

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**



TESIS DOCTORAL

**DIAGNÓSTICO PREOPERATORIO DE CARCINOMA PAPILAR DE
TIROIDES MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN
BRAF^{T1799A} EN CITOLOGÍAS DE TIROIDES OBTENIDAS MEDIANTE
PUNCIÓN Y ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA (PAAF)**

**Marisa Cañadas Garre
Granada, Junio 2010**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Marisa Cañadas Garre
D.L.: GR 3440-2010
ISBN: 978-84-693-5357-8

M^a INMACULADA ROSA MONTES RAMÍREZ, Profesora Titular del Departamento de Fisiología e Investigadora del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Granada
Y

JOSÉ MANUEL LLAMAS ELVIRA, Profesor Asociado de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, y Jefe de Servicio del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Universitario Virgen de las Nieves,

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación titulado:

“Diagnóstico preoperatorio de carcinoma papilar de tiroides mediante la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante punción y aspiración con aguja fina (PAAF)”

ha sido realizado por la Licenciada en Bioquímica D^a MARÍA LUISA CAÑADAS GARRE para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada, en el Departamento de Fisiología bajo nuestra dirección.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada, a 2 de junio de 2010.

Fdo.: M^a I. Rosa Montes Ramírez

Fdo.: José Manuel Llamas Elvira

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias al Dr. José Manuel Llamas Elvira, director de esta tesis, ya que sin su ilimitada visión de futuro y su tenaz persistencia por instaurar un Laboratorio de Biología Molecular en el contexto de un Servicio de Medicina Nuclear, habría sido imposible iniciar esta investigación. Gracias por la confianza depositada para desarrollar este trabajo, así como todos los medios puestos a mi alcance para poder llevarlo a cabo. Gracias por creer en mí desde el principio, hasta convencerme incluso a mí misma.

A la Dra. M^ª I. Rosa Montes Ramírez, también directora de esta tesis, sin cuya colaboración habría sido materialmente imposible llevar esta tesis a su consecución. Gracias por la dedicación personal, gracias por todo el tiempo invertido. Gracias por su paciencia infinita con mis dudas citológicas y pronósticas. Gracias por “meter la pata” en el momento gammagráfico preciso!! Voy a echar mucho de menos nuestras sinfonías de teclado a 4 manos (no así el mollete-martillo)...

A los adjuntos del Servicio de Medicina Nuclear, tanto con los que he tenido la oportunidad de compartir este trabajo como los que no han participado directamente, porque siempre han estado dispuestos a dedicarme el tiempo necesario, incluso sacrificando el de sus propias líneas de investigación. En especial, a la Dra. M^ª Angustias Muros de Fuentes, por su colaboración en esta investigación, y por su revisión de la tesis. Al Dr. Manuel Gómez Río, por su apoyo incondicional durante todo el trayecto, por su visión crítica de mis datos, y de la vida en general.

Al equipo de enfermería del Servicio de Medicina Nuclear, con una mención especial a las supervisoras, Lales y Yolanda, por su paciencia con mis peticiones de material. A todos los demás integrantes del Servicio de Medicina Nuclear, que me acogieron desde el primer día como una más, que en todo momento han tenido una palabra amable, y que han hecho la convivencia nuclear-molecular mucho más fácil y agradable.

A todos los componentes de la Unidad de Tiroides del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), gracias por adoptarnos tanto a mí como a nuestro *braf* como parte importante del protocolo de estudio del nódulo tiroideo en este hospital.

Al equipo de endocrinos de este hospital, sin cuya confianza, espíritu innovador y afán de superación no habríamos podido emprender una cohorte de pacientes a gran escala. Gracias a su capacidad de adaptación a las nuevas técnicas y rutinas ha sido posible contar con los pacientes y las muestras para este análisis. Al Dr. Martín López de la Torre Casares, por convertirse en mi “enviado de *braf*” tantas veces, por solucionarme tantas dudas tiroideas, que nunca acaban, y por iniciar junto con el Dr. Carlos García Calvente la recogida de pacientes para el estudio de *braf* en citologías. Al Dr. Ricardo Vílchez Joya, por ser el fan nº1 de *braf*. Al Dr. Gonzalo Piédrola Maroto y a la Dra. Teresa Muros de Fuentes, y a todos los demás, gracias por vuestros esfuerzos con los pacientes positivos, y en especial a la Dra. Susana Céspedes Mas, por sufrir el primer *braf* positivo y sobrevivir a ello, aunque las dos quedáramos marcadas de por vida!... Gracias, gracias, gracias, porque sin vuestra voluntad, dedicación y esfuerzo no habríamos podido completar estos casi 5 años de pacientes.

A la Dra. Patricia Becerra Massare, patóloga adscrita a la Unidad de Tiroides, porque sin su total abnegación en la revisión de muestras citológicas y en parafina no habríamos podido detectar ni medio *braf*. Sin su eterna disponibilidad y absoluta diligencia sé que esta tesis no habría sido posible, ya que no hubiera existido material alguno que analizar. Gracias porque tras su incorporación al equipo, las muestras comenzaron a fluir, y fluir...

Al Dr. Jesús M^ª Villar del Moral, Jefe de la Sección de Cirugía Endocrina del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del HUVN, y a la Dra. Nuria Muñoz Pérez, también componentes de la Unidad de Tiroides del HUVN, por la confianza depositada en esta investigación, especialmente en la intervención de pacientes *braf* positivos. Gracias asimismo

por extender la colaboración tiroidea al ARN y los perfiles génicos e invitarme a participar en un proyecto tan interesante.

Al Dr. Ángel Concha, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del HUVN, por permitirme el acceso “casi sin límites” a los recursos de su Servicio. A los demás patólogos de este Servicio, por estar siempre dispuestos a ayudarme con la revisión de muestras. Al resto de componentes de este Servicio, por tratarme siempre con tanta amabilidad y estar siempre dispuestos a ayudarme con mis “tubillos” y “cristalillos”. A Rosa y Manolo, por ser los “guardianes” de mis pacientes de citologías tiroideas. A Lola, por hacerme esas lonchas de parafina tan estupendas, y buscarme tanto paciente y tanta muestra, y otra vez, y otra, y otra... A Inma, por buscar y re-buscar para fotografiar y re-fotografiar... Y a todos: Gracias porque sois increíbles!!

Al Dr. Federico Garrido Torres-Puchol, Jefe de Servicio de Análisis Clínicos del HUVN, por poner a mi disposición la infraestructura de su Servicio, por la creación y puesta en marcha, junto al Dr. Llamas, de la “Unidad Funcional Nuclear-An. Clínicos”. Gracias al Dr. Francisco Ruiz-Cabello por sus buenos consejos. Gracias a la Dra. Susana Pedrinaci por su colaboración y asesoramiento con la secuenciación de muestras, y a su equipo humano (Pepi, Inma, Víctor) por estar siempre dispuesto a “meter otra muestrecilla del *braf*... para mañana...”. Al Dr. Miguel Ángel López Nevot y a mis tan queridas “Toñis” por asumir el relevo en la secuenciación de muestras en esta investigación, así que por tanto, también gracias por “para mañana...”

A mis estadísticas favoritas, Sabina Pérez Vicente y Manuela Expósito Ruiz, por no desfallecer asesorándome con los métodos epidemiológicos y los análisis estadísticos, y sobre todo por no fallecer a consecuencia de ello.

A mis padres, porque ellos me han fabricado así, y ahora van a tener que quedarse con el resultado. Por enseñarme a trabajar duro y constante, y no esperar recompensa a cambio. Por apoyarme incansablemente a lo largo de estos años, por patrocinarme al inicio de mi carrera y constituir siempre un sustento emocional. Por ser unos referentes estupendos.

A mi hermano, Antonio, y a mi cuñada, Lucía, por soportarme tantas horas -consecutivas, que cuenta más- y después de todo, pedir más. Por acompañarme en aquellas noches de experimentos científicos y compartir muchos días con más experiencias no científicas, aderezadas con tanto cariño. Gracias por vuestros ánimos y por proporcionarme una visión de la vida desde otro ángulo. Gracias por estar siempre ahí para mí incondicionalmente. Antonio: siento lo de las referencias, tienes permiso para negarme cualquier cosa de aquí en adelante.

A mi queridísima Mar Vera Sánchez, la “vera inventora” del *braf*, por su cariño, su generosidad, por tener esa personalidad infranqueable de lo malo que me hizo tanto bien, y que me enseñó a apreciar lo que vale una compañera de trabajo.

A todos mis amigos (Loli, Mar, Marga, Laura, Sonia, Anu, Salva, Isa, Celia, Mari Carmen, Carmen M, Carmencilla, Clarice, Cristian, Desi, Karen, Maribel...), por aguantarme a lo largo de mis días y de mis tesis, y aún así seguir demostrándome que sois lo mejor...Gracias por recordarme que existe la vida después de la tesis, gracias por ser como sois.

A Saray y a Tana, por ayudarme a pasar las correcciones y los resultados, respectivamente.

A los que no he nombrado explícitamente: GRACIAS con el mismo cariño.

Marisa

Resumen

RESUMEN DE LA TESIS

Antecedentes e Hipótesis

La mejor herramienta para el diagnóstico precoz de lesiones tiroideas es el examen citológico mediante punción y aspiración con aguja fina (PAAF). Aunque la precisión diagnóstica de la citología mediante PAAF es elevada, aproximadamente el 10-30% de los nódulos tiroideos sometidos a PAAF son diagnosticados como indeterminados o no valorables.

La mutación BRAF^{T1799A} constituye la principal alteración genética del carcinoma papilar de tiroides, y se encuentra en el 45% de los carcinomas papilares de tiroides. Su determinación en citologías de tiroides podría detectar carcinoma papilar y/o anaplásico de tiroides preoperatoriamente, redefiniendo el diagnóstico citopatológico y reorientando la estrategia terapéutica en pacientes con falsos negativos. La detección de nuevos casos gracias a la identificación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología sería de gran utilidad en la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo, ya que podría incrementar la sensibilidad de la estrategia diagnóstica mediante PAAF.

Aunque la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma papilar de tiroides se asocia generalmente a parámetros clínico-patológicos de alto riesgo y/o recidiva, su establecimiento como indicador de peor pronóstico es motivo de controversia en la actualidad.

Objetivos

Evaluar la utilidad de la identificación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF durante el protocolo diagnóstico preoperatorio de nódulos tiroideos, especialmente en la detección de falsos negativos.

Analizar la asociación entre el genotipo del tumor y un comportamiento más agresivo del carcinoma papilar de tiroides.

Metodología

El punto de partida de nuestro estudio fue la determinación de la prevalencia y especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} por el carcinoma papilar de tiroides mediante el análisis de su estado en pacientes con diferentes patologías tiroideas durante el periodo 1998-2005 (Fase 1). En la Fase 2, aplicamos la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} a pacientes en estudio de nódulo tiroideo durante el periodo 2006-2007, con el fin de averiguar si su introducción en el protocolo de diagnóstico del nódulo tiroideo aumenta la sensibilidad de la citopatología tiroidea para detectar preoperatoriamente carcinoma papilar. Por último (Fase 3), analizamos la posible asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con un comportamiento más agresivo del carcinoma papilar de tiroides (edad, sexo, extensión extratiroidea, metástasis, estadio, recidiva tumoral, persistencia de enfermedad, etc.).

Resultados

En la Fase 1, encontramos que el estado de la mutación BRAF^{T1799A} fue negativo en el tejido tiroideo normal, así como en el tejido tumoral de los pacientes con neoplasias benignas y malignas de tiroides diferentes de carcinoma papilar. En pacientes con carcinoma papilar de tiroides, la prevalencia obtenida fue del 46,4%.

En la Fase 2, la inclusión de la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} de forma rutinaria en las citologías tiroideas aumentó la sensibilidad de la técnica citopatológica para la detección de carcinoma papilar desde un 45% hasta un 60%, reduciendo en un 27,3% los falsos negativos.

En la Fase 3, las únicas variables asociadas estadísticamente con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} de forma independiente fueron edad superior a 60 años y tamaño tumoral.

Conclusiones

La mutación BRAF^{T1799A} es específica de carcinoma papilar de tiroides, con una prevalencia del 46,4%, y puede detectarse de forma fiable y representativa en el material procedente de las citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF. Su incorporación a la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo incrementa la sensibilidad de la estrategia diagnóstica mediante PAAF, debido principalmente al rescate del 27,3% de los falsos negativos de la Citopatología. Aunque se encuentra asociada a parámetros de peor pronóstico, como mayor edad y tamaño tumoral, no predice un comportamiento más agresivo, como metástasis, multifocalidad, extensión extratiroidea en el momento del diagnóstico, ni recidiva tumoral, persistencia de enfermedad, o necesidad de más intervenciones quirúrgicas/terapéuticas durante el seguimiento.

Comunicaciones

Los resultados de esta Tesis han sido parcialmente publicados en Comunicaciones a Congresos:

J. Villar del Moral; N. Muñoz Pérez; M. L. Cañadas Garre; E. Cabrera Cazorla; P. Becerra Massare; E. Olmos Juárez; R. Rodríguez González; J. I. Arcelus Martínez; J. A. Ferrón Orihuela.

Estudio de la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con factores pronósticos clinicopatológicos en carcinoma papilar de tiroides.

Cirugía Española 2009; 86:16-17.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, M. López de la Torre Casares, M. A. López Nevot, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

The presence of BRAF^{T1799A} mutation in the primary tumour is associated to patient's age and tumour's size, but not with the recurrence of papillary thyroid carcinoma.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2009; 36 (S): S288. Poster Walk.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, M. López de la Torre Casares, M. A. López Nevot, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

The detection of BRAF^{T1799A} mutation on fine needle aspiration biopsies reduces in 30% the rate of false negative papillary carcinomas.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2009; 36 (S): S472. Poster.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, M. López de la Torre Casares, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

La mutación BRAF^{T1799A} está asociada de forma independiente con mayor edad y mayor tamaño tumoral en carcinoma papilar de tiroides.

Endocrinol Nutr. 2009; 56:8. Comunicación Oral.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, M. López de la Torre Casares, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

La presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario no predice recurrencia de carcinoma papilar de tiroides.

Endocrinol Nutr. 2009; 56:8-10. Comunicación Oral.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, M. López de la Torre Casares, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

AMES y MACIS son los sistemas que mejor predicen la recurrencia de carcinoma papilar de tiroides.

Endocrinol Nutr. 2009; 56:11. Comunicación Oral.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, M. López de la Torre Casares, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

La invasión extratiroidea de la lesión es un indicador independiente de recurrencia en carcinoma papilar de tiroides.

Endocrinol Nutr. 2009; 56:11-12. Comunicación Oral.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, M. López de la Torre Casares, P. Becerra Massare, M. A. Muros de Fuentes, J. Villar del Moral, Á. Concha López, F. Garrido Torres-Puchol, A. Ferrón Orihuela, J. M. Llamas Elvira.

Más del 30% de los carcinomas papilares de tiroides hallados en pacientes con PAAF negativa puede ser detectado preoperatoriamente mediante el análisis de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa.

Endocrinol Nutr. 2009; 56:12-13. Comunicación Oral.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, M. Vera Sánchez, M. Muros de Fuentes, P. Jiménez Gámiz, M. López de la Torre Casares, J. Villar del Moral, F. Garrido Torres-Puchol, Á. Concha López, A. Ferrón Orihuela, J. Llamas Elvira.

Heterogeneous Distribution of BRAF^{T1799A} Mutation in the Primary Tumour and Metastases of Papillary Thyroid Carcinomas.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008; 34 (S2): S389. Póster.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, M. Vera Sánchez, M. Muros de Fuentes, P. Jiménez Gámiz, M. López de la Torre Casares, J. Villar del Moral, F. Garrido Torres-Puchol, Á. Concha López, A. Ferrón Orihuela, J. Llamas Elvira.

BRAF^{T1799A} Mutation Is Associated With Papillary Thyroid Carcinomas Larger Than 1 cm.

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008; 34 (S2): S390. Póster.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, M. Vera Sánchez, M. Muros de Fuentes, P. Jiménez Gámiz, M. López de la Torre Casares, J. Villar del Moral, F. Garrido Torres-Puchol, Á. Concha López, A. Ferrón Orihuela, J. Llamas Elvira.

Preoperative Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma by Detection of B-RAF^{T1799A} Mutation on Fine Needle Aspiration Biopsy Specimens

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008; 34 (S2): S218. Poster Walk.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, P. Jiménez Gámiz, M.A. Muros de Fuentes, M. Vera Sánchez, F. Garrido Torres-Puchol, A. Concha López, M. López de la Torre Casares, J.M. Llamas Elvira.

La determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides mejora la detección del carcinoma papilar de tiroides.

Rev Esp Med Nucl 2008; 27 (S1): 19. Comunicación Oral.

M. Cañadas Garre, E. Cabrera Cazorla, P. Becerra Massare, P. Jiménez Gámiz, M.A. Muros de Fuentes, M. Vera Sánchez, F. Garrido Torres-Puchol, A. Concha López, M. López de la Torre Casares, J.M. Llamas Elvira.

La determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides aumenta la detección de carcinoma papilar de tiroides

Endocrinol Nutr. 2008; 55:22. Comunicación Oral.

M. Vera, M. Cañadas, P. Becerra, P. Jiménez, M. Muros, F. Garrido, A. Concha, M. López, G. Yagüe, J.M. Llamas. Detection of B-RAF^{T1799A} mutation in patients with papillary thyroid cancer surgery from Hospital Virgen de las Nieves of Granada (1999-2005).

Eur J Nucl Med Mol Imaging 2007; 34 (S2): S379. Póster.

M. Cañadas Garre, M. Vera Sánchez, P. Becerra Massare, F. Ruiz Cabello, M.A. Muros de Fuentes, F. Garrido Torres-Puchol, A. Concha López, M. López de la Torre Casares, J.M. Llamas Elvira.

Diagnóstico preoperatorio de cáncer papilar de tiroides mediante la determinación de la mutación B-RAF^{T1799A} en PAAF de tiroides.

Rev Esp Med Nucl 2007; 26 (S1): 52. Póster.

M. Cañadas Garre, M. Vera Sánchez, P. Becerra Massare, F. Ruiz Cabello, M.A. Muros de Fuentes, F. Garrido Torres-Puchol, A. Concha López, M. López de la Torre Casares, J.M. Llamas Elvira.

Diagnóstico preoperatorio de cáncer papilar de tiroides mediante la determinación de la mutación B-RAF^{T1799A} en PAAF de tiroides.

Endocrinol Nutr. 2007; 54:131. Póster.

49 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición.

Murcia, 16-18 de mayo de 2007.

M. Vera Sánchez, M. Cañadas Garre, P. Becerra Massare, P. Jiménez Gámiz, M.A. Muros de Fuentes, F. Garrido Torres-Puchol, A. Concha López, M. López de la Torre Casares, G. Yagüe Guirao y J.M. Llamas Elvira.

Detección de la mutación B-RAF^{T1799A} en pacientes operados de cáncer de tiroides en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada (1999-2005).

Endocrinol Nutr. 2007; 54:131. Póster.

49 Congreso de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición.

Murcia, 16-18 de mayo de 2007.

M Vera, M Cañadas, C García, M de Arcocha, MA Muros, A Ramírez, A Concha, JM Llamas.

Frecuencia y valor diagnóstico de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tiroideo de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides y patologías tiroideas benignas.

XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Medicina Nuclear. Granada.

Rev Esp Med Nucl 2006; 25 (S1): 65. Póster.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ESTRUCTURA FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA TIROIDES	3
Embriología y Anatomía	3
Histología	3
Células Foliculares	4
Células C	4
Fisiología	5
Hormonas tiroideas	5
Eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo	6
NÓDULOS TIROIDES	8
Importancia clínica	8
Evaluación de los nódulos tiroideos	8
Factores de riesgo para carcinoma diferenciado de tiroides	9
Pruebas bioquímicas y modalidades de imagen indicadas	10
1. Determinación de tirotropina sérica (TSH)	10
2. Ecografía de tiroides	10
3. Exploración con radioisótopos	12
Estudio de nódulos tiroideos mediante biopsia por punción y aspiración con aguja fina	12
Indicaciones	12
Evaluación de la idoneidad de la muestra	13
Formato informativo de los aspirados de tiroides	13
Directrices para el manejo del paciente con nódulos tiroideos, basadas en el diagnóstico citológico	14
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE TIROIDES	16
Incidencia	16
Mortalidad	17
Supervivencia	18
Prevalencia	18
NEOPLASIAS TIROIDES MALIGNAS	19
Clasificación histológica de la OMS de carcinomas tiroideos	19
Carcinoma papilar de tiroides	19
Características anatomopatológicas	19
Criterios diagnósticos de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas obtenidas en biopsias por punción y aspiración con aguja fina	21
Perfil inmunohistoquímico	22
Variantes morfológicas del carcinoma papilar de tiroides	22
CPT variante folicular	23
CPT variante células altas	23
CPT variantes sólido-trabecular	23
CPT variante esclerosante difusa	23
CPT variante folicular difusa	24
CPT variante encapsulado	24
CPT variante de células claras	24
CPT variante microcarcinoma (esclerosante oculto)	24
Carcinoma pobremente diferenciado	24
Carcinoma anaplásico o indiferenciado	25
FACTORES PRONÓSTICOS Y DE RIESGO EN CÁNCER DIFERENCIADO DE TIROIDES	26
Presentación clínica	26

Factores pronósticos clínicos e histopatológicos	27
Edad y sexo	27
Tamaño tumoral	27
Localización del tumor e infiltración de la cápsula tiroidea	27
Subtipo tumoral	28
Invasión vascular	28
Metástasis	28
Estadificación e índices pronósticos del carcinoma papilar de tiroides	29
Estrategia de seguimiento postquirúrgico en cáncer de tiroides	30
Terapia inicial	30
Seguimiento a largo plazo	31
Tiroglobulina	31
Rastreo corporal total con ¹³¹ I	31
Ecografía cervical	32
BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES	33
Mutaciones <i>braf</i>	33
Reordenamientos <i>ret/ptc</i>	35
Reordenamientos <i>ntrk1 (trka)</i>	37
Mutaciones ras	37
Reordenamientos <i>pax8/ppary</i>	38
Utilidad diagnóstica de las alteraciones genéticas asociadas a CPT	39
Utilidad pronóstica de las alteraciones genéticas asociadas a CPT	40
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
<hr/>	
Hipótesis	43
Objetivos	43
METODOLOGÍA	45
<hr/>	
Plan de Trabajo	47
FASE 1. Estudio preliminar de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma de tiroides: especificidad y representatividad	49
1.1. Diseño	49
1.2. Población de referencia	49
1.3. Población de estudio	49
1.3.1. Criterios de inclusión	49
1.3.2. Criterios de exclusión	49
1.4. Selección de la muestra de pacientes	49
1.5. Descripción de las variables	50
1.5.1. Variables independientes	50
1.5.2. Variable dependiente	51
1.6. Análisis de los datos	51
1.6.1. Análisis estadístico	51
FASE 2. Detección preoperatoria de carcinoma papilar de tiroides mediante determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF	53
2.1. Diseño	53
2.2. Población de referencia	53
2.3. Población de estudio	53
2.3.1. Criterios de inclusión	53
2.3.2. Criterios de exclusión	53
2.3.3. Cálculo del tamaño de muestra	53

2.4. Protocolo de estudio	53
2.4.1. Flujo de pacientes	53
2.4.2. Seguimiento de los pacientes	54
2.5. Descripción de las variables	54
2.5.1. Variables independientes	54
2.5.2. Variable dependiente	54
2.6. Análisis de los datos	54
2.6.1. Análisis estadístico	55
FASE 3. Estudio de la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con un fenotipo más agresivo de carcinoma papilar de tiroides.	56
3.1. Diseño	56
3.2. Población de estudio	56
3.2.1. Criterios de inclusión	56
3.2.2. Criterios de exclusión	56
3.3. Protocolo de estudio	56
3.3.1. Seguimiento de los pacientes	56
3.4. Descripción de las variables	57
3.4.1. Variables dependientes	57
3.4.2. Variables independientes	57
3.5. Análisis de los datos	58
3.5.1. Análisis estadístico	58
4. Limitaciones del análisis del estudio	59
5. Técnicas para la determinación de la mutación BRAF^{T1799A}	60
5.1. Algoritmo de trabajo	60
5.2. Especímenes	60
5.2.1. Muestras de citología tiroidea	60
5.2.2. Muestras de biopsia tiroidea	61
5.3. Determinación de la mutación BRAF ^{T1799A}	61
5.3.1. Procesamiento previo de las citologías de tiroides y del tejido en parafina para la extracción del ADN	61
5.3.2. Extracción del ADN genómico	62
5.3.3. Amplificación por PCR del exón 15 del gen <i>braf</i>	62
5.3.4. Determinación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} mediante polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)	64
5.3.5. Determinación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} mediante secuenciación bidireccional directa	65
RESULTADOS	67
1. Estudio preliminar de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma de tiroides: especificidad y representatividad	69
1.1. Aspectos epidemiológicos de la población de estudio	69
1.2. Tipo histológico	70
1.3. Prevalencia de la mutación BRAF ^{T1799A} en carcinoma papilar de tiroides	71
1.4. Especificidad de la mutación BRAF ^{T1799A} para detectar carcinoma papilar de tiroides	72
1.5. Representatividad (detectabilidad y fiabilidad) de la mutación BRAF ^{T1799A} en muestras citológicas	73
1.6. Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas obtenidas por PAAF.	75
Sensibilidad	75

Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.	76
BRAF ^{T1799A}	76
Citopatología	77
Citopatología complementada con la determinación de BRAF ^{T1799A}	78
2. Detección preoperatoria de carcinoma papilar de tiroides mediante determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF	79
2.1. Aspectos epidemiológicos de la población de estudio	79
2.2. Detección preoperatoria de carcinoma papilar de tiroides	79
Diagnóstico citopatológico	79
Estado de la mutación BRAF ^{T1799A} en citologías de tiroides	80
Fiabilidad de la detección. Confirmación histopatológica	82
Casos de carcinoma papilar de tiroides en la cohorte 1	84
2.3. Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas obtenidas por PAAF.	86
BRAF ^{T1799A}	86
Citopatología	87
Citopatología complementada con la determinación de BRAF ^{T1799A}	87
3. ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON UN FENOTIPO MÁS AGRESIVO DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES.	89
3.1. Aspectos epidemiológicos de la población de estudio	
3.1.1. Edad y sexo	89
3.1.2. Tipo histológico	89
3.1.3. Estadificación	90
3.1.4. Grupos de riesgo	91
3.1.5. Tiempo de seguimiento	92
3.1.6. Estado al final del seguimiento	93
3.2. Prevalencia de la mutación BRAF ^{T1799A} en carcinoma papilar de tiroides	94
3.3. Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con las características clinicopatológicas de alto riesgo del carcinoma papilar de tiroides	94
3.3.1. Descripción de las variables clinicopatológicas de los pacientes con CPT.	95
Tamaño tumoral	95
Metástasis ganglionares y a distancia	95
Invasión extratiroidea	95
Multifocalidad	95
Otras características histopatológicas de riesgo	95
3.3.2. Asociación entre las características clinicopatológicas y el estado de la mutación BRAF ^{T1799A} en pacientes con CPT.	95
Edad y sexo	96
Tamaño tumoral	97
Estadio	97
Subtipos histológicos	97
Metástasis	98
Otras características histopatológicas	98
3.4. Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con la recidiva tumoral durante la evolución del paciente con CPT	98
3.4.1. Asociación entre las características clinicopatológicas de alto riesgo y la recidiva tumoral en pacientes con CPT	98
Tipo histológico de los pacientes con recidiva de CPT	99
Estadificación y grupos de riesgo en los pacientes con recidiva de CPT	100

Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con recidiva de CPT	101
3.4.2. Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con las variables relativas al tratamiento con ¹³¹ I en CPT	103
DISCUSIÓN	105
FASE 1. Estudio preliminar de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma de tiroides: especificidad, representatividad y sensibilidad	107
Determinación de la Prevalencia y Especificidad de la mutación BRAF ^{T1799A} en carcinoma papilar.	107
Representatividad del estado de la mutación BRAF ^{T1799A} en muestras citológicas	108
Precisión diagnóstica para detectar carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas	108
FASE 2. Detección preoperatoria de carcinoma papilar de tiroides mediante determinación de la mutación BRAF^{T1799A}	110
Otros marcadores genéticos	116
FASE 3. Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con un fenotipo más agresivo del carcinoma papilar de tiroides	120
Prevalencia de la mutación BRAF ^{T1799A} en CPT.	120
Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con las características clínicas e histopatológicas del CPT	124
Edad	126
Sexo	126
Tamaño tumoral	127
Estadio	127
Agresividad y subtipo histológico	128
Metástasis Ganglionares	130
Metástasis Distantes	130
Otros Parámetros Histopatológicos	130
Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con la recidiva tumoral	132
Asociación entre las características clinicopatológicas de alto riesgo y la recidiva tumoral	132
Recidiva, estadio y sistemas de estratificación del riesgo	132
Asociación de la presencia de la mutación BRAF ^{T1799A} con recidiva de CPT	132
Valor pronóstico de la mutación BRAF ^{T1799A} para persistencia de la enfermedad	134
Asociación de la mutación BRAF ^{T1799A} con la pérdida de la avidéz por radioyodo.	135
Conclusiones generales de la Fase 3	136
Consideraciones generales y perspectivas futuras	137
CONCLUSIONES	139
Conclusiones generales	141
Conclusiones individuales	142
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	145
REFERENCIAS	147

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA TIROIDES

Embriología y Anatomía

La glándula tiroides es la primera de las glándulas endocrinas en desarrollarse, aproximadamente a partir del día 24 de gestación. Se origina como una proliferación de células epiteliales endodérmicas en el lugar correspondiente al *foramen cecum* de la lengua del adulto, que posteriormente desciende hasta el cuello como un componente del conducto tirogloso. El divertículo embrionario mesodérmico se forma en la línea media entre la primera y segunda bolsas faríngeas, se hace bilobulado, y permanece conectado a la superficie ventral faríngea por el conducto tirogloso. Más tarde se forma el hueso hioides a partir del segundo arco branquial, delante del cual se sitúa el conducto tirogloso. Normalmente el conducto se oblitera, formando un sólido tallo tirogloso que se atrofia dejando como vestigio en el 40% individuos un tercer lóbulo piramidal que se extiende hacia arriba desde el istmo interlobular para terminar en la superficie del cartílago tiroides. (Fisher & Polk, 1989; Mansberger & Wei, 1993).

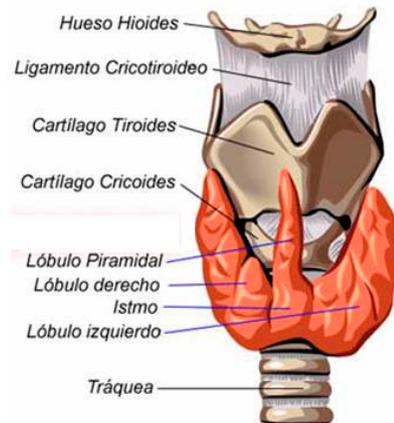


Figura 1.1. La glándula tiroides humana y sus relaciones anatómicas.
(modificada de <http://training.seer.cancer.gov>)

Las células parafoliculares o células C productoras de la hormona calcitonina se originan de la quinta bolsa faríngea que dará lugar al cuerpo ultimobranquial. Finalmente, células de la cresta neural migran e infiltran el cuerpo ultimobranquial, el cual se incorpora a la glándula tiroides junto con las células C.

