caso de pacientes con tres nódulos, el 50% de cánceres. Actualmente, la recomendación de la AAT en la tiroides multinodular, es la de puncionar solamente los nódulos que tengan características ecográficas sospechosas de malignidad (Recomendación grado B), y si ninguno de los nódulos tiene características ecográficas que sugieran malignidad, se sugiere puncionar únicamente el nódulo dominante (Recomendación grado C).

- 1 Presencia de la mutación BRAFV600E en nódulos tiroideos, y su relación con el
 - 2 diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides
-

1.6.1 Core needle aspiration (Biopsia por punción con aguja gruesa)

La biopsia por punción con aguja gruesa (Core Needle Aspiration, CNB) de la tiroides se ha propuesto como una técnica alternativa de diagnóstico en nódulo tiroideo. La técnica usada es similar a la empleada en cáncer de mama, y permite obtener una gran cantidad de tejido no sólo del nódulo, sino de la arquitectura tisular que lo rodea, lo que permite establecer un diagnóstico histológico, e incluso puede emplearse tinciones inmunohistoquímicas en esta muestra⁴⁰.

Algunos estudios muestran que el CNB tiene gran utilidad en el diagnóstico complementario en el contexto de un resultado indeterminado en el ACAF^{41,42}. Sin embargo la evidencia es insuficiente para determinar la utilidad del CNB en el diagnóstico del carcinoma de tiroides⁴⁰. En el momento, la única indicación para su uso, de acuerdo con la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos, es en casos seleccionados con resultados inadecuados en el ACAF⁴³. Se considera que este tipo de biopsia no ofrece un valor diagnóstico adicional al momento de diferenciar un nódulo hiperplásico de un adenoma folicular o un carcinoma⁴⁴.

1.7 El Sistema Bethesda para el reporte citopatológico de tiroides

En el 2007 se propuso unificar la terminología para reportar los resultados de las citologías de tiroides, siguiendo un esquema similar al empleado en los reportes de citología cervical (Papanicolaou). Se creó así el Sistema Bethesda para el reporte citopatológico de tiroides, con el propósito⁴⁵ de:

- Facilitar la comunicación entre las diversas especialidades que abarcan el estudio de la patología tiroidea
- Facilita la correlación citología-histología para las enfermedades tiroideas
- Permite la investigación de la epidemiología, biología molecular, patología y diagnóstico de la enfermedad tiroidea, en especial la neoplasia.
- Permite compartir datos confiables de forma sencilla entre los laboratorios, para el desarrollo de estudios colaborativos.

Este sistema también permite la evaluación de la calidad de la muestra al momento de ser evaluada, de tal forma que una biopsia Diagnóstica, Adecuada o Satisfactoria, es aquella que cumple con los criterios específicos para ser considerada citológicamente adecuada. Una muestra Adecuada cuenta con la presencia de por lo menos seis grupos celulares foliculares, cada uno que contenga 10 a 15 células derivadas de por lo menos dos aspirados de un nódulo. La muestra que no cumple con estos criterios se clasifica como No Diagnóstica o Insatisfactoria (Categoría I)^{5,30,36}. Los extendidos que contienen únicamente células inflamatorias o coloide, tienen sangre que oscurece la muestra, extendidos muy gruesos, fijados en alcohol o secados al medio ambiente, también se clasifican como inadecuados⁴⁵.

Las seis categorías y sus características se resumen en la tabla 1.5, junto con la probabilidad de malignidad de cada una de las categorías.

Tabla 1.5. Categorías del Sistema Bethesda y su riesgo de malignidad⁴⁵. Modificado con autorización.

Categoría	Riesgo de malignidad
No diagnóstica o insatisfactoria <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fluido quístico ▪ Especimen virtualmente acelular ▪ Otros 	1-4%
Benigno <ul style="list-style-type: none"> ▪ Consistente con nódulo folicular benigno (incluye el nódulo coloide, el nódulo adenomatoso, etc) ▪ Consistente con tiroiditis de Hashimoto en el contexto clínico apropiado ▪ Consistente con tiroiditis granulomatosa (subaguda) ▪ Otros 	0-3%
Atipia de significado indeterminado o Lesión folicular de significado indeterminado	5-15%
Neoplasia folicular o sospechoso de neoplasia folicular <ul style="list-style-type: none"> ▪ Especificar si es tipo célula de Hürthle (oncocítico) 	15-30%
Sospechoso de malignidad <ul style="list-style-type: none"> ▪ Sospechoso para carcinoma papilar ▪ Sospechoso para carcinoma medular ▪ Sospechoso para carcinoma metastásico ▪ Sospechoso para linfoma ▪ Otros 	60-75%
Maligno <ul style="list-style-type: none"> ▪ Carcinoma papilar de tiroides ▪ Carcinoma pobremente diferenciado ▪ Carcinoma medular de tiroides ▪ Carcinoma no diferenciado (anaplásico) ▪ Carcinoma de células escamosas ▪ Carcinoma con características mixtas (especificar) ▪ Carcinoma metastásico ▪ Linfoma No Hodgkin ▪ Otros 	97-99%

En promedio el 70% de los especímenes extraídos mediante ACAF son benignos, 5% son malignos, 10% sospechosos, y 15% insatisfactorios³⁰.

En el caso de los especímenes insatisfactorios (Bethesda I), se recomienda repetir el ACAF bajo guía ecográfica, lo que permite obtener un diagnóstico definitivo en el 50-80% de los casos³⁰.

1 Presencia de la mutación BRAFV600E en nódulos tiroideos, y su relación con el
4 diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

En el paciente que presente de forma persistente un resultado Bethesda I, se debe considerar la cirugía, puesto que se ha observado que el 10% de estos nódulos son malignos⁴⁶.

La Atipia de Significado Incierto – Bethesda III se deriva de la observación de una variedad de cambios benignos en las células foliculares, o de células malignas en una muestra que no es óptima, o que presentan cambios malignos muy sutiles⁴⁷. Tanto el término “Atipia de significado indeterminado” como el término “Lesión folicular de significado indeterminado” tienen la misma equivalencia, y cada laboratorio es libre de elegir uno de los dos para sus reportes⁴⁷.

La pertinencia en usar esta categoría radica en el elevado porcentaje de riesgo de malignidad, que se encuentra en un punto medio entre la categoría benigna (Bethesda II) y la categoría sospechosa de neoplasia folicular (Bethesda IV)⁴⁷. El eliminar esta categoría, y clasificar estos resultados dentro de una categoría de riesgo superior o inferior puede llevar a un aumento tanto de falsos positivos como de falsos negativos, y aumentaría la variabilidad inter e intraobservador⁴⁸.

Estos pacientes suelen ser observados, y se les realiza un nuevo ACAF en tiempo prudencial (conducta de bajo riesgo), o son llevados a cirugía según el riesgo que tengan de desarrollar cáncer (conducta de alto riesgo). Aunque ciertos factores de riesgo para malignidad (sexo masculino, nódulo mayor de 4 cm, edad avanzada) van a mejorar la precisión diagnóstica, se considera que en general los valores predictivos de los factores de riesgo son bajos⁵.

La tiroidectomía en manos expertas es un procedimiento seguro, pero las complicaciones de esta cirugía son significativas^{3,4}, como la lesión del nervio laríngeo recurrente, lesiones de la vena yugular interna (en los casos de vaciamiento ganglionar), la resección de las glándulas paratiroides junto con el tejido tiroideo, el sangrado postoperatorio, y el riesgo inherente de infección postquirúrgica.

2. Capítulo 2 – Carcinoma de Tiroides

2.1 Epidemiología

El carcinoma de tiroides es la patología maligna más frecuente del sistema endocrino, comprendiendo hasta el 90% de las neoplasias endocrinas⁴⁹. Su incidencia se ha reportado entre 9-12/100.000 individuos, y aumenta con la edad, pero alcanza una meseta a partir de los 50 años⁵⁰. El riesgo de desarrollar cáncer de tiroides es de 0.69% (1 en 146 individuos)⁴, siendo dos a tres veces más común en mujeres que en hombres. Se desconoce la causa por la cual la incidencia de esta enfermedad es mayor en mujeres, sin embargo, se considera que es mayor la incidencia de enfermedad tiroidea benigna en mujeres, por lo que la detección de cáncer es mayor en este grupo poblacional⁵¹. La tasa de mortalidad anual de esta enfermedad se encuentra en 0.4 – 2.8/100.000 en mujeres, y 0.2-1.2/100.000 en hombres.¹

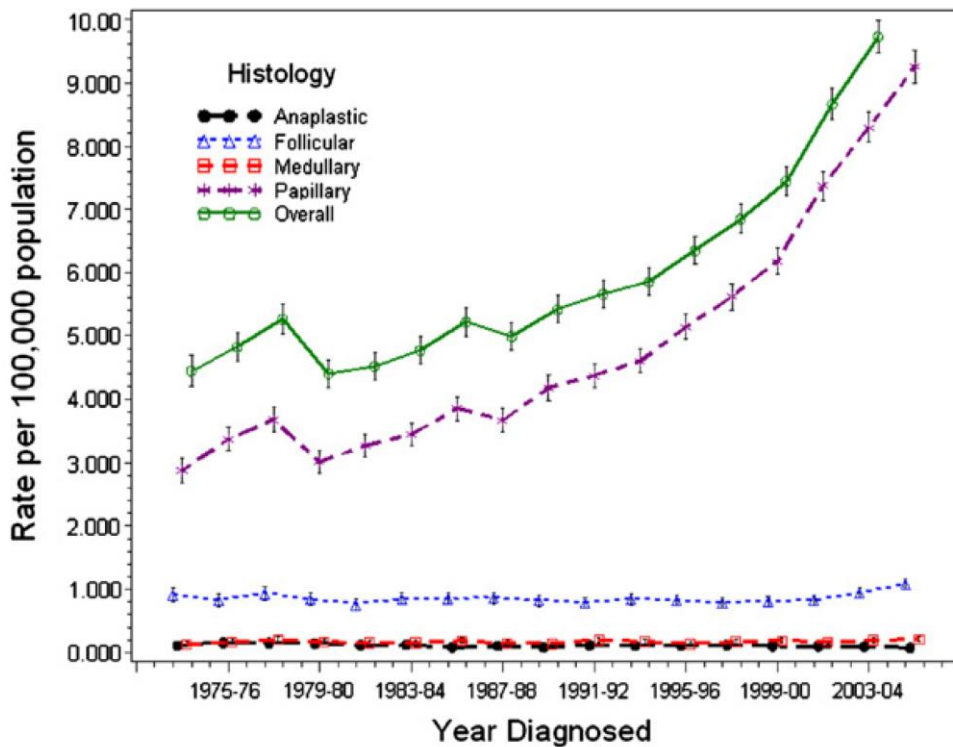
En Colombia, en un estudio realizado en la ciudad de Bucaramanga entre 1996 y 1999, Mantilla, Vesga e Insuasty informaron que el cáncer de tiroides se encontró entre las diez neoplasias más frecuentes con una frecuencia de 2,4% de todos los cánceres registrados en el Hospital Universitario Ramón González Valencia.⁵² Un estudio realizado por Pardo y colaboradores⁵³, en el que describe los casos nuevos reportados en el Instituto Nacional de Cancerología en el 2002, reportó 4990 nuevos casos de cáncer, de los cuales el 3.2% (159 casos) fueron diagnosticados como carcinoma de la glándula tiroides, ocupando el séptimo lugar entre las diez primeras causas de cáncer; 137 casos se presentaron en mujeres y 22 en hombres. Se encontró también que el 39.6% de los casos de carcinoma de tiroides presentaban metástasis a otros órganos.

Actualmente, y de acuerdo con la publicación del Instituto de Cancerología en Colombia⁵⁴, entre 2007 y 2011 el cáncer de tiroides se ubicó entre las primeras cinco causas de casos nuevos de cáncer en mujeres con una incidencia estimada anual ajustada por edad de 9,4 por 100.000 habitantes; en prevalencia estimada anual ocupó el tercer lugar en mujeres, después del cáncer de mama y cuello uterino, siendo de 1.985 casos en un año, 5.835 en tres años y 9.573 en cinco años por cada 100.000 habitantes. Sin embargo, la mortalidad es baja (0,7 por 100.000 habitantes, puesto 17 de 21 tipos de cáncer evaluados en este reporte en mujeres). En hombres, la incidencia es de 1,3 por 100.000 habitantes, la prevalencia es de 224 casos por 100.000 habitantes a un año, y la mortalidad es de 0,3 por 100.000 habitantes (la más baja respecto a otros tipos de cáncer).

La figura 2.1 muestra la tendencia de la incidencia anual de cáncer de tiroides en la población estadounidense¹⁹. En esta figura se evidencia un aumento progresivo de la incidencia de cáncer tiroideo en los últimos 20 años, en especial del carcinoma papilar. Según un análisis realizado por Castro y López⁵⁵ donde evalúan la mortalidad por carcinoma de tiroides en

Colombia entre los años 2006 y 2010, se muestra una tendencia a la estabilidad de la tasa de mortalidad respecto al quinquenio previo.

Figura 2.1. Incidencia del carcinoma de tiroides de 1975 a 2004 en población estadounidense¹⁹. Con autorización.



2.2 Presentación y factores de riesgo

Estos pacientes suelen ser diagnosticados en un examen de rutina, al ser evaluados por su médico, quien encuentra una masa dependiente de tiroides, o por el hallazgo de un incidentaloma, como se explicó previamente. Prácticamente, en todos los casos las pruebas de función tiroidea son normales⁴. Es raro encontrar pacientes con signos al examen físico como los mencionados en la tabla (factores de riesgo de malignidad), y el hallazgo de metástasis a distancia es exótico⁴⁹.

Al momento del diagnóstico, el tumor se encuentra localizado en la tiroides en el 59% de los casos, está diseminado a ganglios linfáticos en el 34%, y presenta diseminación a otros órganos en el 5%⁴.

Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de tiroides¹ son:

- La edad menor de 20 y mayor de 60 años. La aparición de cáncer de tiroides es rara en individuos menores de 16 años, y tienen un estadio más avanzado al momento del diagnóstico.
- Diferencias étnicas, siendo mayor la incidencia en países como Islandia, Filipinas, Japón e Israel.
- Exposición a radiación ionizante ya sea accidental, laboral o terapéutica, este último en el caso de los niños tratados por leucemia o linfoma. La edad y tiempo de exposición a esta radiación también son factores de riesgo a considerar.
- La deficiencia de ingesta de yodo se asocia con un aumento del riesgo de carcinoma folicular, mientras que en países donde la ingesta de yodo es suficiente, la incidencia de carcinoma papilar es mayor.
- Un índice de masa corporal en rango de obesidad brinda un riesgo 5 veces mayor en hombres y 2 veces en mujeres.
- Factores hormonales: La incidencia es mayor en mujeres que en hombres (2-4:1).
- La tiroiditis de Hashimoto o el bocio multinodular no se consideran lesiones premalignas^{1,56}.
- La TSH normal o elevada es un factor de riesgo independiente de malignidad²⁰. El hipertiroidismo es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades linfoproliferativas del tiroides.

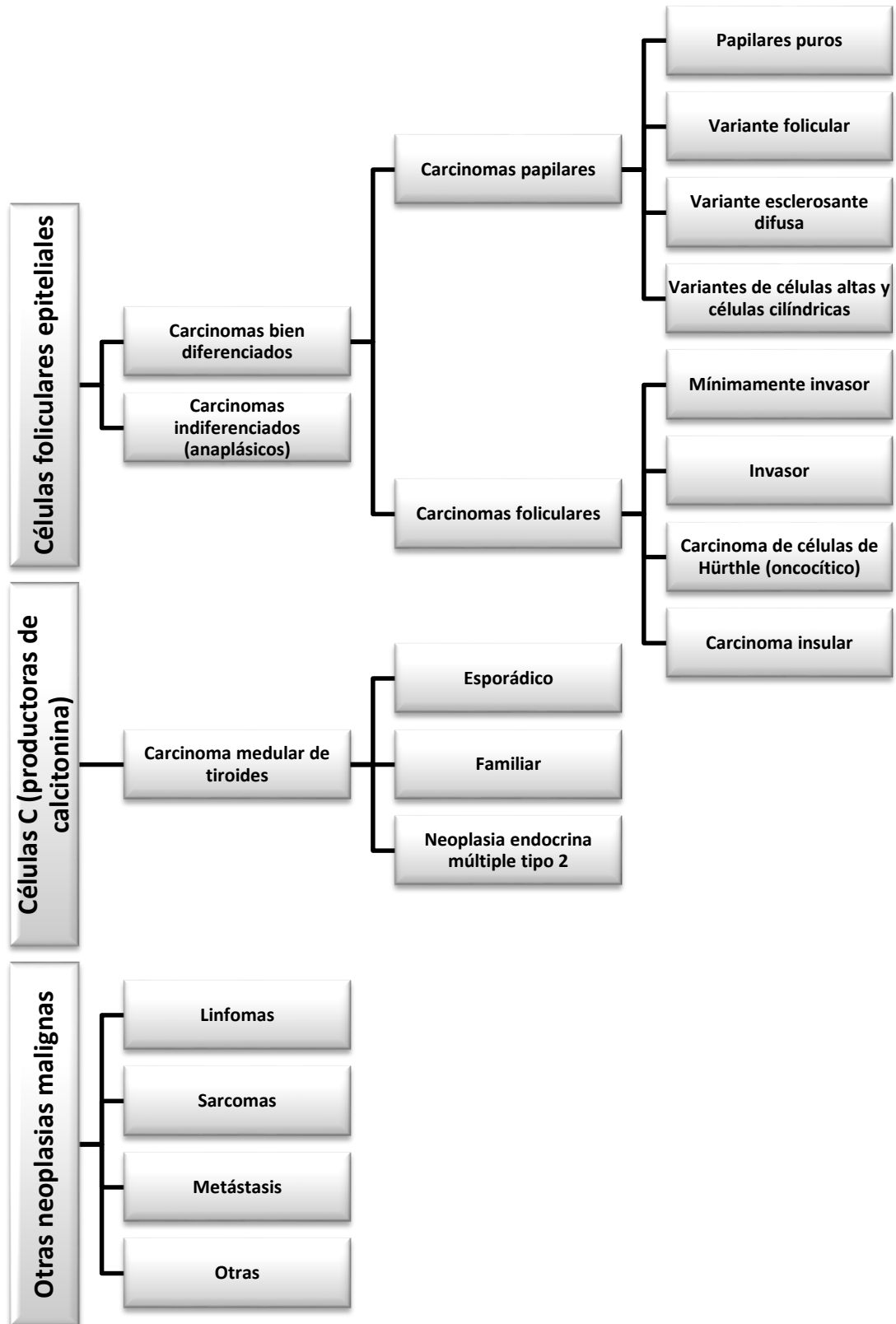
2.3 Clasificación de las neoplasias tiroideas

Las neoplasias del tiroides se clasifican en Benignas y Malignas, y a su vez, las neoplasias malignas se clasifican según su origen celular (células epiteliales foliculares, células C, otro origen). La **figura 2.2** muestra la clasificación de los tipos de carcinoma de tiroides.

Las neoplasias derivadas de células epiteliales foliculares se dividen en tumores bien diferenciados, y tumores anaplásicos. Dentro de los tumores bien diferenciados se encuentran el carcinoma papilar que comprende entre el 80 y 90% de todos los carcinomas de tiroides, el carcinoma folicular, que comprende aproximadamente el 10%, el carcinoma de células de Hürthle y el carcinoma pobremente diferenciado. Dado que estos cánceres tienen la capacidad de concentrar el yodo, se tratan con yodo radiactivo posterior a la cirugía⁵⁷.

Los tumores anaplásicos comprenden menos del 2% de la totalidad de los cánceres de tiroides, y son el tipo tumoral más agresivo, con una sobrevida media menor a seis meses. La mayoría de los pacientes se encuentra en estadios avanzados al momento del diagnóstico (diseminación regional o metástasis a nodos linfáticos), y en un 40% tienen metástasis a distancia⁵⁸. Pueden originarse de novo o a partir de un carcinoma previamente bien diferenciado⁵⁷.

Figura 2.2. Clasificación de las neoplasias tiroideas malignas.



El carcinoma medular se deriva de las células C, y son tumores neuroendocrinos que se presentan de forma esporádica o asociados a Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2A y 2B⁵⁷. Otros tipos de tumores que se presentan en la tiroides son los linfomas, los sarcomas y las metástasis de otros tipos de cáncer.

2.4 Carcinoma papilar de tiroides

El carcinoma papilar de tiroides se define como “un tumor epitelial maligno que muestra evidencias de diferenciación celular folicular, y se caracteriza por la formación de papilas y/o un grupo de cambios nucleares distintivos.”² Conforman más del 90% de todos los carcinomas diferenciados de tiroides⁵⁷, siendo la incidencia más elevada (95%) en Corea^{59,60}, donde se asocia a una ingesta alta en yodo como factor de riesgo principal. Más del 80% de los carcinomas papilares son detectados en estadios tempranos (estadio I-II⁶¹), y tienen muy buen pronóstico. La mortalidad de esta enfermedad es del 1%, y la gran mayoría son pacientes en estadio IV.

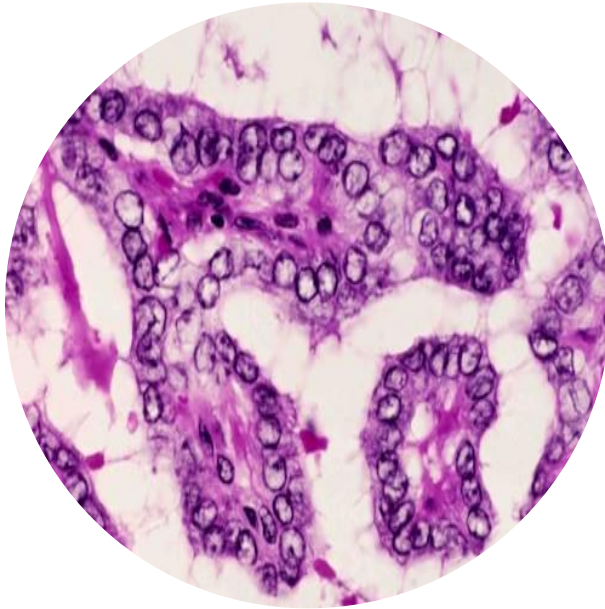
Histológicamente, pueden presentarse como lesiones únicas o múltiples, y las características típicas son la formación de papilas, la inclusión de cuerpos de Psammomma, y núcleos con cromatina dispersa, que se describen como “Ojos de Anita la huerfanita” (“*Little Orphan Annie*”), puesto que al microscopio parecen estar vacíos (figura 2.3). Dentro de este tipo de carcinoma existen las siguientes variantes principales^{49,62}:

- Variante clásica: Tiene papilas complejas con centros delgados, cubiertos por células cuboidales, y presentan cuerpos de Psammomma.
- Variante folicular: Son tumores que muestran los núcleos característicos, pero el resto de su arquitectura semeja el carcinoma folicular.
- Variante de células altas: Muestran células columnares con citoplasma eosinófilo intenso, son tumores grandes y presentan invasión vascular y extratiroidea. Suelen presentarse en pacientes de edad avanzada.

Otras variantes son la oncocítica, células claras, sólida, y cribiforme-morular.

En un estudio⁶³ llevado a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología en Colombia, se describió la distribución de las variantes histológicas del carcinoma papilar de tiroides en una muestra de 619 casos. Se encontró que la variante más frecuente es la combinada (dos o más variantes en el mismo caso, 50.9%), seguido de la variante folicular (23.4%) y la variante clásica (22.1%). Se encontró invasión capsular en el 78% de los casos, e invasión extratiroidea en el 61.8% de los casos.

Figura 2.3. Izquierda. Aspecto histológico del carcinoma papilar de tiroides. Derecha. Imagen de “Little Orphan Annie”



<http://www.pathologystudent.com/?p=204>.

http://www.bookpalace.com/acatalog/Home_Little_Orphan_Annie_1936.html.

2.5 Marcadores moleculares

Teniendo en cuenta que una citología indeterminada conlleva un riesgo de malignidad tan alto como 15%, se requiere otro tipo de ayuda diagnóstica para optimizar el tratamiento de estos pacientes, y evitar procedimientos y riesgos innecesarios. De ahí que los esfuerzos en investigación se han enfocado en el uso de marcadores tumorales como complemento al ACAF, para afinar el diagnóstico de carcinoma de tiroides, y brindar al paciente un tratamiento con el menor riesgo, la menor tasa de morbilidad, y un bajo riesgo de recurrencia de enfermedad. Entre ellos se encuentran los marcadores inmunohistoquímicos y los marcadores genéticos. En el momento, el uso de estos marcadores tienen un grado de recomendación C en las guías de la ATA⁵.

2.5.1 Inmunohistoquímica en cáncer de tiroides

- HBME-1

Este anticuerpo monoclonal tiene una gran afinidad por el tejido tiroideo maligno de origen epitelial folicular, especialmente carcinoma papilar, comparado con tejido benigno. Su aplicación como único test tiene una especificidad muy variable, por lo que se investiga su uso en combinación con otros marcadores.

- Citoqueratina 19

Es un marcador sensible mas no específico de carcinoma papilar, puesto que se expresa en tejido normal alrededor de lesiones tumorales y en tiroiditis linfocítica crónica. Su sensibilidad es alta en carcinoma papilar variante clásica⁴⁹.

- Galectina 3

Es una proteína de la familia de las lectinas, y se ha atribuido que es necesaria para mantener el fenotipo maligno en carcinoma papilar de tiroides⁶⁴. Se expresa en células epiteliales e inflamatorias, de tal forma que en algunos casos se expresa en tiroiditis y bocio multinodular, lo que limita su uso en cáncer. Su uso en muestras de ACAF tiene sensibilidad alrededor de 75% y especificidad de 83%.

La combinación de dos de estos marcadores en el diagnóstico de cáncer tiroideo en muestras de ACAF ha mostrado sensibilidades entre 83% y 100%, y especificidades entre 91% y 100%, pero su uso aún se encuentra en investigación⁶⁴.

2.5.2 Marcadores genéticos en cáncer de tiroides

Entre las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo de cáncer tiroideo se encuentran mutaciones en genes supresores tumorales (*p53*, *APC*, *p16*), genes que codifican receptores tirosina Kinasa (*RET/PTC*, *TRK*, *MET*, *c-MYC*), proteínas nucleares (*PAX8/PPARG1*), y proteínas de señalización (*BRAF*, *RAS*).²¹

La tabla muestra la prevalencia de las alteraciones genéticas en diversos tipos tumorales tiroideos. Las mutaciones en los genes *BRAF*, *RAS* y el rearrreglo *RET/PTC* son mutuamente excluyentes, dado que, como todas las mutaciones pertenecen a una misma vía de señalización, una única alteración oncogénica es suficiente para inducir transformación y tumorigénesis en las células tiroideas.^{65,66}

Tabla 2.1. Prevalencia de las principales alteraciones genéticas en carcinoma diferenciado y anaplásico de tiroides.¹ Con autorización.

Genes	Carcinoma papilar	Carcinoma folicular	Carcinoma anaplásico
<i>BRAF</i>	45%	Raro	20%
<i>RAS</i>	10%-20%	40%-50%	50%-60%
<i>NTRK1</i>	<5%	-	-
<i>PIK3/AKT y PTEN</i>	-	7%	15%
<i>TP53</i>	Raro	Raro	60-80%
<i>CTNNB1</i>	Raro	Raro	66%
<i>RET/PTC</i>	25-30%	-	-
<i>PAX8/PPARG</i>	-	35%	-

- RET

El protooncogén *RET* (OMIM #164761) codifica para un receptor transmembrana con actividad tirosina Kinasa, y está implicado en la regulación del crecimiento, diferenciación, supervivencia y migración de las células que se originan de la cresta neural⁶⁷. En los rearrreglos de *RET*, la porción del gen que codifica para el dominio tirosina Kinasa se fusiona con otros genes no relacionados, provocando una activación de la vía MAP Kinasa⁶⁶.

De los 11 tipos de rearrreglos en *RET*, los más frecuentemente encontrados en carcinoma de tiroides son *RET/PTC1* (60-70%), que se forma por la fusión con el gen *CCDC6* [inv10 (q11.2q21)]; y *RET/PTC3* (20-30%) formado por la fusión con el gen *NCOA4*^{66,68} por una inversión paracéntrica dentro de 10q11.2. Estos rearrreglos provocan que *RET* se encuentre bajo el control transcripcional del gen con el que se ha fusionado, y se exprese en las células foliculares tiroideas donde normalmente no se expresa.⁶⁹

Las mutaciones en *RET* se encuentran en el carcinoma papilar de tiroides esporádico y posterior a radiación. También se encuentran en carcinoma medular (en el 98% de los casos familiares y 30 a 50% de los casos esporádicos), y en la Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2A y 2B⁷⁰. En estos casos, a diferencia de los carcinomas papilares, se produce por mutaciones missense con ganancia de función del gen *RET*⁶⁹.

- Rearreglo *PAX8/PPARG*

El oncogén *PAX8/PPARG* resulta de la translocación t(2;3)(q13;p25), lo que produce una fusión entre *PAX8*, que es un factor de transcripción esencial en la diferenciación tiroidea, y *PPARG*, el receptor gamma activado proliferado del peroxisoma, que es un miembro de la familia de receptores esteroideos/tiroideos nucleares⁶⁹. Se encuentra en el 36% de los carcinomas foliculares, 11% de los adenomas foliculares, y el 13% de los carcinomas papilares variante folicular, pero no se encuentra en los carcinomas anaplásicos.⁶⁹ El modo de acción carcinógeno de este rearrreglo es un efecto inhibidor dominante negativo sobre *PPARG*, que se cree tiene funciones de gen supresor tumoral.

- RAS

Las mutaciones en cualquiera de los tres genes *RAS* (*K RAS*, *N RAS*, *H RAS*) (OMIM #109800) se observan con más frecuencia en los adenomas foliculares y en los carcinomas foliculares. Es raro encontrarlos en los carcinomas papilares, con una frecuencia entre el 10% y el 20%.⁷¹ Se ha encontrado también una frecuencia de hasta el 50% en los tumores anaplásicos.⁷² Estos genes codifican proteínas G que se encuentran en la superficie interna de la membrana y transmiten señales mediante las vías MAPK y PI3K. Las mutaciones en *RAS* son de tipo puntual en su mayoría, y se encuentran especialmente en los codones 12, 13 y 61¹, causando una activación constitutiva mejorando ya sea su afinidad para ligar GTP (Codones 12 y 13), o disminuyendo su actividad GTPasa intrínseca (Codón 61).⁶⁹

- NTRK1

El gen *NTKR1* se localiza en el locus 1q22, y codifica para el receptor del Factor de Crecimiento Nervioso (NFG), una tirosina kinasa, regulando el desarrollo y la maduración del sistema nervioso central y periférico⁶⁹. Los rearrreglos cromosómicos son la causa de su activación¹, produciendo una expresión ectópica y una activación constitutiva de la proteína NTRK1. Los mecanismos por el cual la mutación en *NTKR1* se asocia a carcinoma papilar no son claros.

Las mutaciones más frecuentemente encontradas en el carcinoma papilar de tiroides se producen a nivel del protooncogén *BRAF*, que se tratará posteriormente, y es el tema central de este proyecto.

2.5.3 Otros marcadores

Los microRNA (miRNA) y su expresión se han estudiado en carcinoma papilar de tiroides, encontrándose que miR-221, miR-222 y miR-146b, entre otros, se expresan al alta en este tipo de cáncer, y se correlacionan con el estado mutacional del carcinoma papilar⁶⁸.

Se ha atribuido el polimorfismo rs2910464G>C en el miR-146a-3p a un alto riesgo de desarrollo de carcinoma papilar familiar en pacientes caucásicos siendo protector el polimorfismo C>C, si bien otros estudios son controversiales⁷³.

En estudios de expresión de miRNA en muestras de ACAF se han encontrado valores de exactitud entre 37% y 90%, con sensibilidad entre 79% y 100% y especificidad entre 20% y 95%^{73,74}. Se considera que se requieren más estudios para determinar su utilidad.

Se ha empleado además la tecnología Next Generation Sequencing mediante una plataforma (ThyroSeq) que permite detectar una serie de 12 genes con 284 puntos hotspot, que incluyen *BRAF*, *RAS* y los rearrreglos *RET/PTC* y *PAX8/PPARG*, además de otros genes asociados a carcinoma papilar de tiroides pero de menor frecuencia. Su uso aún se encuentra en investigación⁷⁵

24 Presencia de la mutación BRAFV600E en nódulos tiroideos, y su relación con el diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

3. Capítulo 3 – El Gen *BRAF* y su aplicación en Carcinoma Papilar de Tiroides

3.1 Vía MAP Kinasa⁷⁶

La vía de transducción de señales dependiente de la proteína kinasa de activación por mitógeno, o MAPK (*Mitogen activation protein kinase*) es una cascada activada mediante RAS conservada en los organismos eucariotas desde las levaduras hasta los vertebrados (la vía RAF/MEK/ERK ha sido documentada únicamente en *Metazoa*⁷⁷), que regula el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, en respuesta a factores de crecimiento, citocinas y diversas hormonas^{78,79}. El efecto múltiple de esta vía se ha atribuido tanto a la duración como a la intensidad de su activación, además de su interacción con otras vías de señalización intracelular que funcionan paralelamente.⁷⁷

La vía MAPK puede ser activada por citocinas y factores de crecimiento⁸⁰, mediante su acción sobre receptores de membrana, de tipo tirosina kinasa. Este tipo de receptores tiene tres regiones en su estructura: un dominio extracelular de unión con el ligando, un dominio transmembrana, y un dominio intracelular que posee la actividad tirosina kinasa⁸⁰. En la gran mayoría de receptores tirosina kinasa, la unión del ligando provoca que las cadenas del receptor se dimericen, lo que hace que los dominios kinasa de ambas cadenas se aproximen y se activen mediante una fosforilación cruzada sobre múltiples tirosinas (transautofosforilación).⁶⁰

Después de la activación de un receptor tirosina kinasa, se forma un complejo entre el receptor activado, la proteína GRB2 y la proteína SOS (*Son of sevenless*) a nivel de la cara citosólica de la membrana plasmática. La formación de este complejo depende de la habilidad de GRB2 de ligarse simultáneamente tanto al receptor tirosina kinasa como a SOS.

Un dominio SH2 en la proteína GRB2 se liga a un residuo de fosfotirosina específico en el receptor activado. GRB2 tiene también dos dominios SH3, que se ligan a secuencias ricas en prolina de la proteína SOS activada. La activación del receptor y la formación del complejo proteico hacen que SOS se relocalice del citosol a la membrana plasmática, donde se encuentra cerca al sustrato, en este caso, RAS-GDP. La unión de SOS a RAS-GDP provoca un cambio

conformacional en este último, lo que abre el bolsillo que contiene a GDP, que se difunde. Como la concentración de GTP en el citosol es diez veces mayor a la concentración de GDP, GTP se acopla de forma espontánea a RAS y lo activa. RAS activado mediante GTP se liga al dominio regulatorio N-terminal de RAF (MAPKKK, MAP3K), y la activa. La hidrólisis de RAS-GTP a RAS-GDP libera a RAF activado, y éste fosforila a MEK (MAPKK, MAP2K), activándolo. Tanto RAF como MEK tienen localización citoplasmática. MEK activado fosforila y activa a ERK (MAP kinasa, MAPK).⁷⁶

El sitio catalítico en la MAP kinasa inactiva está bloqueado por una secuencia de aminoácidos llamada el “labio de activación”. En el momento en que MEK se liga a MAPK, se produce una desestabilización de esta estructura, exponiendo un residuo de tirosina en la posición 185, y MEK la fosforila. Posteriormente, MEK fosforila el residuo de treonina en la posición 183. La fosforilación de estos residuos provoca un cambio conformacional de MAPK a nivel del labio de activación, que permite el ligamiento de ATP a su sitio catalítico. La fosforilación de estos residuos también produce la dimerización de MAPK, y de esta forma, puede trasladarse al núcleo. La forma monomérica de MAPK no puede hacerlo.⁷⁶ En el núcleo, MAPK activa la transcripción de *genes de respuesta inmediata* (por ejemplo, *c-Fos*), que a su vez codifican otras proteínas reguladoras de genes, y de esta forma, regulan la actividad de muchos factores de transcripción.

La vía MAPK puede activarse en respuesta a diferentes estímulos, y cada estímulo activa una vía MAPK determinada en la célula. Un mecanismo por el cual se evita que estas vías se activen de forma cruzada entre sí es el acople de cada uno de los intermediarios (MAP3K, MAP2K, MAPK) a la proteína de “andamio” (*scaffold*) KSR1, la cual es un homólogo de RAF que carece de actividad kinasa.⁷⁸ Esta proteína es necesaria para la activación de la vía MAP Kinasa, de esta forma, se asegura la especificidad espaciotemporal de la respuesta⁸¹.

La actividad de la vía MAP-MEK-ERK está limitada por mecanismos de retroalimentación negativa⁸². Uno de ellos es la fosforilación de todos los componentes de la vía mediado por ERK o sus sustratos. Otro mecanismo es la activación por parte de ERK de genes que inhiben la vía MAPK.

3.2 BRAF

El protooncogén *BRAF* (nombre oficial: Homólogo B1 del oncogén del sarcoma murino viral V-RAF), se localiza en el locus 7q24, tiene una extensión de 190.753 bp (pares de bases), 18 exones, un transcripto de mRNA de 2949 pares de bases, y se ha encontrado un pseudogen localizado en Xq13.3. Codifica para la proteína B RAF, que es una kinasa de serina/treonina, perteneciente a la familia de las RAF kinasas, y se expresa en todos los tipos celulares⁸³. La proteína BRAF es la isoforma más frecuentemente encontrada en las células foliculares tiroideas.⁸⁴ Entre las tres proteínas de esta familia (ARAF, BRAF, CRAF), BRAF es la que activa con mayor potencia la vía de señalización de la MAPK⁶⁹.

BRAF es una proteína de 766 aminoácidos, con un peso molecular de 84.437 kDa, y comparte tres regiones conservadas (CR) con las demás RAF kinasas. CR1 está compuesto de un dominio

ligado a RAS, y un dominio rico en cisteína, que puede ligar dos iones de zinc. Tiene interacción con RAS y con los fosfolípidos de membrana. CR2 es un dominio rico en serina/treonina y contiene un sitio que cuando es fosforilado, puede ligarse a una proteína reguladora 14-3-3, cuya función es inhibitoria de la actividad de RAF. CR3 es el dominio proteína kinasa, y se localiza cerca a la terminación C.⁸⁵ Es también el sitio de unión de ATP, y contiene múltiples sitios de fosforilación, siendo los más importantes T598 y S601, los cuales al ser fosforilados al mismo tiempo, activan la proteína dentro de la cascada de activación de la MAPK.⁸⁶

La activación de B RAF dentro de la vía MAPK comprende los siguientes eventos⁸⁷:

Reclutamiento en la membrana plasmática mediado por su interacción con RAS.

Dimerización de las proteínas RAF.

Fosforilación y desfosforilación de diferentes dominios.

Disociación de la proteína inhibidora RAF kinasa (RKIP)

Asociación con complejos proteicos *scaffold* (KSR, kinasa supresora de RAS).

En una célula en reposo, B RAF se encuentra en el citosol en una conformación en la cual el dominio regulatorio N-terminal está ligado al dominio kinasa C terminal, inhibiendo su actividad⁸². La conformación inactiva es estabilizada mediante un dímero de la proteína 14-3-3. Cada dímero se liga a un residuo de serina de RAF, uno a la serina 365 en la región CR2, y otro a la serina 729 cerca al extremo C-terminal⁸⁵. La activación de RAF implica la intervención de la proteína PP2A, que media la desfosforilación del residuo S365 de BRAF, de tal forma que KSR1 es trasladada de la superficie de la membrana al interior de la célula y funcione como andamio de BRAF, a su vez que la proteína 14-3-3 es desplazada de su sitio para iniciar la activación de BRAF⁸¹. En el momento en que RAS-GTP se liga al extremo N-terminal de RAF, rompe la inhibición sobre la actividad kinasa de RAF (la interacción entre el dominio N terminal y C terminal), y provoca un cambio conformacional en RAF que deshace la interacción con la proteína 14-3-3. Las RAF kinasas forman homodímeros o heterodímeros entre sí, y la dimerización de RAF es necesaria para la expresión de su actividad kinasa.

Dentro del proceso de activación, la fosforilación de la treonina 599 y la serina 602, paso esencial en la activación de B RAF. Mientras que A RAF y C RAF requieren fosforilaciones adicionales en la región N-terminal, esta región en B RAF contiene aspartato en las posiciones 448 y 449, que aportan carga negativa. La serina en la posición 446 se encuentra fosforilada de forma constitutiva, lo que hace que B RAF no requiera modificaciones adicionales durante el proceso de activación^{78,85}, y hacen que B RAF sea más activa que las otras dos proteínas RAF.⁸⁸

3.3 *BRAF*^{V600E} y otras mutaciones

La signatura principal de la señalización celular en el carcinoma papilar de tiroides es la activación de la vía MAP Kinasa, pero el grado de activación varía dentro de los diferentes

tipos histológicos⁸⁹. De los componentes de la vía MAPK, el gen BRAF y la mutación V600E, en la cual se produce una transversión de Timina a Adenina en la posición 1799 del exón 15 (c.1799T>A; Rs113488022), lo que provoca una sustitución de Valina a Glutamato en la posición 600, es la más frecuente de las mutaciones de *BRAF* en general(80%) y es la que más frecuentemente se encuentra en el carcinoma papilar de tiroides (40%)^{65,68,69,72,83,90-92}.

La mutación *BRAF*^{V600E} se encuentra usualmente en el 40% a 60% de los carcinomas papilares clásicos y en el 80% de la variante de células altas, mientras que es raro en la variante folicular (menos del 10%). También puede encontrarse en el 20% a 30% de los carcinomas anaplásicos y en el 10% a 15% de los carcinomas pobremente diferenciados, especialmente en los que presentan focos de carcinoma papilar bien diferenciado.⁶⁸

Se han descrito más de 100 mutaciones distintas en *BRAF*, de las cuales más del 80% se encuentran en melanomas, 5-15% en tumores tiroideos, 1-3% en cáncer pulmonar, y 5% en cáncer colorrectal.⁹³ En el cáncer tiroideo, las mutaciones de este gen son prácticamente exclusivas de la posición 1799, en el exón 15, que es un sitio *Hotspot*. Es una mutación de tipo somático en los carcinomas tiroideos de tipo esporádico, y no se ha encontrado este tipo de mutación en línea germinal, según reporta Xing⁶⁵ en un estudio realizado en una serie de carcinomas papilares de tipo familiar.