El tiroides humano se sitúa frente o alrededor de la tráquea, bajo el cartílago cricoides. Constituida por dos lóbulos laterales de tejido firme muy vascularizado conectados entre sí el istmo, la glándula normal es suave, de color rojo-pardusco y pesa 15-25 g en áreas no endémicas de bocio. Presenta al corte un aspecto brillante y translúcido que le confiere el coloide. Su cápsula es delgada y normalmente incompleta, no se separa fácilmente, y contiene un considerable número de canales venosos que se hacen notablemente prominentes cuando aumenta su vascularización (Figura 1.1). La cápsula fibrosa está conectada con tabiques fibrosos que penetran en el parénquima tiroideo y lo dividen en lóbulos, denominados tirómeros (Carcangiu 1997; Rosai, 2004).

Histología

La nodularidad del parénquima tiroideo se ha identificado microscópicamente en aproximadamente el 10% de las glándulas endocrinológicamente normales (Brown *et al*, 1986). La unidad funcional esencial del tiroides es el folículo, una estructura redonda u ovalada alineada en una monocapa de células epiteliales que descansa sobre una membrana basal. El lumen del folículo contiene coloide, un material viscoso que en su mayor parte está compuesto por proteínas secretadas por las células foliculares, incluyendo tiroglobulina (Tg). El coloide, que es pálido eosinófilo en la glándula secretora activa, adquiere una tinción intensamente eosinófila en los folículos en reposo.

Los folículos están separados entre sí por tejido fibroconectivo suelto, y presentan un diámetro medio de 200 μm aunque su tamaño puede variar incluso dentro de la misma glándula, dependiendo del estado funcional del tiroides y la edad del individuo. Aunque existen variaciones en la forma de los folículos, los folículos elongados son una característica de

condiciones neoplásicas o hiperplásicas, o resultado de la compresión de una masa adyacente en expansión.

Células Foliculares

Las células epiteliales secretoras que recubren el folículo se denominan células foliculares o tirocitos y muestran variaciones en su forma y tamaño según el estado funcional de la glándula. Se describen tres tipos principales, que reflejan un *continuum* morfológico: células lisas (endoteloides), cuboidales y columnares (cilíndricas). Las células lisas son relativamente inactivas. Las células cuboidales (de igual anchura que altura) son las más numerosas, y su función principal es secretar coloide. Las menos frecuentes células columnares reabsorben la Tg presente en el coloide, liberan hormonas activas y excretan esas hormonas a los vasos sanguíneos; pueden poseer una cutícula apical, gotitas de lípido apicales, y una o más vacuolas basales (vacuolas de Bensley). La polaridad funcional es aparente a nivel del folículo y de la célula folicular. Un folículo único puede tener células lisas a un lado y cuboidales o columnares bajas al otro.

A nivel celular, todas las células foliculares manifiestan una polaridad manifiesta, descansando con las bases sobre la membrana basal y con los ápices dirigidos hacia el lumen del folículo. El tamaño y la posición del núcleo y algunos componentes del citoplasma pueden variar considerablemente. En el tiroides en reposo, el núcleo es redondo u oval, se localiza en el centro de la célula, y normalmente contiene un nucleolo localizado excéntricamente. La cromatina puede estar granulada finamente o en grupos. En células secretoramente activas, el núcleo se alarga; debido a que el alargamiento del citoplasma es principalmente apical, el núcleo adquiere una posición basal. El citoplasma normalmente es débilmente eosinófilo; sólo excepcionalmente, en casos diferentes a la normalidad, aparece granular e intensamente eosinofílico, lo que se denomina oncócítico (también denominadas células de Hürthle).

Ultraestructuralmente, las células foliculares se organizan en una monocapa alrededor del coloide y descansan en una membrana basal, de aproximadamente 35-40 nm de grosor, que las separa del estroma intersticial. De la superficie de las células emanan microvellosidades, que aumentan en número y longitud en células funcionalmente activas. Las membranas celulares de células adyacentes interdigitan de una forma compleja y están unidas por complejos de unión hacia el ápice. El citoplasma contiene cantidades variables de retículo endoplasmático, mitocondrias de tamaño normalmente pequeño, y lisosomas. Cuando el número de mitocondrias es muy elevado, la célula adquiere, al nivel del microscopio óptico, una apariencia de citoplasma granular intensamente eosinófilo, correspondiente a las células de Hürthle.

Las células foliculares sintetizan la proteína tiroglobulina, que es liberada al espacio coloidal por exocitosis vesicular. La tiroglobulina es importante como sustrato para la yodación de la tirosina y la posterior síntesis de hormonas tiroideas. En respuesta a la estimulación endocrina, las células foliculares captan el coloide por fagocitosis, y lo degradan enzimáticamente dentro de las vesículas endocíticas, para rendir las hormonas tiroideas. Éstas son liberadas por las células foliculares al espacio extracelular desde donde entran en los abundantes capilares.

Células C

En mamíferos, las denominadas células claras o células C, están presentes en la pared folicular y el espacio extracelular interfolicular y entre las células foliculares. Son muy numerosas en la porción central de los tercios medio y superior de los lóbulos tiroideos (Gibson *et al*, 1980; Gibson *et al*, 1981; Gibson *et al*, 1982; Wolfe *et al*, 1974), y son más abundantes en tiroides infantiles que en glándulas adultas (Gibson *et al*, 1980; Wolfe *et al*, 1975), aunque se han observado agregados considerables de células C en algunos adultos sin anomalías endocrinológicas conocidas (Gibson *et al*, 1981; Gibson *et al*, 1982; O'Toole *et al*, 1985).

Las células parafoliculares o células C pueden tener forma de poligonal a fusiforme, citoplasma de baja densidad, y contienen numerosos gránulos citoplasmáticos delimitados por membrana, que contienen calcitonina. Un pequeño número de células C (o células similares a ellas) contienen somatostatina. La calcitonina, está implicada en el control homeostático del calcio, reduciendo los niveles plasmáticos de Ca^{2+} , en una acción que se opone a las glándulas paratiroides (Nelkin *et al*, 1989).

Por su parte, las células epidermoides tienen aspecto fusiforme-ovoide, y forman pequeños nidos sólidos con la misma distribución en los lóbulos tiroideos que las células C; pequeños quistes rellenos de fluido y unas cuantas células mucosas pueden encontrarse dentro o acompañando los nidos celulares sólidos. Estos folículos, denominados mixtos (Harach, 1987), se alinean junto a células foliculares y epidermoides (algunas veces también células C) y contienen tanto coloide como material mucoide.

Patologías tiroideas

Las células oxifílicas (oncocitos, células de *Askanazy* o células de *Hürthle*) son células foliculares alteradas; están alargadas, tienen un citoplasma eosinofílico granular y el núcleo es grande, hipercromático y de forma irregular (Bronner & LiVolsi, 1988; Flint *et al*, 1988). El citoplasma está ocupado con mitocondrias hinchadas. Es frecuente encontrar este tipo de células en la enfermedad de *Graves* de larga evolución, tiroiditis autoinmune, en tiroides dañado por radiación, neoplasias y en algunos nódulos adenomatosos (Friedman, 1949).

En el estroma tiroideo es frecuente encontrar pequeños grupos de células linfoides (Mitchell *et al*, 1984), así como en el tejido intersticial suele haber células dendríticas presentadoras de antígeno, cuyo número se incrementa en enfermedades tiroideas autoinmunes (Kabel *et al*, 1988).

Fisiología

La principal función de la glándula tiroidea es la producción de hormonas tiroideas, de las cuales, las más importantes son la tiroxina (T4) y la triyodotironina (T3). Aproximadamente el 95% de la hormona tiroidea activa es T4 y el 5% restante, T3. Ambas requieren yodo para su síntesis y su secreción está regulada por un mecanismo de retro-alimentación negativo que implica los efectos de la concentración hormona circulante sobre hipotálamo y adenohipófisis.

Las hormonas tiroideas estimulan el metabolismo, incrementan el consumo de oxígeno, la producción de calor, la frecuencia y el gasto cardiacos; así como la síntesis de proteínas en todos los tejidos del organismo. Son esenciales para el desarrollo y crecimiento normal del organismo y la maduración del sistema nervioso central y periférico. La aceleración del crecimiento puede ser consecuencia de la acción directa sobre las células incrementando su velocidad de división, mediante la acción permisiva de una gran variedad de hormonas promotoras del crecimiento (Sterling, 1979; Green, 1987; Müller & Seitz, 1984^{a,b,c}; Oppenheimer, 1985).

Hormonas tiroideas

Las etapas en la biosíntesis de hormonas tiroideas incluyen la ingesta de yodo a partir del agua y los alimentos, su absorción y transporte como yoduro en el fluido extracelular y su concentración dentro del tiroides, donde sus niveles intracelulares son 30 veces superiores que en sangre periférica. La captación activa de yoduro a través de la membrana basal está mediada por el transportador de yoduro sódico humano (NIS, *human sodium iodide symporter*), en un proceso acoplado al flujo de sodio (Lin *et al*, 2001). A continuación, el yoduro intratiroideo es oxidado a yodo. Este último paso es dependiente de la acción de la peroxidasa de yoduro, que oxida el ión yoduro a una forma altamente reactiva del yodo, que a continuación se une a la tirosina, formando monoyodotirosina (MIT) cuando se une una molécula de yodo, y diyodotirosina (DIT) cuando se unen dos moléculas de yodo. Los residuos

de yodotirosina se unen para formar las hormonas tiroideas biológicamente activas, tiroxina (T4), y triyodotironina (T3). La tiroxina resulta del acoplamiento de dos moléculas de DIT, y la triyodotironina del acoplamiento de una molécula de MIT con una molécula de DIT (Ingbar, 2000). Las hormonas tiroideas se almacenan en la tiroglobulina (Tg), con numerosos residuos de tirosina, incluyendo la T4 y T3 biológicamente activas. La Tg es una gran proteína de coeficiente de sedimentación 19S y una masa molecular de 670000 D, formada por dos subunidades idénticas de coeficiente de sedimentación 12S, a las que se le unen muchos oligosacáridos. Las variaciones en las cadenas glucídicas de la molécula de Tg se han evaluado mediante análisis de reactividad a varias lectinas, y se han encontrado diferencias entre la glándula normal y varios estados patológicos, incluyendo las neoplasias (Maruyama *et al*, 1998). La Tg se almacena en el centro de los folículos tiroideos, y constituye el principal componente del coloide. Está codificada por un gen que ocupa más de 200 kilobases en el genoma bovino (de Martynoff *et al*, 1987). Los mecanismos moleculares implicados en la expresión específica de tejido y hormono-dependiente del gen de la tiroglobulina se han estudiado en células foliculares en cultivos primarios y en líneas celulares (Christophe *et al*, 1989; Lee *et al*, 1989).

Estudios ultraestructurales han puesto de manifiesto los cambios morfológicos que acompañan a la producción y secreción de hormonas tiroideas. La síntesis de Tg ocurre en el retículo endoplasmático y continúa en el aparato de Golgi, donde se incorporan los extremos glucídicos; a continuación se empaqueta en pequeñas microvesículas apicales, cuyo contenido se descarga al lumen folicular tras la fusión de las membranas de las vesículas con la cara luminal de la membrana plasmática.

La resorción de tiroglobulina tiene lugar a través de los pseudópodos citoplasmáticos (*streamers*), que invaginan porciones diminutas de coloide, que a continuación son incorporadas a la célula en forma de pequeñas gotas de coloide unido a membrana, las cuales se fusionan con lisosomas, y su contenido es digerido por enzimas lisosomales (Björkman *et al*, 1974; Green, 1987; Ericson & Engström, 1978; Ide, 1984). Los productos de la digestión, incluyendo T3 y T4, difunden a la corriente sanguínea, donde son transportados principalmente por una proteína transportadora específica, la globulina de unión a tiroxina (TBG, *thyroxin-binding globulin*). La TBG transporta normalmente más del 70% de las hormonas tiroideas. Aproximadamente el 20% de las hormonas tiroideas circulantes es transportado por transtiretina (pre-albúmina) y albúmina (Sterling, 1979). Sólo una pequeña porción de las hormonas tiroideas circulantes (aproximadamente, el 0,005% de T3 y el 0,015% de T4) se encuentra libre y, por tanto, biológicamente activo. Las formas libres circulantes y biológicamente activas de T3 y T4 se encuentran en equilibrio con las hormonas unidas a las proteínas transportadoras. La cantidad de T4 circulante es mucho mayor que la de T3; sin embargo, T3 es unas cuatro veces más activa biológicamente; como resultado, la contribución final de T3 a la actividad biológica de las hormonas tiroideas iguala a la de T4 (Liddle & Liddle, 1981).

Eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo

Las actividades biosintéticas y secretoras del tiroides están controladas por el nivel de tirotropina (TSH, *thyroid stimulating hormone*), una glicoproteína sintetizada y secretada por la adenohipófisis (Larsen, 1982). La TSH se une a un receptor específico, situado en la superficie basolateral de la membrana de las células foliculares, y mediante la activación de la ruta de la adenilato ciclasa regula el complejo mecanismo responsable de la síntesis de T3 y T4 (Davies *et al*, 2002^b; Pittman, 1974). La estimulación de la glándula tiroidea por la TSH incrementa su actividad secretora y su vascularización, resultando en hipertrofia e hiperplasia de las células foliculares, acompañada de reducción de la cantidad de coloide almacenado. A nivel funcional, esto se refleja en un incremento en la concentración y organificación de yodo, síntesis y secreción de hormonas (Liddle & Liddle, 1981; Farid & Szkudlinski, 2004). La liberación de TSH

a continuación está regulada por un tripéptido secretado por el hipotálamo, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, *thyrotropin releasing hormone*). La liberación de TSH y TRH están reguladas a su vez por los niveles circulantes de T3 y T4 libres, mediante retroalimentación negativa sobre adenohipófisis e hipotálamo (bajos niveles de T3 y T4 libres estimulan la liberación de TSH y TRH). En contraste, la liberación de TSH y TRH están inhibidas por elevados niveles de de T3 y T4 libres circulantes (Larsen, 1982; Pittman, 1974).

NÓDULOS TIROIDEOS

Un nódulo tiroideo es una lesión discreta dentro de la glándula tiroides radiológicamente distinta del parénquima tiroideo circundante (Cooper *et al*, 2009). Las lesiones palpables que no se corresponden con anomalías radiológicas no pueden definirse estrictamente como nódulos tiroideos (Marqusee *et al*, 2000). Los nódulos no palpables que son detectables por ultrasonidos u otros estudios anatómicos de imagen se denominan “nódulos descubiertos incidentalmente” o “incidentalomas”. Los nódulos palpables y no palpables presentan el mismo riesgo de malignidad, siempre que tengan el mismo tamaño (Hagag *et al*, 1998). Generalmente, deberían ser evaluados sólo nódulos > 1 cm, ya que tienen mayor potencial de malignidad clínicamente relevante. Nódulos < 1 cm pueden requerir evaluación, si presentan hallazgos ecográficos sospechosos, historia de irradiación de cabeza o cuello o antecedentes familiares de cáncer de tiroides (Cooper *et al*, 2009).

IMPORTANCIA CLÍNICA

Los nódulos tiroideos son muy comunes. En la población general, del 3-7% pueden detectarse mediante palpación (Vander *et al*, 1968; Hegedüs, 2004) y, del 20-76% por ultrasonidos (Ezzat *et al*, 1994; Tan & Gharib, 1997), mientras que se encuentran en un 50% de las autopsias (Mortensen *et al*, 1955; Ross, 2005). La prevalencia aumenta proporcionalmente con la edad, la deficiencia de yodo y la exposición a radiación ionizante. Los nódulos tiroideos son más frecuentes en mujeres, con una incidencia de 0,1% por año y una probabilidad de desarrollar un nódulo tiroideo durante la vida del 10% (Tan & Gharib, 1997; Ross, 2005; Filetti *et al*, 2006). La importancia clínica de los nódulos tiroideos, además de los infrecuentes síntomas compresivos locales o la disfunción tiroidea, es principalmente la posibilidad de cáncer de tiroides, que aparece en el 5% de todos los nódulos tiroideos, independientemente de su tamaño (Belfiore *et al*, 1989; Tan & Gharib, 1997; Hagag *et al*, 1998; Filetti *et al*, 2006). Debido a la elevada prevalencia de la enfermedad nodular tiroidea, no es económicamente factible ni clínicamente necesario realizar un estudio funcional y estructural completo de todos los nódulos tiroideos. Así, es esencial desarrollar una estrategia costo-efectiva sistemática para el diagnóstico y tratamiento de los nódulos tiroideos que evite la cirugía innecesaria y potencialmente peligrosa (Gharib & Papini, 2007).

EVALUACIÓN DE LOS NÓDULOS TIROIDEOS

Muchas patologías tiroideas (Tabla I.2), tanto benignas como malignas, pueden causar nódulos tiroideos (Hegedüs, 2004; Ross, 2005; Gharib & Papini, 2007). Los nódulos tiroideos de diagnóstico reciente deben evaluarse principalmente para descartar malignidad (Hegedüs, 2004; Ross, 2005; Gharib & Papini, 2007; Tan & Gharib, 1997). La evaluación clínica comienza con una anamnesis y un examen físico minuciosos, centrándose en la glándula tiroidea y en los nódulos linfáticos cervicales adyacentes (Cooper *et al*, 2009).

Los factores que guardan relación con la predicción de malignidad incluyen sexo masculino, antecedentes familiares de carcinoma de tiroides en parientes con 1 grado de parentesco, historia de irradiación de cabeza o cuello, irradiación total del cuerpo para el trasplante de médula ósea, exposición al desastre de Chernobyl antes de la edad de 14 años; crecimiento rápido, síntomas compresivos locales, criterios de sospecha en el examen ecográfico, parálisis de cuerdas vocales, disfonía, linfadenopatías cervicales palpables ipsilaterales y fijación del nódulo a los tejidos circundantes (Curtis *et al*, 1997; Pacini *et al*, 1997; Tuttle *et al*, 2007; Cooper *et al*, 2009).

La aparición de una nueva masa, el crecimiento lento pero progresivo del nódulo, la apariencia firme o dura de un nódulo solitario o dominante y/o, la presencia de adenopatías cervicales

adyacentes son características sospechosas de malignidad que deben promover una evaluación más extensa (Hegedüs, 2004; Ross, 2005; Filetti *et al*, 2006).

Finalmente, debe tenerse en cuenta la existencia de enfermedad familiar tiroidea benigna o maligna como el cáncer de tiroides (carcinoma papilar o medular), la neoplasia endocrina múltiple tipo 2, la poliposis adenomatosa familiar, el complejo de Carney tipo1, la enfermedad de Cowden y el síndrome de Gardner, aunque sean menos frecuentes (Malchoff & Malchoff, 2006; Gharib & Papini, 2007). Las características asociadas a un mayor riesgo de desarrollo de cáncer en nódulos tiroideos (Gharib & Papini, 2007) se encuentran en la Tabla I.3.

Tabla I.2. Causas frecuentes de nódulos tiroideos	
BENIGNOS	
	Nódulo Coloide
	Tiroiditis de Hashimoto
	Quiste simple o hemorrágico
	Adenoma folicular
	Tiroiditis subaguda
MALIGNOS	
Primarias	
	Carcinoma derivado de células foliculares:
	Carcinoma papilar de tiroides
	Carcinoma folicular de tiroides
	Carcinoma anaplásico de tiroides
	Carcinoma derivado de células C:
	Carcinoma medular de tiroides
	Linfoma de tiroides
Secundarias	
	Carcinoma metastásico

Gharib & Papini, 2007.

Tabla I.3. Riesgo elevado de malignidad en nódulos tiroideos	
	Historia de irradiación de cabeza/cuello en la infancia
	Historia familiar de carcinoma papilar, medular o MEN2
	Edad inferior a 20 años o superior a 70 años
	Sexo masculino
	Nódulo en crecimiento
	Adenopatías cervicales anormales
	Nódulo adherido
	Parálisis de las cuerdas vocales

Gharib & Papini, 2007.

Factores de riesgo para carcinoma diferenciado de tiroides

La radiación ionizante está considerada el factor de riesgo predominante. La glándula tiroides es sensible a la **irradiación interna y externa**, y se ha descrito una fuerte relación dosis-respuesta entre la incidencia de cáncer de tiroides y la dosis absorbida de radiación (Somerville *et al*, 2005). El tratamiento con radiación administrada durante la infancia y la adolescencia se considera un fuerte factor de riesgo independiente para el desarrollo de cáncer diferenciado de tiroides. Esto es probablemente debido a la rápida proliferación celular en la infancia. De hecho, la publicación reciente de que la actividad proliferativa de las células de tiroides desciende con la edad, documenta una posible explicación para el mayor riesgo de cáncer de tiroides inducido por radiación en niños, comparado con adultos (Saad *et al*, 2006).

En casos de bocio nodular, la edad y el sexo, pero no la glándula tiroidea multinodular, se acumulan para determinar el riesgo de cáncer. En un estudio de 5637 pacientes con enfermedad nodular tiroidea, se ha demostrado que la proporción de malignidad es menor en pacientes entre 40-60 años y mayor en pacientes menores de 30 años o mayores de 60 (Williams *et al*, 1977). El riesgo de un segundo tumor primario en los años posteriores en mujeres jóvenes con carcinoma diferenciado de tiroides debería también ser considerado. En un estudio retrospectivo de cohortes de 10932 mujeres con carcinoma papilar de tiroides, se ha demostrado que se encontraban a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama in situ, cáncer de riñón y melanoma (Canchola *et al*, 2006).

La elevada incidencia de carcinoma folicular de tiroides agresivo, así como de carcinomas anaplásicos de tiroides, en áreas con deficiencia de yodo, y de carcinoma papilar de tiroides en áreas con alta ingesta de yodo, sugiere que la ingesta de yodo podría estar implicada en la patogénesis de la enfermedad, pudiendo invertir la relación entre carcinoma papilar y folicular de tiroides (Belfiore *et al*, 1992). Sin embargo, el papel de otros factores nutricionales, como el selenio, aún no se encuentra completamente dilucidado (Duntas, 2006).

Finalmente, la historia familiar es otro factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma papilar de tiroides. Estudios epidemiológicos han mostrado que el 5% de los pacientes que desarrollan cáncer de tiroides, y especialmente aquellos con carcinoma papilar de tiroides, tienen al menos un pariente con carcinoma diferenciado de tiroides (Duntas, 2006). También se ha descrito un aumento en la incidencia de carcinoma papilar de tiroides en pacientes con poliposis coli adenomatosa familiar, y con su subtipo, el síndrome de Gardner (Bell & Mazzaferri, 1993; Schlumberger & Pacini, 1999).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y MODALIDADES DE IMAGEN INDICADAS

1. DETERMINACIÓN DE TIROTROPINA SÉRICA (TSH)

En ausencia de sospecha clínica específica, la evaluación tiroidea inicial requiere solamente la determinación del nivel sérico de TSH, de acuerdo con todas las Guías de Práctica Clínica para el Diagnóstico y Manejo de Nódulos Tiroideos (*American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi, AACE/AME; American Thyroid Association, ATA; European Thyroid Association, ETA*). La determinación de calcitonina sérica está recomendada por la ETA en la evaluación inicial; la AACE/AME la recomienda sólo en caso de sospecha de carcinoma medular de tiroides tras examen citológico o por la historia familiar. Por su parte, la ATA no se pronuncia a favor ni en contra (Gharib *et al*, 2008; Cooper *et al*, 2009).

Una vez detectado un nódulo tiroideo >1-1,5 cm en cualquier diámetro, y realizada la determinación de TSH, si su concentración en suero es menor del normal, debe realizarse una gammagrafía tiroidea, con objeto de documentar la funcionalidad del nódulo. Ya que los nódulos funcionantes rara vez portan malignidad, no es necesaria una evaluación citológica. En el caso de hipertiroidismo patente o subclínico, se continúa la evaluación con ecografía de tiroides (Cooper *et al*, 2009). El algoritmo de evaluación de nódulos tiroideos puede verse en la Figura I.4.

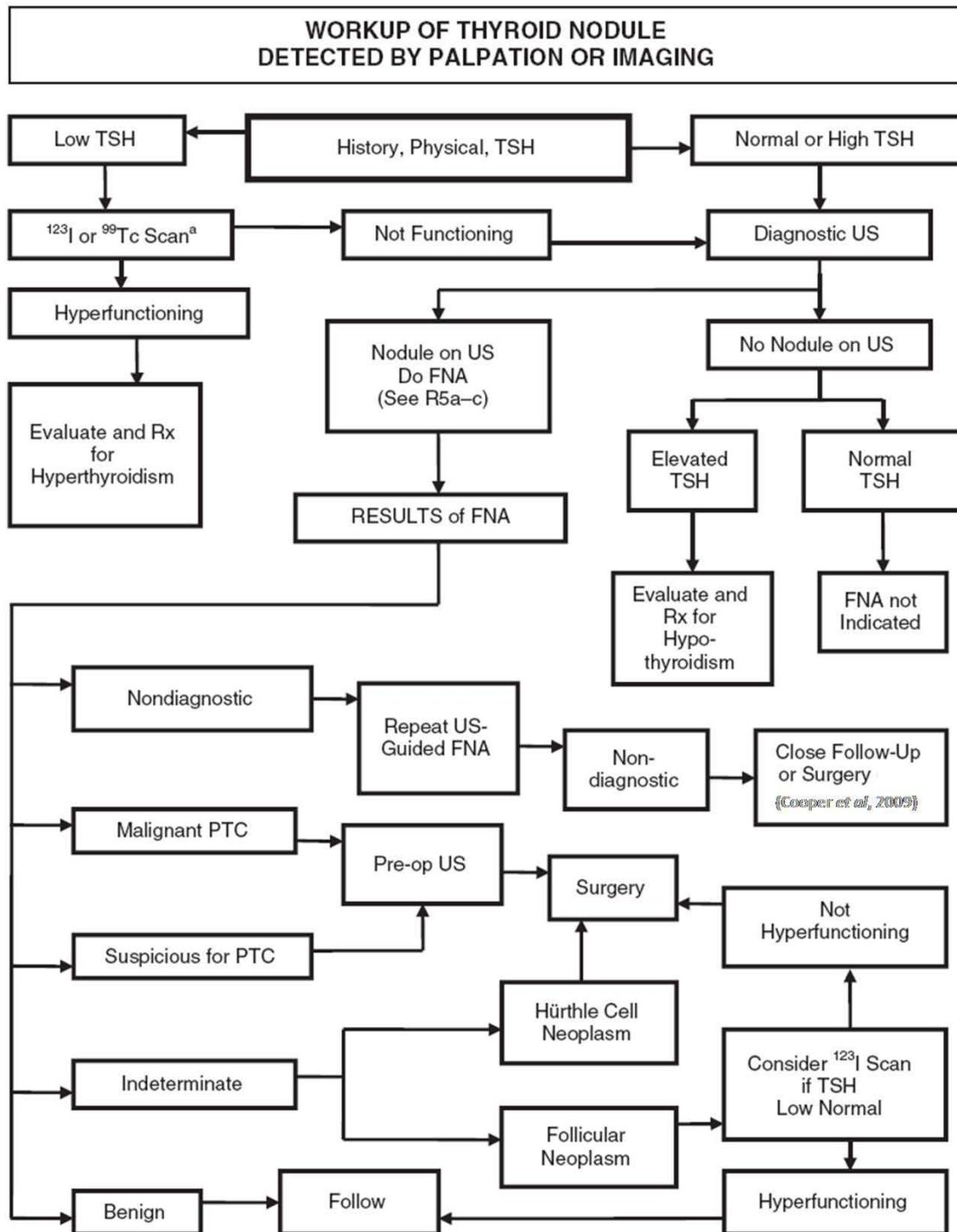
2. ECOGRAFÍA DE TIROIDES

La ultrasonografía es la prueba más sensible para detectar lesiones en el tiroides. Mide de forma precisa las dimensiones, identifica la estructura y evalúa los cambios difusos en el parénquima tiroideo. Es una técnica no invasiva, de coste reducido, que identifica nódulos no aparentes en el examen físico, gammagrafía tiroidea y otras modalidades de imagen (Baskin, 2000).

Se recomienda que todos los pacientes que presentan un tiroides nodular, con un nódulo solitario palpable o un bocio multinodular, sean evaluados mediante ultrasonografía (AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009), con el objetivo de:

- Buscar nódulos adicionales no sospechados.
- Medir el número y tamaño de los nódulos.
- Registrar las características ecográficas (microcalcificaciones, márgenes irregulares, imágenes vasculares, contenido quístico o sólido, hipoecogenicidad, forma del nódulo), para la evaluación del riesgo de malignidad.
- Seleccionar las lesiones que requieren PAAF guiada por ecografía (Tan & Gharib, 1997; Baskin, 2000).
- El examen ultrasonográfico debe realizarse en todo paciente que presente una historia familiar de cáncer de tiroides, neoplasia endocrina múltiple tipo 2 o antecedentes de irradiación en cabeza o cuello, incluso aunque el tiroides sea normal a la palpación (Baskin, 2000; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006).
- La ecografía de tiroides diagnóstica se debe llevar a cabo, excepto si la TSH sérica se encuentra suprimida. Esta exploración confirma si existe un nódulo que corresponda a

la anomalía palpable, si tiene un componente quístico >50% y si se localiza en la parte posterior de la glándula tiroides (Cooper *et al*, 2009).



^aSi la gammagrafía no muestra una distribución uniforme del trazador, debe considerarse la ecografía para evaluar la presencia de un contenido quístico.

Figura 1.4. Algoritmo para la evaluación de pacientes con 1 ó más nódulos tiroideos.

Asimismo, la ecografía se indica para dirigir la biopsia. El componente quístico y la ubicación posterior del nódulo pueden disminuir la precisión de la biopsia mediante Punción y Aspiración con Aguja Fina (PAAF) dirigida por palpación (Hall *et al*, 1989; Alexander *et al*, 2002). Además,

puede haber otros nódulos tiroideos presentes que requieran biopsia, basándose en su tamaño y apariencia (Brander *et al*, 1992; Tan *et al*, 1995; Marqusee *et al*, 2000).

3. EXPLORACIÓN CON RADIOISÓTOPOS

El examen tiroideo con radioisótopos está indicado por las Guías de Práctica Clínica si la TSH está suprimida y en nódulos con diagnóstico citológico de neoplasia folicular (Gharib *et al*, 2008; Cooper *et al*, 2009).

Esta exploración mide la capacidad de captación de radiotrazador del nódulo en relación al tejido tiroideo circundante. La gammagrafía tiroidea es la única técnica que permite la evaluación de la función nodular tiroidea y que detecta áreas de autonomía dentro de la glándula tiroidea. Basándose en el patrón de captación radioisotópica, los nódulos pueden clasificarse como:

- Hiperfuncionantes o “calientes”, si la captación del nódulo es mayor.
- Hipofuncionantes o “fríos”, si la captación es menor.
- Isofuncionante o “templado”, si la captación es homogénea.