Se han descrito varias mutaciones raras de *BRAF* en los carcinomas papilares de tiroides¹. Una de ellas es la mutación puntual K601E, en la que se produce una sustitución de lisina por glutamato. Se presenta en el 9% de la variante folicular de los carcinomas papilares de tiroides⁹⁴. La segunda es el rearrreglo *AKAP9-BRAF*, que está asociado a exposición a radiación. En este rearrreglo se produce una inversión paracéntrica de 7q, lo que lleva a la fusión de la región N-terminal de *AKAP9* con el dominio kinasa de *BRAF*, lo que lleva a la expresión del dominio kinasa activado de *BRAF*.⁹⁵

Trovisco y colaboradores⁹⁴ reportaron un caso de carcinoma papilar de tiroides variante sólida, con una delección de una tripleta de nucleótidos que abarca las posiciones 1799 a 1801, originando la conversión del codón 600 (GTG) y el codón 601 (AAA) en un único codón (GAA), lo que conlleva a la introducción de un glutamato en el segmento de activación de BRAF. Los autores sugieren que esta mutación pueda tener un potencial tumorigénico mucho menor que las mutaciones V600E ó K601E.

3.4 Mecanismos patogénicos de la mutación BRAFV600E

3.4.1 Estructura molecular

La estructura cristalina de BRAF muestra un P loop (*phosphate binding loop*) rico en glicina, que coordina las fracciones adenosina y fosfato del ATP, y un motivo DFG, que forma enlaces hidrofóbicos con el P loop. En el estudio de Wan y colaboradores⁷⁸, se demostró que el

mecanismo por el cual esta mutación tiene potencial oncogénico, se atribuye a que la incorporación del glutamato dentro del segmento de activación de BRAF, puede imitar la fosforilación activadora del residuo de tirosina en la posición 598, o del residuo de serina en la posición 601⁹⁴, produciendo así una activación constitutiva de la proteína. Al reemplazarse la Valina, que es un aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica de tamaño mediano, por el glutamato, que es un residuo de gran tamaño y con carga negativa, va a desestabilizar las interacciones que mantienen al motivo DFG en una conformación inactiva, y le da la vuelta al segmento activador colocándolo en su conformación activa. Es probable que sea la mutación más frecuente debido a que sólo requiere una sustitución de una única base, e incluso se propone que sustituciones como V600K, V600D o V600R puedan tener similar mecanismo de activación constitutiva de BRAF. BRAFV600E además no requiere dimerización para su activación, y por tanto, es insensible a la retroalimentación negativa mediada por ERK⁸².

3.4.2 Vías de señalización y Hormona tiroidea

Se ha evaluado la función de la vía de señalización TSH/GNAS/cAMP/PKA en el desarrollo de PTC. Los ratones BRAFV600E mutantes que son *knockout* para el receptor de TSH desarrollan carcinomas papilares de menor tamaño, sin las características del tipo tumoral de células altas, y menos invasivos que aquellos con el receptor de TSH *wild type*⁹⁶. La expresión reducida de THRB (Receptor de Hormona Tiroidea Beta) es una característica propia de los PTC. Un estudio⁹⁷ mostró que no hay diferencias significativas de la expresión de THRB en tumores portadores de BRAFV600E y no portadores.

Se ha investigado la función del cobre en la vía de señalización MAPK, y se ha encontrado que el cobre mejora la fosforilación de ERK1/2 mediada por MEK1 a través de la interacción Cu-MEK1, que la expresión reducida de *Ctr1* en *Drosophila* suprime el fenotipo MAPK y la señalización en células de mamífero, y que la quelación del cobre disminuye la actividad kinasa de MEK1/2⁹⁸. Dado que la tumorigénesis de BRAFV600E depende de la actividad kinasa de MEK1 y 2, se ha demostrado que al disminuir el flujo, la biodisponibilidad y el ligamiento del cobre a MEK1, se disminuye la actividad kinasa de MEK1(2), y la tumorigénesis inducida por BRAFV600E⁹⁹. Se ha planteado además el uso de quelantes de cobre para el tratamiento de tumores posiblemente en combinación con inhibidores de la vía MAPK, no sólo en cánceres positivos para mutaciones BRAF, sino también en cánceres que desarrollen resistencia a inhibidores BRAFV600E y potencialmente a inhibidores MEK1/2.

3.4.3 Modelo murino

Los diversos modelos murinos empleados para evaluar la activación de la vía MAPK mediante BRAFV600E han mostrado resultados consistentes. En el estudio de Knauf et al¹⁰⁰ se crearon 2 líneas de ratones transgénicos en los que la expresión de BRAFV600E estaba ligada al gen promotor de la tiroglobulina (Tg), lo que permite una expresión limitada a la tiroides. Estos ratones presentaron glándulas de mayor tamaño que los ratones *wild type*, desarrollaron tumores tipo carcinoma papilar multifocales, con características similares a los carcinomas papilares humanos. Se encontró también que estos ratones son hipotiroideos, y presentan

disminución de la expresión de Tg, NIS (Cotransportador de sodio y yodo, *Sodium-iodide symporter*), y TPO (peroxidasa tiroidea, *Thyroid Peroxidase*), que son marcadores de diferenciación celular del tirocito.

En el estudio llevado a cabo por Franco y colaboradores⁹⁶, se demostró que la expresión endógena de *BRAF^{V600E}* en células tiroideas es suficiente para inducir carcinoma papilar, y consideran esta mutación como un evento iniciador del desarrollo de carcinoma papilar de tiroides. Postulan una posible participación de la TSH en la oncogénesis del carcinoma papilar de tiroides, proponiendo que la actividad de la vía de señalización de TSH podría predisponer a las células tiroideas a la transformación inducida por *BRAF^{V600E}*. En este modelo se usaron ratones transgénicos con BRAFV600E activable mediante Cre-TPO, y al igual que el modelo de Knauf, estos ratones tenían expresión reducida de Tg, NIS y TPO; y también desarrollaron carcinomas papilares a partir de la semana 5.

Sin embargo, los problemas específicos de estos modelos murinos son:

- BRAFV600E se expresa en todas las células tiroideas desde el período fetal, lo que representa un modelo de cáncer familiar y no somático.
- El promotor de Tg está regulado por los niveles de TSH, y por tanto, los niveles elevados de TSH promueven la expresión patológica de BRAFV600E¹⁰¹.

Shimamura et al¹⁰² desarrollaron un modelo murino que permite la expresión condicional mediada por Cre de BRAFV600E en células tiroideas. Estos ratones desarrollaron focos hiperplásicos de células epiteliales, y a las 52 semanas, lesiones similares a PTC con invasión ocasional a músculo, sin embargo, no se demostró una transformación completa tumoral. Esto sugiere que la expresión posnatal de BRAFV600E es suficiente para producir cáncer a nivel monocelular, pero que puede no ser suficiente para el desarrollo de un fenotipo tumoral completo, sin que esto signifique que BRAFV600E sea la mutación iniciadora. Es posible que se requieran mecanismos adicionales genéticos o epigenéticos para la expresión completa de un fenotipo tumoral.

3.4.4 Características histológicas

La mutación BRAFV600E se asocia mayormente con las variantes clásica y de células altas del carcinoma papilar¹⁰³. Dentro de las características histológicas del carcinoma papilar BRAFV600E positivo se encuentran mayor grado de inflamación crónica (infiltración linfocítica), tienen características nucleares bien definidas del carcinoma papilar, pero los cuerpos de psammomma son menos frecuentes comparado con los tumores papilares con mutación en RET¹⁰³.

Los tumores tiroideos tienen en general una expresión baja de Ki-67 respecto a otros tumores (mama, pulmón). Los cánceres BRAFV600E positivos en tiroides muestran una expresión baja de Ki-67, pero significativamente mayor que los tumores sin mutación¹⁰⁴

3.5 BRAFV600E como factor pronóstico en carcinoma papilar de tiroides

La mutación *BRAF^{V600E}* se asocia con factores de mayor agresividad tumoral en el carcinoma papilar de tiroides, como mayor extensión extratiroidea, estadios más avanzados al momento del diagnóstico, mayor grado de metástasis a nódulos linfáticos¹⁰⁵ o a otros órganos, y menor captación de yodo radiactivo durante el tratamiento. Por ello, se propone su uso como marcador pronóstico en estos tumores.⁶⁸ Esta mutación es rara en carcinomas tiroideos en niños, y en pacientes expuestos a la radiación de Chernobyl, y se asocia con una edad avanzada al momento de la presentación de la enfermedad.⁹⁵

En un estudio realizado por Liu y colaboradores¹⁰⁶, se demostró que la mutación BRAFV600E no solo es un iniciador del carcinoma papilar de tiroides, sino que está implicado en el mantenimiento del fenotipo proliferante, el estado transformado, y la progresión del carcinoma papilar de tiroides. También se ha visto que la mutación BRAFV600E induce senescencia en tirocitos, pero que la señalización mediante TSH/TSHR hace que la célula evite el paso a senescencia y entre en etapa de potencial malignización¹⁰⁷.

Xing y colaboradores¹⁰⁸ llevaron a cabo un estudio retrospectivo donde evaluaron el estado de la mutación *BRAF^{V600E}* en una muestra de pacientes llevados a tiroidectomía total, e hicieron la correlación con la lectura de citología, la lectura de patología, y factores clínicos y paraclínicos asociados a riesgo de recurrencia. En este estudio, demostraron la asociación independiente entre la mutación *BRAF^{V600E}* con la recurrencia de carcinoma papilar de tiroides, inclusive en pacientes que se encontraron en estadios iniciales. También demostraron que la mutación *BRAF^{V600E}* se asocia de forma independiente con la agresividad del tumor en los casos de recurrencia. Otro estudio⁹⁵ muestra que se encuentra un mayor número de mutaciones *BRAF^{V600E}* en las metástasis de carcinoma papilar, que en las lesiones primarias, lo que sugiere que la metástasis a nodos linfáticos puede ser promovida, o inclusive, requiere que se adquiera la mutación *BRAF^{V600E}*.

El comportamiento agresivo de los tumores que portan la mutación *BRAF^{V600E}* puede ser causado por la tendencia de estos tumores a perder su diferenciación.^{68,71} Esta pérdida de diferenciación se asocia con la disminución de la expresión de genes específicos del carcinoma papilar de tiroides tales como *NIS*, *TPO*, *Pendrina* y *Tg*^{79, 96}.

También se cree que la mutación V600E explica las alteraciones en la función del cotransportador sodio/yodo (NIS), y en otras vías moleculares implicadas en el metabolismo del yodo en la célula folicular, lo que se asocia con la baja captación de yodo en tumores tiroideos, que predispone a una falla en el tratamiento con yodo radiactivo.^{1,68,109,110} Se ha demostrado que los tumores tiroideos portadores de BRAFV600E presentan una inmunorreactividad mucho menor a NIS respecto a los tumores wild type. En línea celular murina con expresión condicional de BRAFV600E se demostró también la disminución de mRNA de NIS¹¹¹. En un estudio posterior de los mismos autores¹⁰⁹, postulan que un mecanismo que causa esta alteración, es la secreción de TGF- β inducida por *BRAF^{V600E}*, lo que lleva a una represión de la expresión de NIS, independiente de la vía MAPK; si bien se requiere estudios adicionales para esclarecer el mecanismo preciso. Aunado a lo anterior, se ha visto que los tumores portadores de BRAFV600E no captan yodo radiactivo (el cual es uno de los tratamientos post tiroidectomía)¹¹².

BRAF^{V600E} se asocia con una sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), lo que a la vez se asocia con mayor invasividad y estadios avanzados de la enfermedad. Se ha observado también que estos tumores tienen una gran vascularización, y tienden a expresar niveles elevados de mRNA y proteína VEGF.¹¹³

En el estudio de Hu y colaboradores¹¹⁴, los autores observaron una relación fuerte entre la mutación *BRAF^{V600E}* con la metilación aberrante de 4 genes supresores tumorales: *TIMP3*, *SLC5A8*, *DAPK*, y *RARB2*; la metilación anormal de estos genes se relaciona con subtipos de carcinoma papilar más agresivos. Es probable que el silenciamiento epigenético de estos genes sea un mecanismo mediante el cual la mutación *BRAF^{V600E}* promueva la progresión del cáncer.¹¹³

3.6 Microcarcinomas

De acuerdo con la OMS, el microcarcinoma papilar tiroideo se define como un carcinoma papilar de tiroides de 1 cm o menos de diámetro.² La prevalencia de este tipo de cáncer en el grupo de carcinomas papilares oscila entre 5.4% y 7.7%³⁰. En este tipo de tumores es posible que se produzca una mutación *BRAF^{V600E}* tempranamente, o inclusive, que sea esta mutación la que inicie los eventos tumorigénicos que resultan en carcinoma papilar. Estas afirmaciones están basadas en estudios en ratones portadores de la mutación *BRAF^{V600E}*, que desarrollan lesiones tumorales tiroideas con un patrón papilar.⁹⁵

Con respecto al comportamiento de la mutación *BRAF^{V600E}* en los microcarcinomas, en un estudio¹¹⁵ se hizo un análisis retrospectivo de muestras de carcinomas papilares menores a 20 mm, en el cual se pretendió demostrar si la mutación *BRAF^{V600E}* confería un comportamiento biológico más agresivo a este tipo de tumores. Los investigadores encontraron que la mutación *BRAF^{V600E}* era más común en carcinomas papilares con invasión a la cápsula tiroidea que los tumores que no invadieron la cápsula. El análisis univariado y multivariado realizado en este estudio demostró también que la mutación *BRAF^{V600E}* tiene una fuerte asociación con las variantes de carcinoma papilar (clásica y de células altas), tamaño tumoral (mayor a 11mm), multifocalidad, ausencia de cápsula tumoral, extensión extratiroidea, metástasis a nodos linfáticos y estadios más avanzados. Otro estudio¹¹⁶ demostró que el 75% de los pacientes con microcarcinomas que presentaban extensión extratiroidea portan la mutación BRAFV600E, y el 66% tenían metástasis a ganglios linfáticos. En estos ganglios también se encontró la mutación. Esto indica el comportamiento agresivo de los microcarcinomas con mutación BRAFV600E.

3.7 Diagnóstico del carcinoma de tiroides mediante la detección de la mutación *BRAF^{V600E}*

La detección de la mutación *BRAF^{V600E}* en especímenes de ACAF ha sido evaluada por distintos autores mediante múltiples técnicas, entre las que se encuentran secuenciación, pirosecuenciación, técnicas colorimétricas (*Mutector assay*), *Melting curve analysis* y diversas variantes de PCR (RFLP, *LightCycler*, MASA)¹¹⁷.

El estudio llevado a cabo por Jin y colaboradores¹¹⁸ mostró una comparación entre cuatro métodos de detección de mutación BRAF en especímenes obtenidos mediante ACAF: secuenciación directa, ensayo colorimétrico, PCR en tiempo real con sondas FRET, y PCR en tiempo real alelo-específica con SYBR Green. Encontraron una especificidad del 100% y una sensibilidad del 53,5% para los cuatro métodos, y consideran que la PCR en tiempo real alelo-específica es la técnica más fácil de realizar e interpretar.

Al evaluar la sensibilidad y especificidad de la detección de *BRAF^{V600E}*, prácticamente todos los estudios muestran una especificidad del 100%, y sensibilidades que oscilan entre el 15% y el 84%¹¹⁹. El valor predictivo positivo en estos estudios es cercano al 100%; el valor predictivo negativo reporta valores tan bajos como del 17.9% y altos como el 91%.

Un meta-análisis¹²⁰ que evaluó el valor diagnóstico de la detección de la mutación BRAFV600E en muestras de ACAF en 27 estudios muestra una sensibilidad del 60% y una especificidad del 99%. El área bajo la curva fue de 0.8376, con un índice Q de 0.7696, lo que se interpreta como una prueba aceptable debido a la variabilidad en la sensibilidad de los estudios revisado. Sin embargo, consideran que la prueba es una herramienta muy útil para confirmar un diagnóstico de PTC, sin embargo, su baja sensibilidad limita su uso generalizado. La detección de mutaciones en el gen BRAF es específico para carcinoma papilar de tiroides, sin embargo es poco sensible, debido a que muchos tumores, como el PTC variante folicular, es negativo para ambas pruebas, y sólo es positivo para mutaciones de RAS⁴⁷. Teniendo en cuenta que el 90% de los tumores tiroideos son carcinomas papilares⁵⁷, y que hasta un 80% de estos tumores son portadores de la mutación BRAFV600E (dependiendo del subtipo tumoral), se considera que la detección de la mutación BRAFV600E es una herramienta útil para refinar el diagnóstico de PTC en muestras de aspirado tiroideo con resultado indeterminado.

Un estudio prospectivo llevado a cabo por Nikiforov y colaboradores¹²¹ sobre una muestra de 1057 ACAF de nódulo tiroideo cuyo resultado de citología fuese catalogado como Atipia de significado indeterminado o Lesión folicular de significado indeterminado (Bethesda III), en el cual se evaluó tanto la calidad de la muestra tomada como el panel mutacional en el que se incluyó *BRAF^{V600E}*, *RAS*, *RET/PCR* y *PAX8/PPARG*, se encontró que la detección de estas mutaciones aumentaba en valor predictivo positivo hasta un 87% a 95% para predecir carcinoma de tiroides, lo que, sumado al ACAF, ofrecería una estratificación de riesgo más exacta en estos pacientes.

34 Presencia de la mutación BRAFV600E en nódulos tiroideos, y su relación con el diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

4. Capítulo 4 - Metodología

4.1 Objetivo general

Estimar la frecuencia de la mutación BRAFV600E en especímenes de citología extraídos a partir de biopsia por aspiración con aguja fina (ACAF) de nódulo tiroideo en una muestra de la población de Bogotá, D.C., e investigar la concordancia de esta prueba con los resultados de la citología y la patología.

4.2 Objetivos específicos

1. Investigar la presencia de la mutación BRAFV600E en muestras de citología.
2. Comparar la presencia de la mutación BRAFV600E con la lectura inicial de citología (Clasificación de Bethesda) dada por los patólogos.
3. Determinar la frecuencia de la mutación BRAFV600E en la muestra de pacientes con nódulo tiroideo.
4. Investigar la frecuencia del diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides en muestras de histopatología, en los casos en que el paciente sea sometido a procedimiento quirúrgico (lobectomía, tiroidectomía total).
5. Establecer la relación entre la presencia de la mutación BRAFV600E en muestras de citología, y el diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides en muestras de histopatología.

4.3 Tipo de estudio

Estudio de concordancia (consistencia).

4.4 Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se calculó con el software STATCALC de EpiInfo versión 3.5.3 (CDC Atlanta) con base en los siguientes criterios: prevalencia de carcinoma tiroideo del 3%, de los cuales el 90% son de tipo papilar, presencia de la mutación BRAFV600E en este tipo de carcinoma del 60%, peor frecuencia esperada de 30%, tamaño de la población disponible de 300 pacientes, nivel de confianza de 95% y poder del 80%. El tamaño de muestra calculado fue de 268 pacientes.

4.5 Obtención de la muestra

Se realizó una búsqueda activa de instituciones de diagnóstico imagenológico donde se llevaran a cabo procedimientos de ACAF. La EPS Coomeva, mediante su comité de Ética Médica, accedió a ser incluida dentro del trabajo de investigación (ver anexo). Se tomó como base de inclusión de pacientes la ciudad de Barranquilla, con el respaldo de la epidemióloga de la Regional Caribe, enfermera Melinda Cárdenas. La IPS Cediul, centro de diagnóstico radiológico, se tomó como centro de recolección de muestras.

La IPS Dinámica, ubicada en la ciudad de Medellín, y representada por la Directora Científica Dra. Jenny Carmona, accedió a ingresar al estudio de investigación. Las muestras se obtuvieron mediante el respaldo del Dr. Alejandro Vélez, médico patólogo.

A cada paciente que ingresara a la institución para realización de ACAF según criterios de inclusión, se le explicó el propósito del estudio y se le invitó a participar. Cada uno de los pacientes firmó el consentimiento informado (ver anexo) aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, el cual no reemplazó en ningún momento el consentimiento informado de cada institución participante.

4.5.1 Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 18 años, con diagnóstico clínico y ultrasonográfico de nódulo tiroideo, que cumplieran criterios para realización de biopsia aspiración con aguja fina, de acuerdo con las recomendaciones de la Guía de manejo de la Asociación Americana de Tiroides, que ingresaran a cada una de las instituciones incluidas en el estudio para su realización, y hubieran firmado previamente el consentimiento informado (ver Anexo 1).

Los criterios para la realización de aspirado con aguja fina de tiroides son:

- Historia de alto riesgo para carcinoma de tiroides, y nódulo mayor de 5 mm con características ecográficas sospechosas de malignidad (Recomendación tipo A).
- Historia de alto riesgo para carcinoma de tiroides, y nódulo mayor de 5 mm sin características ecográficas sospechosas de malignidad (Recomendación tipo B).
- Todos los nódulos linfáticos cervicales anormales (Recomendación tipo A).
- Nódulos de tamaño igual o mayor a 1 cm, con presencia de microcalcificaciones en la ecografía (Recomendación tipo B).
- Nódulos sólidos e hipocóicos mayores a 1 cm (Recomendación tipo B).