Los nódulos calientes casi nunca son malignos, mientras que los fríos presentan un riesgo de cáncer de tiroides que varía entre 5-15%. Debido a que la gran mayoría de las lesiones tiroideas son frías y sólo una minoría malignas, el valor predictivo de los nódulos hipofuncionantes para malignidad es bajo. Además, la especificidad diagnóstica disminuye si la lesión es <1cm, ya que no puede ser identificada en la gammagrafía (McHenry *et al*, 1998; Tollin *et al*, 2000^b; Meier & Kaplan, 2001).

ESTUDIO DE NÓDULOS TIROIDEOS MEDIANTE BIOPSIA POR PUNCIÓN Y ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA (PAAF)

La PAAF, ya sea guiada por palpación o ecografía, está reconocida como el procedimiento diagnóstico de elección en la evaluación de nódulos tiroideos detectados clínica o incidentalmente (Gharib *et al*, 2008; Cooper *et al*, 2009). La PAAF es con diferencia el método preoperatorio más valioso para identificar pacientes con cáncer de tiroides. Desde su incorporación a la rutina diagnóstica ha tenido un considerable impacto en el manejo de pacientes con nódulos tiroideos, contribuyendo a la reducción de pacientes intervenidos quirúrgicamente, e incrementando obviamente el porcentaje de nódulos malignos hallados en la cirugía (Hamberger *et al*, 1982; Suen, 1988; Galloway *et al*, 1991). Así, en la Clínica Mayo, un año después de la incorporación de la PAAF, el porcentaje de pacientes con indicación de cirugía de tiroides descendió del 67 al 43%; mientras que el porcentaje de nódulos extirpados que resultaron malignos aumentó del 14 al 29%, y el coste del estudio diagnóstico completo de un nódulo descendió en un 25% (Hamberger *et al*, 1982).

Indicaciones

Tradicionalmente, la principal indicación para la biopsia de tiroides mediante PAAF ha sido la presencia de un nódulo solitario o un nódulo dominante en un bocio multinodular, ya que se consideraba menor el riesgo de cáncer en bocio multinodular que en un nódulo solitario.

Sin embargo, la literatura reciente indica que si un nódulo en un contexto de bocio multinodular crece constantemente, se convierte en dominante, o cambia de consistencia, su riesgo de malignidad es el mismo que el de un nódulo solitario (Franklyn *et al*, 1993; Tollin *et al*, 2000^b). El examen con PAAF siempre está indicado en estos supuestos.

En enfermedades autoinmunes de tiroides, tales como la enfermedad de Graves y la tiroiditis de Hashimoto, una anomalía dominante localizada en la glándula tiroidea también es una indicación de biopsia tiroidea mediante PAAF (Joseph & Jhingran, 1995).

Como test diagnóstico, la punción-aspiración con aguja fina puede utilizarse para diagnosticar carcinoma papilar, carcinoma pobremente diferenciado, carcinoma medular, carcinoma anaplásico, malignidad metastásica, tiroiditis, y la mayoría de los quistes y bocios nodulares benignos. Sin embargo, el adenoma folicular, el carcinoma bien diferenciado y algunos bocios hiperplásicos son indistinguibles en la biopsia mediante PAAF

Evaluación de la idoneidad de la muestra

La obtención de muestras celulares apropiadas por PAAF requiere una suficiente sangre capilar o fluido tisular que sirva como vehículo, sin que cause problemas de dilución.

El producto final idóneo de un procedimiento de biopsia por aspiración debe ser una extensión citológica satisfactoria en términos de calidad (espesor, fijación), preparada y teñida (Papanicolau, Diff-Quick) de modo que permita un diagnóstico citopatológico preciso, benigno o no. Los criterios para considerar una muestra óptima son:

- Celularidad adecuada (*según criterio de cada Institución Sanitaria*) y extensión fina en monocapa.
- Fijación adecuada (para tinción con Papanicolau).
- Material celular bien teñido y visualizado.
- Contener fragmentos donde sea posible evaluar los patrones propios de arquitectura del tejido.
- Mostrar detalles de la morfología nuclear.
- Mostrar características citoplasmáticas.
- Permitir visualizar los cuerpos de *psammoma*, cuando estén presentes.
- Tinción del coloide.

El criterio de idoneidad relativo a la celularidad de la muestra citológica de tiroides varía según autores (Goellner *et al*, 1987; Hamburger & Husain, 1988; Caruso & Mazzaferri, 1991; Nguyen *et al*, 1991). Así, unos recomiendan 5-6 grupos de células foliculares bien preservadas, con al menos 10-15 células en cada grupo (Goellner *et al*, 1987; Caruso & Mazzaferri, 1991), criterio adoptado por el **Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN)**. Por otro lado, algunos autores recomiendan al menos 6 aspirados del nódulo a estudiar, conteniendo 6 grupos de células benignas en un mínimo de 2 aspirados (Hamburger & Husain, 1988); mientras que otros exigen 10 grupos de células foliculares con al menos 20 células en cada grupo (Nguyen *et al*, 1991). Sin embargo, Kini y Miller se rigen por un criterio estricto que requiere al menos 2 preparaciones con 8-10 fragmentos de tejido con células foliculares (Kini *et al*, 1985; Kini 2008). Este requisito eleva el porcentaje de resultados no valorables para el diagnóstico al 20% (Kini *et al*, 1985), pero minimiza el riesgo de falsos negativos (Miller *et al*, 1985).

Formato informativo de los aspirados de tiroides

Categoría No Valorable (Muestra inadecuada o insatisfactoria para el diagnóstico)

La muestra se califica de “insatisfactoria” para el diagnóstico citológico en ausencia de células foliculares, e “inadecuada” cuando el número de células foliculares es inferior al criterio de la Institución (Goellner *et al*, 1987; Caruso & Mazzaferri, 1991).

Esta categoría no valorable abarca un promedio de 10-21% en resultados de PAAF (Miller *et al*, 1985; Caruso & Mazzaferri, 1991; Gharib & Goellner, 1993; Hamburger, 1994), aunque la literatura describe resultados tan bajos como 2% (Pepper *et al*, 1989) y tan altos como 31% (Burch *et al*, 1996).

Tras la repetición de la biopsia, la incidencia de resultados diagnósticos es del 62% (Chow *et al*, 2001; Gharib & Goellner, 1993; Goellner *et al*, 1987), aunque un 30-38% permanecen como no diagnósticos debido a factores inherentes a la lesión (fibrosis, vascularidad aumentada, cambio quístico) (Kini, 2008).

El rendimiento de malignidad en la categoría no diagnóstica tiene un promedio de 2-9%, según las series de pacientes publicadas (McHenry *et al*, 1993; MacDonald & Yazdi, 1996; Schmidt *et al*, 1997). Sin embargo, en un estudio se describe un 7% de malignidad en el grupo no diagnóstico, porcentaje que se incrementa al 37% cuando se considera sólo casos sometidos a cirugía (Chow *et al*, 2001).

Categoría benigna (Patología benigna o Negativo para malignidad)

Este diagnóstico significa que la muestra de aspirado no presenta malignidad y el paciente se debe manejar de modo conservador. Esta categoría se considera la más común y comprende el 60-70% de todos los diagnósticos. La muestra es representativa de enfermedad benigna no neoplásica, ya sea bocio nodular o cualquier tipo de tiroiditis. Aunque la incidencia de malignidad en esta categoría no puede calcularse en sentido estricto, ya que habitualmente los pacientes no son intervenidos quirúrgicamente, es reconocida como muy baja.

Categoría indeterminada

Incluye los siguientes patrones citolopatológicos:

- Proliferación folicular o de células de Hürthle
 Celularidad idónea, características citológicas sugerentes de malignidad, pero ausencia de criterios para un diagnóstico definitivo (e.g. adenoma folicular *versus* diagnóstico diferencial de carcinoma folicular o de carcinoma papilar variante folicular).
- Atipias
 - Celularidad idónea, con la mayoría, pero no todas, las características citológicas de carcinoma papilar.
 - Celularidad inadecuada, con características celulares que sugieren marcadamente malignidad.

Esta categoría representa un promedio de 11-21% de los resultados citológicos, y la extirpación quirúrgica se recomienda en todos los casos (Caruso & Mazzaferri, 1991; Gharib & Goellner, 1993; Gharib *et al*, 1993; Gharib, 2004). La mayoría de resultados de la biopsia postquirúrgica son benignos; así, se encuentra un 20-40% de neoplasias malignas, 30-40% de adenomas celulares foliculares/Hürthle, y 20-30% de enfermedades no neoplásicas (Caruso & Mazzaferri, 1991).

Categoría Positiva para malignidad

Varias neoplasias malignas de tiroides ofrecen diagnósticos citológicos precisos con un elevado grado de sensibilidad y especificidad incluyendo carcinoma papilar, carcinoma de células de Hürthle, carcinoma folicular pobremente diferenciado, carcinoma insular, carcinoma medular, carcinoma anaplásico, linfoma maligno de células grandes y carcinoma metastásico. En una recopilación de 10 series, se encontró una variación de malignidad del 1-18%, con una media del 4% (Caruso & Mazzaferri, 1991).

DIRECTRICES PARA EL MANEJO DEL PACIENTE CON NÓDULOS TIROIDEOS, BASADAS EN EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

El manejo clínico de los nódulos tiroideos depende fundamentalmente del diagnóstico citológico, aunque está influenciado por los resultados combinados de la medida de TSH, la citología tiroidea mediante PAAF y los ultrasonidos.

Nódulos con diagnóstico citológico positivo en la PAAF

Si los resultados citológicos son positivos para una neoplasia tiroidea maligna primaria, la cirugía se recomienda en todas las ocasiones, previa evaluación ecográfica (Thyroid Carcinoma

Task Force, 2001; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009). Si la PAAF preoperatoria resulta sospechosa de carcinoma papilar de tiroides, es recomendable realizar una tiroidectomía total o casi total (Schlumberger, 1998; Thyroid Carcinoma Task Force, 2001; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009). Con la excepción de los microcarcinomas intratiroides sin evidencia de implicación ganglionar, deben extirparse los nódulos linfáticos dentro del compartimento central del cuello (nivel VI) (Thyroid Carcinoma Task Force, 2001; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009).

Nódulos con diagnóstico citológico negativo en la PAAF

La mayoría de los nódulos tiroideos no necesitan un tratamiento específico una vez descartada la malignidad y la disfunción tiroidea (Hegedüs, 2004; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009). A menos que el nódulo (o nódulos) causen síntomas locales o preocupación excesiva al paciente, el tratamiento destinado a la disminución del volumen o al cese del crecimiento es innecesario, debido a la velocidad de crecimiento tan baja de las lesiones tiroideas benignas, aunque debe realizarse seguimiento clínico y ecográfico cada 1-2 años (Alexander *et al*, 2003; Costante *et al*, 2004).

Nódulos con diagnóstico citológico indeterminado en la PAAF (proliferación folicular/atipias)

Del total, aproximadamente el 20% de las muestras indeterminadas son malignas, pero el riesgo de cáncer varía desde el 15% para el diagnóstico “proliferación o neoplasia folicular” hasta un 60% en el caso de muestras “atípicas” (Gharib, 1994; Gharib & Goellner, 1995; Castro & Gharib, 2003). Se considera que es preferible extirpar estas lesiones citológicamente sospechosas (Castro & Gharib, 2003; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009). La repetición de la PAAF no es útil; normalmente crea confusión y no proporciona información útil para el manejo clínico (Cersosimo *et al*, 1993). Los marcadores actuales, tanto inmunohistoquímicos como moleculares, no distinguen de manera fiable entre neoplasias foliculares benignas y malignas (Castro & Gharib, 2005), y su aplicación en la práctica clínica no está aprobada (AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009).

Nódulos no diagnósticos en la PAAF (no valorables)

Una muestra insatisfactoria resulta normalmente de un nódulo quístico que da lugar a pocas o ninguna célula folicular. La repetición de la PAAF da lugar a especímenes satisfactorios en el 50% de los casos (Chow *et al*, 2001). La PAAF guiada ecográficamente mejora la precisión de la técnica y reduce la proporción de muestras insatisfactorias. Dos estudios europeos muestran que las proporciones de muestras no diagnósticas (8,7% y 16%) pueden descender (hasta 3,5% y 7%, respectivamente) con el uso de la PAAF guiada ecográficamente (Carmeci *et al*, 1998; Danese *et al*, 1998). A pesar de la experiencia, de la repetición de la biopsia, y de la PAAF guiada ecográficamente, aún queda un 5% residual de nódulos que persisten como no diagnósticos, lo que crea un dilema en el manejo para el clínico (McHenry *et al*, 1993; MacDonald & Yazdi, 1996; Schmidt *et al*, 1997). Por tanto, los quistes no diagnósticos recurrentes, mayores de 3-4 cm, y los nódulos sólidos deberían ser tratados quirúrgicamente (Cooper *et al*, 2009).

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE TIROIDES

Los carcinomas de tiroides son aproximadamente 2,5 veces más frecuentes en mujeres que en hombres, con una edad de presentación entre 35-64 años (Horner *et al*, 2009). Son tumores con una incidencia baja pero creciente, que en general presentan baja letalidad y alta supervivencia, que en mujeres es del 86% y en hombres del 82% a los 5 años (Coleman *et al*, 2003; López-Abente *et al*, 2003; Horner *et al*, 2009).

INCIDENCIA

Las estadísticas de cáncer proporcionadas por el programa *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), del *National Cancer Institute* (NCI), estimaron para el año 2009 1,48 millones de nuevos casos de cáncer en Estados Unidos, de los cuales 10000 hombres y 27200 mujeres serían diagnosticados de cáncer de tiroides (Horner *et al*, 2009). Entre los tipos de cáncer más frecuentes, el de tiroides ocupa el 26º puesto en hombres, y el 5º en mujeres, con un 4% de los casos nuevos de cáncer estimados para 2009 (Jemal *et al*, 2009).

En la Unión Europea (UE), según datos de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), se diagnostican más de 16.000 nuevos casos al año, con una incidencia cruda de 2 y 6 casos por cada 100.000 en hombres y mujeres, respectivamente (Ferlay *et al*, 1999).

En los registros poblacionales españoles de cáncer se contabilizaron 1817 casos de cáncer de tiroides en hombres y 2090 casos en mujeres durante el periodo 1999-2002, lo que refleja una razón de tasas hombre:mujer < 1. La tasa de incidencia oscila entre 1,27-3,25 en hombres y 3,81-12,09 en mujeres en España, mientras que en la provincia de Granada muestra valores de 1,27 en hombres y 8,93 en mujeres (Tablas I.5 y I.6) (Cabanes *et al*, 2009).

Tabla I.5. Casos de cáncer en el Registro de Tumores de Granada durante el periodo 1998-2002.

	Total Localizaciones Anatómicas	TIROIDES
HOMBRES	10643	128
MUJERES	7896	133
TOTAL CASOS	18539	261

Cabanes *et al*, 2009.

Tabla I.6. Tasas de incidencia de cáncer recogidas por el Registro de Tumores de Granada durante el periodo 1998-2002 (nº casos/10⁵ personas).

	Total Localizaciones Anatómicas		TIROIDES	
	HOMBRES	MUJERES	HOMBRES	MUJERES
Tasas de incidencia de cáncer ajustadas a la población europea	482,88	314,75	1,27	8,93
Razón de Tasas Hombre:Mujer	1,5		0,1	

Cabanes *et al*, 2009.

Atendiendo al Registro de Tumores de Granada, se diagnosticaron 261 nuevos casos de cáncer de tiroides durante el periodo 1998-2002, lo que corresponde al 1,4% (1,2% de los casos en hombres y 1,7% de los casos en mujeres) de los nuevos casos de cáncer diagnosticados durante ese periodo (Tabla I.5) (Cabanes *et al*, 2009).

Según el Registro Hospitalario de Tumores del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), durante el periodo comprendido entre 1 de enero de 2004 y 30 de mayo de 2008, se diagnosticaron 51 casos de cáncer de tiroides (17 varones y 34 mujeres), con una distribución según tipos histológicos (Tabla I.7) equivalente a la publicada por Hundahl y colaboradores (1998), correspondiente a 53856 casos de carcinoma de tiroides diagnosticados durante el periodo 1985-1995, procedentes de la Base de Datos del NCI (*The National Cancer Data Base*), que representa cerca del 60% de los casos de cáncer incidentes en USA.

Tabla I.7. Casos de cáncer de tiroides en el HUVN durante el periodo 2004-2008.

TIPO HISTOLÓGICO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Carcinoma Papilar de Tiroides	38	74,5%
Carcinoma Folicular de Tiroides	7	13,7%
Carcinoma Medular de Tiroides	2	3,9%
Carcinoma Anaplásico	3	5,9%
Sarcoma de Tiroides	1	2,0%
Total	51	

Registro de Tumores. HUVN.

La incidencia de cáncer de tiroides en USA experimentó un incremento de 2,4 veces en el periodo 1973-2002. Prácticamente todo el aumento fue atribuible al sufrido por el carcinoma papilar de tiroides, que se triplicó, mientras que no hubo cambio significativo en la incidencia de los tipos histológicos menos frecuentes, es decir, folicular, medular y anaplásico (Davies & Welch, 2006). El incremento en la incidencia de cáncer de tiroides se ha atribuido predominantemente a la detección de pequeños carcinomas papilares (<1-2 cm), procedente principalmente de una mejora en el diagnóstico de enfermedad subclínica (Davies & Welch, 2006; Albores-Saavedra *et al*, 2007). Sin embargo, el aumento del escrutinio no puede ser la única explicación, ya que recientemente se ha descrito que, a pesar de que el mayor incremento ocurre en tumores ocultos, también se observa un aumento general en tumores de todos los tamaños, incluyendo aquéllos > 4 cm y los que presentan enfermedad distante (Chen *et al*, 2009).

MORTALIDAD

De acuerdo con las estadísticas de cáncer del programa SEER, la mortalidad estimada para 2009 en USA por cáncer de tiroides era de 1630 individuos, correspondiente al 0,29% de defunciones totales por cáncer (0,35% en mujeres y 0,24% en varones). La tasa de mortalidad ajustada por edades fue de 0,5 por 100000 individuos por año (Horner *et al*, 2009; Jemal *et al*, 2009), equivalente a las tasas ajustadas de 0,53 y 0,68 por 100000 habitantes-año de la UE (Lope-Carvajal *et al*, 2004).

España presenta unas tasas de mortalidad menores, con 0,37 casos por 100000 hombres y 0,51 casos por 100000 mujeres (tasa ajustada a la población UE). La Tabla I.8 muestra que, durante el año 2007, se produjeron en España un total de 290 defunciones por cáncer de tiroides; 36 de ellas en Andalucía y 7 en la provincia de Granada (Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII, 2007)

Tabla I.8. Mortalidad por Cáncer de Tiroides. 2007.

	España	Andalucía	Granada
Número de defunciones			
HOMBRES	98	15	3
MUJERES	192	21	4
Tasa cruda/10⁵			
HOMBRES	0,44		0,68
MUJERES	0,85		0,89
Tasa truncada (35-64 años)			
HOMBRES	0,37		0,55
MUJERES	0,34		0,61
Edad media a la defunción			
HOMBRES	67		63
MUJERES	72		70

Mortalidad por cáncer y otras causas en España. Año 2007.

Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. ISCIII.

SUPERVIVENCIA

De acuerdo con los datos de supervivencia proporcionados por EUROCARE-4 (*EUROpean Cancer Registry-based study on survival and CARE of cancer patients*), la supervivencia relativa ajustada por edad a los 5 años en pacientes diagnosticados entre 1995-1999 es del 86,5% para adultos europeos, y de 82,0% en españoles (Cabanés *et al*, 2009).

Supervivencia según tipo histológico

La gran mayoría de pacientes (95,2% del total de casos de carcinoma de tiroides) son diagnosticados de carcinoma de tiroides papilar o folicular, y presentan excelentes tasas de supervivencia a 10 años que oscilan entre 85-93% (Hundahl *et al*, 1998). Sin embargo, pacientes con carcinoma indiferenciado o anaplásico (tan sólo el 1,7% de los casos), muestran un pésimo pronóstico, con un 14% de supervivencia a los 10 años (Hundahl *et al*, 1998).

La supervivencia del cáncer de tiroides está muy influenciada por la edad del paciente en el momento del diagnóstico, reduciéndose especialmente a partir de los 60 años de edad en todas las histologías (Hundahl *et al*, 1998).

Supervivencia en carcinoma diferenciado de tiroides (Carcinoma Papilar y Folicular).

Atendiendo a la estadificación de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (Greene *et al*, 2002), se observan diferencias sutiles en el pronóstico de ambos tipos histológicos, aunque para los pacientes con carcinoma folicular de tiroides con estadios III-IV el pronóstico se presenta ligeramente peor. En el caso del carcinoma papilar, la supervivencia a 5 años se reduce del 100% en los estadios I-II, al 94% para el estadio III y al 48% para el estadio IV. Por otro lado, en el carcinoma folicular, la supervivencia a 5 años disminuye del 99% en los estadios I-II al 82% para el estadio III, y al 47% para el estadio II (Hundahl *et al*, 1998). Utilizando el sistema de estratificación del riesgo AMES (Cady & Rossi, 1988), se encontraron diferencias significativas en la supervivencia a 5 años entre el grupo de alto riesgo (80%) y el de bajo riesgo (99%) (Hundahl *et al*, 1998).

PREVALENCIA

En Estados Unidos, el 1 de enero de 2006 había aproximadamente 410404 habitantes vivos con antecedentes de cáncer de tiroides (Horner *et al*, 2009; Jemal *et al*, 2009), lo que corresponde a un prevalencia estimada de 0,0831% (0,0368% en hombres y 0,1285% en mujeres). Esta prevalencia se ha calculado usando carcinoma de tiroides como primera neoplasia (Horner *et al*, 2009).

La prevalencia parcial estimada para 2002 en España, según las estimaciones de Globocan 2002 (Ferlay *et al*, 2004), y calculada por Cabanés y colaboradores (2009), considerando el impacto de la incidencia correspondiente al año, a los tres años y a los cinco años anteriores, se encuentra en la Tabla I.9.

TABLA I.9. Número de casos de cáncer prevalentes en España (por sexo).					
	CASOS ANUALES	DEFUNCIONES ANUALES	PREVALENCIA		
			1 AÑO	3 AÑOS	5 AÑOS
Todas las localizaciones tumorales excepto piel					
HOMBRES	97765	58589	68338	168985	245382
MUJERES	63983	34647	50573	134031	203736
TIROIDES					
HOMBRES	390	75	343	975	1559
MUJERES	1154	195	1047	3024	4901

Cabanés *et al*, 2009. Datos de Globocan 2002 (Ferlay *et al*, 2004).

NEOPLASIAS TIROIDEAS MALIGNAS

Clasificación histológica de la OMS de carcinomas tiroideos (DeLellis *et al*, 2004).

La OMS en su edición de 2004 describe como principales subtipos de carcinoma de tiroides los siguientes:

Carcinoma Papilar

Sinónimos: adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mixto papilar-folicular

Carcinoma Folicular

Carcinoma Pobremente Diferenciado

Carcinoma Indiferenciado (anaplásico)

Carcinoma Medular de tiroides

En esta introducción, nos centraremos solamente en la descripción anatomopatológica y clínica del carcinoma papilar de tiroides, el pobremente diferenciado y el anaplásico, por ser las únicas variantes histológicas en las que se ha descrito la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}, principal objeto de esta tesis.

CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

El carcinoma papilar constituye aproximadamente el 80% de las neoplasias tiroideas malignas (Hundhal *et al*, 1998). Pertenece al subtipo de carcinomas bien diferenciados de origen epitelial folicular, y se define como un tumor maligno epitelial que muestra evidencias de diferenciación folicular y presenta rasgos nucleares distintivos (LiVolsi *et al*, 2004).

Los factores de riesgo para el desarrollo de carcinoma papilar de tiroides incluyen la exposición a radiación ionizante, factores genéticos, y enfermedad nodular de tiroides (Duntas & Grab-Duntas, 2006).

Este tumor es de crecimiento lento y curso indoloro. Su pronóstico se considera favorable, aunque depende de factores de riesgo, como la edad del paciente, el estado de la extensión (oculto, intra- o extratiroidea) y la diferenciación histológica. En las imágenes con radionúclidos se presenta como nódulos fríos. Por su lado, la ecografía puede mostrar un nódulo sólido hipoecoico con focos ecogénicos discretos y microcalcificaciones o con focos ecogénicos groseros (Reading *et al*, 2005).

La biopsia por punción y aspiración con aguja fina (PAAF) se considera crucial en el análisis citológico de esta neoplasia y se recomienda como primera aproximación para el diagnóstico del “nódulo tiroideo solitario” (Gharib *et al*, 2008).

El carcinoma papilar de tiroides tiende a la diseminación intraglandular, la propagación de metástasis a nódulos linfáticos e invasión local, y demuestra menos predisposición a la diseminación hematológica en comparación al carcinoma folicular. La enfermedad suele encontrarse localizada en la glándula tiroidea en el 67% de los casos, en tiroides y nódulos linfáticos en el 13%, y sólo en nódulos linfáticos en el 20%. Las metástasis a distancia son infrecuentes y ocurren de forma tardía. (Carcangiu *et al*, 1985⁵).

En el seguimiento a largo plazo se han descrito casos de recidiva hasta 30 años después del tratamiento inicial (Tubiana *et al*, 1985), aunque la mortalidad es muy baja (6,5%) (McConahey *et al*, 1986).

CARACTERÍSTICAS ANATOMOPATOLÓGICAS

El carcinoma papilar presenta diversos patrones microscópicos. Típicamente tienen un epitelio neoplásico organizado sobre tallos fibrovasculares con *papilas* genuinas (origen de su denominación), similares a hojas de helecho; aunque también pueden carecer de tallos discernibles. Las células neoplásicas pueden ser cuboidales, columnares o escamoides, con

citoplasmas desiguales alrededor de un núcleo ovoide central. El estroma de las papilas puede ser edematoso o hialino, conteniendo linfocitos, macrófagos espumosos y hemosiderina. Las papilas se asocian casi siempre a folículos en una proporción variable, los cuales tienen forma irregular, frecuentemente tubular y ramificada. Aun cuando se combinen ambas estructuras (papilar-folicular), el comportamiento biológico del tumor es el de un carcinoma papilar, por lo que debe ser clasificado como tal (Rosai, 2004).

Las células de carcinoma papilar presentan los siguientes rasgos nucleares característicos, los cuales han adquirido gran relevancia en el diagnóstico histopatológico actual:

- **Núcleos con fondo cristalino** (ópticamente claro), que presenta con frecuencia gran tamaño. Estos núcleos muestran cromatina pálida, con condensación periférica que proporciona la apariencia vidriosa o acuosa, típica del carcinoma papilar. El nucléolo es poco notorio y desplazado contra la membrana nuclear (Gray & Doniach, 1969; Hapke & Dehner, 1979).
- **Pseudoinclusiones nucleares**, que representan invaginaciones del citoplasma, bien delineadas como formaciones acidófilas (Johannessen & Sobrinho-Simões, 1980).
- **Cavitaciones nucleares**, que al igual que las pseudoinclusiones, son expresión morfológica de invaginaciones de la membrana nuclear. Tienden a aparecer en núcleos ovalados o fusiformes dispuestos en paralelo al eje mayor (Chan & Saw, 1986).
- **Microfilamentos nucleares**. Se han descrito unos pocos casos en los que el núcleo cristalino se debe al acumulo de finas fibras en forma de hilo (Yamashita *et al*, 1992).

Aproximadamente en el 50% se observan “cuerpos de *psammoma*”, “microcálculos” o “calcoesferitas”. Son pequeñas esferas calcificadas y laminadas basófilas, no birrefringentes, de 5-100 μm , localizadas en el tallo papilar, en el estroma fibroso o entre células tumorales en focos sólidos. (Klinck & Winship, 1959; Batsakis *et al*, 1960; Russell *et al*, 1963; Selzer *et al*, 1977; Johannessen & Sobrinho-Simões, 1980; Vickery, 1983). Su presencia es un indicador diagnóstico de carcinoma papilar, ya que su hallazgo en otras lesiones tiroideas es excepcional (Patchefsky & Hoch, 1972).

Las mitosis son extremadamente raras o ausentes (Lee *et al*, 1985) y, la mitad de los casos de carcinoma papilar presentan fibrosis.

En la quinta parte de los casos aparecen áreas con un patrón de crecimiento sólido-trabecular asociado en proporción similar a focos de metaplasia escamosa (Meissner & Adler, 1958; Woolner, 1971; Franssila, 1973; Rosai *et al*, 1983; Vickery, 1983). La infiltración linfocítica del estroma parece en torno al 30% de los casos (Franssila, 1973; Carcangiu *et al*, 1985^d); no se ha dilucidado si la infiltración es reactiva a la neoplasia o corresponde a una tiroiditis de Hashimoto preexistente (Selzer *et al*, 1977).

El coloide en el carcinoma papilar es de tinción densa (Rosai *et al*, 1983). Se pueden encontrar células gigantes multinucleadas dispersas, presumiblemente en respuesta a la pérdida de coloide (Guter & DeLellis, 1996).

Los carcinomas papilares pueden presentarse clínicamente con metástasis nodulares en un 19,7%. La degeneración quística tiene una incidencia del 52,5% (Carcangiu *et al*, 1985^c), mientras un 9,1% muestra cambios quísticos marcados, que también se desarrollan en las metástasis nodulares.

La implicación multifocal de 1 ó los 2 lóbulos ocurre en aproximadamente el 20% de los casos (Meissner & Adler, 1958; Hirabayashi & Lindsay, 1961; Hawk & Hazard, 1976), pero puede ser mayor si se extirpa toda la glándula (Russell *et al*, 1963).

CRITERIOS DIAGNÓSTICOS DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES EN MUESTRAS CITOTOLÓGICAS OBTENIDAS EN BIOPSIAS POR PUNCIÓN Y ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA

Los aspirados de carcinomas papilares contienen generalmente muchas células, divididas en fragmentos de tejido, hojas en monocapa y grupos tridimensionales. Una presentación típica a muy baja magnificación incluye un gran número de fragmentos de tejido con patrones estructurales característicos, mezclados con una gran población de células neoplásicas pleomórficas, aisladas o en grupos.

El diagnóstico citopatológico de carcinoma papilar se realiza en base a los criterios característicos descritos en la Tabla I.10. Así, el diagnóstico no puede basarse en un solo criterio, ya que las características enumeradas en la tabla I.10 también pueden encontrarse en enfermedades benignas.

TABLA I.10. CARACTERÍSTICAS CITOPATOLÓGICAS DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

CELULARIDAD	Variable. De abrumadoramente celular a escaso en tumores con desmoplasia o con cambio quístico.
PRESENTACIÓN	Células neoplásicas aisladas, en grupos cohesivos no apretados o en fragmentos de tejido sincitial con varias configuraciones arquitectónicas.
CÉLULAS	Amplio rango de tamaños y formas (pequeño, mediano, muy grande; redondeadas, cuboideas, columnares cortas, alargadas, poligonales, fusiformes). Límites celulares de bien a pobremente definidos.
NÚCLEOS	Pleomórficos en tamaño y forma (redondeados, ovales, rectangulares). Membranas nucleares de suaves a irregulares. Cromatina característica, pálida, en polvo a finamente granular. Múltiples micro/macronucleolos. Cavitaciones nucleares longitudinales. Inclusiones intranucleares únicas o múltiples, de pequeñas a grandes, ocupando completamente el núcleo, bordeados por cromatina condensada. Mitosis de rara a ausente. La degeneración puede enmascarar características nucleares.
CITOPLASMA	Variable, insignificante en el tipo clásico y abundante en algunas variantes morfológicas. Pálido.
METAPLASIA ESCAMOSA	±
CUERPOS DE PSAMMOMA	A menudo presentes. Desnudos o incorporados en fragmentos de tejido sincitial de células neoplásicas que muestran características nucleares de carcinoma papilar. Únicas o múltiples dentro de cualquier determinado fragmento de tejido. Apariencia de laminada concéntrica a dispersa. De basofílicos a combinación de múltiples colores (marrón, ámbar, violeta, púrpura). Algunas veces, refringentes. Los cuerpos de psammoma desnudos no presentan importancia diagnóstica.
CÉLULAS GIGANTES	Casi siempre presentes. Variables en número y tamaño, el nº de núcleos varía. Redondeados a ovales con cromatina finamente granular y micronucleolos. Cavitaciones e inclusiones no presentes. Citoplasma abundante, denso y no fagocítico.
FONDO	Normalmente limpio sin necrosis. Evidencia de hemorragia reciente o antigua. Histiocitos con o sin hemosiderina. Infiltración linfocítica ±. Coloide variable, de pálido a denso, a menudo en hebras.
INMUNOPERFIL	Reactivo a tiroglobulina, TTF-1 y citoqueratina 19.

PERFIL INMUNOHISTOQUÍMICO

Las células de carcinoma papilar muestran reactividad positiva a tiroglobulina de manera consistente, excepto las de la variante de células columnares, en las que la positividad es variable (Wenig *et al*, 1998). Las células de carcinoma papilar también muestran reactividad a las queratinas de alto y bajo peso molecular, lo que indica una tendencia a la metaplasia escamosa. La reactividad positiva también se manifiesta con el factor de transcripción de tiroides-1. Se ha documentado positividad a vimentina, pero no al antígeno carcinoembrionario o la calcitonina. También se ha descrito una fuerte reactividad a la proteína S-100 (Rosai *et al*, 1992). Otros marcadores para el carcinoma papilar identificados incluyen CK-19, CD-15, HBME-1 y galectina-3 (Baloch *et al*, 1999; Hirokawa *et al*, 2000; Cheung *et al*, 2001^b; Aratake *et al*, 2002; Khurana *et al*, 2003; Saggiorato *et al*, 2004).

VARIANTES MORFOLÓGICAS DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

Las variantes morfológicas del carcinoma papilar se clasifican en base al patrón arquitectónico (de crecimiento) y al tipo celular. Cada variante debe tener más del 75% del tumor compuesto por un patrón morfológico específico para ser clasificado en esa designación específica. El denominador común para todas las variantes es la típica morfología nuclear, caracterizada por núcleos pálidos, nucléolos, cavitaciones nucleares e inclusiones citoplasmáticas intranucleares, a excepción de la variante de células columnares. Estas características nucleares permiten un diagnóstico histológico y citológico preciso del carcinoma papilar.

Es muy frecuente observar patrones de crecimiento múltiple en un determinado carcinoma papilar. Por tanto, el diagnóstico citológico depende del área presente en la muestra y puede no ser representativa del patrón morfológico principal. Histológicamente, las variantes morfológicas del carcinoma papilar de tiroides se reconocen con facilidad, pero generalmente no se intenta su identificación en muestras citológicas, a excepción de la variante folicular.

Los rasgos que caracterizan algunas de las variantes –incluyendo encapsulación (variante encapsulada), implicación difusa (variante difusa macrofolicular), estroma similar a la fascitis nodular o desmoplásica y carcinomas micropapilares (microcarcinoma)– no pueden apreciarse en muestras citológicas, sino únicamente en secciones histológicas. Además, la incidencia de la mayoría de estos subtipos es baja, y sus características citopatológicas han sido documentadas en raras ocasiones. Con la excepción de los carcinomas de células columnares, todos los demás subtipos tienen las mismas características nucleares típicas, por lo que puede hacerse fácilmente un diagnóstico genérico de carcinoma papilar de tiroides con un alto grado de precisión. El reconocimiento citológico de los subtipos morfológicos no está garantizado y sería insignificante en términos de manejo del paciente, ya que la tiroidectomía total se realiza de forma rutinaria ante un diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides, independientemente del subtipo morfológico.

Se han descrito diversas variantes histopatológicas del carcinoma papilar de tiroides (LiVolsi, 1990; Kini, 2008). La clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2004 tipifica las siguientes VARIANTES (LiVolsi *et al*, 2004):

- tipo clásico o convencional
- variante folicular
- variante macrofolicular
- variante de células oncocíticas (oxifílicas)
- variante de células claras
- variante esclerosante difusa
- variante de células altas
- variante de células columnares
- variante sólida-trabecular
- carcinoma cribiforme
- carcinoma papilar con estroma de tipo fascitis
- carcinoma papilar con componente insular focal
- carcinoma papilar con células escamosas o carcinoma mucoepidermoide
- carcinoma papilar con carcinoma de células fusiformes y gigantes
- carcinoma combinado papilar y medular
- microcarcinoma papilar (esclerosante oculto)

La literatura describe además otras variantes morfológicas del carcinoma papilar de tiroides (CPT), como la variante folicular difusa, la variante encapsulada y la similar a tumor Warthin (Rosai, 2004; Kini, 2008). Mientras algunas de las variantes descritas tienen mejor pronóstico que el tipo convencional, otras tienden a comportarse de manera agresiva, mostrando una mortalidad y morbilidad mayores. Entre las últimas se incluyen la variante de células altas, la esclerosante difusa y, el carcinoma papilar de tiroides con áreas desdiferenciadas. Por otro lado, la variante folicular, la oncocítica y las originadas en el contexto de tiroiditis autoinmune se asocian con consecuencias adversas.

Descripción de las variantes de CPT más frecuentes

CPT variante folicular

Descrito por Lindsay y colaboradores (1960), y definido en detalle por Chem y Rosai (1977), las variantes foliculares comprenden hasta el 12% de los carcinomas papilares de tiroides (Meissner & Adler, 1958; Chem & Rosai, 1977; Rosai *et al*, 1992). Se ha establecido una elevada incidencia de metástasis en nódulos linfáticos cervicales. Aunque su comportamiento biológico es similar al del carcinoma papilar clásico, algunos autores han indicado un curso clínico agresivo, con mayor propensión a metastatizar a distancia, particularmente a pulmón (Carcangiu *et al*, 1985^c; Rosai *et al*, 1992; LiVolsi, 1990; Tielens *et al*, 1994).

CPT variante células altas

Descrita por primera vez por Hawk y Hazard (1976), la variante de células altas comprende aproximadamente el 10% de los carcinomas papilares de tiroides (Johnson *et al*, 1988; Flint *et al*, 1991; Hicks & Batsakis, 1993; Terry *et al*, 1994; Ostrowski & Merino, 1996; Bocklage *et al*, 1997; van den Brekel *et al*, 1997; Gamboa-Domínguez *et al*, 1997; Merino & Monteagudo, 1997; Filie *et al*, 1999; Pisani *et al*, 1999; Solomon *et al*, 2002). Estos tumores tienden a aparecer en pacientes de avanzada edad, con una relación hombre:mujer de 1:5.

El tamaño del tumor es grande y voluminoso, con frecuencia excede los 6 cm de diámetro y, contiene áreas de necrosis, extensión extratiroidea e invasión vascular (42%). El comportamiento biológico es más agresivo que el del tipo clásico (Johnson *et al*, 1988), con mayor incidencia de recidivas, metástasis en nódulos linfáticos cervicales (75%) y metástasis distantes (17%). La mortalidad es del 35% de los casos (Johnson *et al*, 1988; Rosai *et al*, 1992; LiVolsi *et al*, 2004).

CPT variantes sólido-trabecular

Esta variante es común en niños, incluyendo aquéllos expuestos a radiación. Se caracteriza por un patrón de crecimiento sólido compuesto de células poligonales con abundante citoplasma rosa y los rasgos nucleares típicos del carcinoma papilar clásico (Rosai *et al*, 1992; Nikiforov *et al*, 2001). Presenta invasión vascular y extratiroidea en un tercio de los casos (LiVolsi *et al*, 2004).

CPT variante esclerosante difusa

Descrito por primera vez por Vickery (1983), la variante esclerosante difusa se observa más frecuentemente en niños y adolescentes, y representa el 2,3% de todos los carcinomas papilares de tiroides (Chan *et al*, 1987; Carcangiu & Bianchi, 1989; Soares *et al*, 1989; Caruso *et al*, 1990; Fujimoto *et al*, 1990; Hayashi *et al*, 1990; Schröder *et al*, 1990; Gómez-Morales *et al*, 1991; Kumarasinghe, 1998; Imamura *et al*, 2000; Triggiani *et al*, 2003).

Esta variante muestra una mayor incidencia de implicación de los nódulos linfáticos cervicales y metástasis pulmonares. Los depósitos metastásicos no son tan distintivos como el tumor primario y se asemejan al carcinoma papilar tipo clásico (Chan *et al*, 1987).

CPT variante folicular difusa

Originalmente descrito por Sobrinho-Simões y colaboradores (1990), la variante folicular difusa predomina en mujeres, que pueden ser hipertiroideas, y se presenta macroscópicamente como un bocio. La glándula tiroides se encuentra aumentada y ocupada difusamente por una neoplasia que muestra el patrón folicular y la morfología nuclear del carcinoma papilar. El curso clínico se ha descrito como agresivo, con metástasis distantes (Ivanova *et al*, 2002).

CPT variante encapsulado

Se caracteriza por una encapsulación total, con o sin invasión de la cápsula por el tumor; puede asociarse con metástasis linfáticas pero la incidencia de metástasis distantes es prácticamente nula (Schröder *et al*, 1984^a; Evans, 1987; Baloch & LiVolsi, 2000).

CPT variante de células claras.

Meissner y Adler describieron un 28% de casos con cambio de células claras en 224 casos de carcinoma papilar de tiroides (Meissner & Adler, 1958). Algunos autores consideran los carcinomas papilares con cambio de células claras como una expresión de discrepancia morfológica (Carcangiu *et al*, 1985^a; Schröder & Böcker, 1986). Rosai y colaboradores han establecido que esta característica es rara e intrascendente (1992). El citoplasma claro es un resultado del acúmulo de glucógeno o formación vesicular (Civantos *et al*, 1984).

CPT variante microcarcinoma (esclerosante oculto)

De acuerdo a la definición de la OMS, el microcarcinoma papilar es un tumor de tamaño ≤ 10 mm (DeLellis *et al*, 2004). Las lesiones que varían entre 5-10 mm son visibles a simple vista, pueden ser palpadas por el endocrinólogo (a no ser que se encuentren situadas profundamente), visualizadas por ultrasonidos y, pueden ser biopsiadas (Kini, 2008).

Los términos “microcarcinoma” y “carcinoma esclerosante oculto” se usan generalmente como sinónimos.

El microcarcinoma puede ser solitario, multifocal, unilateral o bilateral, circunscrito y bien definido, con o sin encapsulación. Puede infiltrar en el parénquima circundante, o ser esclerótico y precisamente diferenciado del parénquima normal adyacente (Chan, 1990).

Las metástasis en los nódulos linfáticos pueden aparecer con el microcarcinoma, y también metástasis a distancia (Laskin & James, 1983; Harach & Franssila, 1984; Naruse *et al*, 1984; Strate *et al*, 1984; Hoie *et al*, 1988).

Kasai y Sakamoto sugirieron una subclasificación del microcarcinoma como diminuto o “minute”(0-5 mm) y pequeño o “tiny” (5-10 mm), debido a la diferencia en cuanto a incidencia de metástasis en nódulos linfáticos (13 vs 59%) y extensión extratiroidea (3 vs 10%) (Kasai & Sakamoto, 1987).

CARCINOMA POBREMENTE DIFERENCIADO

La OMS lo define como neoplasia derivada de células foliculares que muestra limitada evidencia de una diferenciación celular de estructura folicular (DeLellis *et al*, 2004). Ocupa una posición intermedia entre carcinomas papilares y foliculares diferenciados y carcinomas anaplásicos o indiferenciados (Sakamoto *et al*, 1983; DeLellis *et al*, 2004).

Los carcinomas pobremente diferenciados aparecen como grandes masas solitarias en el tiroides, que corresponden a nódulos fríos gammagráficamente. Los nódulos linfáticos regionales pueden aparecer agrandados. Frecuentemente, suelen presentarse como un crecimiento reciente en un paciente con tiroides multinodular o uninodular de larga duración, aunque también pueden presentarse como masas de crecimiento rápido. Además de

metástasis nodulares, son relativamente habituales las metástasis pulmonares y óseas en el momento del diagnóstico (DeLellis *et al*, 2004).

La apariencia histopatológica del carcinoma pobremente diferenciado es variable (Cabanne *et al*, 1974; Lucot *et al*, 1979; Sakamoto *et al*, 1983; Carcangiu *et al*, 1984; Ljungberg *et al*, 1984). Se reconocen tres patrones histológicos diferentes: insular, trabecular y sólido (Papotti *et al*, 1993; Sobrinho-Simões, 1996). El diagnóstico se basa en la identificación de estos patrones en la mayoría del tumor, junto con un patrón infiltrativo de crecimiento, necrosis e invasión vascular.

CARCINOMA ANAPLÁSICO O INDIFERENCIADO

Menos del 2% de los carcinomas tiroideos pueden clasificarse como anaplásicos o indiferenciados (Hundahl *et al*, 1998). Tradicionalmente, estos tumores incluyen los poco frecuentes carcinomas de células pequeñas, y los tipos más comunes, el de células gigantes y el de células fusiformes.

En cuanto a los tumores de células gigantes y de células fusiformes, ambas son neoplasias agresivas que normalmente se presentan en pacientes de avanzada edad, y con mayor frecuencia en mujeres. El paciente puede relatar una historia de un nódulo tiroideo que, tras muchos años de estabilidad, de repente comienza a crecer rápidamente. Algunos pacientes presentan historia previa de carcinoma de tiroides de bajo grado; otros presentan un carcinoma de tiroides de bajo grado descubierto en el momento del diagnóstico del carcinoma anaplásico, y algunos no tienen historia de enfermedad tiroidea.

El análisis patológico minucioso de tiroides que contienen carcinomas anaplásicos ha demostrado una elevada incidencia (50-70%) de vestigios de carcinoma papilar o folicular bien diferenciado (Carcangiu *et al*, 1985^b; Rosai *et al*, 1985; Hurlimann *et al*, 1987; LiVolsi *et al*, 1987; Shvero *et al*, 1988; Venkatesh *et al*, 1990; Ordóñez *et al*, 1991; Rosai *et al*, 1992), o algunas veces un adenoma o nódulos adenomatosos (Venkatesh *et al*, 1990), confirmando la impresión clínica de que los carcinomas anaplásicos se originan a partir de neoplasias de bajo grado.

La evaluación macroscópica muestra una masa infiltrante, pálida y dura, que puede contener focos blandos de necrosis y hemorragia. Estos tumores invaden los tejidos blandos cervicales e involucran a los nódulos linfáticos regionales, a menudo por extensión directa. El análisis microscópico revela variados patrones histológicos, muchas figuras mitóticas, y regiones de necrosis aguda.

Estudios ultraestructurales han demostrado la presencia de estructuras que se asemejan a pequeños folículos y conexiones entre las células, apoyando la idea de un fenotipo epitelial (Carcangiu *et al*, 1985^b; Rosai *et al*, 1985; LiVolsi *et al*, 1987; Shvero *et al*, 1988; Venkatesh *et al*, 1990; Ordóñez *et al*, 1991). La evidencia inmunohistoquímica de tiroglobulina se ha demostrado en unos pocos carcinomas anaplásicos, lo que probablemente representa la difusión de células con tiroglobulina de los folículos tiroideos destruidos (Rosai *et al*, 1985; LiVolsi *et al*, 1987); del 50 al 100% de estos tumores contienen queratina (Carcangiu *et al*, 1985^b; Rosai *et al*, 1985; LiVolsi *et al*, 1987; Shvero *et al*, 1988).

FACTORES PRONÓSTICOS Y DE RIESGO EN CÁNCER DIFERENCIADO DE TIROIDES

PRESENTACIÓN CLÍNICA

Los registros de tumores indican que, en el momento del diagnóstico, el cáncer de tiroides se encuentra localizado en tiroides en el 59% de los casos, diseminado a nódulos linfáticos regionales en el 34%, y presente fuera del cuello como metástasis distantes en el 5% (Ries *et al*, 2007, 2008). Esto es consistente con las series clínicas retrospectivas publicadas, que describen diseminación a nódulos linfáticos en el 20-50% de los pacientes en la evaluación clinicopatológica rutinaria (Mazzaferri & Kloos, 2001; Chow *et al*, 2003; Grebe & Hay, 1996; Ito *et al*, 2003; McConahey *et al*, 1986; Nam-Goong *et al*, 2004; Scheumann *et al*, 1994). Con una disección meticulosa del cuello y un minucioso examen patológico, el 80-90% de los pacientes presentan implicación linfática microscópica en el momento del diagnóstico (Arturi *et al*, 1997; Qubain *et al*, 2002). En estas series clínicas, la diseminación metastásica en el momento del diagnóstico se observa solamente en el 2-5% de los casos (McConahey *et al*, 1986; Hay, 1990; Mazzaferri & Jhiang, 1994).

Según el estudio multicéntrico de cohortes de Hundahl y colaboradores (2000), la mayoría de los pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides (75%) presentan un nódulo tiroideo palpable, y en menor medida, adenopatías cervicales (27%), con una minoría de pacientes que hayan presentado síntomas relacionados, como disfagia (10%), estridor (4%), ronquera o cambios en la voz (7%). Sin embargo, de forma creciente se encuentran carcinomas ocultos en estudios de imagen obtenidos por otros motivos.

Aunque los síntomas atribuibles a diseminación de metástasis distantes son una manifestación infrecuente del cáncer diferenciado de tiroides (2%) (Hay *et al*, 2002^{ab}), las metástasis se presentan en el diagnóstico inicial en un 46-73% (Haq & Harmer, 2005; Lin *et al*, 1999^b; Benbassat *et al*, 2006).

El cáncer diferenciado de tiroides es una enfermedad indolora y potencialmente curable en la mayoría de los pacientes, que presentan generalmente un buen pronóstico, asociado a una mortalidad específica a los 10 años inferior al 10% (Hundahl *et al*, 1998; Cross *et al*, 2006). Sin embargo, un subgrupo de estos pacientes presenta un mal desenlace debido a un curso tumoral agresivo, tanto clínica como histológicamente (DeGroot *et al*, 1990).

La recidiva tumoral se puede detectar entre el 13-23% a partir de los 16,6 años tras el diagnóstico, con recidiva local en el 9-30% de los casos y el 7,5% de recidiva fuera del cuello (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Simon *et al*, 1996; Mazzaferri & Kloos, 2001; Hay *et al*, 2002^{a,b}). La recidiva clínicamente evidente no es un suceso trivial, con un 8% de los pacientes con recidiva local, y un 50% de los pacientes con recidiva a distancia que mueren por esta enfermedad (Mazzaferri & Jhiang, 1994).

El reconocimiento y evaluación de factores pronósticos, combinado con datos de factores moleculares que evalúan el riesgo de recidiva y estratifican los pacientes con carcinoma diferenciado de tiroides, se han usado para la selección de modalidades de tratamiento específicas (Mazzaferri, 1987; Shaha, 1998; Cady, 1998).

El riesgo de metástasis, recidiva o fallecimiento están relacionados con varios parámetros, que han sido recopilados recientemente por la AJCC (*American Joint on Cancer Committee*), la UICC (*International Union Against Cancer*) y la NCCN (*National Cancer Comprehensive Network*) (Tabla I.11) (Duntas & Grab-Duntas, 2006).

Tabla I.11. Factores pronósticos para metástasis, riesgo de recidiva y muerte por cáncer diferenciado de tiroides.

FACTORES RELATIVOS A LOS PACIENTES
Edad inferior a 15 años o superior a 45 años
Género masculino
Antecedentes familiares de cáncer de tiroides
FACTORES RELATIVOS AL TUMOR
Diámetro del tumor > 4 cm
Localización bilateral
Extensión tumoral fuera de la cápsula tiroidea
Subtipo tumoral:
Células altas
Células columnares
Células de Hürthle
Atipia nuclear acentuada, necrosis tumoral
Invasión vascular
Metástasis en nódulos linfáticos cervicales o mediastínicos
Metástasis a distancia
Captación de yodo baja o ausente en metástasis o tumor

Duntas & Grab-Duntas, 2006.

FACTORES PRONÓSTICOS CLÍNICOS e HISTOPATOLÓGICOS

Edad y sexo

Desde 1925 se ha considerado la edad como un importante factor pronóstico para el cáncer diferenciado de tiroides (Craver, 1925; Crile & Hazard, 1953). Para pacientes con edad inferior a 40 años, la mortalidad en el momento del diagnóstico es baja y, se incrementa progresivamente a partir de esta edad. Los pacientes mayores de 65 años, comparados con los menores de 40, desarrollan a menudo tumores agresivos locales y presentan recidivas clínicas (Cunningham *et al*, 1990; Ward & Assumpção, 2004). Un estudio reciente reveló que la edad en el momento del diagnóstico era el factor más relevante en la determinación de la supervivencia esperada (Ronga *et al*, 2002); por el contrario, las características histológicas del cáncer diferenciado de tiroides no se relacionan con la edad (Tubiana *et al*, 1985).

En el cáncer diferenciado de tiroides, el sexo tiene poca importancia pronóstica, ya que las mujeres presentan una supervivencia sólo ligeramente superior a los hombres (Mazzaferri & Kloos, 2001).

Tamaño tumoral

El riesgo de recidiva y de muerte asociada a cáncer diferenciado de tiroides es proporcional al incremento en tamaño del tumor primario (Schlumberger & Pacini, 1999; Mazzaferri & Kloos, 2001). El tamaño del carcinoma papilar de tiroides varía desde < 1 cm, (microcarcinoma), hasta grandes tumores predictivos de recidiva y menor tiempo de supervivencia. Cuando se considera el diámetro del tumor en el momento del diagnóstico, el riesgo acumulativo para infiltración extratiroidea y presencia de metástasis en los nódulos linfáticos es mayor en el carcinoma papilar que en el folicular, mientras que en el caso de metástasis distantes y tumores de igual tamaño, el riesgo es el mismo para ambos (Machens *et al*, 2005).

Localización del tumor e infiltración de la cápsula tiroidea

El carcinoma papilar de tiroides se presenta a menudo con focos múltiples en uno o los dos lóbulos de la glándula tiroidea. Se ha demostrado recientemente que la multifocalidad de los tumores representa con mayor probabilidad tumores separados que metástasis intranodulares de un clon tumoral (Sugg *et al*, 1998).

La extensión del tumor fuera de la cápsula tiroidea está asociada generalmente con un mal pronóstico, que ha sido demostrado en grandes estudios mediante análisis multivariante (Hay

et al, 1993; Shaha *et al*, 1995). En esta línea de evidencia, se ha descrito que la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico, combinado con características como sexo masculino, tamaño tumoral y edad superior a 60 años, hace descender significativamente la supervivencia (Tzavara *et al*, 1999).

Subtipo tumoral

Los pacientes con **Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT)** exhiben una tasa de supervivencia superior a los de carcinoma folicular, debido principalmente a que se presentan a edad más temprana; la supervivencia a 10 años de 95% y 80%, respectivamente (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Baloch & LiVolsi, 2001). Sin embargo, estas estadísticas pueden variar dependiendo de otros factores pronósticos.

La variante de células altas del CPT se encuentra habitualmente en tumores >5 cm de diámetro, en varones de edad avanzada, y se asocia con manifestaciones extratiroides y muerte en el 25% de los pacientes.

La variante de células columnares del CPT es rara, con un comportamiento muy agresivo, aparición de metástasis distantes y fallecimiento (Evans, 1986).

Finalmente, la variante esclerosante difusa del CPT, que afecta a niños y adolescentes, induce esclerosis difusa de la glándula tiroides, infiltración linfocítica asociada al tumor, y metástasis pulmonares en el 25% de los pacientes (Chan *et al*, 1987).

La variante de “células de Hürthle” del **Carcinoma Folicular de Tiroides (CFT)** se caracteriza por invasión trans-capsular y/o vascular, metástasis linfáticas proximales y mal desenlace (Chen *et al*, 1998; Baloch & LiVolsi, 2001).

Por su parte el “carcinoma folicular mínimamente invasivo”, con invasión capsular sólo, se asocia con buen pronóstico.; mientras que el “carcinoma folicular con invasión vascular”, con metástasis hematológicas en hueso y pulmón, causa el fallecimiento hasta en el 50% de los pacientes en los siguientes 10 años (Brennan *et al*, 1991; Baloch & LiVolsi, 2001).

El carcinoma encapsulado, ya sea papilar, folicular o mixto, presenta un buen pronóstico.

Invasión vascular

Tanto en carcinoma papilar como folicular, la detección de invasión vascular histológica por el tumor es un signo de agresividad tumoral que conlleva invasión hematológica, metástasis distantes y peor pronóstico (Falvo *et al*, 2005). Se ha demostrado que la invasión vascular intra- y/o extratiroidea favorece las recidivas locales y metástasis distantes, más frecuentes en carcinoma folicular (Gardner *et al*, 2000).

Metástasis

En pacientes con CPT son más frecuentes las metástasis en ganglios linfáticos proximales, en comparación con el CFT. En conjunción con la edad, estas metástasis constituyen un factor pronóstico muy importante en la recidiva tumoral y en el fallecimiento asociado a cáncer (Hughes *et al*, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que las metástasis limitadas a nódulos linfáticos proximales no influyen en la tasa de supervivencia (Lin *et al*, 1999).

En un estudio reciente se ha mostrado que los factores de riesgo significativos para la persistencia y recidiva de enfermedad en cáncer diferenciado de tiroides fueron el número de metástasis en nódulos linfáticos, la extensión extracapsular del tumor, la localización de metástasis ganglionares, combinado con un tamaño tumoral >4 cm e incremento del nivel de Tg a los 6-12 meses tras el tratamiento (Leboulleux *et al*, 2005). También se ha mostrado que pacientes con recidiva locorregional, una edad superior a 45 años, histología folicular e infiltración de la cápsula tiroidea, la presencia de metástasis distantes, la no ablación de restos tiroideos, así como la ausencia de captación de radioyodo y la localización de la recidiva

locorregional en lecho tiroideo, están asociadas con una supervivencia reducida (Rouxel *et al*, 2004).

Los sitios más frecuentes de enfermedad metastásica distante son los pulmones, seguido del esqueleto, suponiendo estos dos sitios la práctica totalidad de los focos metastásicos distantes (Haq & Harmer, 2005). Las metástasis pulmonares pueden aparecer en estudios mediante TAC como micromódulos (<5mm) o nódulos; también pueden encontrarse radiográficamente ocultas (identificadas solamente en gammagrafía con ¹³¹I diagnóstica o post-tratamiento).

Los pacientes con metástasis distantes presentan un mal pronóstico y una considerable mortalidad específica. Además, el número, el tamaño, y la localización de estas metástasis son factores importantes. Los pacientes con micrometástasis pulmonares muestran una mayor tasa de supervivencia que los que presentan macrometástasis, mientras que éstos últimos presentan mejor tasa de supervivencia que los pacientes con metástasis óseas (Clark, 1996; Maxon, 1993). Las metástasis a distancia presentan un peor desenlace, especialmente a partir de los 70 años (Haq & Harmer, 2005). Aunque el paciente viva durante largos períodos, su supervivencia global se encuentra significativamente reducida (Clark *et al*, 2005). Los resultados de algunas pequeñas series muestran una proporción de supervivencia a 5 años del 100% para resultados normales, 88% para el caso de metástasis micronodulares y 25% para metástasis nodulares (Ilgan *et al*, 2004).

Es bien conocido que pacientes con carcinoma de tiroides pobremente diferenciado a menudo exhiben lesiones hipermetabólicas, evidenciada por un aumento de la captación de glucosa, pérdida de capacidad de concentrar ¹³¹I.

ESTADIFICACIÓN E ÍNDICES PRONÓSTICOS DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

La estadificación y clasificación del riesgo del cáncer es una parte esencial e integral de su manejo, y los sistemas de estadificación no sólo proporcionan información pronóstica precisa al clínico y a su paciente, sino que facilita el intercambio de información entre distintas instituciones médicas (Greene, 2005; Cooper *et al*, 2009). Sin embargo, en pacientes con carcinoma papilar de tiroides es controvertido cuál de los actuales sistemas de estadificación es el más preciso para predecir la supervivencia (Lang *et al*, 2007).

Se han desarrollado varios sistemas de estadificación para el carcinoma papilar de tiroides. Todos intentan tener en cuenta factores que predicen el comportamiento tumoral para proporcionar información pronóstica y guiar la intensidad adecuada del tratamiento y el seguimiento. Aunque estos sistemas de estadificación difieren sutilmente, los factores más relevantes incluyen edad del paciente en el momento del diagnóstico, tamaño y extensión tumoral, implicación de nódulos linfáticos regionales, y finalmente, metástasis distantes. Una menor edad al diagnóstico se asocia con un pronóstico mucho más favorable, debido a que estos tumores tienden a ser subtipos histológicos menos agresivos que responden muy eficientemente a la terapia con radioyodo (Jukkola *et al*, 2004; Loh *et al*, 1997; Rouxel *et al*, 2004; Durante *et al*, 2006).

En nuestro estudio hemos aplicado los siguientes Sistemas de Estadificación:

EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer (Byar *et al*, 1979).

El sistema EORTC fue el primer intento de estatificar en un solo sistema todos los tipos histológicos de carcinoma de tiroides, incluyendo los carcinomas anaplásicos y medulares. La puntuación pronóstica se deriva y estratifica en grupos de riesgo o estadios 1 - 5 (ANEXO II).

AMES: Age, Metastases, Extent, Size. Lahey Clinic (Cady & Rossi, 1988).

El sistema AMES se desarrolló a partir de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides. Los factores pronósticos incluyen edad, metástasis distantes, invasión extratiroidea y tamaño. Tanto la edad como el tamaño se expresan como variables categóricas; 5 cm es el punto de corte para el tamaño; para la edad es de 41 años en hombres y 51 en mujeres.

MACIS: Metastases, Age, Completeness or resection, Invasion, Size. Mayo Clinic (Hay *et al*, 1993).

Este sistema se desarrolló como alternativa al sistema AGES (Age, Grade, Extent, Size) debido a que en la mayoría de los centros el grado del carcinoma papilar de tiroides no se evalúa. El sistema se basa únicamente en el estudio de pacientes con carcinoma papilar de tiroides; se obtiene una puntuación pronóstica que estratifica los pacientes en 4 grupos de riesgo I-IV.