- Nódulos sólidos iso e hiperecoicos mayores a 1 cm (Recomendación tipo C).
- Nódulos mixtos (sólidos y quísticos) mayores a 1.5 cm, con cualquier característica ecográfica sospechosa de malignidad (Recomendación tipo B).
- Nódulos mixtos (sólidos y quísticos) mayores a 1.5 cm, sin características ecográficas sospechosas de malignidad (Recomendación tipo C).
- Nódulo espongiforme mayor o igual a 2 cm (Recomendación tipo C).

4.6 Registro de pacientes

A cada paciente se le asignó un número consecutivo, junto con un carácter alfabético en el caso de haberse tomado más de una muestra, con el fin de preservar la identidad del paciente en completa confidencialidad durante el procesamiento de las muestras. Se asignó además, el carácter M al finalizar el consecutivo, para agrupar las muestras procedentes de la ciudad de Medellín, y los caracteres BQ para las muestras recolectadas en Barranquilla. Cada médico que realizó el procedimiento de ACAF diligenció el formato de recolección de datos para cada paciente (ver anexo), formato de uso exclusivo del investigador principal. Las características evaluadas para el estudio fueron edad, sexo, tamaño del nódulo, características ecográficas de malignidad (microcalcificaciones, vascularidad aumentada, ausencia de halo ecogénico, márgenes infiltrativos, nódulo hipoeicoico, altura mayor que el ancho), resultado de citología con clasificación Bethesda, cirugía posterior, y en caso de cirugía tipo de tumor.

4.7 Toma de la muestra.

Previo a la recolección de la muestra, a cada centro diagnóstico se le proveyó de tubos eppendorf con aproximadamente 100 cc de reactivo de preservación de ácidos nucleicos Allprotect Tissue Reagent (QIAGEN®, Germany).

Dos radiólogos (ED, LG) y un patólogo (AV) realizaron el procedimiento ACAF en cada uno de los centros de recolección. A cada paciente se le realizó el aspirado con aguja fina (ACAF) guiado por ecografía de uno o dos nódulos (según diagnóstico ecográfico previo y por el cual fue remitido), de acuerdo con la técnica usual (ver anexo). La muestra para estudio se obtuvo posterior a la realización del extendido en lámina para citología, mediante el lavado de la aguja de la muestra con 0,5 a 1 cc de cloruro de sodio al 0.9% estéril, y depositando este lavado en el tubo con el preservante de ácidos nucleicos. Cada tubo se marcó con el número consecutivo del paciente registrado en la hoja de recolección de datos, y se almacenó a -20°C hasta su procesamiento.

4.8 Extracción de ADN

Se probaron cuatro métodos de extracción de ADN entre los cuales se encuentran:

- Kit de extracción Qiamp Micro DNA según instrucciones del fabricante.
- Kit de extracción de ADN MoBio según instrucciones del fabricante.
- Extracción mediante Salting Out según protocolo descrito por Miller et al¹²².

- Extracción mediante Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico, según protocolo modificado provisto por Diana Mayorga. (Ver anexo).

Se realizó cuantificación de concentración de ADN y pureza (relación 260/280 y 260/230) mediante equipo de espectrofotometría Nanodrop 2000.

4.9 Detección de la mutación BRAFV600E mediante PCR en tiempo real – curva melting

La PCR en tiempo real es una técnica variante de la PCR convencional, que permite la cuantificación de la muestra y su análisis durante la amplificación. Esto es posible gracias a la medición de fluorescencia de un determinado fluoróforo que, en este experimento, se añade a uno de los extremos de un oligonucleótido que se une mediante apareamiento de bases a una secuencia específica de ADN. La cantidad de fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en la reacción.

La curva melting, realizada al finalizar la amplificación de la muestra, consiste en el calentamiento progresivo de la muestra desde una temperatura determinada, lo que induce la disociación de la doble cadena de cada fragmento (*melting*). Dependiendo de la secuencia de nucleótidos de cada fragmento, se requiere una temperatura de melting determinada para romper los puentes de hidrógeno de la doble cadena. En el caso de un SNP (single nucleotide polymorphism), la sola variación del nucleótido provoca un cambio de temperatura melting entre dos cadenas con distinto SNP, base sobre la cual se puede realizar la genotipificación del segmento analizado. Cada amplificado va a generar un pico de fluorescencia máximo a una temperatura determinada, en el cual el 50% de los fragmentos están disociados. Posteriormente, se produce el descenso progresivo de fluorescencia hasta el momento en el que el 100% de los fragmentos están disociados.

Esta técnica es útil para analizar muestras con genotipo heterocigoto, puesto que en este caso se visualizarán dos picos de temperatura distintos.

Se describirá a continuación los pasos que se siguieron para la realización del experimento.

4.9.1 Selección de sondas y primers

Se utilizaron para esta prueba los primers y sondas descritos por Nikiforov et al¹²³. Cada uno de ellos se estudió con los programas Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), y Beacon Designer, para evaluar su viabilidad y determinar la proporción de Guaninas (G), Citocinas (C), y Temperatura de fusión (Tm).

Tabla 4.1. Secuencias de primers y sondas empleados en RT-PCR Melting curve Gen *BRAF* (GenBank ID NG_007873.3).

Nombre	Secuencia 5' a 3'	T _m (°C)
Forward	TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	59°
Reverse	GGCCAAAATTTAATCAGTGGA	60°
Sonda FL	AGCTACAGTGAAATCTCGATGGAG-FL	
Sonda LC	LCRed640-GGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGA-P	

T_m: Temperatura de fusión. FL: Fluoresceína. LC: LCRed 640. P: Fosfato.

4.9.2 Características de la reacción

La reacción de amplificación se llevó a cabo en capilares de vidrio con un volumen final de 20 uL, utilizando 2 uL de DNA (5-50 ng), 2 uL (10x) de LightCycler® Fast Start DNA Master HybProbe de Roche (que contiene 10 mM MgCl₂, trifosfatos de desoxinucleótido, buffer de reacción y Taq polimerasa), 2.4 uL de MgCl₂ 25 mM, 1 uL (0,5 uM) de cada primer (forward y reverse), y 2 uL (0,2 uM) de cada sonda (FL y LC).

El equipo utilizado fue el LightCycler® 2.0 Instrument Carousel-Based System. Las condiciones de la reacción son las mismas descritas por Nikiforov et al¹²³. (Tabla). La curva melting se realizó posterior a la amplificación, mediante el calentamiento gradual de las muestras a 0.1°C/s desde 45°C a 95°C. Los picos de melting se construyeron mediante el trazado de la derivada negativa de la señal fluorescente correspondiente con la temperatura (-dF/dT). La temperatura pico de melting esperada para una muestra wild type es de 63°C, y la de una muestra heterocigota es de 59°C.

Tabla 4.2. Condiciones de amplificación de la reacción de PCR en tiempo real.

Segmento	Temperatura	Tiempo
Preincubación (1 ciclo)		
Incubación	95°C	10 min
Amplificación (45 ciclos)		
Desnaturalización	95°C	5 s
Anillamiento	54°C	20 s
Extensión	72°C	12 s

Cada muestra se procesó por triplicado. Se tomó como control positivo la línea celular de cáncer de colon HT-29, la cual es heterocigota para la mutación BRAFV600E; como control negativo se tomó ADN de sangre periférica de un individuo sano, y una reacción blanco, sin ADN.

4.9.3 Curva de calibración

Inicialmente se realizó una curva de calibración para determinar el límite de detección de la prueba. Para ello, se siguió el protocolo sugerido por Applied Biosystems¹²⁴.

a. Cálculo de la masa de ADN por genoma

El estimado del tamaño del genoma humano haploide es de 3×10^9 bp. La masa del ADN del genoma humano se calcula con la siguiente fórmula:

$$m = (n) (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$$

n = tamaño del genoma; m= masa

El resultado se convierte en unidades picogramo, lo que da un total de 3,288 pg de masa del genoma humano haploide. Dado que en cada genoma existe una copia del gen BRAF, se calcula que 3,288 pg de ADN genómico humano contienen una copia del gen BRAF.

b. Cálculo de la masa de ADN que contiene el número de copias de interés y la concentración de ADN necesario.

Se calcula la masa del ADN que contiene un determinado número de copias, en este caso de 100.000 a 10 copias, como lo indica la siguiente fórmula:

Número de copias de interés x masa del genoma haploide = masa del ADN requerido

Para determinar la concentración de ADN necesario para cada dilución, en este caso 2 uL, se divide la masa del ADN entre 2 uL.

Tabla 4.3. Cálculo de concentración de ADN por número de copias.

Número de copias	x 3,288 pg	Masa del ADN necesario	÷ 2 uL	Concentración final (pg/uL) de ADN
100.000		328.800		164.400
10.000		32.880		16.440
1.000		3.288		1.644
100		328,8		164,4
10		32,88		16.4

Para realizar las diluciones, se usó la fórmula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

C_i : Concentración inicial; V_i = Volumen inicial; C_f = Concentración final; V_f = Volumen final.

Las tablas muestran las diluciones para el ADN wild type de sangre periférica (usado como control negativo), y el ADN de las células HT-29 (usado como control positivo).

Tabla 4.4. Diluciones para ADN wild type.

Dilución	Fuente de ADN para dilución	Concentración inicial (pg/uL)	Volumen inicial de ADN (uL)	Volumen de diluyente (uL)	Volumen final (uL)	Concentración final de la dilución (pg/uL)	Número de copias de BRAF por cada 2 uL
1	Stock	208.000	79,03	20,97	100	164.400	100.000
2	Dilución 1	164.400	10	90	100	16.440	10.000
3	Dilución 2	16.440	10	90	100	1.644	1.000
4	Dilución 3	1.644	10	90	100	164,4	100
5	Dilución 4	164,4	10	90	100	16,44	10

Tabla 4.5. Diluciones para ADN células HT-29.

Dilución	Fuente de ADN para dilución	Concentración inicial (pg/uL)	Volumen inicial de ADN (uL)	Volumen de diluyente (uL)	Volumen final (uL)	Concentración final de la dilución (pg/uL)	Número de copias de BRAF por cada 2 uL
1	Stock	175.000	93,94	6,06	100	164.400	100.000
2	Dilución 1	164.400	10	90	100	16.440	10.000
3	Dilución 2	16.440	10	90	100	1.644	1.000
4	Dilución 3	1.644	10	90	100	164,4	100
5	Dilución 4	164,4	10	90	100	16,44	10

4.10 Secuenciación de fragmentos

La muestra de ADN fue sometida a PCR convencional con condiciones similares a la PCR en tiempo real, y fueron llevadas a secuenciación al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular del Instituto de Genética (SSiGMol) de la Universidad Nacional de Colombia. Éste se llevó a cabo empleando la técnica de BigDye Terminator de ABI (el método de dideoxi o Sanger) y corridas en un analizador genético Applied Biosystems 3500, utilizando los kits de Applied Biosystems BigDye® Cycle Sequencing. Se utilizó el primer BRAF Forward.

Cada secuencia se analizó con el programa Sequence Scanner Software 2 versión 2.0 de Applied Biosystems; y se hizo alineamiento de secuencias con el gen de referencia (BRAF,

GenBank ID: NG_007873.3) con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Ambos programas son de libre distribución.

4.11 Reportes de citología de nódulo tiroideo.

Cinco patólogos (MD, RG, MR, SS, AV) realizaron la lectura de citología de los ACAF extraídos. Ninguno de los patólogos conoció el resultado de la detección de la mutación de cada muestra.

4.12 Reporte de patología de tiroidectomía.

A los pacientes quienes por su resultado de citología fueron llevados a cirugía se les solicitó el reporte de patología de la pieza quirúrgica, del cual se revisó tipo de tumor.

4.13 Análisis estadístico.

Se realizó un análisis de la muestra mediante estadística descriptiva, utilizando distribución de frecuencias. Se estimó la concordancia entre los resultados de PCR en tiempo real y secuenciación. Se calculó la relación entre el estado de la mutación y factores clinicopatológicos de la muestra como edad, sexo, tamaño tumoral, características ecográficas y resultado de ACAF como datos crudos, mediante test de Chi cuadrado. Se estimó la concordancia entre la detección de la mutación y la presencia de enfermedad maligna diagnosticada por histopatología. Se estimaron las características operativas de la prueba (sensibilidad, especificidad, valores predictivos y LR) con sus respectivos intervalos de confianza calculados por el método binomial exacto. Los análisis se hicieron en forma global, y estratificados por resultado de citología y por resultado de patología (en los casos indicados). Los análisis se llevaron a cabo mediante el programa IBM SPSS Versión 19.

5. Capítulo 5 - Resultados

5.1 Ensayo de límite de detección

Las curvas de calibración mostraron un nivel de fluorescencia detectable y uniforme hasta una concentración de 100 copias/uL tanto de ADN wild type como ADN mutado (Figuras 5.1 y 5.2). La concentración de 10 copias para el ADN HT-29 mostró solapamiento con la concentración de 100 copias, lo que podría corresponder a contaminación vs. pobre detección, por lo que se considera que la prueba es apta para detectar ADN mutante con una concentración de hasta 100 copias/haploide.

Figura 5.1. Curvas de eficiencia. ADN wild type.

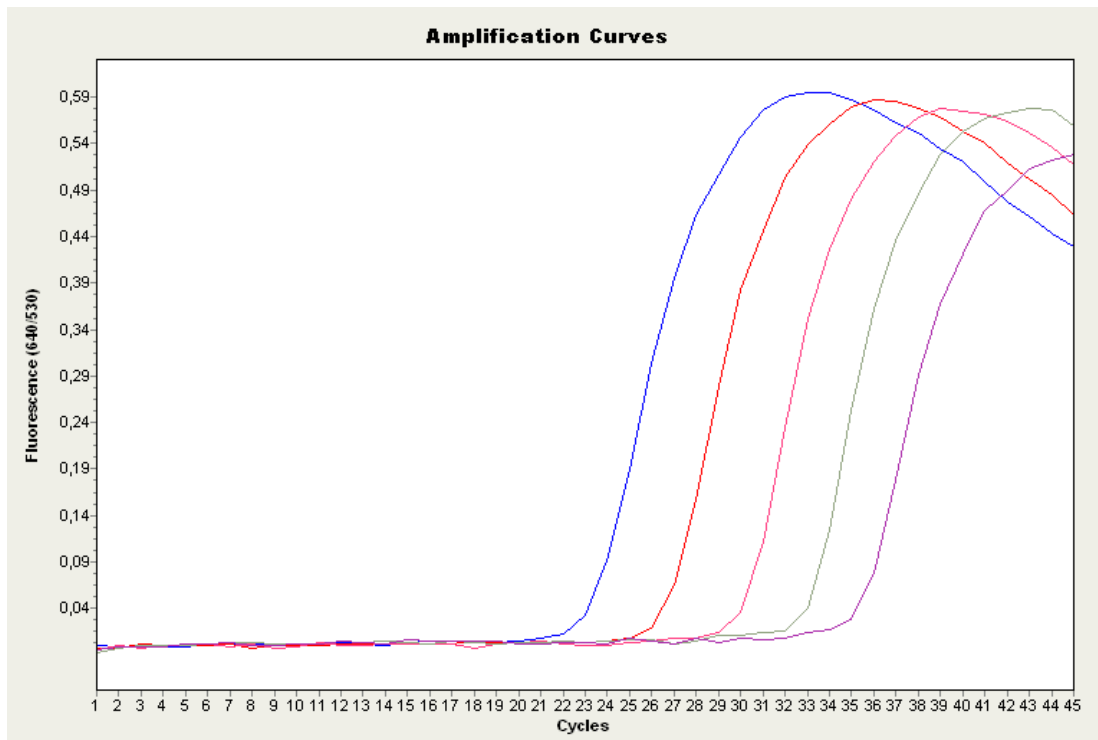
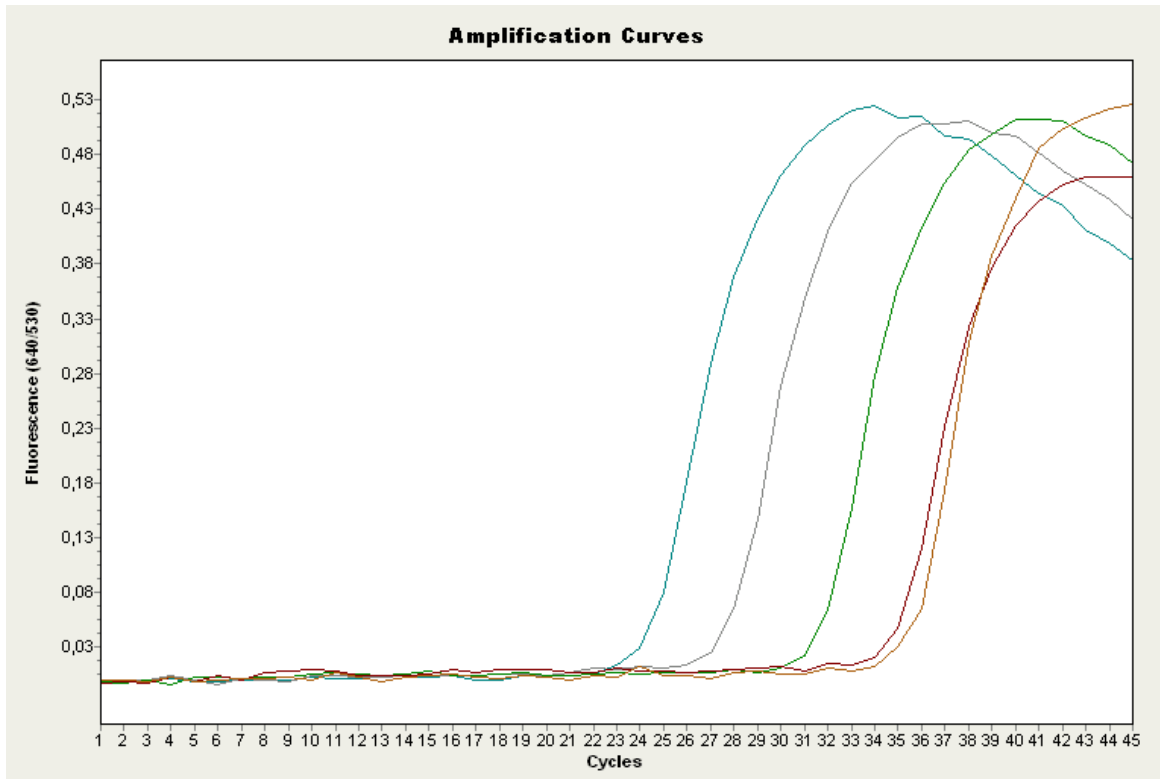
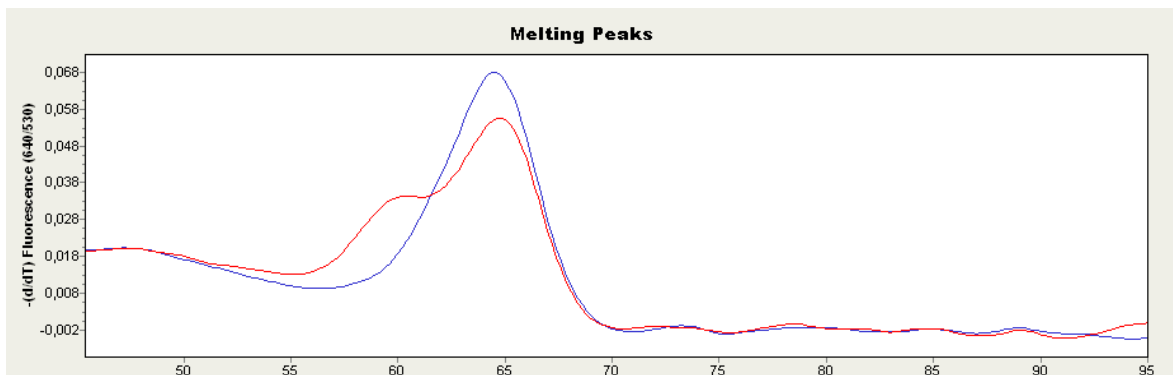


Figura 5.2. Curvas de eficiencia ADN HT-29.



El pico de melting calculado para una muestra wild type fue de 64°C, y para una muestra heterocigota fue de 60°C (en ambos casos, un grado por encima de la temperatura reportada por Nikiforov et al).

Figura 5.3. Curvas melting comparativas entre una muestra control negativo (sangre periférica donante sano, en azul) y una muestra control positivo heterocigoto (Línea celular HT-29, en rojo)



5.2 Características de la población analizada

Entre Agosto de 2014 y Julio de 2015 se inició la recolección de muestras. Se incluyeron al estudio un total de 226 muestras de 186 pacientes, de los cuales 170 pacientes (91.4%) fueron mujeres y 16 (8.6%) fueron hombres, con una proporción mujer:hombre de 10.6 a 1. 145 (78%) pacientes provenían de Barranquilla, 39 (20.8%) de Medellín y 2 (1%) de Bogotá. El promedio de edad fue de 50.7 años (SD \pm 15.4). 5 pacientes (2.2%) tuvieron antecedente de carcinoma papilar de tiroides reseado (hemitiroidectomías), todas las mujeres fueron procedentes de Barranquilla. La tabla 5.1 muestra las características de los pacientes.

Tabla 5.1. Características clínicas y demográficas de los pacientes.

Ciudad	Barranquilla n = 145	Medellín n = 39	Bogotá n = 2	Total n = 186
Sexo				
F	135 (72.5%)	33 (17.7%)	2 (1%)	170 (91.4%)
M	10 (5.3%)	6 (3.2%)	0	16 (8.6%)
Edad				
0-17 años	2 (1.0%)	3 (1.6%)	0	5 (2.7%)
18 a 44 años	46 (25%)	13 (7%)	1 (0.5%)	60 (32.6%)
Más de 45 años	95 (51.6%)	23 (12.5%)	1 (0.5%)	119 (64.6%)
Antecedente familiar de cáncer de tiroides				
No	119 (64%)	38 (20.4%)	2 (1%)	159 (85.4%)
Si	15 (8%)	1 (0.5%)	0	16 (8.6%)
ND	11 (5.9%)	0	0	11 (5.9%)
Antecedente de enfermedad tiroidea				
Si	74 (39.7%)	8 (4.3%)	1 (0.5%)	83 (44.6%)
No	52 (28%)	31 (16.6%)	1 (0.5%)	84 (45.1%)
ND	19 (10.2%)	0	0	19 (10.2%)

84 pacientes (37.8%) no tuvieron antecedente de enfermedad tiroidea, 83 (37.3%) pacientes tuvieron enfermedad tiroidea previa, y no hubo datos en 19 (8.4%) pacientes. La distribución de pacientes con antecedentes de enfermedad previa se visualiza en la figura 5.4.

159 pacientes (85.4%) no refirieron antecedente de cáncer de tiroides en la familia, y en 11 (5.9%) no hubo datos. 16 pacientes (8.6%) refirieron antecedente de cáncer tiroideo, de los cuales 10 (6.2%) tuvieron un solo familiar afectado, 3 (1.8%) tuvieron dos familiares afectados, uno (0.6%) tuvo tres o más familiares afectados, y en 2 (1.25%) no se mencionó el familiar afectado.

Al evaluar el número de nódulos, la media de número de nódulos dominantes fue de 1.48, un rango entre 1 y 15 nódulos (ver figura 5.5). En el 2,96% de los pacientes no se visualizaron nódulos definidos ya fuera por micronodularidad o por ausencia de los mismos. La media de tamaño de los nódulos tiroideos evaluados fue de 16,39 mm (SD \pm 10.525).

Figura 5.4. Distribución de pacientes con enfermedad tiroidea previa.

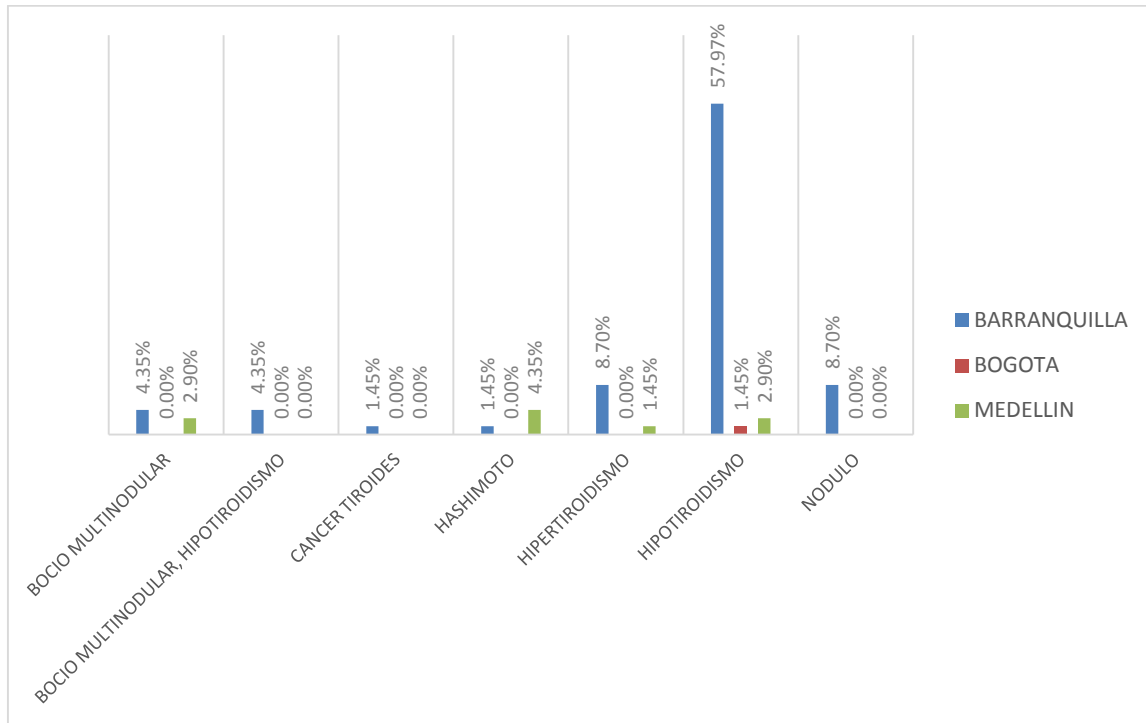
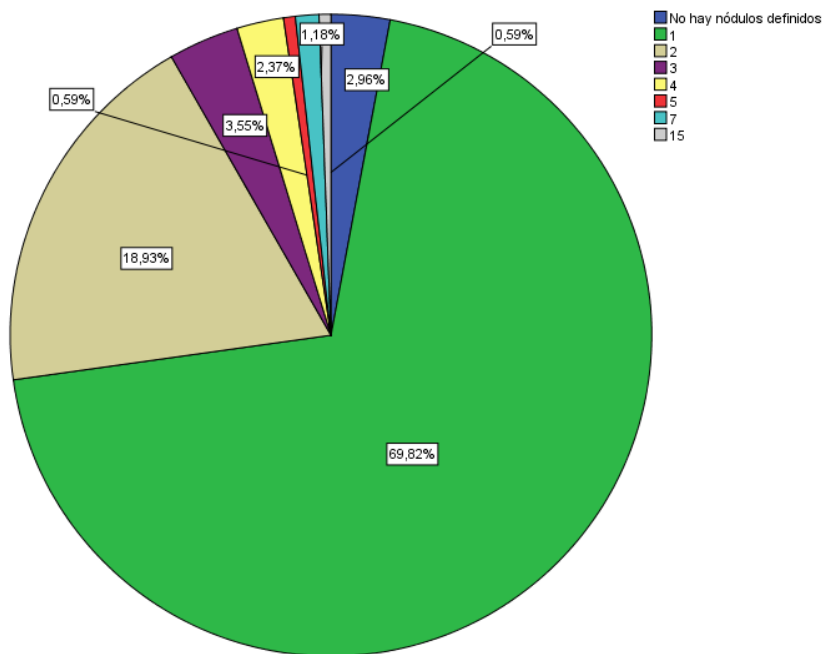


Figura 5.5. Porcentaje de pacientes según el número de nódulos tiroideos evaluados por ecografía.



5.3 Relación entre la presencia de la mutación BRAFV600E y el diagnóstico citológico de ACAF tiroideo.

Del grupo de pacientes se excluyeron del análisis 5 pacientes (6 muestras), tres de 12 años, una de 13 años y una de 17 años, puesto que no cumplieron el criterio de edad para el análisis.

5.3.1 ACAF y características ecográficas.

De las 220 muestras restantes, 51 (23.1%) fueron tomadas por ED, 106 (48.1%) por LG, 37 (16.8%) por AV, y 1 (0.4%) por un radiólogo externo. En 25 muestras (11.3%) no hubo datos del radiólogo que tomó la muestra.

Según las características ecográficas sugestivas de malignidad, 197 muestras contaban con esta información, en 23 muestras no se reportaron estas características. Se encontró que 85 muestras (43.1%) no tienen ninguna característica ecográfica que sugiera malignidad, 53 (26.9%) tienen al menos 1 característica, 35 (17.7%) tienen dos características, 17 (8.8%) tienen 3 características, 4 (2%) tienen 4 características, 1 (0.5%) muestra tiene 5 características, y 2 (1%) tienen 6 características de malignidad.

El 11.4% de las muestras tuvieron microcalcificaciones, 27.3% tuvieron vascularidad aumentada, 8.6% tuvieron ausencia de halo ecogénico, 35% fueron nódulos hipoeoicos, 9.1% tuvieron márgenes infiltrativos, y en 2.7% se reportó una altura mayor que el ancho.

5.3.2 Lectura de citología

En la clasificación según el patólogo que hizo la lectura, 12 (5.5%) lecturas fueron hechas por MD, 34 (15.5%) por RG, 21 (9.5%) por MR, 7 (3.2%) por SS, y 37 (16.8%) por AV. En 106 (48.2%) muestras no se obtuvieron datos del resultado de citología, y 3 (1.4%) lecturas fueron realizadas por patólogos externos al estudio.

Inicialmente se tomó únicamente las muestras cuyo resultado incluyó la clasificación Bethesda. 77 muestras (35,16%) se clasificaron dentro de uno de los 6 grupos. En el 15,53% de las lecturas realizadas, no se reportó ésta clasificación (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Frecuencias según resultados de citología

Clasificación Bethesda	Número de muestras (porcentaje)
I	15 (6.8%)
II	54 (24.5%)
III	2 (0.9%)
IV	4 (1.8%)
V	5 (2.3%)
VI	1 (0.5%)
No reportado*	33 (15%)
Sin datos	106 (48.2%)

*Corresponde a todos aquellos reportes de patología donde no se clasifica la muestra.

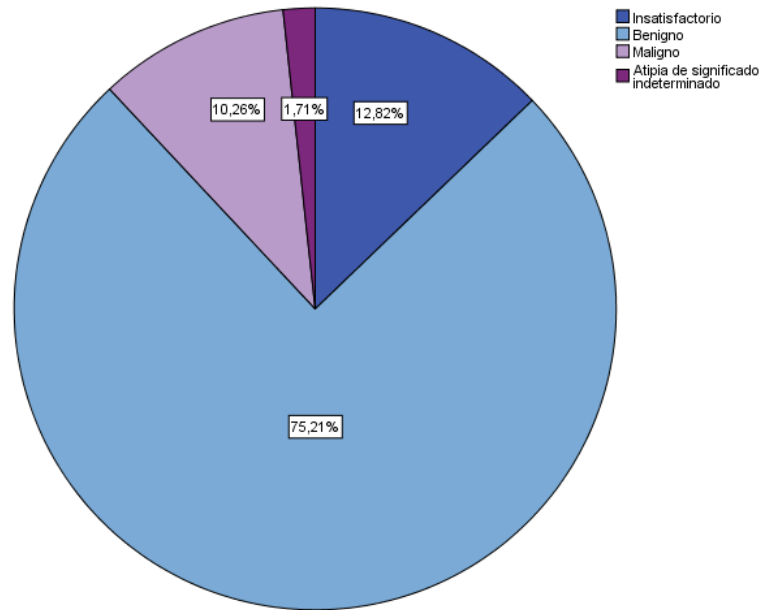
Al incluir las muestras con y sin reporte de Bethesda, y teniendo en cuenta el reporte de citología como presencia o ausencia de malignidad en el tejido, se analizaron en total 117 muestras. La tabla 5.3 muestra los resultados de citología reportados por patólogo clasificados como benignos.

Tabla 5.3. Reportes de citología sin clasificación Bethesda, catalogados como benignos para el estudio.

Bocio coloide
Bocio coloide nodular
Bocio hiperplásico
Bocio hiperplásico quístico
Bocio quístico
Células foliculares de morfología usual, negativo para malignidad.
Células monomórficas dispuestas en grupos sobre matriz proteinácea y hemorrágica sugestiva de coloide, esporádicos histiocitos
Fondo hemorrágico, hipercelulares, denso infiltrado de células inflamatorias linfocitarias pequeñas uniformes maduras, aislados grupos de células foliculares de núcleos ovoides uniformes y núcleos agrandados, linfocitos que infiltran células epiteliales.
Extendido hemorrágico, linfocitos, escasas células epiteliales foliculares de morfología habitual
Linfocitos, leucocitos. Ausencia de malignidad.
Linfocitos, células epiteliales sin cambios morfológicos, negativo para malignidad.
Macrófagos, linfocitos. Ausencia de malignidad.
Nódulo coloide

El resultado de citología de ACAF fue benigno en 88 pacientes (75.2%), maligno en 12 pacientes (10.3%), insatisfactorio en 15 pacientes (12.8%), y se encontró atipia de significado incierto en dos de ellos (1.7%) (Ver figura 5.6). De los pacientes con patología maligna, 6 presentaron carcinoma papilar (50% de los pacientes con patología maligna, 5.1% del total de pacientes), y 6 presentaron neoplasia folicular (50% de los pacientes con patología maligna, 5.1% del total de pacientes).

Figura 5.6. Porcentaje de pacientes según resultado de citología de ACAF.



5.3.3 Extracción de ADN de aspirado tiroideo

Se probaron diferentes técnicas para la extracción de ADN. Sin embargo, al evaluar la concentración de ADN mediante espectrofotometría, tanto las curvas obtenidas como la relación 260/280 y 260/230 hacían suponer una mala calidad del ADN (ver figuras 5.7). Esto es posiblemente debido a la baja concentración de ADN obtenido.

Comparando el resultado obtenido a partir de la amplificación de la muestra, es decir, al comparar el método de extracción de ADN con un resultado interpretable o no de la PCR en tiempo real o secuenciación (Tabla 5.4), se observó que las técnicas de extracción mediante kit brindan un ADN de buena calidad para ser posteriormente utilizado en cualquier técnica molecular. La técnica de Salting out no es una buena técnica para extracción de ADN, teniendo en cuenta el tiempo y la conservación del tejido en preservante de ácidos nucleicos. La técnica de fenol cloroformo sigue brindando un ADN de buena calidad, sin embargo, es un método tóxico, y las trazas de fenoles pueden interferir con el manejo posterior de la muestra.

Tabla 5.4. Comparación entre los métodos de extracción de ADN empleados en el estudio.

Método de extracción	Resultado interpretable	Resultado no interpretable	Total n = 220
Kit MoBio	2 (100%)	0	2 (0.9%)
Kit Qiagen	29 (100%)	0	29 (13.2%)
Salting Out	19 (50.4%)	18 (49.6%)	37 (16.8%)
Fenol cloroformo	132 (86.9%)	20 (13.2%)	152 (69.1%)

Figura 5.7. Dos imágenes (A y B) de curvas de extracción de ADN de aspirado de nódulo tiroideo, obtenido mediante kit Qiagen, cada una con concentraciones diferentes.

Figura A.

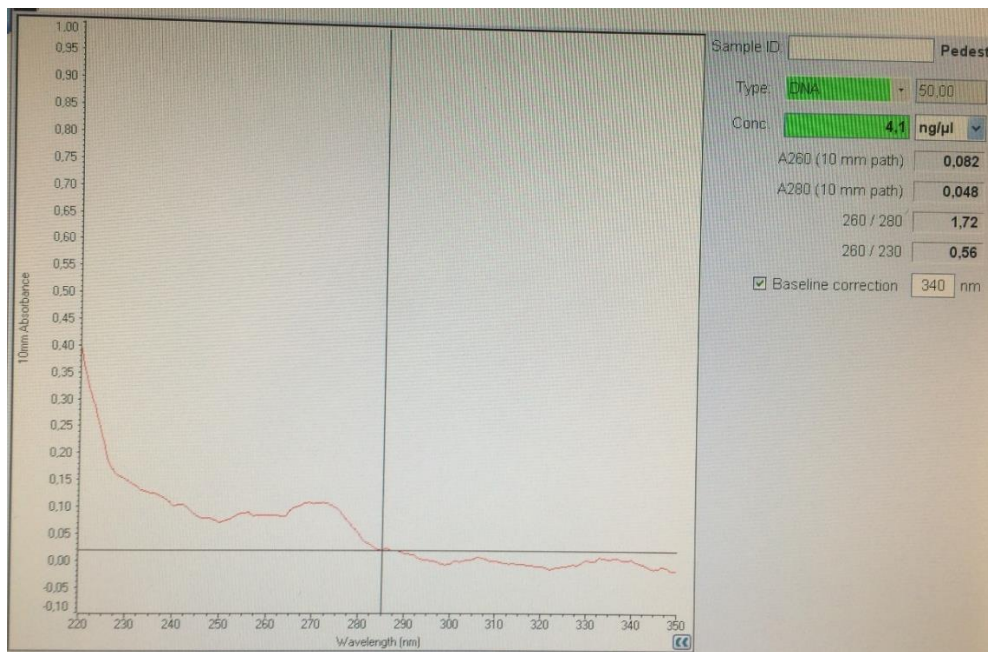
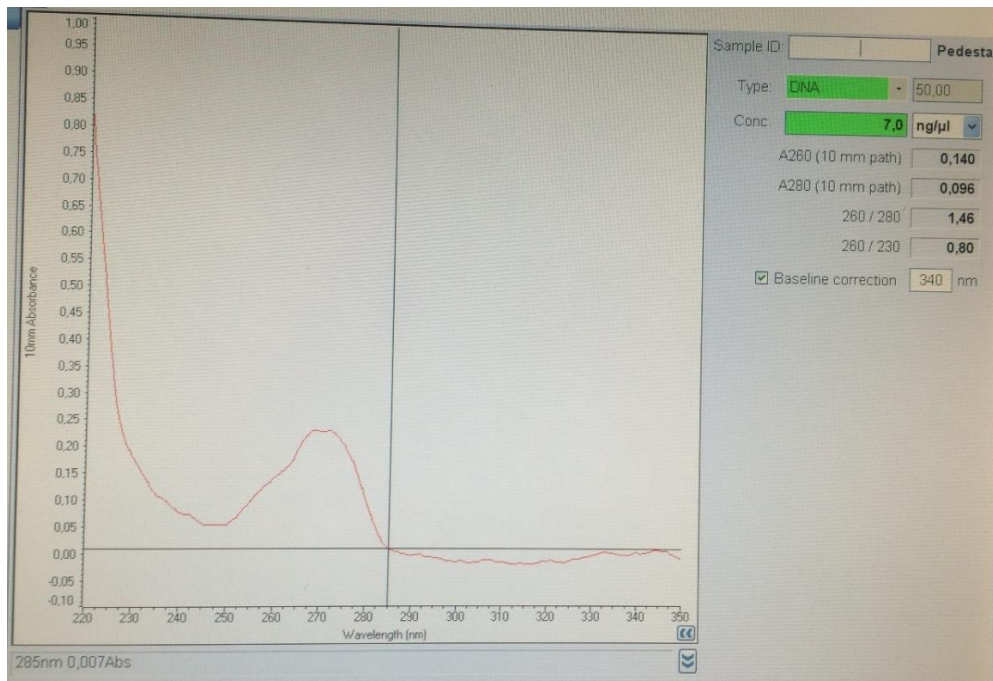


Figura B.



5.3.4 Detección de la mutación BRAFV600E en aspirado tiroideo.

Del total de las muestras, 111 fueron analizadas mediante PCR en tiempo real y curva melting, y 109 fueron analizadas mediante secuenciación (ver tabla 5.4). Once muestras analizadas por PCR en tiempo real y 5 muestras analizadas mediante secuenciación fueron positivas para la mutación BRAFV600E. Todas las muestras positivas en PCR en tiempo real fueron llevadas a secuenciación. De las 12 muestras positivas analizadas por PCR, 9 fueron negativas en la secuenciación y 3 fueron positivas (ver figuras 5.8, 5.9, 5.10, 5.11). Se realizó prueba de concordancia a 16 muestras que fueron sometidas a PCR en tiempo real y a secuenciación, y se obtuvo un valor Kappa de 0.19.

Tabla 5.5. Resultados de la detección de la mutación BRAFV600E.

Estado de la mutación BRAFV600E	PCR en tiempo real n = 111	Secuenciación n = 109	Total n = 220
Positiva	11 (9.9%)	5 (4.6%)	16 (7.3%)
Negativa	81 (73%)	85 (78%)	166 (75.5%)
No interpretable	19 (17.1%)	19 (17.4%)	38 (17.3%)

Figura 5.8. Curva melting del paciente BQ-32, con mutación BRAFV600E. Se observan dos picos de temperatura, uno a 60°C y otro a 64°C.

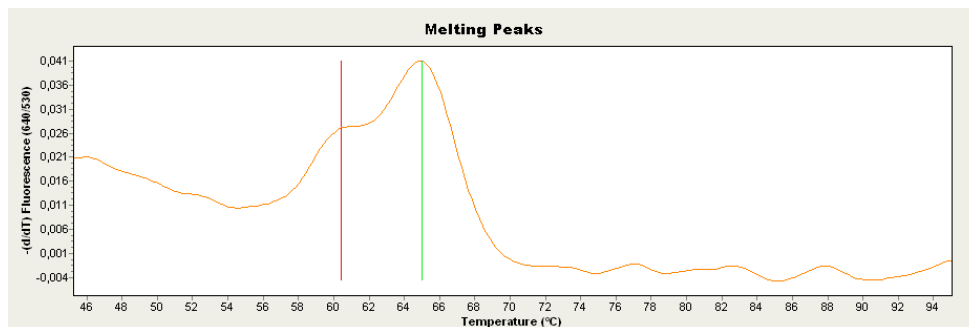


Figura 5.9. Curva melting del paciente BQ-7, wild type. Se observa un único pico de temperatura a 64°C.