GAMES: Grade, Age, Metastases, Extent, Size. Memorial Sloan Kettering (Shaha *et al*, 1994).

Este sistema de estadificación contempla pacientes con cáncer diferenciado de tiroides. Los pacientes son estratificados en 3 categorías (bajo riesgo, riesgo intermedio y riesgo elevado). Los puntos de corte para las variables continuas fueron establecidos en 45 años y 4 cm.

TNM, 6ª Edición: Sistema de Estadificación TNM. AJCC/UICC. (Greene *et al*, 2002).

La AJCC/UICC aplicó este sistema de clasificación basándose en parámetros pTNM. Está recomendado para todos los tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides (Brierley *et al*, 1997; Loh *et al*, 1997), ya que proporciona un método útil que describe la extensión del tumor (Wittekind *et al*, 2002) (Anexo III). Es el único sistema de estadificación que es revisado regularmente para actualizarlo con los cambios predominantes en el campo del carcinoma de tiroides. La 6ª edición comenzó a usarse en enero de 2003 y, como en ediciones anteriores, el sistema TNM describe la extensión anatómica del tumor primario (T), la implicación de los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis a distancia (M). Aunque el sistema es aplicable a todos los tipos histológicos de carcinoma de tiroides, la agrupación del estadio varía dependiendo de cada tipo histológico; sin embargo, el carcinoma papilar y folicular se estadifican de la misma forma.

ESTRATEGIA DE SEGUIMIENTO POSTQUIRÚRGICO EN CÁNCER DE TIROIDES**Terapia inicial**

El pilar de la terapia en cáncer diferenciado de tiroides incluye la resección quirúrgica (normalmente tiroidectomía casi total, en la que todo el tejido tiroideo macroscópico es retirado, con la excepción de un pequeño remanente, necesario para conservar las glándulas paratiroides y los nervios recurrentes laríngeos), posible disección de nódulos linfáticos y posible ablación de los restos tiroideos con radioyodo (Cooper *et al*, 2009; Sosa & Udelsman, 2006). El único estudio de imagen preoperatorio de rutina es la ecografía de cuello, que puede realizarse para identificar posibles metástasis multifocales o cervicales, ya que estos hallazgos afectarían a la extensión de la cirugía inicial (Stulak *et al*, 2006; Kouvaraki *et al*, 2003; Sosa & Udelsman, 2006). Las metástasis en ganglios linfáticos cervicales no palpables se detectan con ecografía en el 33% de los pacientes con carcinoma papilar de forma preoperatoria (Stulak *et al*, 2006).

La tiroidectomía casi total es seguida de la ablación de restos con radioyodo, para tratar cualquier posible enfermedad local persistente o la presencia de metástasis no sospechadas. La utilidad de la ablación con radioyodo en todos los pacientes con estadio I es controvertida, pero las Guías de Práctica Clínica de la ATA la recomiendan en pacientes con características de mayor riesgo de enfermedad temprana, incluyendo el estadio I multifocal, metástasis cervicales (pacientes <45 años sin metástasis distantes son estadio I, independientemente de

la presencia de metástasis nodulares locales), evidencia de invasión microvascular y subtipos histológicos más agresivos (Cooper *et al*, 2009; Sawka *et al*, 2004).

Seguimiento a largo plazo

La base del manejo a largo plazo incluye el reemplazo hormonal tiroideo con supresión de TSH y vigilancia bioquímica e iconográfica de intensidad variable, dependiendo de las características histológicas y clínicas.

Los principios básicos para el manejo de cualquier enfermedad persistente o recurrente detectable, en orden de importancia, son:

- a. Resección quirúrgica de las metástasis locorregionales detectadas en ausencia de metástasis distantes extendidas.
- b. Terapia repetida con radioyodo para enfermedad persistente, recidiva local o enfermedad metastásica diseminada hasta que no se detecte más efectividad del tratamiento o la reserva de médula ósea se encuentre comprometida.
- c. Consideración de terapia con radiación para enfermedad no resecable e insensible a yodo.
- d. La consideración de protocolos de quimioterapia en investigación, así como regímenes de quimioterapia actualmente estandarizados, no juegan un papel importante en el manejo a largo plazo del cáncer diferenciado de tiroides (Cooper *et al*, 2009).

Tiroglobulina

Ya que la Tg es secretada por el tejido tiroideo normal, la determinación inicial en suero no se obtiene hasta que la tiroidectomía y la ablación con radioyodo, si procede, se han realizado; la medida de Tg ha demostrado ser una herramienta específica y sensible en la detección de metástasis y recidiva local. Un nivel elevado o creciente de Tg sérica en un paciente sin tejido tiroideo remanente es un marcador altamente específico de recidiva tumoral, los valores predictivos negativos superan el 90% en pacientes de bajo riesgo (Mazzaferri *et al*, 2003).

Rastreo corporal total con ¹³¹I

La relevancia clínica del rastreo corporal total diagnóstico en el seguimiento a largo plazo de los pacientes de cáncer diferenciado de tiroides de bajo riesgo ha disminuido notablemente dado el extendido uso de la Tg sérica y la ecografía. Además, la sensibilidad de esta técnica es baja en pacientes tras la ablación con radioyodo; de hecho, se ha demostrado que el rastreo de cuerpo completo no tiene valor diagnóstico en pacientes con Tg negativa (Cailleux *et al*, 2000; Pacini *et al*, 2002).

Un rastreo de cuerpo completo obtenido tras recibir la dosis terapéutica de radioyodo presenta mayor sensibilidad para la detección de metástasis locorregionales y distantes, y puede revelar focos tumorales adicionales que no fueron apreciados antes del tratamiento con ¹³¹I, en aproximadamente el 10-15% de los casos (Fatourehchi & Hay, 2000).

Sin embargo, la ecografía ha demostrado ser más sensible que el rastreo corporal total en la detección de recidiva local (sensibilidad de la ecografía 70%, frente a 20% del rastreo); cuando además se combina la medida de Tg con la ecografía, la sensibilidad asciende a 96,2% y la especificidad al 100%, frente a 92,7% y 100% de la combinación de rastreo corporal y Tg (Pacini *et al*, 2003). Además, la dosis de radioyodo administrada puede hacer disminuir la captación de la dosis terapéutica de ¹³¹I, en un efecto conocido como aturdimiento.

Dadas sus limitaciones, el uso del rastreo corporal total ha decaído en el seguimiento de pacientes de bajo riesgo de recidiva, aunque aún es útil para detectar metástasis distantes captantes de yodo en el contexto de niveles incrementados de Tg y ecografías normales en pacientes de riesgo bajo o intermedio o en pacientes de alto riesgo para detectar enfermedad persistente tras la terapia inicial basándose en niveles de Tg, evidencia clínica o características histológicas.

Ecografía cervical

La ecografía cervical (así como la PAAF guiada con ecografía) ha emergido en los últimos años como la modalidad de imagen dominante para evaluar el lecho tiroideo o las metástasis locorregionales, permitiendo la identificación, localización y toma de muestra de metástasis de hasta 5 mm (Johnson & Tublin, 2008).

La ecografía ha demostrado ser claramente superior a la evaluación clínica en la detección de recidiva locorregional, con más del 60% de pacientes con confirmación histopatológica de recidiva que presentaban ecografía positiva y sin embargo, resultados clínicos negativos (Stulak *et al*, 2006; Kouvaraki *et al*, 2003).

Las guías de práctica clínica recientemente publicadas por la NCCN incluyen recomendaciones más estrictas para el rastreo anual con radioyodo y un mayor énfasis en la utilidad de la ecografía de cuello. Específicamente, estas recomendaciones incluyen:

- Ultrasonografía de cuello periódica.
- Medida de Tg estimulada con TSH humana recombinante (rhTSH) en pacientes de bajo riesgo con ecografía de cuello reciente negativa y Tg suprimida con TSH negativa que no presentaban metástasis distantes o invasión de tejidos blandos en la estadificación inicial.
- Rastreo con radioyodo cada 12 meses hasta ausencia de enfermedad tratable si la Tg es detectable, o presentaban metástasis distantes o invasión de tejidos blandos en la estadificación inicial. Consideración de una técnica de imagen adicional no basada en radioyodo si el rastreo con radioyodo es negativo y la Tg estimulada es superior a 2-5 ng/ml (Mittendorf *et al*, 2007).

Estas guías apoyan el uso del rastreo terapéutico si la Tg estimulada es superior a 10 ng/ml y los estudios de imagen negativos.

Las guías recientes de la ATA son similares, y sugieren la consideración del rastreo terapéutico empírico si el nivel de Tg estimulada es superior a 10 ng/ml tras la supresión, o 5 ng/ml tras rhTSH, y los estudios de imagen, incluyendo TAC de tórax sin contraste, son negativos. Para pacientes con niveles de Tg estimulada inferiores a 5 (rhTSH) ó 10 ng/ml (supresión), se recomienda un seguimiento de 6 a 12 meses. Las guías de la ATA también limitan el uso del rastreo con radioyodo al seguimiento de pacientes con riesgo intermedio-alto de enfermedad (Cooper *et al*, 2009). Una Tg que no se eleva con rhTSH o supresión de T4 tras 6-12 meses post-tratamiento definiría de forma efectiva una población de pacientes de riesgo intermedio-bajo que se encuentra a muy bajo riesgo de recidiva.

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

Este tumor presenta con frecuencia mutaciones en genes que codifican proteínas que transducen señales a través de la ruta de señalización MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). Esta cascada intracelular ubicua regula el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia en respuesta a factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, que interaccionan con receptores tirosina quinasa de la superficie celular (Robinson & Cobb, 1997). El 70% de los carcinomas papilares presentan mutaciones activantes de los genes *braf*, *ret* o *ras* y rara vez se solapan entre sí en el mismo tumor. Esto sugiere que la señalización a través de la ruta MAPK es esencial para el inicio del tumor y que la alteración de un solo efector de la ruta es suficiente para la transformación celular (Kimura *et al*, 2003; Soares *et al*, 2003; Frattini *et al*, 2004). A pesar de su capacidad común para activar la ruta MAPK, cada una de estas mutaciones probablemente presenta efectos únicos y característicos sobre la transformación celular, ya que se asocian con firmas de expresión génica únicas, así como distintas propiedades biológicas y fenotípicas de los carcinomas papilares (Giordano *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006).

Mutaciones *braf*

BRAF es uno de los 3 miembros de una familia altamente conservada de serina-treonina-quinasa RAF (ARAF, BRAF y CRAF), que son efectores clave de la ruta canónica MAPK (RAF-MEK-ERK). Esta ruta es crucial en la transducción de señales mediante factores de crecimiento, hormonas y citoquinas, y está implicada en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Tanoue & Nishida, 2003).

Los genes *raf* se han descrito como oncogenes porque las proteínas RAF son efectores inmediatos de las oncoproteínas RAS, y debido a que su descripción inicial fue su forma oncogénica viral *v-raf* (Rapp *et al*, 1983). La evidencia final fue el descubrimiento de mutaciones activantes en el gen *braf* en un amplio panel de cánceres humanos (Brose *et al*, 2002; Davies *et al*, 2002^a), de manera prominente en melanoma cutáneo (63-66%), carcinoma seroso de ovario (33-40%) (Davies *et al*, 2002^a; Singer *et al*, 2003) y carcinoma colorrectal (11-20%) (Rajagopalan *et al*, 2002; Wang *et al*, 2003).

Las mutaciones puntuales del gen de la serina-treonina quinasa BRAF (localizado en el cromosoma 7q34) (Cohen *et al*, 2003^b; Xing *et al*, 2005^a) son en su mayoría (~90%) de un solo tipo, que implica la transversión de la timina situada en posición 1799 de la secuencia del gen por una adenina (T1799A). El resultado es la sustitución del aminoácido valina, localizado en la posición 600 de la proteína, por un glutamato (V600E) (Smanik *et al*, 1995; Davies *et al*, 2002^a; Kimura *et al*, 2003). La mutación BRAF^{T1799A} o BRAF^{V600E} mimetiza la fosforilación en el segmento de activación de BRAF, insertando un residuo cargado negativamente y adyacente a un sitio de fosforilación activante en la serina 599 (Davies *et al*, 2002^a). Esto causa la conversión de BRAF a una forma catalíticamente activa, mediante la alteración de la asociación del segmento de activación con el bucle P de unión a ATP, que es el que normalmente mantiene a BRAF en una conformación inactiva (Dhillon & Kolch, 2004; Hubbard, 2004; Wan *et al*, 2004).

La mutación BRAF^{T1799A} constituye la principal alteración genética del carcinoma papilar de tiroides, y se encuentra en el 45% de los carcinomas papilares de tiroides (Xing, 2005^a), aunque varía según las series entre un 20-83% (Cohen *et al*, 2003^b; Kimura *et al*, 2003; Soares *et al*, 2003; Kim *et al*, 2004).

Además, las mutaciones de *braf* se encuentran en carcinomas anaplásicos de tiroides (20%) y en carcinomas pobremente diferenciados (15%), concretamente en aquellos tumores que además contienen áreas de carcinoma papilar bien diferenciado (Namba *et al*, 2003;

Nikiforova *et al*, 2003^a; Begum *et al*, 2004; Ciampi & Nikiforov, 2005; Xing, 2005^a). En estos tumores, la mutación de *braf* es detectable en ambas regiones tumorales, tanto en las áreas tumorales bien diferenciadas como en las pobremente diferenciadas o anaplásicas, lo que proporciona evidencia de que se trata de un proceso de carcinogénesis temprana.

Otros mecanismos de activación de BRAF mucho menos frecuentes incluyen la mutación puntual K601E, pequeñas inserciones o deleciones conservando el marco de lectura alrededor del codón 600 (Trovisco *et al*, 2004; Carta *et al*, 2006; Hou *et al*, 2007^b), y el reordenamiento *akap-braf*, que es más frecuente en carcinomas papilares asociados a exposición a la radiación (Ciampi *et al*, 2005).

Las mutaciones en *braf* presentan una elevada prevalencia en carcinomas papilares tipo clásico y de la variante de células altas, y son menos frecuentes en la variante folicular (Trovisco *et al*, 2004; Adeniran *et al*, 2006).

Numerosos estudios han mostrado correlación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y características tumorales de mayor agresividad, como son extensión extratiroidea, estadio tumoral avanzado en la presentación, recidiva tumoral y metástasis en ganglios linfáticos o a distancia (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005). Un hallazgo relevante, establece que la mutación BRAF^{T1799A} es un predictor independiente de recidiva tumoral, incluso en pacientes con estadio I-II de la enfermedad (Xing *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006^c). Esta mutación también se ha asociado a la disminución de la capacidad de los tumores para captar radioyodo, y al fracaso del tratamiento de la enfermedad recurrente, lo que podría ser debido a la pérdida de regulación del simporter de Na⁺/I⁻ (NIS), y otros genes relacionados con el metabolismo del yoduro en células foliculares tiroideas (Xing *et al*, 2005; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006). La mayoría de los estudios, aunque no todos, asocian la mutación BRAF^{T1799A} con características tumorales más agresivas (Puxeddu *et al*, 2004; Trovisco *et al*, 2005; Fugazzola *et al*, 2006), por lo que generalmente se acepta como un marcador fiable de carcinomas papilares de comportamiento más agresivo.

En estudios de ratones transgénicos, con expresión específica en tiroides de la forma BRAF^{T1799A}, también se ha sugerido la implicación de la forma mutante de BRAF^{T1799A} en el inicio y la desdiferenciación del tumor, así como su relación con características tumorales más agresivas (Knauf *et al*, 2005). Estos animales desarrollan carcinomas papilares de elevada penetrancia y características microscópicas semejantes a las observadas en humanos. Estos tumores murinos aparecen frecuentemente acompañados de invasión vascular, capsular y de músculo esquelético peritiroideo, características todas ellas de comportamiento más agresivo en humanos, y demostrando también evolución hacia carcinomas pobremente diferenciados.

Las mutaciones de *braf* son casi siempre mutuamente excluyentes respecto a las, relativamente raras, mutaciones de los genes *ras* y de los reordenamientos *ret* (*ret/ptc*) y *nrk1*, sumando entre todas aproximadamente el 70% de los casos de carcinomas papilares de tiroides (Kimura *et al*, 2003; Soares *et al*, 2003; Frattini *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Liu *et al*, 2005). Esta activación oncogénica mutuamente excluyente de *ret/ptc*, *ras* y *braf* en carcinoma papilar de tiroides apoya la existencia de una ruta lineal de señalización oncogénica en la que estarían involucradas RET/PTC-RAS-BRAF-MEK-ERK, un concepto también reforzado por experimentos funcionales *in vitro* (Melillo *et al*, 2005; Mitsutake *et al*, 2006).

Tras la detección de reordenamientos *ret/ptc* en la tiroiditis de Hashimoto, las mutaciones *braf* fueron también investigadas en estas lesiones (Kim *et al*, 2005^a; Smyth *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005). Aunque Kim y colaboradores fueron los únicos en detectar mutaciones en *braf* en casos de tiroiditis de Hashimoto con áreas coexistentes de carcinoma papilar de tiroides que presentaban la mutación de *braf* (Kim *et al*, 2005^a), no se puede excluir la hipótesis de contaminación por células del carcinoma papilar *braf*-positivas, por lo que este estudio no es

conclusivo del papel neoplásico de BRAF^{T1799A} en la tiroiditis de Hashimoto (Nikiforova & Nikiforov, 2008).

En el contexto de carcinoma papilar de tiroides en niños post-Chernobyl, las mutaciones de *braf* se han encontrado en muy baja frecuencia (Nikiforova *et al*, 2004^a; Kumagai *et al*, 2004; Lima *et al*, 2004; Powell *et al*, 2005). Los reordenamientos *ret/ptc* se presentan con una frecuencia muy elevada, y no coexisten con alteraciones genéticas de *braf*, como en los casos esporádicos (Kumagai *et al*, 2004; Lima *et al*, 2004). Se ha sugerido que la radiación ionizante contribuye a la incidencia de carcinoma papilar de tiroides principalmente mediante la inducción de roturas en la doble hélice de ADN y la consiguiente recombinación ilegítima, conduciendo de esta forma a reordenamientos *ret/ptc* y *ntrk1* (Nikiforova *et al*, 2000; Nikiforova *et al*, 2004^a). La elevada prevalencia de los reordenamientos *ret/ptc* y las bajas frecuencias recíprocas de las mutaciones de *braf* son también características de los carcinomas papilares de tiroides infantiles y juveniles (Bongarzone *et al*, 1996; Sugg *et al*, 1996; Soares *et al*, 1998; Lima *et al*, 2004; Powell *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005).

En tumores tiroideos malignos, la mutación BRAF^{T1799A} se encuentra restringida al carcinoma papilar y carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos originados a partir de carcinoma papilar (Nikiforova *et al*, 2003^a; Namba *et al*, 2003; Begum *et al*, 2004). Por tanto, la detección de esta mutación en muestras de PAAF de tiroides o en muestras extirpadas quirúrgicamente es prácticamente diagnóstica de carcinoma papilar (Cohen *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004).

El análisis de la mutación *braf* podría ser particularmente útil en la redefinición de muestras de PAAF de tiroides diagnosticadas dentro de la categoría indeterminada (atipia o proliferación folicular), ya que podría establecer un diagnóstico de certeza de carcinoma papilar en un porcentaje significativo de estos casos (Cohen *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004). Además, la detección de la mutación BRAF^{T1799A} puede ser evaluada mediante varias técnicas moleculares, usando ADN aislado a partir de muestras de PAAF frescas o en muestras de archivo fijadas (Jin *et al*, 2006).

Reordenamientos *ret/ptc*

Los receptores para factores de crecimiento también pueden conducir a la transformación celular cuando su estructura se ve modificada mediante mutaciones activadoras. Un ejemplo relevante para la patogénesis de los carcinomas papilares tiroideos es el oncogén *ret/ptc* (Grieco *et al*, 1990), una forma mutante del receptor tirosina quinasa RET. Un reordenamiento cromosómico une los promotores de genes no relacionados al fragmento C-terminal de RET (el cual pierde los dominios transmembrana y extracelular), resultando en la producción aberrante de una forma truncada del receptor en el citoplasma de células tiroideas. Esta proteína quimérica contiene la región implicada en la transmisión de la señal de crecimiento, pero pierde los sitios que permiten la recepción de la señal (unión a ligando) y de anclaje a la membrana. Todas las fusiones dejan el dominio tirosina quinasa del receptor RET intacto y permiten a la oncoproteína RET/PTC unirse a la proteína SHC y activar la cascada RAS-RAF-MAPK (Knauf *et al*, 2003).

RET es el receptor de membrana para el GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*) y, normalmente no se expresa en células foliculares tiroideas (Sanicola *et al*, 1997). La expresión normal de RET y su actividad quinasa están restringidas a un subgrupo de células derivadas de células de la cresta neural embrionaria (Schuchardt *et al*, 1994). Consistente con esto, la forma salvaje de RET se expresa en altos niveles en células C-parafoliculares (Nikiforov, 2002).

En carcinomas papilares tiroideos humanos se han encontrado varios tipos de reordenamientos de *ret*, formados por la fusión del dominio tirosina quinasa intracelular 3' del gen con diferentes fragmentos génicos 5':

ret/ptc1. Formado por una inversión paracéntrica del brazo largo del cromosoma 10, que conduce a la fusión con un gen denominado *h4/d10s170* (Grieco *et al*, 1990).

ret/ptc2. Ocurre por translocación recíproca entre los cromosomas 10 y 17, resultando en la yuxtaposición del dominio tirosina quinasa de *c-ret* con una porción de la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMP_c (Bongarzone *et al*, 1993, 1994). Otros 9 tipos de translocaciones intercromosómicas se han identificado recientemente (Kondo *et al*, 2006; Nikiforova & Nikiforov, 2008).

ret/ptc3. También es resultado de una inversión paracéntrica (tanto *ret* como *ele1* se encuentran en el brazo largo del cromosoma 10), y se forma por la fusión con el gen *rfg/ele1(ncoa4)* (Minoletti *et al*, 1994; Santoro *et al*, 1994; Fugazzola *et al*, 1996).

ret/ptc1, 2 y 3 son las alteraciones más frecuentes en las que se encuentra implicado el gen *ret* en carcinoma papilar de tiroides, aunque se han identificado al menos 15 tipos diferentes hasta la fecha (Kondo *et al*, 2006; Nikiforova & Nikiforov, 2008).

ret/ptc es típicamente más frecuente en tumores de pacientes con historia de exposición a radiación (50-80%) y en carcinomas papilares de niños y adultos jóvenes (40-70%) (Nikiforov *et al*, 1997; Soares *et al*, 1998; Fenton *et al*, 2000; Rabes *et al*, 2000).

Los reordenamientos somáticos del proto-oncogén *ret* se han detectado en 3-60% de los carcinomas papilares de tiroides esporádicos adultos, con una media del 20% (Nikiforov, 2002; Teng & Hempstead, 2004). La prevalencia de *ret/ptc* en carcinoma papilar de tiroides varía significativamente en diferentes estudios, lo que probablemente refleja la diferente sensibilidad de la metodología de detección y la variabilidad del muestreo geográfico, así como la diferente composición histológica de las series (Nikiforov *et al*, 1997; Nikiforov, 2002). En la mayoría de las series que tratan con carcinomas papilares de tiroides esporádicos, *ret/ptc1* es el tipo más frecuente, constituyendo el 60-70% de los reordenamientos, mientras que *ret/ptc3* corresponde al 20-30% (Soares *et al*, 1998; Sugg *et al*, 1998; Tallini *et al*, 1998; Nikiforov, 2002). En contraposición, en el cáncer de tiroides relacionado con Chernobyl, los reordenamientos *ret/ptc3* son los más frecuentes (Nikiforov *et al*, 1997; Motomura *et al*, 1998; Thomas *et al*, 1999; Nikiforov, 2002; Williams, 2006), al menos para la “primera ola” de cánceres originados en este contexto, ya que *ret/ptc1* parece predominar en casos con un período de latencia más largo (Williams, 2006). Otros tipos de reordenamientos *ret/ptc* más raros parecen estar predominantemente asociados a exposición a radiación ionizante terapéutica o ambiental (Bongarzone *et al*, 1993; Klugbauer *et al*, 1998^a; Klugbauer & Rabes, 1999; Corvi *et al*, 2000; Klugbauer *et al*, 2000; Salassidis *et al*, 2000; Nikiforov, 2002; Saenko *et al*, 2003); exceptuando las fusiones *elks-ret* y *hook3-ret*, descritas en carcinomas papilares sin antecedente conocido de radiación (Nakata *et al*, 1999; Ciampi *et al*, 2007).

La distribución del reordenamiento *ret/ptc* dentro del tumor puede ser bastante heterogénea, y variar desde estar implicadas todas las células (*ret/ptc* clonal), a ser detectado sólo en una pequeña fracción de células tumorales (*ret/ptc* no clonal) (Unger *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2006). Aunque *ret/ptc* se ha encontrado en varios estudios en adenomas y otras lesiones tiroideas benignas (Ishizaka *et al*, 1991; Sheils *et al*, 2000; Elisei *et al*, 2001), puede asumirse que el reordenamiento clonal *ret/ptc* (es decir, el que se encuentra en la mayoría de células dentro del tumor) es razonablemente específico de carcinomas papilares (Nikiforova & Nikiforov, 2008).

Los reordenamientos *ret/ptc* se pueden detectar en muestras de PAAF de tiroides. Varios estudios han demostrado que la detección de *ret/ptc* puede perfeccionar el diagnóstico preoperatorio de nódulos tiroideos, particularmente en muestras con diagnóstico citopatológico indeterminado o con insuficiente cantidad de células (Cheung *et al*, 2001^a; Salvatore *et al*, 2004). A pesar de que estos estudios han proporcionado evidencias relevantes sobre la utilidad diagnóstica potencial de la detección de *ret/ptc* en muestras de PAAF de

tiroides, la realización de este análisis se debe definir todavía antes de implementar esta técnica en la rutina clínica. Un problema potencial de este test es la necesidad de aislar ARN de una calidad aceptable, cuestión difícil de asegurar en muestras fijadas (Nikiforova *et al*, 2004^b).

Los carcinomas papilares con reordenamientos *ret/ptc* suelen presentarse a una edad más temprana, y presentan una elevada proporción de metástasis en nódulos linfáticos, histología papilar clásica y menor estadio en la presentación, particularmente los que presentan *ret/ptc1* (Adeniran *et al*, 2006). En carcinomas papilares asociados con exposición a radiación ionizante (como en los tumores post-Chernobyl), *ret/ptc1* se ha encontrado asociado a histología papilar clásica, mientras que el tipo *ret/ptc3* es más frecuente en la variante sólida (Nikiforov *et al*, 1997).

Reordenamientos *ntrk1* (*trka*)

El gen *ntrk1* (*neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1*, o *trka*, *tyrosine kinase receptor A*) se localiza en el cromosoma 1, que está entre los de mayor frecuencia de alteraciones estructurales en carcinoma papilar de tiroides. Este gen codifica el receptor de alta afinidad para el NGF (*nerve growth factor*), el cual activa la ruta RAF-MEK-ERK (Miller & Kaplan, 2001).

Los reordenamientos cromosómicos detectados en carcinoma papilar de tiroides afectan a los receptores tirosina quinasa para factores de crecimiento, *ret* y *ntrk1* (Tallini, 2002), ambos implicados en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis neural en sistema nervioso central y periférico (Teng & Hempstead, 2004).

Los reordenamientos de *ntrk1* implican su fusión a genes heterólogos (Nikiforov, 2002), y generan proteínas quiméricas que han sido extensamente estudiadas en modelos *in vitro* usando varios transcriptos *ntrk1*; sus propiedades oncogénicas proceden de la activación anómala permanente de su dominio tirosina quinasa (Tallini, 2002).

Los reordenamientos oncogénicos del gen *ntrk1* son raros, se encuentran normalmente en menos del 10% de los casos de carcinoma papilar de tiroides esporádicos (Kuo *et al*, 2000; Musholt *et al*, 2000; Frattini *et al*, 2004; Liu *et al*, 2005).

La señalización celular a través de NTRK1 está modulada por la presencia de p75NTR (*neurotrophin receptor p75NTR*) (Miller & Kaplan, 2001). Al contrario que NTRK1, p75NTR se une a todas las neurotrofinas, pero pierde la actividad tirosina quinasa intrínseca (Teng & Hempstead, 2004). Se ha sugerido la implicación de NTRK1 y p75NTR en la etiopatogenia del carcinoma papilar de tiroides en base a la detección de reordenamientos de *ntrk1* en carcinoma papilar de tiroides, junto a la observación de expresión dirigida a tiroides de la proteína quimérica reordenada NTRK1 en ratones transgénicos (Russell *et al*, 2000; Rocha *et al*, 2006). También se ha descrito que la localización celular de p75NTR está relacionada con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}, aunque la relevancia biológica de este descubrimiento aún está por aclarar (Rocha *et al*, 2006).

Mutaciones *ras*

Los genes *ras* (*Hras*, *Kras* y *Nras*) se encuentran frecuentemente implicados en la carcinogénesis humana; aproximadamente el 15% de todos los cánceres humanos presentan mutaciones en estos genes (Bos, 1989). Todos codifican proteínas G relacionadas entre sí, las cuales juegan un papel esencial en la transducción intracelular de señales originadas en los receptores de membrana. En su estado inactivo, la proteína RAS se encuentra unida a GDP. Tras su activación, libera GDP y une GTP, activando varias rutas de señalización, entre ellas la ruta MAPK clásica (RAF-MEK-ERK) (Peyssonnaud & Eychène, 2001) y la ruta PI3K/Akt (*phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B*). En situación normal, la proteína RAS-GTP activada se inactiva rápidamente debido a su actividad GTPasa intrínseca y a la acción de proteínas GTPasas citoplasmáticas.

Las mutaciones de *ras* encontradas en tumores aparecen de forma característica en los codones 12, 13 ó 61 de cualquiera de los 3 genes, resultando en la activación constitutiva de proteínas RAS. Estas mutaciones puntuales en dominios discretos del gen *ras* pueden incrementar su afinidad por GTP (como es el caso de las mutaciones en los codones 12 y 13), o inactivar su función GTPasa autocatalítica (mutación en el codón 61). Como resultado, la proteína mutante queda permanentemente en la posición activa, y activa continuamente sus dianas posteriores.

Las mutaciones puntuales que implican varios sitios específicos (codones 12, 13 y 61) de los genes *Hras*, *Kras* o *Nras* se han descrito en, aproximadamente, el 10-20% de los carcinomas papilares de tiroides (Namba *et al*, 1990^c; Ezzat *et al*, 1996; Vasko *et al*, 2004). Los carcinomas papilares que presentan mutación en *ras* casi siempre presentan histología variante folicular; esta mutación además se asocia con características nucleares significativamente menos marcadas de carcinoma papilar, encapsulación más frecuente y baja proporción de metástasis nodulares (Zhu *et al*, 2003; Adeniran *et al*, 2006). Algunos estudios han descrito la asociación entre mutaciones de *ras* y una mayor frecuencia de metástasis a distancia (Hara *et al*, 1994). Las mutaciones del gen *ras* no están restringidas a carcinoma papilar, sino que se encuentran en otras neoplasias tiroideas benignas y malignas, así como en tumores de otros tejidos.

Las mutaciones en genes *ras* son particularmente prevalentes en carcinomas foliculares clásicos (40-50%) y adenomas foliculares (20-40%) (Suarez *et al*, 1990; Esapa *et al*, 1999; Basolo *et al*, 2000; Motoi *et al*, 2000), y menos frecuentes en carcinoma papilar de tiroides (Vasko *et al*, 2003). Su prevalencia en carcinomas papilares varía ampliamente, dependiendo de las series estudiadas (0-16%) (Lazzereschi *et al*, 1997; Sugg *et al*, 1999; Nikiforova *et al*, 2003^b; Vasko *et al*, 2003). Las mutaciones asociadas a carcinoma papilar (y a lesiones tiroideas en general) implican predominantemente al codón 61 de *Nras* y, en menor extensión, de *Hras* (Vasko *et al*, 2003; Zhu *et al*, 2003; Castro *et al*, 2006; Di Cristofaro *et al*, 2006).

Reordenamientos *pax8/ppary*

El reordenamiento *pax8/ppary* es el resultado de la translocación t(2;3)(q13;p25). El gen *pax8*, localizado en 2q13, codifica un factor de transcripción esencial para el desarrollo de la estirpe celular epitelial folicular (Mansouri *et al*, 1998), y el gen *ppary*, localizado en 3p25, codifica un factor de transcripción nuclear dependiente de ligando que es miembro de la familia del receptor activador de proliferación de peroxisomas (Fajas *et al*, 1997). Kroll y colaboradores demostraron que la translocación t(2;3) (q13;p25) resulta en la fusión de los dominios de unión a ADN del factor de transcripción de tiroides *pax8* (2q13) con los dominios A hasta F del receptor y del activador de proliferación de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, *ppary1*) (3p25) (Kroll *et al*, 2000). El efecto carcinogénico de este proceso parece ser debido a la pérdida de la función transcripcional propia de *pax8* y *ppary1* en la forma reordenada *pax8/ppary*, así como de las proteínas normales PAX8 y PPAR γ , debido a un efecto dominante negativo (Kroll *et al*, 2000; Au *et al*, 2006) de la función de PPAR γ , aunque el mecanismo mediante el que la supresión de PPAR γ promueve la formación del carcinoma folicular no se conoce completamente (Kroll *et al*, 2000).

En la descripción inicial, tanto el ARN_m como la proteína de PAX8/PPAR γ fueron detectados en carcinoma folicular de tiroides, pero no en adenoma, carcinoma papilar o hiperplasias multinodulares, así que se presentó como un marcador de carcinoma folicular de tiroides (Kroll *et al*, 2000). Sin embargo, esta alteración genética fue posteriormente descrita en varias series de adenomas foliculares de tiroides (Marques *et al*, 2002; Nikiforova *et al*, 2002^a; Cheung *et al*, 2003), lo que descartó la posibilidad de considerar los reordenamientos *pax8/ppary* como un indicador molecular de malignidad.

Recientemente, se ha publicado por primera vez que el gen de fusión *pax8/ppary* también se encuentra en un número relativamente elevado de casos de carcinoma papilar de tiroides variante folicular (37,5%) (Castro *et al*, 2005; Castro *et al*, 2006).

pax8/ppary aparece en aproximadamente el 35% de los carcinomas foliculares clásicos, y con una menor prevalencia, en carcinomas oncocíticos o de células de Hürthle (Dwight *et al*, 2003; French *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^b).

UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS ASOCIADAS A CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

La mejor herramienta para el diagnóstico precoz de lesiones tiroideas es la PAAF. Sin embargo, ya que el diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides se basa en características nucleares típicas, los casos con menor número de núcleos característicos, como ocurre con frecuencia en la variante folicular, podrían diagnosticarse erróneamente como adenoma o tumor folicular en muestras de PAAF (Kini, 2008). Además, el diagnóstico de carcinoma folicular de tiroides no puede llevarse a cabo mediante PAAF, ya que éste depende de la observación de invasión capsular o vascular (Rosai *et al*, 1992; DeLellis *et al*, 2004; Kini, 2008).

Además, los resultados citológicos falsos negativos pueden retrasar el tratamiento y afectar de forma adversa al desenlace del paciente (Yeh *et al*, 2004).

Dadas estas limitaciones de la citología de tiroides, se ha sugerido que la determinación de marcadores genéticos específicos sería una herramienta auxiliar muy útil en el diagnóstico mediante PAAF de tumores tiroideos complicados.

La detección precisa de reordenamientos *ret/ptc* y mutaciones en *braf* (T1799A o V600E, y más raramente, K601E) en muestras de PAAF de tiroides ha demostrado su utilidad proporcionando un diagnóstico inequívoco de carcinoma papilar (Cheung *et al*, 2001^a; Cohen *et al*, 2004; Hayashida *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Xing *et al*, 2004^b; Domingues *et al*, 2005), lo que permitiría diseñar una mejor estrategia clínica en esos casos (Mojica & Khoury, 2006). Sin embargo, en opinión de algunos autores, la fuerte asociación de la mutación BRAF^{T1799A} y, en menor extensión, de *ret/ptc1*, con los casos de carcinoma papilar de tiroides que muestran patrones arquitectónicos típicamente papilares o mezcla de papilar-folicular, limita su utilidad en el cribado, ya que precisamente son los casos más fáciles de diagnosticar mediante PAAF de tiroides, pero podría aumentar la sensibilidad de la detección de carcinoma papilar de tiroides en PAAF (Salvatore *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Nikiforov *et al*, 2006; Nikiforov *et al*, 2009).

Los reordenamientos *pax8/ppary* y las mutaciones en los genes *ras* son bastante prevalentes en los casos de carcinoma papilar variante folicular (Zhu *et al*, 2003; Adeniran *et al*, 2006; Castro *et al*, 2006). Además, estos procesos genéticos aparecen con una frecuencia similar en las lesiones como el carcinoma folicular, y de manera más importante, el adenoma folicular, que sería interesante poder distinguir del carcinoma papilar de tiroides (Kroll *et al*, 2000; Marques *et al*, 2002; Vasko *et al*, 2003; Nakabashi *et al*, 2004; Castro *et al*, 2006). Por lo tanto, en determinados tumores tiroideos de patrón folicular y difícil categorización por PAAF, la identificación de los reordenamientos *pax8/ppary* y/o las mutaciones de *ras* no contribuye a la mejora diagnóstica en muestras de PAAF, ya que no discrimina entre benignidad/malignidad.

Así, hasta el momento no se ha descrito una buena combinación de marcadores moleculares que supere las limitaciones diagnósticas de la citología de tiroides, ya sea para solucionar el dilema diagnóstico en las citologías indeterminadas o para la detección de los falsos negativos.

UTILIDAD PRONÓSTICA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS ASOCIADAS A CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

El carcinoma papilar de tiroides rara vez causa la muerte de los pacientes, ya que éstos suelen responder muy bien a la extirpación quirúrgica del tumor, seguida de tratamiento ablativo con yodo radiactivo (Sawka *et al*, 2004; Jemal *et al*, 2008). Algunos casos presentan un comportamiento agresivo, y otros pueden progresar hasta carcinoma anaplásico de tiroides, de mayor agresividad y letalidad (Rosai *et al*, 1992; Wynford-Thomas, 1997). Muchos grupos han intentado encontrar marcadores genéticos de relevancia clínica para el desenlace del paciente, especialmente cuando se identifican casos de carcinoma papilar de tiroides con un pronóstico reservado (Trovisco *et al*, 2007).

La mayoría de los estudios publicados hasta la fecha se han centrado en la importancia clínica de los reordenamientos *ret/ptc* y, particularmente, de las formas *braf* mutantes. La presencia de reordenamientos *ret/ptc* se ha asociado con la aparición de metástasis en nódulos linfáticos (Sugg *et al*, 1996; Sugg *et al*, 1999; Musholt *et al*, 2000; Adeniran *et al*, 2006), mientras que otros autores no encuentran esta asociación (Soares *et al*, 1998; Basolo *et al*, 2001; Puxeddu *et al*, 2003). De los muchos parámetros clinicopatológicos analizados, los casos *ret/ptc* positivos sólo se han asociado convincentemente con una edad menor al diagnóstico (Bongarzone *et al*, 1996; Sugg *et al*, 1996; Soares *et al*, 1998; Musholt *et al*, 2000; Adeniran *et al*, 2006). El reordenamiento *ret/ptc3* parece estar asociado con tumores de pronóstico reservado, aunque se necesitarían series mayores y con mayor tiempo de seguimiento para corroborar esta hipótesis (Rosai *et al*, 1992; DeLellis *et al*, 2004).

Actualmente, la asociación putativa de mutaciones *braf* con parámetros de peor pronóstico en carcinoma papilar de tiroides es controvertida. La mayoría de los autores estiman que los carcinomas papilares de tiroides con estas mutaciones son propensos a un comportamiento más agresivo (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c). Se ha descrito una asociación estadísticamente significativa entre la mutación BRAF^{T1799A} y una mayor edad al diagnóstico (Nikiforova *et al*, 2003^a; Trovisco *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006), invasión extratiroidea (Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006), metástasis linfáticas (Xing *et al*, 2005), metástasis distantes (Namba *et al*, 2003), estadio tumoral superior (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006), y recidiva (Xing *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006^c). La revelación de mutaciones *braf* en carcinoma de tiroides pobremente diferenciado y carcinoma anaplásico, particularmente en casos derivados de carcinomas papilares de tiroides preexistentes, proporciona un apoyo adicional a su significado pronóstico (Nikiforova *et al*, 2003^a; Soares *et al*, 2004; Knauf *et al*, 2005; Quiros *et al*, 2005).

Por su parte, otros autores no han encontrado ninguna de las asociaciones mencionadas (Puxeddu *et al*, 2004; Fugazzola *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005). Además, dada la estrecha asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y los carcinomas papilares de tiroides con arquitectura papilar predominante, la relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y los indicadores de peor pronóstico podría estar sesgada por el tipo histológico de carcinoma papilar que constituye cada serie. Esto se aprecia cuando la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con extensión extratiroidea, metástasis linfáticas y estadio tumoral avanzado desaparece tras la estratificación de las series por histotipo (Xing *et al*, 2005).

Así, a pesar de las numerosas evidencias que apoyan la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con peores características del carcinoma papilar de tiroides, aún surgen dudas de su utilidad como marcador pronóstico, ya que las discrepancias entre diferentes estudios hacen que no exista un consenso general respecto a su valor pronóstico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La mutación BRAF^{T1799A} es específica de malignidad. Su determinación en citologías de tiroides podría detectar carcinoma papilar y/o anaplásico de tiroides preoperatoriamente, redefiniendo el diagnóstico citopatológico, y reorientando la estrategia terapéutica en pacientes con falsos negativos. La detección de nuevos casos, gracias a la identificación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología, será de gran utilidad en la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo, ya que incrementará la sensibilidad de la estrategia diagnóstica mediante PAAF, particularmente en el rescate de casos categorizados como ausentes de malignidad.

Aunque la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma papilar de tiroides se asocia a parámetros clínicos y patológicos de alto riesgo, su establecimiento como indicador de peor pronóstico es motivo de controversia en la actualidad. Así, nos proponemos dilucidar si esta relación se muestra en nuestros pacientes.

Objetivos

1. Este estudio tiene como principal objetivo evaluar la utilidad de la identificación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF durante el protocolo diagnóstico preoperatorio de nódulos tiroideos, para poner de manifiesto casos de carcinoma papilar de tiroides no detectados en el análisis citológico, e implantarlo como método complementario al diagnóstico citológico preoperatorio.
2. Como objetivo secundario, se analizará la asociación entre el genotipo del tumor y un comportamiento más agresivo del carcinoma papilar de tiroides, i.e. si la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} se relaciona con alguno de los principales factores pronósticos del cáncer de tiroides (principalmente: mayor edad al diagnóstico, sexo masculino, extensión extratiroidea, metástasis linfáticas, metástasis a distancia y estadio tumoral superior), así como con la recidiva tumoral y la persistencia de enfermedad.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

Para responder a los objetivos de la investigación planteados, el Plan de Trabajo se diseñó en tres fases consecutivas, que se describen a continuación.

El punto de partida del estudio (Fase 1) fue la determinación de la prevalencia y especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma papilar de tiroides.

Los resultados preliminares obtenidos en la Fase 1 nos condujeron a desarrollar la segunda fase, donde se aplicó la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} a la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo, para verificar el aumento en la proporción de carcinomas papilares detectados preoperatoriamente.

Completada la Fase 2, analizamos la posible asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con un fenotipo más agresivo del carcinoma papilar de tiroides.

El Proyecto de este estudio fue aprobado por los Comités Ético y de Investigación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves (HUVN), como parte de la investigación “*Estudio de los genes braf, ras, ret/ptc, pax8/ppary, met, trk y nis en tiroides*”. Las muestras de tejido tiroideo y las preparaciones citológicas fueron proporcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica del HUVN, que pertenece a la Red de Bancos de Tejidos Hospitalarios del CNIO (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas), de la RTICCC (Red Temática de Investigación Cooperativa de Centros de Cáncer) y de la Red Autonómica Andaluza de Bancos Hospitalarios, asegurándose por tanto el cumplimiento de la legislación vigente para biobancos, respetando asimismo lo concerniente a la Ley de Protección de Datos, confiabilidad, trazabilidad y disociación reversible o irreversible de los datos según las indicaciones del marco jurídico.

Plan de Trabajo

FASE 1. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CARCINOMA DE TIROIDES: ESPECIFICIDAD Y REPRESENTATIVIDAD (Responde al Objetivo 1)

1.1. Determinación de la Prevalencia y Especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma papilar de tiroides.

Para determinar la especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} por el carcinoma papilar de tiroides, se comparó la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido procedente de la tiroidectomía de pacientes diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides, frente a pacientes con otras patologías tiroideas malignas (carcinoma folicular, carcinoma medular, carcinoma anaplásico, sarcoma de tiroides) y benignas (bocio multinodular, enfermedad de Graves, adenoma folicular).

1.2. Representatividad del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en muestras citológicas.

Con el fin de determinar si el estado de la mutación BRAF^{T1799A} era detectable en el material procedente de citologías de tiroides obtenidas mediante punción-aspiración con aguja fina (PAAF), y que este resultado era fiable y representativo del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en la patología del paciente, se caracterizó el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tiroideo extraído durante la cirugía y en la citología previa del mismo paciente.

1.3. Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Para dilucidar si la incorporación del análisis de BRAF^{T1799A} en la citología previa a la cirugía incrementa la precisión diagnóstica de la citopatología para detectar carcinoma papilar de tiroides, se calcularon los parámetros estadísticos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y precisión diagnóstica) obtenidos al aplicar el análisis citopatológico y la determinación de BRAF^{T1799A} por separado, y se comparó con los resultados obtenidos al aplicar ambas metodologías.

FASE 2. DETECCIÓN PREOPERATORIA DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CITOLOGÍAS DE TIROIDES OBTENIDAS MEDIANTE PAAF (Responde al Objetivo 1)

Con la finalidad de valorar si era posible la detección preoperatoria del carcinoma papilar de tiroides mediante el análisis de la mutación BRAF^{T1799A}, se determinó la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en muestras citológicas de tiroides obtenidas mediante PAAF de pacientes en estudio de nódulo tiroideo en el HUVN durante el período 2006-2007. Como en la fase anterior, se calculó la mejora en la precisión diagnóstica en los pacientes sometidos a cirugía de tiroides (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y precisión diagnóstica).

Se realizó un control interno de la fiabilidad del estado de la mutación, comprobando la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido procedente de tiroidectomía de los pacientes intervenidos de cirugía de tiroides hasta el 1 de septiembre de 2008 y que participaron en esta fase del estudio de BRAF^{T1799A} en nódulo tiroideo.

FASE 3. ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON UN FENOTIPO MÁS AGRESIVO DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES (Responde al Objetivo 2)

3.1. Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con las características clínicas e histopatológicas del carcinoma papilar de tiroides.

Se estudió la relación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con las características clínicas (edad, sexo) e histopatológicas (metástasis, invasión extratiroidea, capsular o vascular, multifocalidad, etc. ver *Metodología Apartado 3.4.2*) de alto riesgo relevantes en el pronóstico del carcinoma papilar de tiroides en los pacientes diagnosticados en el HUVN durante el período 1998-2007.

3.2. Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con la recidiva tumoral

Se estudió la relación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario y la recidiva tumoral durante la evolución de la enfermedad en los pacientes con carcinoma papilar de tiroides que completaron 15 de meses de seguimiento.

FASE 1. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CARCINOMA DE TIROIDES: ESPECIFICIDAD Y REPRESENTATIVIDAD

1.1. Diseño

Estudio observacional descriptivo transversal.

1.2. Población de referencia

Pacientes intervenidos de tiroidectomía total por patología tiroidea.

1.3. Población de estudio

Pacientes intervenidos de tiroidectomía total en el HUVN durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1998 y el 31 de diciembre de 2005.

Los pacientes se clasificaron en los siguientes grupos, en base a su diagnóstico histopatológico:

Grupo 1. Patologías benignas de tiroides.

Pacientes sometidos a cirugía de tiroides con diagnóstico histopatológico de adenoma folicular, bocio simple, uninodular, multinodular o bocio difuso (Enfermedad de Graves-Basedow).

Grupo 2. Neoplasias malignas de tiroides diferentes de carcinoma papilar.

Pacientes sometidos a cirugía de tiroides con diagnóstico histopatológico de carcinoma folicular, anaplásico o sarcoma de tiroides.

Grupo 3. Carcinoma papilar de tiroides.

Pacientes sometidos a cirugía de tiroides con diagnóstico histopatológico de CPT.

1.3.1. Criterios de inclusión

Pacientes sometidos a cirugía radical de tiroides, con uno de los diagnósticos especificados y cuya pieza quirúrgica se encontrara disponible en el Archivo Anatomopatológico del HUVN.

Para el estudio de la representatividad del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en muestras citológicas, se seleccionaron los pacientes de este grupo que fueron sometidos a punción de tiroides (PAAF) antes de la tiroidectomía, y cuya muestra citológica estaba disponible.

1.3.2. Criterios de exclusión

Pacientes cuyo archivo anatomopatológico quedara comprometido al realizar el análisis de la mutación BRAF^{T1799A}. Es decir, que tras adquirir la muestra para el análisis molecular, a partir de la pieza original conservada en el Archivo del Servicio de Anatomía Patológica (bloque incluido en parafina o extensión citológica), no permaneciera en dicho Archivo parte del espécimen representativo de la patología diagnosticada.

Para el estudio de la representatividad del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en muestras citológicas, se excluyeron los pacientes con neoplasia maligna de un tamaño \leq 1 cm, por no poder garantizar la correspondencia entre el nódulo puncionado para la PAAF y el tumor hallado en la tiroidectomía.

1.4. Selección de la muestra de pacientes

Durante el período 1998-2005, en el HUVN se llevaron a cabo 438 tiroidectomías totales, de las cuales 275 se correspondían con un diagnóstico de bocio multinodular; 37 bocio difuso-enfermedad de Graves-Basedow; 8 adenoma folicular; 74 carcinoma papilar; 17 carcinoma folicular; 1 carcinoma medular; 2 carcinoma anaplásico y 1 sarcoma de tiroides.

En el Grupo 1 (patologías benignas de tiroides), al existir un elevado número de pacientes (n=320), se decidió iniciar el análisis, a modo de pilotaje, con 40 pacientes correspondientes al año 2005 (25 bocio multinodular, 13 enfermedad de Graves, 2 adenomas foliculares) y, en caso de encontrar pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A}, continuar de manera secuencial con años anteriores.

En los Grupos 2 y 3, se recogieron todos los pacientes que cumplieran los criterios de inclusión y tuvieran espécimen disponible en el archivo anatomopatológico del HUVN.

Así, el Grupo 2 (neoplasias malignas de tiroides diferentes de carcinoma papilar), quedó configurado con 17 pacientes: 14 carcinomas foliculares de tiroides (2 de ellos de patrón de células oncocíticas o de Hürthle), 2 carcinomas anaplásicos de tiroides y 1 sarcoma de tiroides. El paciente con carcinoma medular de tiroides no fue incluido, porque su espécimen no estaba disponible.

En el Grupo 3 (carcinoma papilar de tiroides) se incluyeron 69 pacientes.

Tabla M1. Población de estudio.					
GRUPO 1 (N=40)		GRUPO 2 (N=17)		GRUPO 3 (N=69)	
Patologías Benignas		Carcinoma No Papilar		Carcinoma Papilar	
25	Bocio Multinodular	14	Carcinoma Folicular	69	Carcinoma Papilar
13	Bocio Difuso	2	Carcinoma Anaplásico		
2	Adenoma Folicular	1	Sarcoma de Tiroides		

1.5. Descripción de las variables

La fuente primaria de información fue la Historia Clínica del paciente, recogida en la Historia Electrónica del HUVN, así como el registro conservado en el Servicio de Anatomía Patológica.

1.5.1. Variables independientes

- Estado de la **mutación BRAF^{T1799A}** en la **sección patológica** de la **pieza quirúrgica** procedente de la **tiroidectomía. Variable independiente principal (Presente/Ausente).**
- Estado de la **mutación BRAF^{T1799A}** en la **citología de tiroides** obtenida mediante PAAF. (*Presente/Ausente*).

Sociodemográficas: Edad. Sexo (*Varón/Mujer*).

Histopatológicas:

- **Categoría del Diagnóstico Citopatológico (PAAF):**

No Valorable.

Negativo Malignidad.

Incluye los diagnósticos:

Benigno. (Bocio, tiroiditis).

Ausencia de células neoplásicas.

Indeterminado.

Incluye los diagnósticos:

Proliferación de células foliculares.

Proliferación de células foliculares con células de Hürthle.

Atipias celulares.

Sospechoso de Carcinoma Papilar de Tiroides.

Sospechoso de Neoplasia maligna diferente a carcinoma papilar.

Como dato adicional también se recogió la fecha de la punción de tiroides.

1.5.2. Variable dependiente: Diagnóstico histopatológico de la pieza de tiroidectomía.

Grupo 1. Patologías benignas de tiroides.

Bocio Multinodular.
Bocio Difuso (Enfermedad de Graves).
Adenoma Folicular.

Grupo 2. Neoplasias malignas de tiroides diferentes de carcinoma papilar.

Carcinoma Folicular de Tiroides.
Carcinoma Anaplásico (Indiferenciado) de Tiroides.
Sarcoma de Tiroides.

Grupo 3. Carcinoma papilar de tiroides. Subtipos de Carcinoma Papilar de Tiroides:

Carcinoma Papilar de Tiroides tipo Clásico.
Carcinoma Papilar de Tiroides variante Folicular.
Carcinoma Papilar de Tiroides variante Folicular Difusa.
Carcinoma Papilar de Tiroides variante Células Altas.
Carcinoma Papilar de Tiroides variante Sólido Trabecular.
Carcinoma Papilar de Tiroides variante Esclerosante Difuso.
Microcarcinoma Papilar de Tiroides.
Carcinoma Papilar de Tiroides variante Células Claras.

Se recogió como dato adicional la fecha de la cirugía de tiroides.

1.6. Análisis de los datos

Para estimar la especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} por el carcinoma papilar de tiroides, se calculó su prevalencia en tejido tiroideo de pacientes de los Grupos 1-3, y se compararon entre sí.

A continuación, para estimar la representatividad del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías tiroideas, para detectar carcinoma papilar de tiroides, se contrastó el resultado de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tiroideo con el de su citología tiroidea previa, en aquellos pacientes sometidos a PAAF antes de la cirugía.

Por último, se calculó la mejora en la precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas al incorporar la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} al diagnóstico citopatológico.

1.6.1. Análisis estadístico

Se realizó mediante el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos). En primer lugar, se llevó a cabo el análisis descriptivo de las variables descritas segmentado por los tres grupos a estudio.

Análisis descriptivo de todas las variables.

Variables cualitativas: frecuencias absolutas y relativas.

Variables cuantitativas: medias y desviación típica para variables con distribución normal, o medianas y percentiles (25 y 75) en caso contrario. Para el análisis de la distribución de las variables cuantitativas, se aplicó el contraste de Kolmogorov-Smirnov (o el de Shapiro-Wilk en los grupos de menos de 50 casos).

Prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A}.

Para la obtención de la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en cada uno de los grupos, se calcularon las frecuencias absolutas y relativas de la distribución de la mutación BRAF^{T1799A} en cada una de las patologías en estudio.

Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Para dilucidar si la incorporación del análisis de BRAF^{T1799A} en la citología previa a la cirugía incrementa la precisión diagnóstica de la citopatología para detectar carcinoma papilar de tiroides, se calcularon los parámetros estadísticos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y precisión diagnóstica) obtenidos al aplicar el análisis citopatológico y la determinación de BRAF^{T1799A} por separado, y se compararon con los resultados obtenidos al aplicar ambas metodologías.

Para el cálculo de estos valores epidemiológicos, se utilizaron las siguientes fórmulas (Galen & Gambino, 1975):

$$\text{Sensibilidad (S)} = \frac{VP}{VP+FN} \cdot 100$$

$$\text{Especificidad (E)} = \frac{VN}{VN+FP} \cdot 100$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo (VPN)} = \frac{VN}{VN+FN} \cdot 100$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo (VPP)} = \frac{VP}{VP+FP} \cdot 100$$

$$\text{Precisión} = \frac{VP+VN}{VP+VN+FP+FN} \cdot 100$$

Los criterios utilizados para definir cada uno de los parámetros son los siguientes:

VERDADERO POSITIVO (VP):

CITOPATOLOGÍA: Diagnóstico citopatológico de indicación quirúrgica (sospecha de CPT o indeterminado) y confirmación histopatológica de CPT.

BRAF^{T1799A}: Presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en ADN procedente de la citología y confirmación histopatológica de CPT.

VERDADERO NEGATIVO (VN):

CITOPATOLOGÍA: Diagnóstico citopatológico sin indicación quirúrgica (negativo malignidad o no valorable) en pacientes con confirmación histopatológica de patología tiroidea benigna o neoplasia maligna distinta de CPT. Pacientes con diagnóstico citopatológico de neoplasia maligna diferente de CPT y confirmación histopatológica de la misma.

BRAF^{T1799A}: Ausencia de la mutación BRAF^{T1799A} en ADN procedente de la citología en pacientes con confirmación histopatológica de patología benigna o maligna distinta de CPT.

FALSO POSITIVO (FP):

CITOPATOLOGÍA: Diagnóstico citopatológico de indicación quirúrgica (sospecha de CPT o indeterminado) y confirmación histopatológica de patología diferente a CPT.

BRAF^{T1799A}: Presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en ADN procedente de la citología y confirmación histopatológica de patología diferente a CPT.

FALSO NEGATIVO (FN):

CITOPATOLOGÍA: Diagnóstico citopatológico sin indicación quirúrgica (negativo malignidad o no valorable) en pacientes con confirmación histopatológica de CPT.

BRAF^{T1799A}: Ausencia de la mutación BRAF^{T1799A} en ADN procedente de la citología en pacientes con confirmación histopatológica de CPT.

FASE 2. DETECCIÓN PREOPERATORIA DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CITOLOGÍAS DE TIROIDES OBTENIDAS MEDIANTE PAAF

2.1. Diseño

Estudio observacional analítico prospectivo de cohortes.

2.2. Población de referencia

Pacientes sometidos a citología de tiroides por patología nodular tiroidea.

2.3. Población de estudio

Cohorte 1. Pacientes en estudio de nódulo tiroideo mediante citología de tiroides.

Pacientes sometidos a citología de tiroides mediante punción-aspiración con aguja fina (PAAF) por patología nodular tiroidea, para descartar malignidad, en el período comprendido entre 1 de enero de 2006 y 31 de diciembre de 2007 en el HUVN.

Se incluyeron en el estudio 475 punciones de nódulos pertenecientes a 400 pacientes sometidos a PAAF de tiroides.

2.3.1. Criterios de inclusión

Pacientes que acuden a la consulta de Endocrinología y que son candidatos a estudio de nódulo tiroideo mediante citología de tiroides, y de los cuales se obtuvo un resultado del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en la muestra citológica.

2.3.2. Criterios de exclusión

Negativa a participar en el estudio.

2.3.3. Cálculo del tamaño de muestra

El cálculo del número de pacientes necesarios para incluir en el estudio se realizó con el programa informático Ene 2.0[®]1992-2005. Se consideró una prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} de 1,76%, ya que aproximadamente el 5% de los nódulos tiroideos son malignos (Belfiore *et al*, 1989; Tan & Gharib, 1997; Filetti *et al*, 2006); de ellos, el 80% corresponden a carcinoma papilar de tiroides (Hundahl *et al*, 1998), y la mutación BRAF^{T1799A} sólo se encuentra en el 44% de los casos (Xing, 2005^a). Según estos parámetros, sería necesario incluir 296 pacientes considerando un error (precisión) del 1,5%, y un intervalo de confianza asintótico normal al 95% bilateral. Se estimó que era necesario recoger pacientes durante 2 años, ya que el HUVN atiende aproximadamente 200 pacientes en estudio de nódulo tiroideo por año.

2.4. Protocolo de estudio

2.4.1. Flujo de pacientes

Los pacientes que se encuentran en estudio de nódulo tiroideo acuden regularmente a revisiones periódicas rutinarias en la consulta de Endocrinología, donde se decide si el nódulo debe ser puncionado para descartar malignidad.

- nódulos tiroideos solitarios mayores de 15 mm.
- nódulos tiroideos múltiples: el más representativo de dicho tamaño, independientemente de sus hallazgos ecográficos.
- nódulos tiroideos entre 10-15 mm si había sospecha ecográfica (microcalcificaciones).

La punción puede ser realizada en la propia consulta, en el caso de que el nódulo sea palpable fácilmente, o guiada por ecografía, en el caso de nódulos más pequeños. Una vez obtenido el diagnóstico citopatológico, los pacientes con sospecha de neoplasia maligna o con un diagnóstico indeterminado (proliferación folicular), no concluyente de malignidad, pero que no permite descartarla, son dirigidos a la consulta de Cirugía General para ser intervenidos de cirugía de tiroides.

2.4.2. Seguimiento de los pacientes

Los pacientes de la cohorte 1 fueron controlados desde la fecha de la punción de tiroides hasta el 1 de septiembre de 2008 por si eran sometidos a cirugía de tiroides (aquellos diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides, pasaron a formar parte de la cohorte 2).

2.5. Descripción de las variables

La fuente primaria de información fue la Historia Clínica del paciente, recogida en la Historia Electrónica del HUVN, así como el registro conservado en el Servicio de Anatomía Patológica.

2.5.1. Variables independientes

- Estado de la **mutación BRAF^{T1799A}** en la **sección patológica** de la **pieza quirúrgica** procedente de la **tiroidectomía. Variable independiente principal (Presente/Ausente).**
- Estado de la **mutación BRAF^{T1799A}** en la **citología de tiroides** obtenida mediante PAAF. (*Presente/Ausente*).

Sociodemográficas: Edad. Sexo (*Varón/Mujer*).