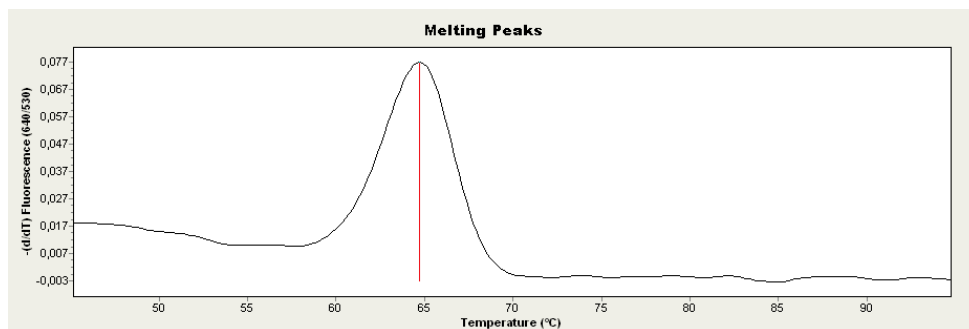
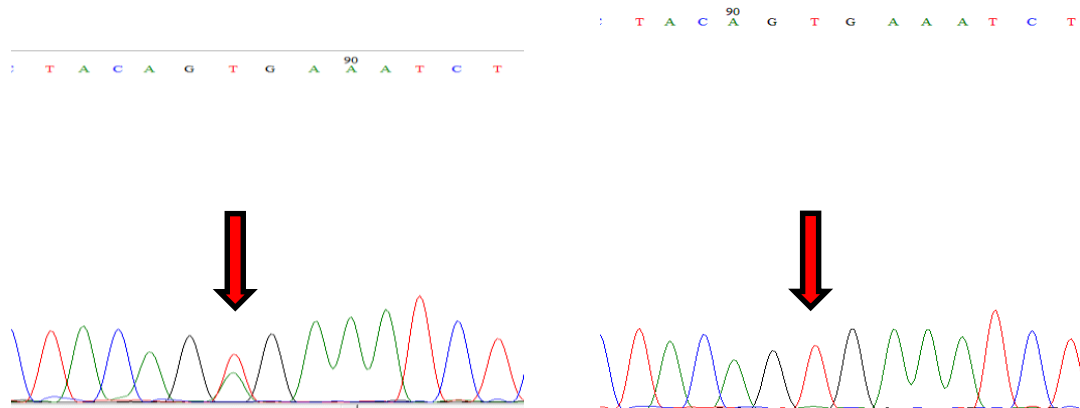


Figura 5.10. A la derecha, secuenciación del paciente BQ-32, que muestra dos señales de fluorescencia de timina y adenina en la posición 1799 del gen BRAF, que corresponde a una mutación c.1799T>A, o V600E. A la izquierda, secuenciación del paciente BQ-88, que muestra una señal de fluorescencia de adenina en la posición 1799 del gen BRAF, que corresponde al estado *wild type* del gen BRAF.



Las muestras con resultado no interpretable con cualquiera de las dos técnicas empleadas se excluyeron del análisis, por lo que se analizaron 182 muestras en total.

Se encontró presencia de la mutación BRAFV600E en 16 muestras (8.8%), de las cuales 10 contaron con resultado de citología benigno, 2 correspondieron a neoplasia folicular, 1 a resultado insatisfactorio, y 2 a carcinoma papilar (ver figura 5.11). Un paciente no se incluye puesto que no se cuenta con resultado de citología. Las características de los pacientes se mencionan en la tabla 5.6.

Figura 5.11. Barras de frecuencias del estado mutacional de las muestras según resultado de citología (incluye las muestras con y sin reporte de Bethesda).

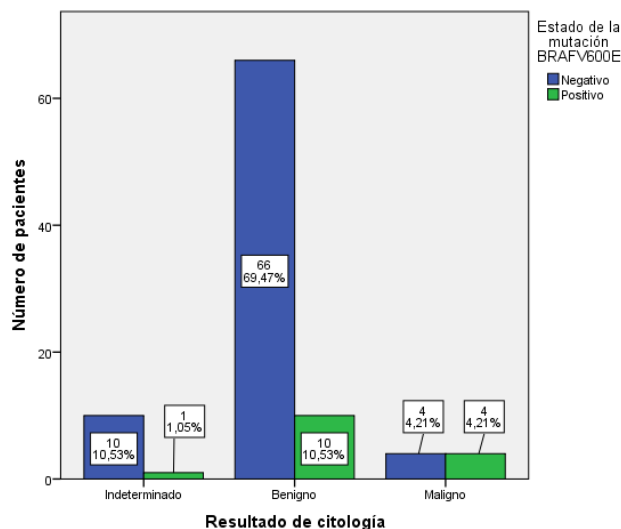


Tabla 5.6. Características de los pacientes con mutación BRAF positiva.

Paciente	Edad	Sexo	Prueba positiva	Citología	Cirugía	Patología
2A	48	F	RTPCR	Bocio hiperplásico quístico	No	N/A
21	70	F	RTPCR	Bocio quístico	No	N/A
27	67	F	RTPCR	Bocio coloide	No	N/A
29	69	F	RTPCR	Bocio coloide	No	N/A
30	49	F	RTPCR, Sanger (Variante K601E)	Neoplasia folicular	Si	Nódulo escleroso calcificado sin malignidad
32	41	F	RTPCR, Sanger	Células foliculares monomorfas, linfocitos, coloide	No	N/A
35A	63	F	RTPCR	Células monomorfas dispuestas en grupos sobre matriz proteínica y hemorrágica, sugestiva de coloide, esporádicos histiocitos	No	N/A
37	61	F	RTPCR	Bocio coloide	No	N/A
45	86	F	RTPCR	Nódulo coloide	No	N/A
46B		F	RTPCR, Sanger	Bocio coloide nodular	No	N/A
47A	36	F	RTPCR	Linfocitos, leucocitos. Ausencia de malignidad	No	N/A
59	42	F	Sanger	Carcinoma papilar	Si	Carcinoma papilar
105	36	M	Sanger	Carcinoma papilar	No*	N/A
115	24	F	Sanger	Neoplasia folicular	Si	Microcarcinoma papilar
130	29	F	Sanger (Variante K601E)	Insatisfactorio	No	N/A

*Este paciente no ha sido llevado a cirugía por presentar crisis miasténica.

Dos muestras tuvieron una mutación BRAF positiva, con una variante K601E (Rs121913364) (figura 5.12), y en una de ellas se encontró además, una variante V600V, en la que se produce un cambio de una guanina por una timina (c.1800G>T, COSM1578949) (figura 5.13).

Figura 5.12. Secuenciación de la muestra 30, donde se evidencia una señal de guanina en la posición 1801 (c.1801A>G, K601E).

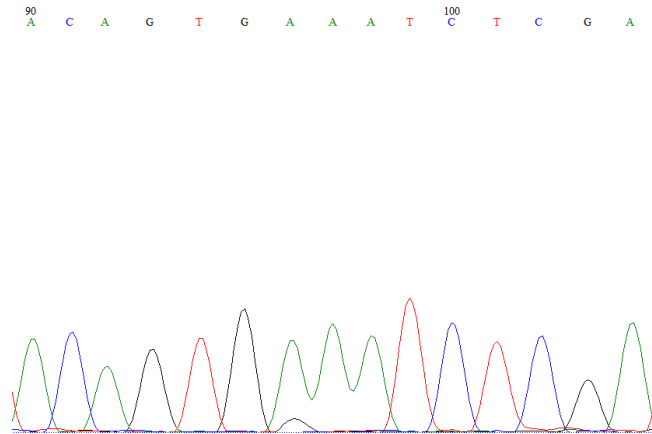
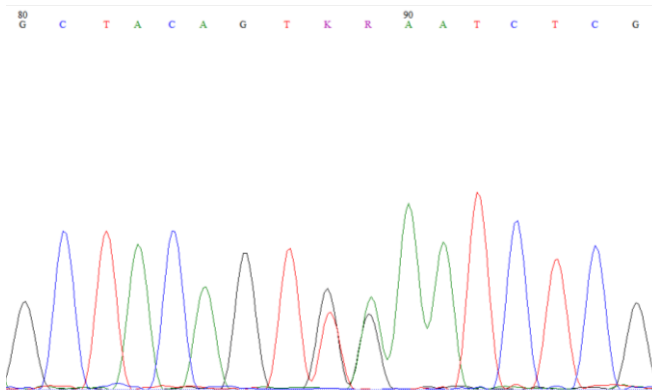


Figura 5.13. Secuenciación de la muestra 130, donde se evidencia una variante K601E, y una variante V600V, en la que se produce un cambio de una guanina por una timina (c.1800G>T, COSM1578949).



5.3.5 Relación entre el estado de la mutación y el diagnóstico citológico.

Se hizo una correlación entre el estado de la mutación BRAFV600E y características clínicas y patológicas de la muestra, como edad, sexo, antecedente de enfermedad tiroidea, tamaño del nódulo, características ecográficas, y resultado de ACAF según resultado benigno o maligno. La tabla 5.7 muestra esta correlación.

Tabla 5.7. Correlación entre el estado de la mutación BRAFV600E y las características clínicopatológicas del nódulo tiroideo.

Característica	BRAF negativo	BRAF positivo	Total	Valor P ^a
Edad (años) ^b	n = 165	n = 16	n = 181	0.432
<45	56 (33.9%)	7 (43.8%)	63 (34.8%)	
>45	109 (66.1%)	9 (56.3%)	118 (65.2%)	
Sexo ^b	n = 166	n = 16	n = 182	0.578
M	15 (9%)	1 (6,3%)	16 (8.8%)	
F	151 (91%)	15 (93,8%)	166 (91.2%)	
Antecedente de enfermedad tiroidea ^b	n = 133	n = 13	n = 146	0.002
No	70 (52.6%)	1 (7.7%)	71 (48.6%)	
Si	63 (47.4%)	12 (92.3%)	75 (51.4%)	
Tamaño nódulo (mm) ^b	n = 114	n = 15	n = 129	0.422
< 10	22 (19.3%)	5 (33.3%)	37 (20.9%)	
10-39	86 (75.4%)	9 (60%)	95 (73.6%)	
> 40	6 (5.3%)	1 (6.7%)	7 (5.4%)	
Características ecográficas de malignidad ^b	n = 145	n = 16	n = 161	0.013
Sin características	64 (44.1%)	3 (18.8%)	67 (41.6%)	
1 característica	45 (31%)	3 (18.8%)	48 (29.8%)	
2 características	25 (17.2%)	6 (37.5%)	31 (19.3%)	
3 o más características	11 (7.6%)	4 (25%)	15 (6.8%)	
ACAF ^b	n = 80	n = 15	n = 95	0.02
Benigno	66 (82.5%)	10 (66.7%)	76 (80%)	
Maligno	4 (5%)	4 (26.7%)	8 (8.4%)	
Indeterminado	10 (12.5%)	1 (6.7%)	11 (11.6%)	

a. Significancia estadística $P < 0.05$.

b. Los valores de n varían, debido a la falta de datos disponibles para cada ítem de la primera columna.

Se tomaron además las lecturas de citología que contaron con clasificación Bethesda para su correlación con el estado mutacional. La tabla 5.8 muestra la prevalencia de la mutación BRAFV600E en 66 muestras de ACAF discriminados por clasificación Bethesda.

Tabla 5.8. Correlación entre el estado de la mutación BRAFV600E con el resultado de citología clasificada mediante Bethesda.

Bethesda	Estado de la mutación BRAFV600E		Valor P ^a
	Positivo	Negativo	
I	1 (10%)	11 (19.6%)	0.008
II	5 (50%)	41 (73.2%)	
III	0	0	
IV	0	1 (1,8%)	
V	4 (40%)	2 (3,6%)	
VI	0	1 (1,5%)	
Total	10 (15.2%)	56 (84.8%)	

a. Likelihood ratio: 0.041

De las 16 muestras con mutación positiva, cuatro fueron clasificados como malignas, y tres de ellas fueron llevados a cirugía. Uno tuvo como resultado nódulo esclerosado sin malignidad (la muestra con variante K601E), otro tuvo carcinoma papilar, y el tercero tuvo microcarcinoma papilar variante clásica. Un cuarto paciente diagnosticado con carcinoma papilar no ha sido llevado a cirugía por presentar una crisis miasténica. Ninguno de los pacientes con diagnóstico benigno y con mutación positiva ha sido llevado a cirugía.

4 muestras con diagnóstico citológico maligno tuvieron mutación negativa, tres con diagnóstico de carcinoma papilar, y uno con diagnóstico de carcinoma folicular. De estos pacientes, se encuentra una paciente con carcinoma folicular que a la fecha no ha sido operada, y de los otros cuatro pacientes no se cuenta con la patología. Otras 4 muestras con ACAF maligno tuvieron un resultado no interpretable.

6. Capítulo 6 – Discusión

6.1 Acerca de la población estudiada

Este estudio es una primera aproximación al uso de marcadores moleculares en muestras de aspirado tiroideo para el diagnóstico de cáncer de tiroides, llevado a cabo en Colombia. Los propósitos de este estudio son probar una técnica apta para detectar la mutación BRAFV600E en aspirado de nódulo tiroideo y determinar su prevalencia, de tal forma que se pueda utilizar como herramienta diagnóstica adicional a la biopsia por aspiración con aguja fina de nódulo tiroideo.

La población reclutada en este estudio tiene parámetros similares a las poblaciones reportadas en el mundo, con una frecuencia de mujeres mayor a la frecuencia de hombres, y un número mayor de individuos mayores de 45 años. La incidencia calculada de cáncer de tiroides en esta muestra fue del 9%, y la distribución según tipo de cáncer fue del 54,4% para carcinoma papilar y 45.5%. Hay que tener en cuenta que estos valores están basados en resultados de citología, por lo que solo se puede hacer una inferencia de la incidencia de cáncer tiroideo.

Es importante considerar la alta proporción de cáncer folicular obtenido en esta muestra, puesto que la incidencia de carcinoma folicular es menor del 10% de la totalidad de los cánceres tiroideos en población sin carencia de yodo, y del 25 al 40% en población con deficiencia de yodo¹²⁵. El cáncer folicular se asocia a baja ingesta de yodo en la dieta, y a hipotiroidismo, mientras que el carcinoma papilar se asocia con una dieta rica en yodo. En general Colombia es un país cuyos parámetros dietarios respecto a la ingesta de yodo han sido intervenidos desde 1948, con el inicio de la yodación de la sal de uso dietético en el país¹²⁶. Actualmente, la prevalencia de bocio depende de la región estudiada. En Atlántico es de 2.5%, mientras que en Antioquia es de 5.6%, con una prevalencia de deficiencia de yodo (cuantificada como una concentración de yodo en orina menor de 100ug/L) en el Atlántico de 4.2 y en Antioquia de 11.8 (Vitamin and Mineral Nutrition Information System, World Health Organization, 2006). Otro factor a tener en cuenta es la elevada incidencia de hipotiroidismo y bocio multinodular en la muestra observada: 44.6%. Puede inferirse que, siendo un país cuyas regiones tienen deficiencia de yodo, se puede observar un aumento de la incidencia de carcinoma folicular respecto a otros países con suplencia de yodo adecuada. La limitación de la determinación de los tipos de carcinoma en este estudio radica en que los datos se basan en los resultados de citología, y la muestra baja obtenida de resultados de patología.

Al realizar una correlación entre las características clínicas y patológicas de la población con el estado de la mutación BRAFV600E, se encontró que no hay relación estadísticamente significativa entre el estado de la mutación y la edad, el sexo, y el tamaño del nódulo, mientras que se encontró una relación estadísticamente significativa entre el antecedente de enfermedad tiroidea y la presencia de la mutación BRAFV600E, así como entre las características ecográficas sugestivas de malignidad y el resultado de ACAF benigno o maligno con la presencia de la mutación.

En este estudio, el 1.4% de los pacientes que no tienen enfermedad tiroidea tienen mutación positiva, mientras que el 13% de los pacientes con enfermedad tiroidea tienen mutación positiva ($P = 0.005$). El 22.8% de los pacientes tuvieron hipotiroidismo como antecedente de enfermedad tiroidea, y está claro que la TSH elevada al momento del diagnóstico de nódulo tiroideo es un factor de riesgo independiente para carcinoma de tiroides²⁰, lo que puede explicar esta relación.

La relación entre el estado mutacional y el resultado de citología es estadísticamente significativo. En el caso del resultado de citología, se encontró que el 13.2% de los pacientes con citología benigna tuvieron mutación positiva, mientras que el 42.9% de los pacientes con citología maligna tuvieron mutación positiva. La asociación entre malignidad y estado mutacional positivo es evidente, sin embargo, se encontró que seis pacientes con citología benigna tenían BRAFV600E positivo en PCR, y dos pacientes con citología benigna tenían BRAFV600E positivo tanto en PCR como en secuenciación, pero dado que no se obtuvieron suficientes resultados de patología de pieza quirúrgica no es posible determinar la fuerza de esta asociación.

La probabilidad de que estos resultados sean falsos positivos es baja, dado que la mutación fue detectada en tres pacientes con dos pruebas con sensibilidades diferentes. Un estudio¹²⁷ que utilizó PCR multiplex mostró que 13 pacientes con mutación positiva fueron llevados a cirugía, encontrándose 9 pacientes con carcinoma papilar de tiroides. También reportaron 5 falsos positivos, que según los autores, se derivaba de poner un punto de corte muy bajo en la técnica. Es necesario, por tanto, determinar con una muestra más grande, y con correlación de la mutación en muestras de patología, un punto de corte específico para mejorar la sensibilidad de la prueba.

Hay que tener en cuenta que ambas pruebas, tanto la detección de la mutación BRAFV600E como la lectura de citología son pruebas que son poco sensibles, pero muy específicas. En el caso de la lectura de la citología, al ser una prueba poco sensible (sensibilidad media: 83%), muy específica (especificidad media 92%)³⁰, y ser operador dependiente, pueden obtenerse falsos negativos, asociados además con la calidad de la muestra. Desafortunadamente no se contó con la infraestructura para poder realizar una segunda observación de estas muestras para el momento de la presentación de este trabajo, pero se recomienda realizar una segunda revisión a la citología de los pacientes con mutación BRAFV600E positiva.

Los pacientes con resultado de ACAF benigno no se han llevado a cirugía por el resultado mismo de la citología. Por tal motivo, no se pudo evaluar la precisión de la prueba, ya que la prueba *gold standard* para el diagnóstico de cáncer tiroideo es la patología de la pieza quirúrgica. Sin embargo, se le dieron indicaciones precisas al paciente para dar a conocer este resultado a su médico tratante, y definir una conducta posterior a criterio del mismo.

Las pruebas evaluadas, PCR en tiempo real y Secuenciación Sanger, han mostrado ser técnicas precisas para detectar la mutación BRAF, aunque la correlación entre estas dos pruebas fue muy baja (Kappa 0.1). De las muestras positivas detectadas por PCR en tiempo real, solo tres fueron detectadas por secuenciación. La proporción de muestras positivas detectadas por PCR fue mayor que las detectadas por secuenciación. De las cinco muestras detectadas por secuenciación, cuatro son carcinomas papilares, y uno tiene resultado indeterminado. Podría concluirse que la técnica de secuenciación tiene un mayor número de falsos negativos, dado que no detecta en su totalidad las muestras positivas para PCR, pero si permite detectar mutaciones distintas a BRAFV600E. Esto ha sido reportado previamente en melanoma¹²⁸. No obstante, es necesario hacer la relación con el resultado definitivo de patología.

Por otra parte, no fue posible determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba, debido a la falta de resultados de patología, por pérdida de contacto con los pacientes, o por no haber sido operados aún. Se debe hacer seguimiento a estos casos por medio de la EPS (Empresa Promotora de Salud), quienes conservan los datos de estos pacientes, y así, evaluar su evolución posterior.

Aunque la mutación BRAFV600E se asocia casi que exclusivamente a carcinoma papilar, lo que significa que al tener un resultado negativo, no descarta por completo que una muestra indeterminada sea cáncer, de tal manera que se está implementando el uso de otros marcadores para aumentar la sensibilidad de la prueba, por ejemplo, KRAS y los rearrreglos RET, así, el paciente se beneficiaría al realizarse estas tres pruebas, dado que el porcentaje de carcinoma folicular que portan la mutación de BRAFV600E es menos del 10%, mientras que KRAS se detecta hasta en el 50% de carcinomas foliculares.

6.2 BRAFK601E

Esta mutación ha sido detectada en un caso de adenoma folicular¹²⁹; en tres casos de carcinoma papilar de tiroides variante folicular¹³⁰; un carcinoma folicular (asociado a una mutación activadora de *PKI3CA*)¹³¹; en melanoma¹³²; en carcinoma de colon¹³³; y en un carcinoma papilar multifocal en el que se observaron dos focos de carcinoma papilar con mutación BRAFV600E, y un foco encapsulado de carcinoma papilar variante folicular con mutación K601E.