Histopatológicas:

- **Categoría del Diagnóstico Citopatológico (PAAF):**
 - No Valorable.**
 - Negativo Malignidad.**
Incluye los diagnósticos:
 - Benigno. (Bocio, tiroiditis).
 - Ausencia de células neoplásicas.
 - Indeterminado.**
Incluye los diagnósticos:
 - Proliferación de células foliculares.
 - Proliferación de células foliculares con células de Hürthle.
 - Atipias celulares.
 - Sospechoso de Carcinoma Papilar de Tiroides.**
 - Sospechoso de Neoplasia maligna diferente a carcinoma papilar.**
- Fecha de la punción de tiroides.
- Fecha de la cirugía de tiroides.

2.5.2. Variable dependiente: Diagnóstico histopatológico de carcinoma papilar de tiroides.

(Sí/No)

2.6. Análisis de los datos

En primer lugar, se analizó la variable independiente principal, (presencia de la mutación BRAF^{T1799A}), en ADN procedente de las citologías de tiroides.

Tanto los pacientes con resultado positivo como negativo para este marcador genético, se incluyeron en la cohorte de estudio y se realizó el seguimiento hasta su posible intervención quirúrgica, ya sea por indicación resultante del diagnóstico citológico (indeterminado,

sospecha de neoplasia maligna) o, por motivos clínicos. Para comprobar que el estado de la mutación BRAF^{T1799A} coincidía en citología y tejido, en los pacientes sometidos a tiroidectomía se analizó además la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el área patológica de la pieza quirúrgica.

El seguimiento de los pacientes negativos para la mutación BRAF^{T1799A} se realizó hasta el 1 de septiembre de 2008.

En el caso de pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A}, si su diagnóstico citológico no era imperativo de cirugía (negativo malignidad o no valorable), fueron informados del resultado de la investigación, y se les recomendó la intervención quirúrgica en base a la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}. Por tanto, fueron derivados al Servicio de Cirugía General para ser sometidos a cirugía de tiroides.

2.6.1. Análisis estadístico

Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Para dilucidar si la incorporación del análisis de BRAF^{T1799A} en la citología previa a la cirugía incrementa la precisión diagnóstica de la citopatología para detectar carcinoma papilar de tiroides, se calcularon los parámetros estadísticos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo y precisión diagnóstica) obtenidos al aplicar el análisis citopatológico y la determinación de BRAF^{T1799A} por separado, y se comparó con los resultados obtenidos al aplicar ambas metodologías.

Para el cálculo de estos valores epidemiológicos, se utilizaron las fórmulas y criterios descritos en el epígrafe 1.6.1.

FASE 3. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON UN FENOTIPO MÁS AGRESIVO DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES.

3.1. Diseño

Estudio observacional analítico de cohortes retrospectivo-prospectivo.

3.2. Población de estudio

Pacientes sometidos a cirugía de tiroides en el HUVN durante el período comprendido entre el 1 de enero de 1998 y el 1 de septiembre de 2008, con diagnóstico histopatológico de carcinoma papilar de tiroides.

Cohorte 2. Pacientes con carcinoma papilar de tiroides.

Pacientes sometidos a cirugía de tiroides con diagnóstico histopatológico de carcinoma papilar de tiroides.

La cohorte 2 se constituyó con los pacientes de carcinoma papilar diagnosticados en el HUVN entre el período comprendido entre el 1 de enero de 1998 y el 31 de diciembre de 2007, más la incorporación de los pacientes procedentes del seguimiento por patología nodular tiroidea intervenidos de cirugía de tiroides hasta el 1 de septiembre de 2008 con diagnóstico histopatológico de carcinoma papilar de tiroides (cohorte 1 de la Fase 2).

Así, en total se reclutaron 106 pacientes afectados de carcinoma papilar de tiroides.

3.2.1. Criterios de inclusión

Pacientes sometidos a cirugía de tiroides radical, con diagnóstico histológico de carcinoma papilar de tiroides y cuya pieza quirúrgica se encontrara disponible en el archivo anatomopatológico del HUVN. En el caso de pacientes sometidos a cirugía tiroidea después del 31 de diciembre de 2007, sólo se incluyeron si pertenecían a la cohorte 1 (citología previa con BRAF^{T1799A}).

3.2.2. Criterios de exclusión

Pacientes cuyo archivo anatomopatológico quede comprometido al realizar el análisis.

3.3. Protocolo de estudio

3.3.1. Seguimiento de los pacientes

Los pacientes diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides (cohorte 2) fueron seguidos desde la fecha de la cirugía hasta el 1 de septiembre de 2008, para la recogida de los datos relativos a su evolución clínica: recidiva tumoral, dosis terapéuticas de ¹³¹I administradas, etc.

Análisis de la evolución clínica del paciente:

En el HUVN, el protocolo de seguimiento rutinario tras la cirugía de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides consiste en la ablación de restos tiroideos a los 3 meses y rastreo corporal total (RCT) anual. El seguimiento se lleva a cabo en la consulta de Endocrinología, donde se realiza la exploración clínica y determinaciones analíticas (Tg, Ac-antiTg, FT4 y TSH), en intervalos de 3 a 15 meses, según el caso (Pacini *et al*, 2007).

En el Servicio de Medicina Nuclear, atendiendo al mismo protocolo y tras una preparación adecuada, se realiza la supresión de tiroxina y determinaciones anuales en suero de TSH, Tg y Ac-antiTg y rastreo con ¹³¹I (más tratamiento si procede), hasta conseguir dos rastreos anuales consecutivos negativos, con Tg negativa. Si durante la evolución del paciente se produce la sospecha clínica, analítica o iconográfica de la presencia de recidiva o metástasis, la existencia de las mismas se confirma mediante técnicas de imagen convencionales (TAC, RMN,

ecografía), y se determina la terapia más adecuada (nueva intervención quirúrgica o terapia con ¹³¹I). En caso de que se intervenga quirúrgicamente al paciente, la confirmación definitiva de recidiva o metástasis se realiza mediante el estudio anatomopatológico.

3.4. Descripción de las variables

La fuente primaria de información ha sido la Historia Clínica de los pacientes, recogida en la Historia Electrónica y en el Servicio de Documentación del HUVN, así como los registros disponibles de cada paciente conservados en los Servicios de Medicina Nuclear y Anatomía Patológica. De la Historia Clínica se ha obtenido la información concerniente al diagnóstico histopatológico, tratamiento recibido, seguimiento clínico y episodios de recidiva tumoral.

3.4.1. Variables dependientes

Recidiva tumoral (Sí/No):

Recidiva de carcinoma papilar de tiroides durante el seguimiento, ya sea en lecho tiroideo, metástasis ganglionares o a distancia, puesta en evidencia mediante métodos de imagen (gammagrafía tiroidea, PET/TAC, TAC, RMN), confirmación citopatológica de la lesión o intervención quirúrgica con exéresis de metástasis y confirmación histopatológica.

La variable se consideró **positiva** cuando existió positividad en alguno de los siguientes parámetros:

- En los casos en los que se llevó a cabo extirpación de la lesión, se consideró **positiva** cuando existió confirmación de metástasis de carcinoma papilar de tiroides mediante diagnóstico anatomopatológico (mediante biopsia o citología).
- En los casos en los que no fue posible obtener un diagnóstico anatomopatológico (debido a que no se resecó la metástasis), el Grupo de Patología Tiroidea del HUVN emitió un informe de consenso entre expertos como **positivo** en base a la evolución clínica e iconográfica del paciente.
- En el caso de la gammagrafía tiroidea, se consideró **positiva** la persistencia de captación en lecho tiroideo a partir del 2º rastreo de tiroides (12 meses tras la cirugía).
- Necesidad de **más de 1** tratamiento de ¹³¹I.

Esta variable se consideró **negativa** si existió negatividad de **todos** los parámetros anteriores.

3.4.2. Variables independientes

Sociodemográficas: Edad. Sexo (*Varón/Mujer*).

Histopatológicas. Datos relativos a la pieza de tiroidectomía:

- **Tamaño de la lesión** (*cm*).
- **Presencia de metástasis regionales en nódulos linfáticos** (*Sí/No*).
- **Número de metástasis regionales en nódulos linfáticos.**
- **Presencia de metástasis a distancia** (*Sí/No*).
- **Número de metástasis a distancia.**
- **Multifocalidad.** Presencia de varios focos tumorales (*Sí/No*).
- **Invasión capsular** (*Sí/No*).
- **Invasión vascular** (*Sí/No*).
- **Invasión extratiroidea** (*Sí/No*).
- **Necrosis tumoral** (*Sí/No*).
- **Actividad mitótica.** Categorías:
 - Sin actividad mitótica*
 - Actividad mitótica leve*

Actividad mitótica moderada

Actividad mitótica alta

- **Extensión extratiroidea** (Sí/No).
- **Estadificación TNM. AJCC Cancer Staging Manual (6th Edition) (Anexo III)**
- **Grupos de riesgo en cáncer de tiroides: (Anexo II)**
- **Índice pronóstico AMES** (Cady & Rossi, 1988) (*Bajo/Alto riesgo*).
- **Índice pronóstico AGES** (Hay *et al*, 1987) (*Grupos 1/2/3/4*).
- **Índice pronóstico MACIS** (Hay *et al*, 1993) (*Mínimo/Bajo/Alto/Máximo riesgo*).
- **Índice del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Data** (Shaha *et al*, 1994) (*Bajo/Medio/Alto riesgo*).
- **Índice EORTC** (European Organization for Research on Treatment of Cancer) (Byar *et al*, 1979) (*Grupos 1/2/3/4/5*).
- Fecha de la cirugía de tiroides.

Datos relativos al tratamiento con ^{131}I :

- **Número de dosis de radioyodo (^{131}I)** administrada al paciente.
- **Dosis de radioyodo (^{131}I) inicial** administrada al paciente (*mCi*).
- **Dosis de radioyodo (^{131}I) total** administrada al paciente (*mCi*).
- **Rastreo Corporal Total** (*positivo/negativo*)

Estado al final del Seguimiento

Libre de enfermedad: dos rastreos consecutivos negativos con tiroglobulina negativa.

Enfermo

Fallecido por enfermedad

Estado de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario (-/+) (variable independiente principal)

3.5. Análisis de los datos

Una vez incorporados todos los pacientes de carcinoma papilar de tiroides a la cohorte 2, se analizó la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido tumoral, y se recogieron todos los datos relativos a la histopatología de los tumores.

En primer lugar, se analizó la relación del estado de BRAF^{T1799A} con los factores pronósticos de cáncer de tiroides (edad, sexo, tamaño tumoral, estadificación TNM, etc).

Además, se realizó un seguimiento de estos pacientes desde el día de la tiroidectomía hasta el 1 de septiembre de 2008, para recoger los datos relativos a la evolución clínica del paciente (recidiva, dosis administradas de ^{131}I , estado al final del seguimiento, etc.), y analizar la asociación de la variable independiente principal, es decir, la presencia de BRAF^{T1799A} en el tumor primario, con la variable dependiente, recidiva de carcinoma papilar de tiroides.

3.5.1. Análisis estadístico

Análisis descriptivo de todas las variables analizadas.

Variables cualitativas: frecuencias absolutas y relativas.

Variables cuantitativas: medias y desviación típica para variables con distribución normal, o medianas y percentiles (25 y 75) en caso contrario.

Análisis bivalente para estudiar la posible relación entre la variable dependiente (recidiva) y las variables independientes, así como la relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y las características más agresivas del carcinoma papilar de tiroides.

Se empleó el test Chi-cuadrado de Pearson para las variables cualitativas con corrección de continuidad para tablas 2x2.

En el caso de variables independientes continuas, en primer lugar se aplicó el contraste de Kolmogorov-Smirnov (o el de Shapiro-Wilk en los grupos de menos de 50 casos) para estudiar la normalidad de la variable ajustando por los grupos de la dependiente. Si la variable se distribuía normalmente, se aplicó el test de la t-Student; en cualquier otro caso, el test no paramétrico U-Mann-Whitney.

Análisis multivariante para analizar si la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} se encuentra asociada a la recidiva.

Se estudiaron las diferencias entre grupos entre la variable principal independiente (presencia de la mutación BRAF^{T1799A}) y los factores pronósticos del cáncer de tiroides (edad, sexo, estadificación, etc.), para evaluar posibles variables confusoras, aplicando los tests correspondientes.

En el caso de la recidiva, al ser esta variable dependiente dicotómica, se ajustó un modelo de regresión logística, en el que se incluyeron las variables independientes que en el análisis bivariante estaban estadísticamente relacionadas con el pronóstico, las posibles variables confusoras (edad, sexo, etc.), y variables de importancia biológica-clínica.

Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$ para el análisis bivariante y de $p < 0,10$ para la regresión logística.

El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

4. Limitaciones del análisis del estudio

Como cualquier estudio de cohortes, los abandonos o pérdidas durante el seguimiento de la cohorte pueden afectar a los resultados de esta investigación. A pesar de ello, no existen razones para pensar que los pacientes perdidos durante el seguimiento o que han abandonado el estudio sean diferentes de los que han permanecido hasta el final, por lo que se minimiza el sesgo de selección.

Aparte de la pérdida de información derivada de mala recogida o conservación de las historias clínicas de los pacientes, se pueden ocasionar pérdidas cuando el paciente haya continuado su seguimiento clínico en otro hospital (en nuestro caso serían mínimas, dado que el HUVN es centro de referencia para la administración de tratamiento de yodo radiactivo en Andalucía Oriental), cuando cambie de residencia o se produzca un fallecimiento por otra causa no relacionada con el cáncer de tiroides.

5. TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A}

La detección de la mutación BRAF^{T1799A} se realizó con la misma técnica en tejido y citología de tiroides, y consistió en una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional y análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción con la enzima TspRI, más secuenciación bidireccional en los casos positivos, tal y como se describe en el Apartado 5.3.

5.1. Algoritmo de trabajo

En todas las muestras, tanto las procedentes de citologías de tiroides como las de tiroidectomías incluidas en parafina, el estado de la mutación BRAF^{T1799A} se estableció en primer lugar mediante análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*). En aquellas muestras que resultaron positivas para la mutación mediante RFLP, se confirmó que el cambio en el patrón de fragmentos obtenido se debía a la presencia de la transversión de la timina correspondiente a la posición 1799 (exón 15) por una adenina, mediante la secuenciación bidireccional del fragmento de amplificación obtenido por PCR. También se secuenció una proporción aleatoria de citologías y biopsias de pacientes que no presentaban la mutación, para comprobar la coincidencia de ambas técnicas.

En los pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente, se analizó la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido patológico representativo de la lesión y en tejido tiroideo normal circundante, seleccionados por un patólogo experto en patología tiroidea.

5.2. Especímenes

Todas las muestras utilizadas en esta investigación (citologías, tejido embebido en parafina), fueron obtenidas para el diagnóstico y seguimiento clínico del paciente. El diagnóstico citológico e histológico de cada muestra se llevó a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del HUVN dentro del protocolo diagnóstico de este centro.

Las muestras necesarias para nuestro estudio fueron revisadas por dos patólogos independientes expertos en patología tiroidea, de acuerdo con los criterios establecidos por la OMS (Hedinger *et al*, 1989). En todo momento, se mantuvo un criterio conservador en cuanto a la preservación del archivo anatomopatológico del paciente.

5.2.1. Muestras de citología tiroidea

Las extensiones citológicas fueron teñidas de manera rutinaria mediante las técnicas Papanicolaou y Diff-Quick para el diagnóstico citopatológico de la muestra.

Para el análisis de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}, se seleccionó 1 ó 2 de las extensiones citológicas más representativas del diagnóstico citopatológico, siempre que no quedara comprometido el archivo anatomopatológico del paciente.

Para el análisis de los resultados de este estudio, el diagnóstico citopatológico de la PAAF de tiroides se clasificó en 5 grupos, basándose en el informe anatomopatológico original:

No Valorable.

Negativo Malignidad.

Incluye los diagnósticos:

Benigno. (Bocio, tiroiditis).

Ausencia de células neoplásicas.

Indeterminado.

Incluye los diagnósticos:

Proliferación de células foliculares.

Proliferación de células foliculares con células de Hürthle.

Atipias celulares.

Sospechoso de Carcinoma Papilar de Tiroides.

Sospechoso de Neoplasia maligna diferente a carcinoma papilar.

5.2.2. Muestras de biopsia tiroidea

En los pacientes intervenidos quirúrgicamente, el tejido procedente de la tiroidectomía fue incluido en parafina y sometido a técnicas rutinarias de tinción con hematoxilina-eosina para el diagnóstico histopatológico definitivo de la pieza quirúrgica.

Para el análisis genético, se realizaron 5 cortes de 7 µm de la zona patológica de la muestra más representativa del diagnóstico histopatológico, y otros 5 cortes de 7 µm de una zona adyacente con características de normalidad, que se procesaron de manera independiente. En el caso de tumores de tamaño ≤ 1 cm, la extracción de tejido del bloque se realizó usando una aguja de 0,6 mm con el Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments, Estados Unidos). La selección de las zonas patológicas y no patológicas fue realizada por un patólogo experto en patología tiroidea.

5.3. DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A}

5.3.1. Procesamiento previo de las citologías de tiroides y del tejido en parafina para la extracción del ADN

La digestión de las células y la extracción del ADN se llevaron a cabo con el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Estados Unidos), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los portaobjetos se sumergieron en xilol (Guinama, España) durante 48-72 h para despegar los cubreobjetos. A continuación, las células se separaron del cristal directamente con tampón ATL proporcionado por el fabricante (Qiagen, Estados Unidos).

Los cortes de parafina procedentes de las biopsias se introdujeron en un microtubo y fueron desparafinadas mediante sucesivas centrifugaciones en xilol y etanol (Merck, Alemania). Procedimiento:

1. Colocar la muestra en un tubo de microcentrífuga (MiniSpin Plus, Eppendorf, Alemania) de 1,5 ml.
2. Añadir 1200 µl de xilol.
3. Agitar vigorosamente.
4. Centrifugar a velocidad máxima 5 min a temperatura ambiente.
5. Eliminar el sobrenadante con una pipeta. No eliminar nada de precipitado.
6. Añadir o 1200 µl de etanol (96-100%) al precipitado para eliminar el xilol residual y mezclar con un agitador vortex (VWR Scientific Products, Estados Unidos).
7. Centrifugar a velocidad máxima 5 min a temperatura ambiente.
8. Eliminar cuidadosamente el etanol con una pipeta.
9. Repetir una vez los pasos 5-7.
10. Incubar el tubo abierto a 37°C durante 10-15 min hasta que se evapore el etanol.
11. Resuspender el precipitado en 180 µl de tampón ATL.

5.3.2. Extracción del ADN genómico

A continuación, se procedió a la extracción del ADN según el protocolo descrito por el fabricante, para muestras de tejido:

1. Añadir proteinasa K (Fermentas Life Sciences, Lituania) y mezclar en agitador vortex. Concentración Final requerida: 400 µg/ml.
2. Incubar a 65°C hasta que el tejido esté completamente lisado en un termobloque fijo Grant-bio BTD (Grant-bio, Reino Unido). Agitar en vortex 2-3 veces por hora durante la incubación para dispersar la muestra.
3. Golpe de centrifuga.
4. Añadir 200 µl de tampón AL y mezclar 15 s en agitador vortex.
5. Incubar 10 min a 70°C. Golpe de centrifuga.
6. Añadir 200 µl de etanol absoluto a la muestra. Agitador vortex 15 s. Golpe de centrifuga.
7. Trasvasar toda la muestra a la columna con la membrana de sílice (colocada en el tubo colector de 2 ml). Cerrar la tapa.
8. Centrifugar a 6000 g 1 min. Colocar la columna en un tubo colector limpio y eliminar el tubo colector con el filtrado.
9. Abrir la columna y añadir 500 µl de tampón AW1.
10. Cerrar la tapa y centrifugar a 6000 g 1 min. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2 ml y eliminar el tubo colector que contiene el filtrado.
11. Abrir la columna y añadir 500 µl de tampón AW2.
12. Cerrar la tapa y centrifugar a 20000 g 3 min en una centrifuga Microfriger BL (JP Selecta, España).
13. Colocar la columna en un tubo de 1,5 ml y eliminar el tubo colector que contiene el filtrado.
14. Abrir la columna y añadir tampón AE (elución).
15. Incubar a temperatura ambiente 5 min y centrifugar a 6000 g 1 min.

La elución del ADN se realizó en 50 µl (muestras procedentes de citología tiroidea) o en 100 µl (muestras procedentes de tejido en parafina) de tampón AE.

5.3.3. Amplificación por PCR del exón 15 del gen *braf*

Para obtener el fragmento del exón 15 de *braf* que contiene la transversión T1799A se usaron los *primers* específicos descritos por Davies (Davies *et al*, 2002^a), que amplifican una secuencia de 224 pares de bases (pb), y cuyas secuencias son:

Primer Forward (F): 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA

Primer Reverse (R): 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA

Secuencia del producto de PCR amplificado:

Los *primers* descritos por Davies amplifican la siguiente secuencia, correspondiente al exón 15 de *braf*, flanqueado por los intrones 15 y 16:

5'-
 TCATAATGCTTGCTCTGATAGGAAATGAGATCTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGATA
 TATTTCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTA CAGTGAAATCTCGA
 TGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGTAAGAATTGAGG
 CTATTTTGC ACTGAT TAAATTTTGGCC-3'

NNNN	Secuencia del exón 15
NNNN	Primer F y R
NNNN	Producto de amplificación correspondiente a los intrones 15/16
NNNN	Secuencia reconocida por la enzima de restricción TspRI (La T 1799 se encuentra en color blanco)
NNNN	Punto de corte de la enzima de restricción TspRI

Programa de amplificación

Se utilizó el protocolo de amplificación por PCR *stepdown* descrito por Cohen (Cohen *et al*, 2003^a).

95°C	2 min	1 ciclo
95°C	1min	2 ciclos
60°C	1min	
72°C	1min	
95°C	1min	2 ciclos
58°C	1min	
72°C	1min	
95°C	1min	40 ciclos
56°C	1min	
72°C	1min	
72°C	5 min	1 ciclo

La PCR *touchdown* es un método de amplificación por PCR que evita o minimiza la amplificación de secuencias inespecíficas. La temperatura a la cual los *primers* se hibridan durante un ciclo de la PCR determina la especificidad de la unión. El punto de fusión de la pareja de *primers* determina el límite superior de la temperatura de hibridación. Justo por debajo de esta temperatura, sólo se producen emparejamientos muy específicos entre el *primer* y la hebra molde. A temperaturas más bajas, los *primers* se unen menos específicamente.

Los primeros pasos de la PCR *touchdown* se realizan a temperaturas de hibridación elevadas, y la temperatura de hibridación va descendiendo gradualmente en cada conjunto de ciclos posteriores, hasta alcanzar una temperatura de hibridación o "*touchdown*", que es la que se usa para los siguientes ciclos. Esto permite el enriquecimiento del producto correcto sobre cualquier otro producto inespecífico. Los *primers* hibridan a la máxima temperatura capaz de tolerar, que es la menos permisiva para la formación de uniones no específicas. Así, la primera secuencia amplificada es la situada entre las regiones de mayor especificidad de los *primers*, que es con mayor probabilidad la región de interés. Estos fragmentos son después amplificados durante las siguientes rondas de amplificación a menores temperaturas, y

compiten con las secuencias no específicas a las que los *primers* pueden unirse a esas temperaturas menores (Don *et al*, 1991; Roux, 1994; Hecker & Roux, 1996). Por tanto, la PCR *touchdown* permite la acumulación de productos más específicos en las fases iniciales, que sirven de molde en las etapas sucesivas de amplificación, disminuyendo la amplificación no específica global.

La PCR *stepdown* consiste en una modificación de la PCR *touchdown*, en la que unos pocos descensos sucesivos en la temperatura de anillamiento de los *primers* han demostrado ser suficientemente efectivos, simplificando la programación del termociclador (Hecker & Roux, 1996), y que resulta en una gran especificidad y rendimiento de la amplificación.

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Biometra T1, (Whatman Biometra, Alemania), con el sistema preformulado para PCR puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences, Estados Unidos), que contiene los reactivos necesarios para realizar la amplificación en un volumen final de 25 μ l (2,5 unidades de Taq DNA polimerasa, estabilizadores, albúmina sérica bovina, mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y tampón de reacción. La concentración de cada dNTP es 200 mM en 10 Mm de Tris-HCl (pH 9,0 a temperatura ambiente), 50 mM de KCl y 1,5 mM de MgCl₂). Para cada amplificación, se usaron aproximadamente 100 ng de ADN celular total.

5.3.4. Determinación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} mediante polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Se utilizó el protocolo descrito previamente por Cohen y colaboradores (2003), que se basa en la digestión del fragmento de PCR de 224 pb con la enzima de restricción TspRI, que reconoce la secuencia CASTG, (donde S puede ser citosina o guanina, y cuyo punto de corte se encuentra desplazado dos nucleótidos más adelante en dirección 5'→3'), dando lugar a tres bandas principales, de 125, 87 y 12 pb en el alelo normal. La mutación BRAF^{T1799A} suprime el sitio de restricción de la posición 1799, resultando una banda de 212 pb procedente del alelo mutante y las bandas residuales del alelo normal (Figura M1).

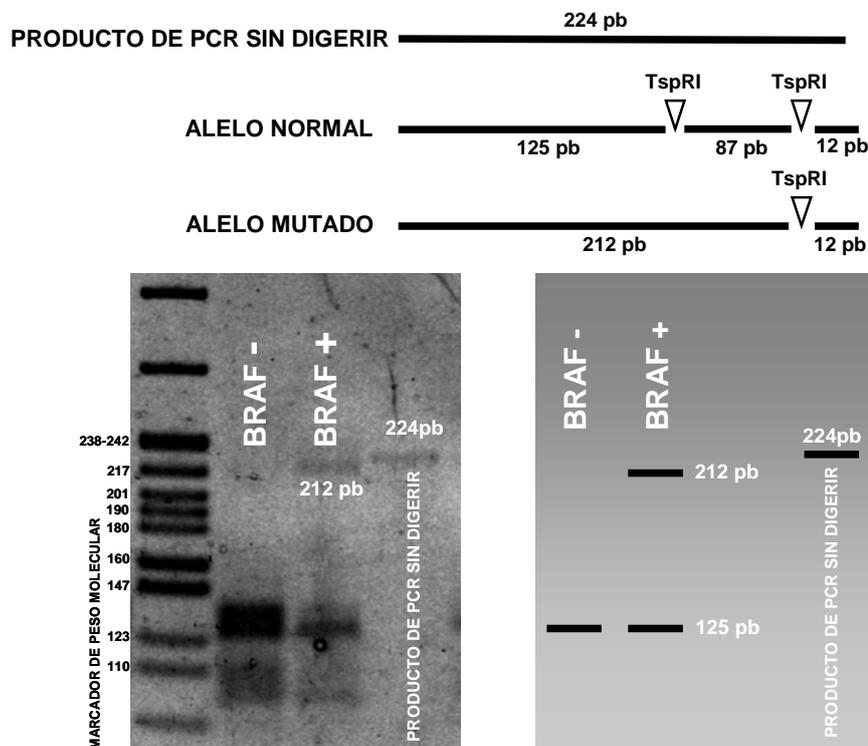


Figura M1. Patrón de fragmentos RFLP característico de la presencia/ausencia de la mutación BRAF^{T1799A} para la interpretación de los resultados. La aparición de una banda de 212 pb es la que determina la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}.

Para la reacción de digestión enzimática, 5-20 µl de producto de amplificación obtenido en la reacción de PCR se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 65°C con 1 µl (10 U/µl) de enzima de restricción TspRI (New England Biolabs, Estados Unidos) en un volumen de reacción de 30 µl en tampón NEB4 suplementado con 0,3 µl de albúmina sérica bovina (100 µg/ml).

Como control negativo de la digestión se utilizó la misma mezcla de reacción, reemplazando la enzima por agua desionizada.

Las muestras digeridas se cargaron en un gel de agarosa Nusieve® GTG® (Lonza, Estados Unidos) al 3,5%. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio 1:10000 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en tampón TBE (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos), y la visualización de las bandas se puso de manifiesto con luz ultravioleta en un sistema de análisis de imágenes DigiDoc-It® (UVP, Estados Unidos).

5.3.5. Determinación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} mediante secuenciación bidireccional directa

En las muestras en las que se detectó la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} mediante la técnica RFLP, ésta fue confirmada mediante secuenciación en ambos sentidos del producto de PCR.

En primer lugar, tras la amplificación por PCR, se confirmó la presencia de un único producto de PCR, sometiéndolos a electroforesis en un gel de agarosa al 2%, tinción con bromuro de etidio 1:10000 y visualización con luz ultravioleta.

A continuación, el producto de PCR se purificó usando el QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Estados Unidos), según el protocolo especificado por el fabricante:

1. Añadir 5 volúmenes de tampón PBI a un volumen de la reacción de PCR y mezclar.
2. Colocar una columna QIAquick en un tubo colector de 2 ml y trasvasar la mezcla de la muestra a la columna con la membrana de sílice para unir el ADN.
3. Centrifugar a 17900 g durante 60 s y descartar el eluido.
4. Lavar con 0.75 ml de tampón PE.
5. Centrifugar a 17900 g durante 60 s y descartar el eluido.
6. Repetir el paso 5.
7. Colocar cada columna QIAquick en un tubo de microcentrífuga de 1,5ml.
8. Eluir el ADN aplicando 30 µl de tampón EB en el centro de la columna y dejando reposar durante 1 min.
9. Centrifugar a 17900 g durante 60 s. El eluido contiene el producto de PCR purificado.

Usando el mismo par de *primers* que en la amplificación por PCR, se llevó a cabo una reacción de secuenciación por separado para cada *primer*, con los reactivos Big Dye terminator V1.0 (Applied Biosystems, Estados Unidos) y las condiciones de reacción sugeridas por el fabricante; el programa de amplificación fue el siguiente: 94°C durante 3 min x 1 ciclo; 96°C durante 10 s, 58°C durante 5 s y 60°C durante 4 min x 25 ciclos.

Tras la reacción de secuenciación, los productos de la secuenciación fueron purificados para retirar el exceso de nucleótidos marcados, usando el DyeEx® 2.0 Spin Protocol for Dye-Terminator Renovation (Qiagen, Estados Unidos), según el protocolo de filtración en columnas de gel descrito por el fabricante:

1. Resuspender la resina de la columna agitando suavemente en un agitador vortex.

2. Aflojar el tapón de la columna $\frac{1}{4}$ de vuelta para permitir el vacío en el interior.
3. Romper el cierre inferior de la columna y colocarla en un tubo colector de 2 ml.
4. Centrifugar 3 min a 750 g y descartar el tubo colector junto con el eluido.
5. Transferir la columna a un tubo de microcentrífuga de 1,5ml.
6. Aplicar la reacción de secuenciación directamente en el centro del lecho de la columna.
7. Centrifugar 3 min a 750 g. Descartar la columna. El eluido contiene el producto de secuenciación purificado.

A continuación, las muestras se secaron en una centrifuga de vacío durante 20 min. La lectura de la secuencia se realizó en un secuenciador ABI PRISM 310 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Estados Unidos), para lo cual antes fueron desnaturalizadas durante 2 min a 95°C en 25 μ l de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Estados Unidos) para cada muestra.