Un estudio¹³⁴ describe las características de una serie de 29 tumores con mutación K601E, de los cuales 27 casos (93%) fueron carcinomas papilares, y de ellos, 20 casos fueron de variante folicular, todos menos uno encapsulado. Además, al evaluar el diagnóstico citológico en 23 casos, se encontró un diagnóstico de neoplasia folicular (Bethesda IV) en 12 casos, 10 casos de atipia de significado indeterminado (Bethesda III), y un caso Bethesda II (benigno). En el seguimiento de estos pacientes se encontró que ninguno de ellos presentó recurrencias o metástasis. Esto sugiere que la mutación BRAFK601E no tiene el mismo potencial de malignidad que su contraparte BRAFV600E, y por tanto, los autores consideran que los pacientes con nódulo tiroideo que porten la mutación K601E podrían ser manejados con tiroidectomía. Por el momento, se requieren más estudios para determinar el potencial maligno de esta mutación.

Con relación a la variante V600V, se ha descubierto en tumores cuyo cambio en la posición 1800 es de una guanina por una adenina (c.1800G>A), que en tiroides se asocia con un tumor

anaplásico¹³⁵, y en melanoma es no respondiente a tratamiento con inhibidores de BRAF¹³⁶. No se ha descrito hasta el momento la variante c.1800G>T, por lo que se desconoce su potencial maligno.

6.3 Carcinoma de tiroides en la población pediátrica

El nódulo tiroideo es una condición poco frecuente en niños, y su manejo difiere en gran medida del manejo dado a la población adulta. Tiene una incidencia de 2.4/100,000 niños menores de 20 años, con una proporción mujer:hombre de 1.5:1¹³⁷. Además, la proporción de nódulos tiroideos que terminan en cáncer en niños es de hasta el 25%¹³⁸. Sin embargo, el pronóstico de estos tumores suele ser mucho mejor comparado con los tumores tiroideos en el adulto, puesto que la gran mayoría de estos tumores son bien diferenciados¹³⁹.

Cinco pacientes en este estudio tuvieron edad menor a 20 años (una paciente de 17 años, tres pacientes de 12 años y una paciente de 13 años). Todas fueron mujeres. Dos de ellas presentaron diagnóstico de neoplasia folicular, una tuvo diagnóstico de tiroiditis linfocítica, y una de nódulo hiperplásico. No se dispuso del resultado de citología de la quinta paciente. Ninguna de las pacientes tuvo presencia de la mutación BRAFV600E en el aspirado tiroideo.

Respecto a la mutación BRAFV600E, la incidencia es mucho menor que en la población adulta (6-7% de los PTC)¹³⁷, pero es la mutación en *BRAF* más frecuentemente encontrada, no obstante, un estudio revela que son más frecuentes los rearrreglos RET/PTC, y eso podría explicar la naturaleza menos agresiva de los carcinomas papilares. En otro estudio¹⁴⁰ se encontró que no se relaciona con un peor pronóstico, y se presenta preferentemente en hombres.

Se requieren estudios adicionales para determinar la incidencia de la mutación BRAFV600E y otros tipos de mutaciones en la población pediátrica.

6.4 Otras consideraciones.

Es relevante mencionar el hecho de que varios pacientes con diagnóstico de carcinoma de tiroides por ACAF no hayan sido operados aún. Desafortunadamente, el sistema de salud que rige actualmente tiene falencias marcadas, una de ellas, el tiempo prolongado entre el diagnóstico de cáncer y su tratamiento. Si bien el carcinoma de tiroides es una neoplasia que tiene un buen pronóstico, puesto que suele detectarse en estadios tempranos, es imperativo que el tiempo que transcurre entre el diagnóstico y el tratamiento no sea tan prolongado: los pacientes tienen 10 meses de haber sido diagnosticados.

Específicamente en este estudio, muchos de los reportes de ACAF no contaron con una clasificación como la de Bethesda, que permite determinar la calidad de la muestra y su potencial de ser interpretada, lo cual limitó en gran medida una adecuada categorización de las muestras. Un resultado que mencione “ausencia de malignidad” puede brindar calma tanto al paciente como al médico tratante, sin embargo, no significa que esta muestra no sea óptima para ser leída, y por tanto, se puede considerar un falso negativo el dar un resultado benigno, o un falso positivo dar un resultado maligno. La categorización hecha de los resultados de ACAF

en este estudio puede que influyan en las correlaciones entre ACAF y resultado maligno, y entre los resultados entre las técnicas de PCR y secuenciación.

7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

Este estudio permitió hacer un acercamiento inicial a la incidencia de la mutación BRAFV600E en nódulo tiroideo en la población colombiana, siendo a la fecha el primero que se realiza en Latinoamérica, una población catalogada como deficiente en yodo.

Se encontró una frecuencia similar entre el diagnóstico de carcinoma papilar y carcinoma folicular determinado por ACAF, lo cual es contradictorio con lo reportado en la literatura.

Se evaluó dos test para la detección de la mutación BRAFV600E (PCR en tiempo real y secuenciación), los cuales mostraron una concordancia muy baja entre sí.

Se encontraron 3 muestras con ACAF benigno portadoras de mutación BRAFV600E confirmada por las dos técnicas utilizadas.

Se encontraron dos pacientes con mutación K601E, y una de ellas con una variante adicional (C.1800G>T), de significado indeterminado, siendo la primera variante reportada a nivel mundial.

No fue posible determinar la sensibilidad y especificidad de las pruebas evaluadas, por la falta de datos de patología.

7.2 Recomendaciones y perspectivas

Se requiere tanto estudios adicionales como seguimiento a largo plazo de los pacientes que participaron en este estudio, con el fin de determinar el comportamiento de la mutación BRAFV600E en la población colombiana.

Se recomienda realizar estudios similares, usando marcadores genéticos como RAS y rearrreglos RET, que puedan ser usados en aspirado de nódulo tiroideo, y que puedan afinar el diagnóstico de cáncer de tiroides, de tal forma que puedan ser usados como complemento en los resultados indeterminados de ACAF.

Es ideal que la detección de la mutación BRAFV600E en aspirado de nódulo se pueda realizar en el mismo sitio donde se pueda hacer la lectura de citología y, en el caso que el paciente lo requiera, se haga la lectura de patología del espécimen, con el fin de dar continuo seguimiento a estos pacientes. En caso de no ser posible, se debe entablar una red de información fluida

66 Presencia de la mutación BRAFV600E en nódulos tiroideos, y su relación con el diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides

entre los servicios de radiología, patología y cirugía, con este mismo fin. Es además necesario, un cambio de fondo en el sistema de salud colombiano, que permita que pacientes con diagnóstico de cáncer accedan de forma temprana al tratamiento, con el fin de reducir el riesgo de recurrencia por tratamiento tardío.

A. Anexo 1. Consentimiento informado.

PRESENCIA DE LA MUTACIÓN *BRAFV600E* EN NÓDULOS TIROIDEOS, Y SU RELACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE CARCINOMA DE TIROIDES.

Bogotá D.C.

Fecha: _____

Yo _____, identificado(a) con _____ No _____ de _____, a nombre propio o en calidad de representante legal del paciente _____, autorizo (en cumplimiento de los artículos 11 y 15 de la resolución 008430 de 1993, expedida por la Dirección de Desarrollo Científico y Tecnológico del Ministerio de Salud) participar en la investigación denominada **PRESENCIA DE LA MUTACIÓN *BRAFV600E* EN NÓDULOS TIROIDEOS, Y SU RELACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE CARCINOMA DE TIROIDES**, la cual tiene como propósito estudiar la mutación en el gen ***BRAF*** en pacientes con nódulo tiroideo, como es mi caso.

Comprendo que mi participación en esta investigación tendrá un interés inmediato, puesto que el encontrar o no una mutación en este gen podrá ser de utilidad para establecer el riesgo de padecer cáncer de tiroides en mí. Por esta razón, los resultados de esta investigación me serán entregados personalmente y por su importancia para el seguimiento, a mi médico tratante. Adicionalmente con los resultados recibiré asesoramiento con el médico endocrinólogo.

Igualmente se me ha informado la garantía de confidencialidad y la reserva de mi identidad, que no recibiré beneficios económicos, ni de otro tipo, y que puedo retirarme del estudio cuando lo desee, sin que esto tenga ninguna consecuencia sobre el manejo para mí.

Por lo tanto, **declaro** que he sido informado de los riesgos del procedimiento, que me han explicado las posibles alternativas y que sé que, en cualquier momento, puedo anular mi consentimiento.

Estoy satisfecho(a) con la información recibida, he podido formular toda clase de preguntas que he creído convenientes, y me han aclarado todas las dudas planteadas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para realizar la extracción de material celular adicional mediante la punción Aspiración con Aguja Fina (ACAF), por personal calificado en _____ para su posterior análisis de DNA. Adicional a ello, en el caso que yo requiera una intervención quirúrgica para remover el tiroides, doy mi consentimiento para realizar la revisión de los resultados de histopatología.

Nombre del paciente: _____

Firma del Paciente o Representante Legal.

Cédula de Ciudadanía

B. Anexo 2. Formato de recolección de datos.

<p style="text-align: center;">PRESENCIA DE LA MUTACIÓN BRAFV600E EN NÓDULOS TIROIDEOS, Y SU RELACIÓN CON EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO Y ANATOMOPATOLÓGICO DE CARCINOMA DE TIROIDES</p> <p style="text-align: center;">Maestría en Genética Humana – Universidad Nacional de Colombia Formato de recolección de datos versión 1.0</p>	
Fecha de diligenciamiento:	Consecutivo:
1. Información del paciente	
1.1 Nombre:	
1.2 Identificación:	1.3 Edad:
1.4 Sexo: F ____ M ____	1.5 Ocupación:
1.6 Lugar de nacimiento:	1.7 Lugar de procedencia:
1.8 Teléfono(s) de contacto:	
2. Indicación de ACAF	
2.4 Diagnóstico previo de cáncer de tiroides: SI ____ NO ____	

3.8 Características ecográficas presentes (marque con una X las que se encuentren reportadas en el informe de ecografía):			
3.8.1 Microcalcificaciones		3.8.2 Nódulo Hipoecoico	
3.8.3 Vascularidad aumentada		3.8.4 Márgenes infiltrativos	
3.8.5 Ausencia de halo ecogénico		3.8.6 Altura mayor que ancho	
3.11 Diagnóstico:			
4 Antecedentes personales			
4.1 Enfermedad tiroidea: SI _____ NO _____		4.2 ¿Cuál?:	
4.5 Exposición a radiación: SI _____ NO _____			
4.6 Antecedente familiar de cáncer de tiroides: SI _____ NO _____			
4.7 Familiar(es) afectado(s):			
7 Aspiración Con Aguja Fina (ACAF) – Obtención de muestra			
7.1 Fecha:	7.2 Institución:	7.3 Radiólogo:	
7.4 Diagnóstico:			
7.5 Número de nódulos:	7.6 Tamaño del nódulo mayor:	7.7 Nódulos puncionados:	
7.8 Presencia de nódulos linfáticos: SI _____ NO _____		7.9 Número de nódulos linfáticos puncionados:	
7.10 Número de punción de obtención de muestra :		7.11 Número total de punciones:	
Formato diligenciado por			
Nombre			
Institución			

C. Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN mediante fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.

Preparado por Johanna Morantes y Sandra Perdomo. Revisado por Fabio Aristizábal. Con modificaciones.

Procesamiento de la muestra

1. Centrifugue los tubos eppendorf 10 minutos a 5000 rpm a 4°C
2. Elimine por inversión el sobrenadante.
3. Adicione buffer de lisis de los glóbulos rojos frío hasta completar 1 mL, mezcle por inversión (4 o 5 veces) y colóquelo en el congelador -20 °C por 5 minutos.
4. Centrifugue por 3 minutos a 10 000 rpm a 4°C
5. Eliminar el sobrenadante por inversión del tubo teniendo cuidado de no remover el pellet.
6. Repetir los pasos 3, 4 y 5 dos veces más.
7. En este punto usted puede almacenar a -80°C el pellet para posterior extracción del ADN usando el método de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
8. Si decide almacenar las células asegúrese de que el pellet se almacene con el menor contenido de líquido posible (Pellet seco).

Tratamiento con proteinasa K

1. Resuspenda el pellet en 200 ul Buffer proteinasa K y adicione 20 ul de Proteinasa K (20mg/mL).
2. Mezcle por inversión

3. Incube a 56°C por una hora
4. Inactive la enzima incubando a 95°C por 5 minutos

Extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1)

1. Adicione 200 uL de una mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) frío.
2. Vórtex por 5 minutos
3. Centrifugue por 10 minutos a 10.000 rpm
4. Transfiera la fase acuosa a tubo de 1,5 mL y adicione un volumen igual de cloroformo (aproximadamente 200 uL)
5. Vortex por 15 segundos
6. Centrifugue por 10 minutos a 10.000 rpm
7. Transfiera fase acuosa a tubo de 1,5 y proceda a precipitar el ADN

Precipitación de ADN

8. Adicione un 0,1 volumen de acetato de sodio 3M (pH 5,2) (FRIO) y 2 volúmenes de etanol al 100% frío.
9. Vortex por 15 segundos
10. Deje precipitando el ADN toda noche a -20°C o a - 80°C por una hora

Recuperación de ADN

11. Centrifugue por 10 minutos a 10.000 rpm
13. Retire el sobrenadante por inversión
14. Adicione 500 uL de etanol al 70% frío.
15. Mezcle por inversión
16. Centrifugue por 10 minutos a 10.000 rpm
17. Descarte el etanol por inversión
18. Deje secar a temperatura ambiente

19. Resuspenda el ADN en agua HPLC Esteril o Buffer TE

20. Cuantifique y almacene a -20°C

D. Técnica de aspirado con aguja fina de tiroides.

1. Paciente en posición decúbito dorsal.
2. Desinfección del área con clorhexidina.
3. Inserción de aguja fina calibre 23 unida a jeringa de 5 cc, en el área delimitada por ecografía.
4. Fijación de la aguja entre los dedos índice y pulgar.
5. Retracción del émbolo de la jeringa, al tiempo que se mueve la punta de la aguja de adelante hacia atrás y en distintas direcciones.
6. Previamente habiendo soltado el émbolo de la jeringa sin empujarlo, proceder a retirar la aguja.
7. Colocación de la punta de la aguja sobre la laminilla.
8. Empujar el émbolo.
9. Retirar la aguja de la jeringa y llenar ésta de aire.
10. Colocar nuevamente la aguja en la jeringa, poner la punta de la aguja sobre la laminilla, y empujar el émbolo.

Para la toma de la muestra para estudio genético:

1. Llenar una jeringa con 1 cc de solución salina normal estéril.
2. A ésta jeringa, colocar la aguja usada para el aspirado tiroideo.
3. Depositar la totalidad del lavado de la aguja en el tubo eppendorf con preservante de ácidos nucleicos.

E.Anexo 5. Carta del comité de Ética Médica EPS Coomeva.



Santiago de Cali, 26 de Agosto de 2014

Doctora
ANGELA MILENA MARTIN RIOS
Estudiante Maestría Genética Humana
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá D.C.

Cordial Saludo,

Una vez revisado el Proyecto: “**Presencia de la Mutación BRAFV600 en Nódulos tiroideos y su relación con el diagnóstico citológico y anatomopatológico de carcinoma de tiroides**” presentado por la Dra. Angela Milena Martin Rios, Estudiante de Maestría Genética Humana de la Universidad Nacional en el pasado comité de ética de la EPS realizado el 16 de Julio de 2.014, el comité de ética considera importante la temática de investigación abordada por este proyecto y aprueba la realización del mismo en la Institución, para lo cual se llevará a cabo la articulación con las áreas operativas para la adecuada ejecución del mismo.

Atentamente,

JOAS BENITEZ DUQUE
Jefe Nacional de Epidemiología
Coordinador Comité de Ética
Coomeva EPS

Bibliografía

1. Giusti F, Falchetti A, Franceschelli F, Marini F, Tanini A, Brandi ML. Thyroid Cancer: Current Molecular Perspectives. *J Oncol*. 2010;2010:1-17. doi:10.1155/2010/351679.
2. Melmed S, Polonski K, Larsen R, Kronenberg H. *Williams Textbook of Endocrinology*. Vol 308. 12th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2011.
3. Gosnell JE, Clark OH. Surgical approaches to thyroid tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(2):437-455, x. doi:10.1016/j.ecl.2008.02.002.
4. Tuttle RM, Leboeuf R, Martorella AJ. Papillary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007;36(3):753-778, vii. doi:10.1016/j.ecl.2007.04.004.
5. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(11):1167-1214. doi:10.1089/thy.2009.0110.
6. Marqusee E, Benson CB, Frates MC, et al. Usefulness of Ultrasonography in the Management of Nodular Thyroid Disease. *Ann Intern Med*. 2000;133(9):696-700. doi:200011070-00011 [pii].
7. Davies L, Randolph G. Evidence-Based Evaluation of the Thyroid Nodule. *Otolaryngol Clin North Am*. 2014;47:461-474. doi:10.1016/j.otc.2014.04.008.
8. Mortensen, JD; Woolner, Lewis B; Bennett WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *J Clin Endocrinol Metab*. 1955;15(October):1270-1280.
9. Asociación Colombiana de Endocrinología. Consenso colombiano para el diagnóstico y manejo de las enfermedades tiroideas. *Acta Médica Colomb*. 1999;24:159-174. <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-1999-06.pdf>.
10. Martin Berdasco F, Otero Ruiz E. Nódulos tiroideos. Incidencia en 1000 autopsias. *Rev la Fac Med*. 1972;38(1):66-72. <http://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/22066>.
11. Popoveniuc G, Jonklaas J. Thyroid Nodules. *Med Clin North Am*. 2012;96(2):329-349. doi:10.1016/j.mcna.2012.02.002.
12. Kung a WC, Chau MT, Lao TT, Tam SCF, Low LCK. The effect of pregnancy on thyroid nodule formation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1010-1014. doi:10.1210/jc.87.3.1010.
13. Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, Bülow I, Ovesen L, Jørgensen T. Risk factors for goiter and thyroid nodules. *Thyroid*. 2002;12(10):879-888. doi:10.1089/105072502761016502.
14. Dean DS, Gharib H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22(6):901-911. doi:10.1016/j.beem.2008.09.019.
15. Tan, Gerry H; Gharib, Hossein; Reading CC. Solitary Thyroid Nodule. Comparison between palpation and ultrasonography. *Arch Intern Med*. 1995;155:2418-2423.
16. Wilhelm S. Evaluation of Thyroid Incidentaloma. *Surg Clin North Am*. 2014;94(3):485-

497. doi:10.1016/j.suc.2014.02.004.
17. Jin J, McHenry CR. Thyroid incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26(1):83-96. doi:10.1016/j.beem.2011.06.004.
 18. Desser TS, Kamaya A. Ultrasound of Thyroid Nodules. *Ultrasound Clin.* 2009;4(2):87-103. doi:10.1016/j.cult.2009.04.007.
 19. Cramer JD, Fu P, Harth KC, Margevicius S, Wilhelm SM. Analysis of the rising incidence of thyroid cancer using the Surveillance, Epidemiology and End Results national cancer data registry. *Surgery.* 2010;148(6):1147-1153. doi:10.1016/j.surg.2010.10.016.
 20. Boelaert K, Horacek J, Holder RL, Watkinson JC, Sheppard MC, Franklyn JA. Serum Thyrotropin Concentration as a Novel Predictor of Malignancy in Thyroid Nodules Investigated by Fine- Needle Aspiration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(October):4295-4301. doi:10.1210/jc.2006-0527.
 21. Bomeli SR, LeBeau SO, Ferris RL. Evaluation of a Thyroid Nodule. *Otolaryngol Clin North Am.* 2010;43(2):229-238. doi:10.1016/j.otc.2010.01.002.
 22. Miller MC. The Patient with a Thyroid Nodule. *Med Clin North Am.* 2010;94(5):1003-1015. doi:10.1016/j.mcna.2010.05.001.
 23. Mchenry CR, Huh ES, Machekano RN. Is nodule size an independent predictor of thyroid malignancy? *Surgery.* 2008;144(6):1062-1069. doi:10.1016/j.surg.2008.07.021.
 24. McCoy KL, Jabbour N, Ogilvie JB, Ohori NP, Carty SE, Yim JH. The incidence of cancer and rate of false-negative cytology in thyroid nodules greater than or equal to 4 cm in size. *Surgery.* 2007. doi:10.1016/j.surg.2007.08.012.
 25. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: Predictive value of ultrasound and color-doppler features. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(5):1941-1946. doi:10.1210/jc.87.5.1941.
 26. Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, et al. Prevalence and Distribution of Carcinoma in Patients with Solitary and Multiple Thyroid Nodules on Sonography. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3411-3417. doi:10.1210/jc.2006-0690.
 27. Barroeta JE, Wang H, Shiina N, Gupta PK, Livolsi V a, Baloch ZW. Is fine-needle aspiration (FNA) of multiple thyroid nodules justified? *Endocr Pathol.* 2006;17(1):61-65. doi:10.1385/EP:17:1:61.
 28. Jin J, Wilhelm SM, McHenry CR. Incidental thyroid nodule: patterns of diagnosis and rate of malignancy. *Am J Surg.* 2009;197(3):320-324. doi:10.1016/j.amjsurg.2008.10.006.
 29. Frank L, Quint LE. Chest CT incidentalomas : thyroid lesions , enlarged mediastinal lymph nodes , and lung nodules. *Cancer Imaging.* 2012;12:41-48. doi:10.1102/1470-7330.2012.0006.
 30. Gharib H, Papini E. Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(3):707-735, vi. doi:10.1016/j.ecl.2007.04.009.
 31. Remonti LR, Kramer CK, Leita CB. Thyroid Ultrasound Features and Risk of Carcinoma : A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Thyroid.* 2015;25(5):538-550. doi:10.1089/thy.2014.0353.
 32. Henrichsen TL, Reading CC. Thyroid Ultrasonography. Part 2: Nodules. *Radiol Clin North Am.* 2011;49(3):417-424. doi:10.1016/j.rcl.2011.02.003.
 33. Nell S, Kist JW, Debray TPA, et al. Qualitative elastography can replace thyroid nodule fine-needle aspiration in patients with soft thyroid nodules . A systematic review. *Eur J Radiol.* 2015;84(4):652-661. doi:10.1016/j.ejrad.2015.01.003.

34. Filetti S, Durante C, Torlontano M. Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2(7):384-394. doi:10.1038/ncpendmet0215.
35. Russ G, Leboulleux S, Leenhardt L, Hegedüs L. Thyroid Incidentalomas: Epidemiology, Risk Stratification with Ultrasound and Workup. *Eur Thyroid J.* 2014;3(3):154-163. doi:10.1159/000365289.
36. Belfiore, A; Lucio La Rosa G. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001;30(2):361-400.
37. Baloch ZW, LiVolsi VA. Current role and value of fine-needle aspiration in nodular goitre. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(4):531-544. doi:10.1016/j.beem.2014.01.010.
38. Hassell L a., Gillies EM, Dunn ST. Cytologic and molecular diagnosis of thyroid cancers. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(1):7-17. doi:10.1002/cncy.20186.
39. Lundgren CI, Zedenius J, Skoog L. Fine-Needle Aspiration Biopsy of Benign Thyroid Nodules: An Evidence-Based Review. *World J Surg.* 2008;32(7):1247-1252. doi:10.1007/s00268-008-9578-9.
40. Hyun J, Kim YE. Effectiveness and Limitations of Core Needle Biopsy in the Diagnosis of Thyroid Nodules : Review of Current Literature. *J Pathol Transl Med.* 2015:230-235.
41. Choi SH, Baek JH, Lee JH, et al. Thyroid nodules with initially non-diagnostic, fine-needle aspiration results: comparison of core-needle biopsy and repeated fine-needle aspiration. *Eur Radiol.* 2014;24(11):2819-2826. doi:10.1007/s00330-014-3325-4.
42. Trimboli P, Nasrollah N, Guidobaldi L, et al. The use of core needle biopsy as first-line in diagnosis of thyroid nodules reduces false negative and inconclusive data reported by fine-needle aspiration. *World J Surg Oncol.* 2014;12(1):61. doi:10.1186/1477-7819-12-61.
43. Gharib H, Papini E, Paschke R, Duick DS, Valcavi R, Vitti P. AACE / AME / ETA Guidelines American Association of Clinical Endocrinologists , Associazione Medici Endocrinologi , and European Thyroid Association Medical Guidelines for Clinical Practice for the Diagnosis and Management of Thyroid Nodules. 16(June 2010):63-102.
44. Hahn SY, Shin JH, Han B-K, Ko EY, Ko ES. Ultrasonography-guided core needle biopsy for the thyroid nodule: does the procedure hold any benefit for the diagnosis when fine-needle aspiration cytology analysis shows inconclusive results? *Br J Radiol.* 2013;86(1025):20130007. doi:10.1259/bjr.20130007.
45. Cibas ES, Ali SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2009;132(5):658-665. doi:10.1309/AJCPPHLWMI3JV4LA.
46. Cibas ES. Fine-needle aspiration in the work-up of thyroid nodules. *Otolaryngol Clin North Am.* 2010;43(2):257-271. doi:10.1016/j.otc.2010.01.003.
47. Bongiovanni M, Krane JF, Cibas ES, Faquin WC. The atypical thyroid fine-needle aspiration: Past, present, and future. *Cancer Cytopathol.* 2012;120(2):73-86. doi:10.1002/cncy.20178.
48. Shi Y, Ding X, Klein M, et al. Thyroid fine-needle aspiration with atypia of undetermined significance: a necessary or optional category? *Cancer.* 2009;117(5):298-304. doi:10.1002/cncy.20039.
49. Al-Brahim N, Asa SL. Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(7):1057-1062. doi:10.1043/1543-2165(2006)130[1057:PTCAO]2.0.CO;2.
50. Kasper LH, Peter F, Gordon F, et al. *Harrison Principios de Medicina Interna Tomo 2.* 17th ed.
51. Monson JP. The epidemiology of endocrine tumours. *Endocr Relat Cancer.*

- 2000;7(1):29-36. doi:10.1677/erc.0.0070029.
52. Mantilla A, Vesga B, Insuasty J. Registro de cáncer, Unidad de Oncología, Hospital Universitario Ramón González Valencia, Bucaramanga, Colombia (1996 - 1999). *MedUNAB Rev la Fac Med la Univ Autónoma Bucaramanga*. 2006;9(1):14-19.
 53. Pardo C, Murillo RHR, Piñeros M, Castro MA. Casos nuevos de cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología, Colombia, 2002. *Rev Colomb Cancerol*. 2003;7(9):4-19.
 54. Pardo C, Cendales R. *Incidencia, Mortalidad Y Prevalencia de Cáncer En Colombia, 2007-2011*. Primera Ed. Bogota D.C.: Instituto Nacional de Cancerología - ESE; 2015. <http://www.urosario.edu.co/Universidad-Ciencia-Desarrollo/ur/Fasciculos-Anteriores/Tomo-I---2006/Fasciculo-12/ur/Cancer-en-Colombia/#.VmfC7YnhDIV>.
 55. Castro-Jimenez, Miguel; Lopez-Daza D. Estabilidad de la mortalidad por cáncer de tiroides en un país emergente. *Rev Salud Pública*. 2015;17(1):1-11. doi:<http://dx.doi.org/10.15446/rsap.v17n1.42209>.
 56. Arora N, Scognamiglio T, Zhu B, Fahey III TJ. Do Benign Thyroid Nodules Have Malignant Potential? An Evidence-Based Review. *World J Surg*. 2008;32(7):1237-1246. doi:10.1007/s00268-008-9484-1.
 57. Cabanillas ME, Dadu R, Hu MI, et al. Thyroid Gland Malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2015;29(6):1123-1143. doi:10.1016/j.hoc.2015.07.011.
 58. Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. Anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer*. 2005;103(7):1330-1335. doi:10.1002/cncr.20936.
 59. Chung K, Yang SK, Lee GK, et al. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAF600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;65(5):660-666. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02646.x.
 60. Kim SK, Kim D, Han HS. Pyrosequencing Analysis for Detection of a BRAF V600E Mutation in an FNAB Specimen of Thyroid Nodules. *Diagnostic Mol Pathol*. 2008;17(2):118-125.
 61. Jameson L. *Harrison's Endocrinology*. 2nd ed. (Fauci, Anthony; Braunwald, Eugene; Kasper, Dennis; Longo, Dan; Hauser, Stephen; Jameson, Larry; Loscalzo J, ed.). McGraw Hill Medical; 2010.
 62. Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Robbins Y Cotran: Patología Estructural Y Funcional*. 7th ed. Elsevier Saunders; 2005.
 63. Romero A, Cuervo-Martínez J, Osorio-Arango L, Olaya N. Histological variants and prognostic factors of papillary thyroid carcinoma at the National Cancer Institute of Colombia. *Biomedica*. 2015;35(3):429-436.
 64. Kato M a., Fahey TJ. Molecular Markers in Thyroid Cancer Diagnostics. *Surg Clin North Am*. 2009;89(5):1139-1155. doi:10.1016/j.suc.2009.06.012.
 65. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):245-262. doi:10.1677/erc.1.0978.
 66. Bhaijee F, Nikiforov YE. Molecular Analysis of Thyroid Tumors. *Endocr Pathol*. 2011;22(3):126-133. doi:10.1007/s12022-011-9170-y.
 67. Puxeddu E, Fagin JA. Genetic markers in thyroid neoplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001;30(2):493-513, x.
 68. Nikiforov YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(5):569-577. doi:10.1043/2010-0664-RAIR.1.
 69. Cassol CA, Asa SL. Molecular pathology of thyroid cancer. *Diagnostic Histopathol*. 2011;17(3):124-139. doi:10.1016/j.mpdhp.2010.12.006.
 70. Castellone MD, Santoro M. Dysregulated RET signaling in thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37(2):363-374, viii. doi:10.1016/j.ecl.2008.02.006.

71. Gilfillan CP. Review of the genetics of thyroid tumours: diagnostic and prognostic implications. *ANZ J Surg.* 2010;80(1-2):33-40. doi:10.1111/j.1445-2197.2009.05173.x.
72. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. Molecular biology of thyroid cancer initiation. *Clin Transl Oncol.* 2007;9(11):686-693. doi:10.1007/s12094-007-0125-1.
73. Wójcicka A, Kolanowska M, Jazdzewski K. Mechanism in Endocrinology: MicroRNA in diagnostics and therapy of thyroid cancer. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(3):R89-R98. doi:10.1530/EJE-15-0647.
74. Lee JC, Gundara JS, Glover A, Serpell J, Sidhu SB. MicroRNA expression profiles in the management of papillary thyroid cancer. *Oncologist.* 2014;19:1141-1147. doi:10.1634/theoncologist.2014-0135.
75. Mon SY, Hodak SP. Molecular Diagnostics for Thyroid Nodules. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014;43(2):345-365. doi:10.1016/j.ecl.2014.02.015.
76. Lodish H, Berk A, Kaiser C, Krieger M, Bretscher A. *Lodish Molecular Cell Biology.* 5th ed. W.H. Freeman; 2004.
77. Peyssonnaud C, Eychène a. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell.* 2001;93(1-2):53-62.
78. Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 2004;116:855-867. doi:10.1016/S0092-8674(04)00215-6.
79. Xing M. Recent Advances in Molecular Biology of Thyroid Cancer and Their Clinical Implications. *Otolaryngol Clin North Am.* 2009;41(6):1-10. doi:10.1016/j.otc.2008.07.001.Recent.
80. Zafon C, Obiols G. Vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica. *Endocrinol y Nutr.* 2009;56(4):176-186. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1575092209709829\files/181/1-s2.0-S1575092209709829-main.pdf>.
81. Ory S, Zhou M, Conrads TP, Veenstra TD, Morrison DK. Protein Phosphatase 2A Positively Regulates Ras Signaling by Dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on Critical 14-3-3 Binding Sites. *Curr Biol.* 2003;13(16):1356-1364. doi:10.1016/S0960-9822(03)00535-9.
82. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med.* 2013;19(11):1401-1409. doi:10.1038/nm.3392.
83. Puxeddu E, Durante C, Avenia N, Filetti S, Russo D. Clinical implications of BRAF mutation in thyroid carcinoma. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(4):138-145. doi:10.1016/j.tem.2007.12.003.
84. Kato M a, Fahey TJ. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. *Surg Clin North Am.* 2009;89(5):1139-1155. doi:10.1016/j.suc.2009.06.012.
85. Roskoski R. RAF protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;399(3):313-317. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.092.
86. Huang Z, Wu Y. [Mutation of the BRAF genes in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2012;15(3):183-186. doi:10.3779/j.issn.1009-3419.2012.03.09.
87. McCubrey J a, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Res.* 2007;1773:1263-1284. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.001.
88. McCubrey J a, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46(1):249-279. doi:10.1016/j.advenzreg.2006.01.004.
89. Kirschner LS, Qamri Z, Kari S, Ashtekar A. Mouse models of thyroid cancer: A 2015

- update. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;421:18-27. doi:10.1016/j.mce.2015.06.029.
90. Li X, Abdel-Mageed AB, Kandil E. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2012;5(4):310-315. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3443896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 91. Xing M. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. *Endocr Rev.* 2007;28(7):742-762. doi:10.1210/er.2007-0007.
 92. Segev DL, Umbricht C, Zeiger M a. Molecular pathogenesis of thyroid cancer. *Surg Oncol.* 2003;12(2):69-90. doi:10.1016/S0960-7404(03)00037-9.
 93. Hussain MRM, Shaik NA, Al-Aama JY, et al. In silico analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in human BRAF gene. *Gene.* 2012;508(2):188-196. doi:10.1016/j.gene.2012.07.014.
 94. Trovisco V, Soares P, Soares R, Magalhães J, Sá-Couto P, Sobrinho-Simões M. A new BRAF gene mutation detected in a case of a solid variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol.* 2005;36(6):694-697. doi:10.1016/j.humpath.2005.04.011.
 95. Sobrinho-Simões M, Máximo V, Rocha AS, et al. Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008;37(2):333-362, viii. doi:10.1016/j.ecl.2008.02.004.
 96. Franco AT, Malaguarnera R, Refetoff S, et al. Thyrotrophin receptor signaling dependence of Braf-induced thyroid tumor initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1615-1620. doi:10.1073/pnas.1015557108.
 97. Rosignolo F, Maggisano V, Sponziello M, et al. Reduced expression of THR β in papillary thyroid carcinomas: relationship with BRAF mutation, aggressiveness and miR expression. *J Endocrinol Invest.* 2015. doi:10.1007/s40618-015-0309-4.
 98. Turski ML, Brady DC, Kim HJ, et al. A Novel Role for Copper in Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Mol Cell Biol.* 2012;32(7):1284-1295. doi:10.1128/MCB.05722-11.
 99. Brady DC, Crowe MS, Turski ML, et al. Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. *Nature.* 2014;509(7501):492-496. doi:10.1038/nature13180.
 100. Knauf J a, Ma X, Smith EP, et al. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005;65(10):4238-4245. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0047.
 101. Kim CS, Zhu X. Lessons from mouse models of thyroid cancer. *Thyroid.* 2009;19(12):1317-1331. doi:10.1089/thy.2009.1609.
 102. Shimamura M, Nakahara M, Orim F, et al. Postnatal expression of BRAFV600E does not induce thyroid cancer in mouse models of thyroid papillary carcinoma. *Endocrinology.* 2013;154(11):4423-4430. doi:10.1210/en.2013-1174.
 103. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(2):216-222. doi:10.1097/01.pas.0000176432.73455.1b.
 104. Nakayama H, Yoshida A, Nakamura Y, et al. Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas. *Anticancer Res.* 2007;27(5B):3645-3649. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972530>.
 105. O'Neill CJ, Bullock M, Chou A, et al. BRAFV600E mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. *Surgery.* 2010;148(6):1139-1146.

- doi:10.1016/j.surg.2010.09.005.
106. Liu D, Liu Z, Condouris S, Xing M. BRAF V600E Maintains Proliferation, Transformation, and Tumorigenicity of BRAF-Mutant Papillary Thyroid Cancer Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(6):2264-2271. doi:10.1210/jc.2006-1613.
 107. Kim YH, Choi YW, Han JH, et al. TSH Signaling Overcomes B-RafV600E-Induced Senescence in Papillary Thyroid Carcinogenesis through Regulation of DUSP6. *Neoplasia.* 2014;16(12):1107-1120. doi:10.1016/j.neo.2014.10.005.
 108. Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF Mutation Predicts a Poorer Clinical Prognosis for Papillary Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6373-6379. doi:10.1210/jc.2005-0987.
 109. Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, De la Vieja A, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Res.* 2009;69(21):8317-8325. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1248.
 110. Romei C, Ciampi R, Faviana P, et al. BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(2):511-520. doi:10.1677/ERC-07-0130.
 111. Riesco-Eizaguirre G. The oncogene BRAFV600E 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):257-269. doi:10.1677/erc.1.01119.
 112. Barollo S, Pennelli G, Vianello F, et al. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with 131I and 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability. *Eur J Endocrinol.* 2010;163(4):659-663. doi:10.1530/EJE-10-0290.
 113. Gómez Sáez JM. Diagnostic and prognostic markers in differentiated thyroid cancer. *Curr Genomics.* 2011;12(8):597-608. doi:10.2174/138920211798120826.
 114. Hu S, Liu D, Tufano RP, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer.* 2006;119(10):2322-2329. doi:10.1002/ijc.22110.
 115. Basolo F, Torregrossa L, Giannini R, et al. Correlation between the BRAF V600E Mutation and Tumor Invasiveness in Papillary Thyroid Carcinomas Smaller than 20 Millimeters: Analysis of 1060 Cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(9):4197-4205. doi:10.1210/jc.2010-0337.
 116. Lee X, Gao M, Ji Y, et al. Analysis of Differential BRAFV600E Mutational Status in High Aggressive Papillary Thyroid Microcarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2009;16(2):240-245. doi:10.1245/s10434-008-0233-3.
 117. Eszlinger M, Paschke R. Molecular fine-needle aspiration biopsy diagnosis of thyroid nodules by tumor specific mutations and gene expression patterns. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;322:29-37.
 118. Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, et al. BRAF Mutation Analysis in Fine Needle Aspiration (FNA) Cytology of the Thyroid. *Diagnostic Mol Pathol.* 2006;15(3):136-143.
 119. Melck AL, Yip L, Carty SE. The utility of BRAF testing in the management of papillary thyroid cancer. *Oncologist.* 2010;15(12):1285-1293. doi:10.1634/theoncologist.2010-0156.
 120. Jia Y, Yu Y, Li X, et al. Diagnostic value of B-RAF V600E in difficult-to-diagnose thyroid nodules using fine-needle aspiration: Systematic review and meta-analysis. Pantanowitz L, ed. *Diagn Cytopathol.* 2014;42(1):94-101. doi:10.1002/dc.23044.
 121. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis

- and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):3390-3397. doi:10.1210/jc.2011-1469.
122. Miller S a., Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215.
123. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular Testing for Mutations in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(6):2092-2098. doi:10.1210/jc.2009-0247.
124. Applied Biosystems. Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR. *Appl Biosyst Doc.* 2003:1-8. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_042486.pdf.
125. McHenry CR, Phitayakorn R. Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *Oncologist.* 2011;16(5):585-593. doi:10.1634/theoncologist.2010-0405.
126. Victoria M, Angélica VRF, Chaves M. Políticas sanitarias y situación actual del Bocio Endémico : El caso de Colombia. *Rev la Fac Med la Univ Nac.* 2012;60(4):343-351.
127. Kim SW, Lee JI, Kim J-W, et al. *BRAF*^{V600E} Mutation Analysis in Fine-Needle Aspiration Cytology Specimens for Evaluation of Thyroid Nodule: A Large Series in a *BRAF*^{V600E} - Prevalent Population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(8):3693-3700. doi:10.1210/jc.2009-2795.
128. Lopez-Rios F, Angulo B, Gomez B, et al. Comparison of Testing Methods for the Detection of *BRAF* V600E Mutations in Malignant Melanoma : Pre- Approval Validation Study of the Companion Diagnostic Test for Vemurafenib. *PLoS One.* 2013;8(1):1-7. doi:10.1371/journal.pone.0053733.
129. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. *BRAF* mutations and *RET/PTC* rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of *PTC*. *Oncogene.* 2003;22(29):4578-4580. doi:10.1038/sj.onc.1206706.
130. Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, et al. *BRAF* mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol.* 2004;202(2):247-251. doi:10.1002/path.1511.
131. Pennelli G, Vianello F, Barollo S, et al. *BRAF*(K601E) mutation in a patient with a follicular thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2011;21(12):1393-1396. doi:10.1089/thy.2011.0120.
132. Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. *BRAF* and *RAS* Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma *BRAF* and *RAS* Mutations in Human Lung Cancer and Melanoma 1. 2002:6997-7000.
133. Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. *RAF/RAS* oncogenes and mismatch-repair status. *Nature.* 2002;418(August). doi:10.1038/418934a.
134. Afkhami M, Karunamurthy A, Chiosea S, et al. Histopathologic and Clinical Characterization of Thyroid Tumors Carrying the *BRAF* K601E Mutation. *Thyroid.* 2015;31(0):thy.2015.0227. doi:10.1089/thy.2015.0227.
135. Park JH, Kwon HJ, Park CS, Hong SW. Anaplastic transformation of papillary thyroid carcinoma in a young man: A case study with immunohistochemical and *BRAF* analysis. *Korean J Pathol.* 2014;48(3):234-240. doi:10.4132/KoreanJPathol.2014.48.3.234.
136. Monsma DJ, Cherba DM, Eugster EE, et al. Melanoma patient derived xenografts acquire distinct Vemurafenib resistance mechanisms. *Am J Cancer Res.*

- 2015;5(4):1507-1518.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101714>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4473327>.
137. Niedziela M. Thyroid nodules. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2014;28(2):245-277. doi:10.1016/j.beem.2013.08.007.
 138. Mussa A, De Andrea M, Motta M, Mormile A, Palestini N, Corrias A. Predictors of Malignancy in Children with Thyroid Nodules. *J Pediatr.* 2015;167(4):886-892. doi:10.1016/j.jpeds.2015.06.026.
 139. Jatana KR, Zimmerman D. Pediatric thyroid nodules and malignancy. *Otolaryngol Clin North Am.* 2015;48(1):47-58. doi:10.1016/j.otc.2014.09.005.
 140. Henke L, Perkins S, Pfeifer J, et al. BRAF V600E Mutational Status in Pediatric Thyroid Cancer Lauren. *Pediatr blood cancer.* 2014;61:1168-1172. doi:DOI 10.1002/pbc.24935.