Para la visualización de los electroferogramas proporcionados por el secuenciador se utilizó el software de libre distribución Chromas Lite versión 2.01. Para el alineamiento de las secuencias de ADN así obtenidas con la secuencia original del gen *braf*, se utilizó la herramienta bioinformática LALIGN, proporcionada libremente por el servidor Genestream, del Instituto de Genética Humana (Montpellier, Francia).

La interpretación de los resultados se realizó en base a la aparición de un doble pico de fluorescencia, en la posición correspondiente a la timina 1799 de la secuencia original, procedente de la contribución conjunta de una adenina y una timina en esa posición en las muestras positivas para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} (Figura. M2).

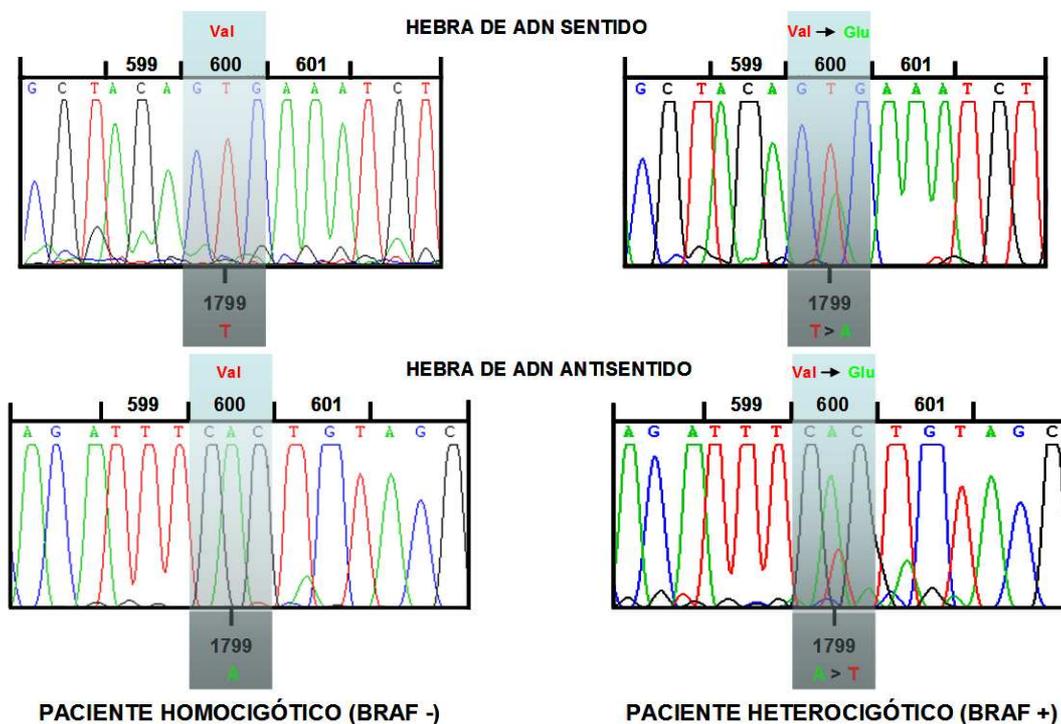


Figura M2. Electroferogramas característicos de la presencia/ausencia de la mutación BRAF^{T1799A} para la interpretación de los resultados. Izquierda: paciente homocigótico. Aparece un único pico de fluorescencia en la posición 1799, correspondiente a timina (rojo). Derecha: paciente heterocigótico. Aparece un doble pico de fluorescencia en la posición 1799, correspondiente a timina (rojo) y adenina (verde).

RESULTADOS

1. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CARCINOMA DE TIROIDES: ESPECIFICIDAD Y REPRESENTATIVIDAD

1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO: Edad y sexo

Grupo 1. Pacientes con patología benigna de tiroides.

La edad media de los pacientes con patología benigna de tiroides (N=40), en el momento del diagnóstico, fue de $49,5 \pm 14,8$ años (media \pm DT, desviación típica), con un mínimo de 18 y un máximo de 76 años. La Figura R1.1.1A muestra la distribución de la población por edades, encontrándose entre los 30-60 años el 70% de los pacientes estudiados. Este grupo estaba constituido por 7 varones y 33 mujeres, con una relación hombre: mujer de 1:4,7. La estratificación de la edad de los pacientes según el sexo no dio lugar a una diferencia significativa ($p=0,328$) de edad entre los distintos grupos (Figura R1.1.1B).

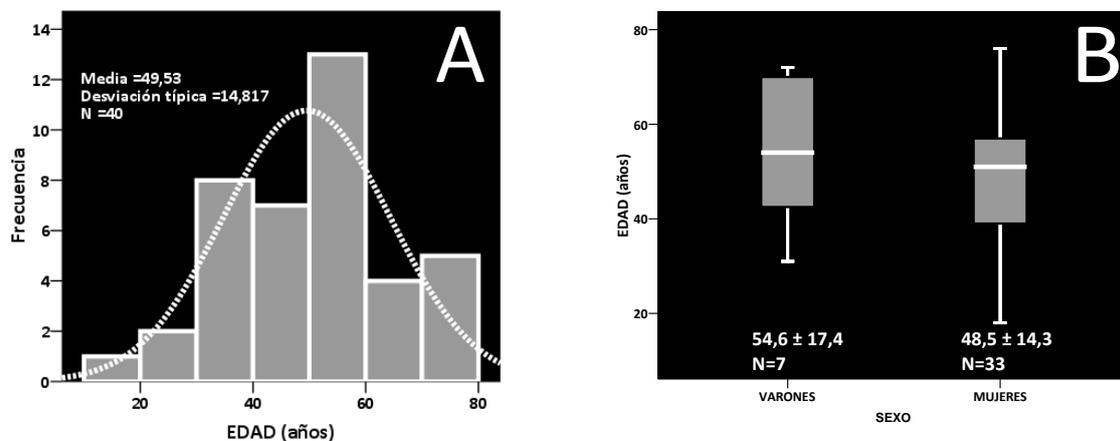


Figura R1.1.1. A. Distribución de la edad al diagnóstico de los pacientes con patologías benignas de tiroides. B. Distribución de la edad estratificada según el sexo de los pacientes con patologías benignas de tiroides (media \pm DT).

Grupo 2. Pacientes con neoplasias malignas de tiroides diferentes de carcinoma papilar.

La edad media de los pacientes con neoplasias malignas de tiroides (n=17), en el momento del diagnóstico fue de $49,2 \pm 20,8$ años, con un mínimo de 14 y un máximo de 82 años. La Figura R1.1.2A muestra la distribución de la población por edades, encontrándose entre los 30-50 años el 47% de los pacientes estudiados. Este grupo estaba constituido por 4 varones y 13 mujeres, con una relación hombre: mujer de 1:3,3. La estratificación de la edad de los pacientes según el sexo no dio lugar a una diferencia significativa de edad ($p=0,365$) entre los distintos grupos (Figura R1.1.2B).

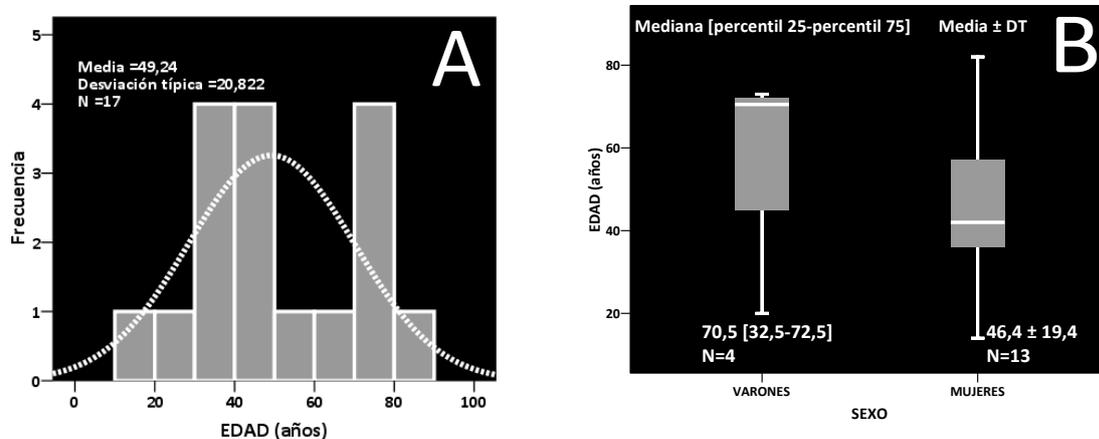


Figura R1.1.2. A. Distribución de la edad al diagnóstico de los pacientes neoplasias malignas de tiroides diferentes a CPT. B. Distribución de la edad estratificada según el sexo de los pacientes con neoplasias malignas de tiroides diferentes a CPT (mediana [percentil 25-percentil 75] o media \pm DT).

Grupo 3. Pacientes con carcinoma papilar de tiroides

La edad media en el momento del diagnóstico de los pacientes con carcinoma papilar de tiroides fue de $44,0 \pm 15,6$ años, con un mínimo de 9 y un máximo de 70 años. En la Figura R1.1.3A se muestra la distribución de la población por edades, encontrándose entre los 30-60 años el 60,9% de los pacientes estudiados. Este grupo estaba constituido por 8 varones y 61 mujeres, con una relación hombre: mujer de 1:7,6. La estratificación de la edad de los pacientes según el sexo no dio lugar a una diferencia significativa de edad ($p=0,921$) entre los distintos grupos (Figura R1.1.3B).

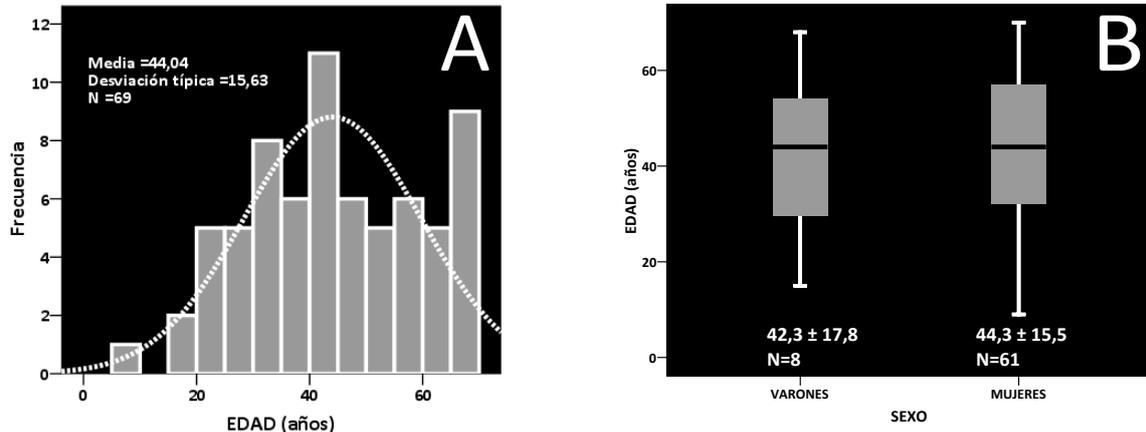


Figura R1.1.3. A. Distribución de la edad al diagnóstico de los pacientes de carcinoma papilar de tiroides. B. Distribución de la edad estratificada según el sexo de los pacientes de carcinoma papilar de tiroides (media ± DT).

1.2. TIPO HISTOLÓGICO

Grupo 1. Pacientes con patología benigna de tiroides.

Los pacientes incluidos en este grupo fueron un total de 40. Como se aprecia en la Figura R1.2.1A, el tipo histológico más frecuente correspondió a bocio multinodular (25 pacientes; 62,5%), seguido de bocio difuso o enfermedad de Graves (13 pacientes; 32,5%), mientras que 2 pacientes (5%) presentaron diagnóstico de adenoma folicular.

Grupo 2. Pacientes con neoplasias malignas de tiroides diferentes de carcinoma papilar.

Los pacientes incluidos en este grupo fueron un total de 17. El tipo histológico más frecuente correspondió a carcinoma folicular, con 14 pacientes afectados (82,4%), de los cuales 12 se ajustaron al patrón folicular convencional y 2 presentaron el subtipo histológico de células oncocíticas o de Hürthle. El resto de pacientes presentaron diagnóstico de carcinoma anaplásico (2 casos; 11,8%) y sarcoma de tiroides (1 caso; 5,9%). (Figura R1.2.1B).

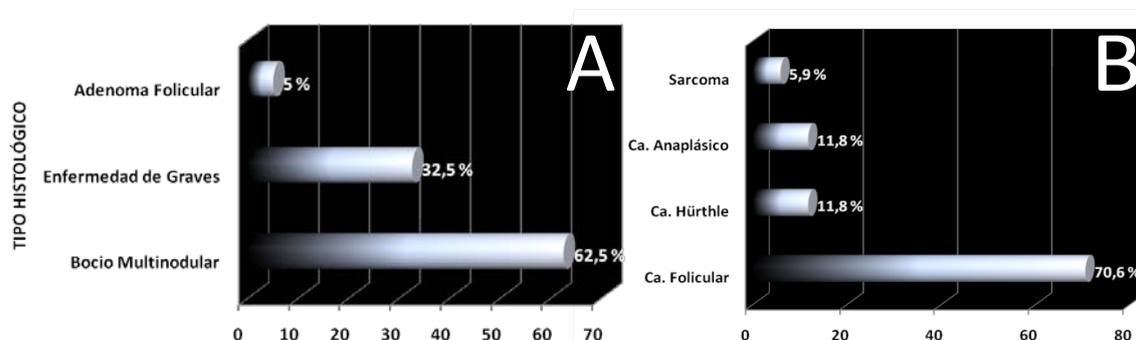


Figura R1.2.1. A. Frecuencia de los subtipos histológicos en el grupo de pacientes con patologías benignas de tiroides. B. Frecuencia de los subtipos histológicos en el grupo de pacientes con neoplasias malignas de tiroides no CPT.

Grupo 3. Pacientes con carcinoma papilar de tiroides.

En estos pacientes, el subtipo histológico clásico fue el más frecuente (44,9%; 31/69 casos). El 2º subtipo en frecuencia fue el microcarcinoma papilar (33,3%; 23/69), mientras que la variante folicular del CPT fue hallada en el 14,5% (10/69). Estos tres subtipos histológicos constituyeron en conjunto el 92,8% de los pacientes estudiados en el grupo. Los subtipos histológicos de los pacientes restantes fueron la variante de células altas en un 2,9% de los casos (2 pacientes), y hubo 1 caso de cada una de las siguientes variantes: variante de células claras, variante esclerosante difusa y variante folicular difusa, con una aportación individual al porcentaje global del 1,4% (Figura R1.2.2).

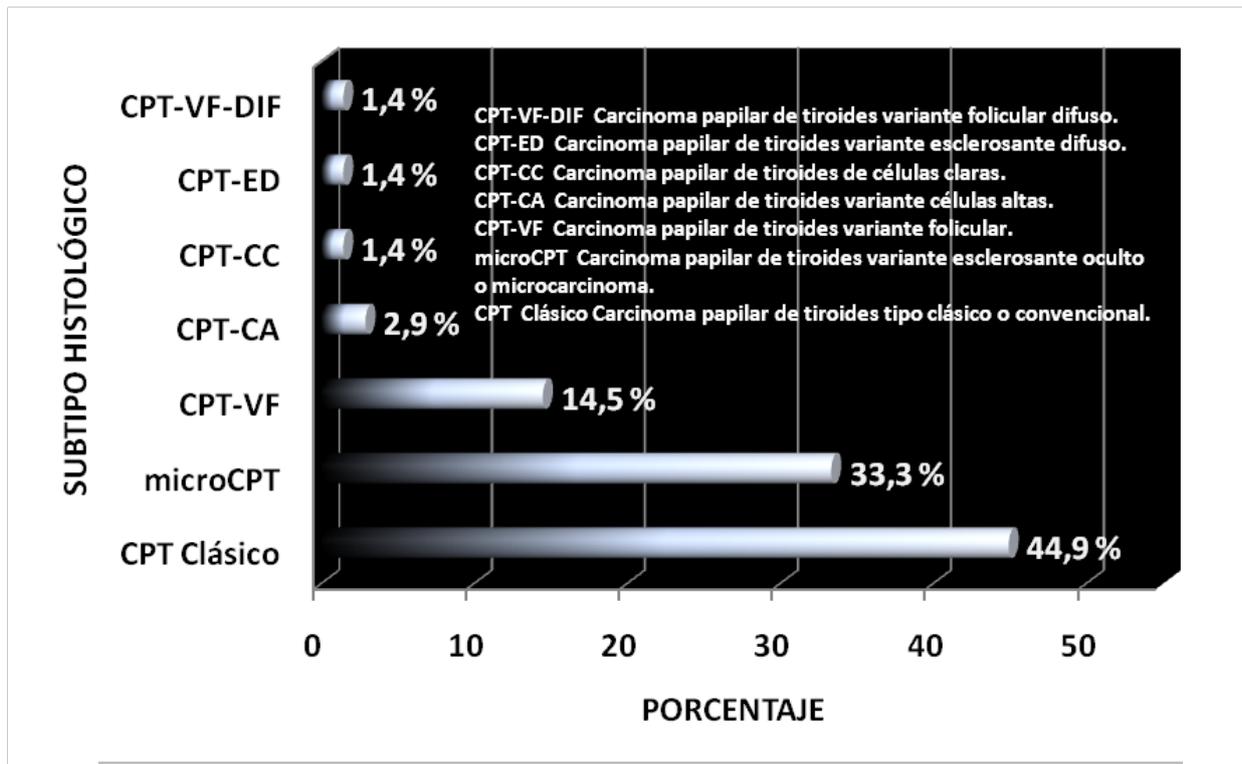


Figura R1.2.2. Frecuencia de los subtipos histológicos de carcinoma papilar de tiroides.

1.3. PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

De los 69 pacientes estudiados con carcinoma papilar de tiroides, 32 resultaron positivos para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tumoral procedente de la tiroidectomía, correspondiendo por tanto a una prevalencia de 46,4% (IC_{95%}: 34,3-58,4).

La distribución de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en los distintos subtipos de carcinoma papilar de tiroides se encuentra en la Tabla R1.3.1. Las variantes histológicas de células altas (CPT-CA) y células claras (CPT-CC) resultaron ser las de mayor prevalencia para la mutación BRAF^{T1799A}, con un 100% de casos positivos; mientras la variante folicular (CPT-VF) resultó positiva en el 50% de los casos (5/10). La prevalencia en la variante clásica del CPT fue del 48,4% (15/31); estos 15 casos positivos de la variante clásica (la más frecuente) contribuyeron en un 21,7% al resultado global. En el subtipo microcarcinoma papilar de tiroides (microCPT), la positividad apareció en el 39,1% (9/23) de estos pacientes (2ª variante histológica más frecuente), con una contribución a la prevalencia global del 13%. Las variantes difusas (esclerosante difusa, CPT-ED y folicular difusa, CPT-VF-DIF) resultaron negativas para la mutación BRAF^{T1799A} en los 2 casos analizados.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	N	BRAF ^{T1799A}			
		-	+	% del total	% por histología
CPT Clásico	31	16	15	21,7	48,4
microCPT	23	14	9	13,0	39,1
CPT-VF	10	5	5	7,2	50,0
CPT-CA	2	0	2	2,9	100,0
CPT-CC	1	0	1	1,4	100,0
CPT-ED	1	1	0	0,0	0,0
CPT-VF-DIF	1	1	0	0,0	0,0
TOTAL	69	37	32	46,4	

Todos los casos analizados que resultaron positivos para la mutación BRAF^{T1799A} fueron sometidos a secuenciación bidireccional del producto de PCR, y en todos los pacientes, la mutación hallada fue la transversión de la timina en la posición 1799 por una adenina.

El análisis de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido sano adyacente al tumor fue negativo en los 69 pacientes.

1.4. ESPECIFICIDAD DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} PARA DETECTAR CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

Para comprobar la especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} por el carcinoma papilar de tiroides, se analizó su presencia en el tejido más representativo de la lesión de todos los pacientes del Grupo 1 (40 pacientes con patología benigna de tiroides: 25 bocio multinodular, 13 bocio difuso, 2 adenoma folicular) y del Grupo 2 (17 pacientes con neoplasias malignas de tiroides diferentes de CPT: 14 carcinoma folicular, 2 carcinoma anaplásico, 1 sarcoma de tiroides), **resultando negativa en todos los casos**. En la Tabla R1.4.1 se muestra el desglose por patologías del resultado de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en estos pacientes.

De los 69 pacientes con carcinoma papilar de tiroides (Grupo 3), la mutación BRAF^{T1799A} **resultó positiva** en 32 casos (46,4%) (Tablas R1.3.1 y R1.4.1).

Estos resultados establecen que la mutación BRAF^{T1799A} es específica de carcinoma papilar de tiroides.

GRUPO 1			GRUPO 2			GRUPO 3		
Patologías benignas	N	BRAF ^{T1799A}	Cáncer no papilar	N	BRAF ^{T1799A}	Carcinoma papilar	N	BRAF ^{T1799A}
Bocio Multinodular	25	-	Carcinoma Folicular	14	-			
Bocio Difuso	13	-	Carcinoma Anaplásico	2	-			
Adenoma Folicular	2	-	Sarcoma de Tiroides	1	-			
TOTAL	40	40 (-)		17	17 (-)		69	32 (+)
	0 %			0 %			46,4 %	

El análisis de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido sano adyacente a la lesión resultó negativo en todos los casos.

1.5. REPRESENTATIVIDAD (DETECTABILIDAD Y FIABILIDAD) DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN MUESTRAS CITOLÓGICAS

Una vez comprobada la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} sólo en pacientes con CPT (tejido del foco de carcinoma papilar de tiroides), se analizaron, de forma retrospectiva, las citologías de tiroides obtenidas por punción y aspiración con aguja fina (PAAF). De los 126 pacientes incluidos en esta fase del estudio, 60 habían sido sometidos a PAAF de tiroides previamente a la intervención quirúrgica. De estos 60 pacientes, se escogió la citología más reciente, preferiblemente realizada en los 12 meses previos a la cirugía, lo cual fue posible en 51 casos (85%). Para el resto de los pacientes, se escogió la punción más reciente que se había realizado.

De los 40 pacientes incluidos en el Grupo 1 (patología benigna de tiroides), 15 tenían una PAAF previa (13 de los 25 pacientes diagnosticados histopatológicamente como bocio multinodular y los 2 de adenoma folicular). De estos 15 pacientes 9 (60%) se habían realizado la punción en los 12 meses anteriores a la cirugía.

De los 17 pacientes incluidos en el Grupo 2 (neoplasias malignas de tiroides diferentes de CPT), 9 tenían una PAAF previa (4 de los 12 pacientes diagnosticados histopatológicamente como carcinoma folicular, los 2 pacientes con carcinoma de Hürthle, los 2 pacientes diagnosticados como carcinoma anaplásico y el paciente con sarcoma de tiroides). De estos 9 pacientes, 8 (88,9%) se habían realizado la punción en los 12 meses anteriores a la cirugía. Ninguna de las lesiones presentadas por estos pacientes en la cirugía fue ≤ 1 cm de tamaño.

De los 69 pacientes incluidos en el Grupo 3 (carcinoma papilar de tiroides), 54 tenían una PAAF previa (22 de los 31 pacientes diagnosticados histopatológicamente como CPT clásico, 18 de los 23 casos de microCPT, los 10 casos de CPT-FV, 1 de los 2 casos de CPT-CA, y los 3 casos de CPT-CC, CPT-ED y CPT-VF-DIF). Para esta fase del estudio se excluyeron los 18 pacientes de microcarcinoma papilar de tiroides, por no poder garantizar la correspondencia entre el nódulo puncionado para la PAAF y el tumor hallado en la tiroidectomía. Por tanto, quedaron finalmente para el análisis citológico 36 pacientes con CPT, de los cuales 34 (94,4%) se habían realizado la punción en los 12 meses anteriores a la cirugía.

El resultado de la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en los pacientes sometidos a PAAF previa, comparada con el resultado obtenido en tejido tiroideo tras la tiroidectomía, se describe en detalle en la Tabla R1.5.1, desglosado por los correspondientes diagnósticos citológicos de la PAAF e histológicos de la pieza quirúrgica. Para simplificar la lectura de estos resultados, el estado de BRAF^{T1799A} en pacientes con citologías tiroideas se muestra resumido en la Tabla R1.5.2, desglosado por diagnóstico histopatológico.

La correspondencia entre el resultado de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en la PAAF con el obtenido en tejido tiroideo procedente de la tiroidectomía fue del 100%.

Tabla R1.5.1. Comparación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tiroideo procedente de la tiroidectomía y las citologías de tiroides de los pacientes con PAAF previa a la cirugía, desglosado por diagnóstico histo- y citopatológico.

CIRUGÍA		PAAF			
N	BRAF ^{T1799A}	N	BRAF ^{T1799A}	-	+
40	GRUPO 1: PATOLOGÍAS BENIGNAS	15		15	0
25	Bocio Multinodular	13 -	2 No Valorable	2	0
			9 Negativo Malignidad	9	0
		0 +	2 Proliferación Folicular	2	0
			---	---	---
2	Adenoma Folicular	2 -	1 No Valorable	1	0
		0 +	1 Negativo Malignidad	1	0
			---	---	---
17	GRUPO 2: NEOPLASIA NO CPT	9		9	0
12	Carcinoma Folicular	4 -	1 Negativo Malignidad	1	0
		0 +	3 Proliferación Folicular	3	0
			---	---	---
2	Carcinoma de Hürthle	2 -	1 No Valorable	1	0
		0 +	1 Proliferación Folicular	1	0
			---	---	---
2	Carcinoma Anaplásico	2 -	1 Proliferación Folicular	1	0
		0 +	1 Neoplasia No CPT	1	0
			---	---	---
1	Sarcoma de Tiroides	1 -	1 Proliferación Folicular	1	0
		0 +	---	---	---
69	GRUPO 3: CARCINOMA PAPILAR	36		17	19
31	CPT Clásico	10 -	1 Negativo Malignidad	1	0
			9 Sospechoso CPT	9	0
		12 +	3 No Valorable	0	1
			1 Negativo Malignidad	0	3
			8 Sospechoso CPT	0	8
10	CPT-VF	5 -	2 No Valorable	1	0
			2 Negativo Malignidad	3	0
		5 +	1 Proliferación Folicular	1	0
			2 Negativo Malignidad	0	2
			3 Proliferación Folicular	0	3
2	CPT-CA	0 -	1	0	1
		1 +	---	---	---
			1 Sospechoso CPT	0	1
1	CPT-CC	0 -	1	0	1
		1 +	---	---	---
			1 Sospechoso CPT	0	1
1	CPT-ED	1 -	1	1	0
		0 +	1 Sospechoso CPT	1	0
			---	---	---
1	CPT-VF-DIF	1 -	1	1	0
		0 +	1 Negativo Malignidad	1	0
			---	---	---

Tabla R1.5.2. Resumen del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en los pacientes sometidos a PAAF previa a la cirugía, desglosado por histopatología.

N	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	N	BRAF ^{T1799A}	
			-	+
40	GRUPO 1: PATOLOGÍAS BENIGNAS	15	15	0
25	Bocio Multinodular	13	13	0
2	Adenoma Folicular	2	2	0
17	GRUPO 2: NEOPLASIA NO CPT	9	9	0
12	Carcinoma Folicular	4	4	0
2	Carcinoma de Hürthle	2	2	0
2	Carcinoma Anaplásico	2	2	0
1	Sarcoma de Tiroides	1	1	0
69	GRUPO 3: CARCINOMA PAPILAR	36	17	19
31	Carcinoma Papilar Clásico	22	10	12
10	Carcinoma Papilar Variante Folicular	10	5	5
2	Carcinoma Papilar Variante Células Altas	1	0	1
1	Carcinoma Papilar Variante Células Claras	1	0	1
1	Carcinoma Papilar Variante Esclerosante Difuso	1	1	0
1	Carcinoma Papilar Variante Folicular Difuso	1	1	0

1.6. PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA DETECCIÓN DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES EN MUESTRAS CITOLÓGICAS OBTENIDAS POR PAAF.

Sensibilidad

La mutación BRAF^{T1799A} resultó positiva en 19 de los 36 pacientes diagnosticados con carcinoma papilar de tiroides que tenían una PAAF previa, tanto en ADN procedente de la citología como de la pieza quirúrgica (Tablas R1.5.1 y R1.6.1). Por tanto, la sensibilidad de la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa en estos pacientes fue del 52,8%.

Tabla R1.6.1. Estado de la mutación BRAF^{T1799A} en los pacientes de carcinoma papilar de tiroides según el diagnóstico citopatológico de la PAAF.

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	BRAF ^{T1799A}			TOTAL	
	-	+	% total	N	%
NO VALORABLE	1	1	2,8	2	5,5
NEGATIVO MALIGNIDAD	5	5	13,9	10	27,8
PROLIFERACIÓN FOLICULAR	1	3	8,3	4	11,1
SOSPECHOSO CPT	10	10	27,8	20	55,6
TOTAL	17	19	52,8	36	100

De estos 36 pacientes, 24 habían sido sometidos a cirugía, indicada por el diagnóstico citológico (4 casos indeterminados, 20 con sospecha de CPT). Así, la sensibilidad del diagnóstico citopatológico previo a la cirugía fue del 66,7% (24/36). La mutación BRAF^{T1799A} resultó positiva en el 75% (3/4) de los casos citológicamente indeterminados, y en el 50% (10/20) de los pacientes en los que se detectó sospecha de CPT en la citología (Tabla R1.6.1). **Si se hubiera realizado la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa, se habrían confirmado preoperatoriamente el 54,2% de los casos de CPT en las categorías con indicación quirúrgica (13/24).**

Los 12 pacientes sin indicación quirúrgica (12/36; 33,3%) porque obtuvieron un diagnóstico citológico negativo para malignidad (10/12; 27,8%) o inadecuado (2/12; 5,5%), se habían

sometido a cirugía por motivos clínicos (Tabla R1.6.1). La mutación BRAF^{T1799A} resultó positiva en el 50% (6/12) de los casos (1 paciente con resultado no valorable y 5 pacientes con resultado negativo para malignidad). Por tanto, **la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa habría detectado el carcinoma papilar en los 6 casos de forma preoperatoria.**

Si sumamos los 6 pacientes detectados como CPT, por la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa (no detectados por el análisis citológico), a los 24 seleccionados por la citopatología, la aplicación conjunta de ambos procedimientos habría rendido una sensibilidad diagnóstica del 83,3% (30/36). Además, 6 pacientes se habrían beneficiado de un diagnóstico precoz de su carcinoma papilar de tiroides, que no había sido detectado en el análisis citopatológico.

Precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Teniendo en cuenta los 126 pacientes incluidos en los Grupos 1-3 (patología benigna, neoplasias malignas no CPT, carcinoma papilar, respectivamente) se puede calcular la sensibilidad y especificidad diagnóstica de la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides y del diagnóstico citopatológico (Los criterios utilizados para definir cada uno de los parámetros epidemiológicos se encuentran descritos en el *Apartado 1.5.1 de METODOLOGÍA*).

Para el cálculo de la precisión diagnóstica en citologías de tiroides, se seleccionaron los 60 pacientes sometidos a PAAF de tiroides previa a la cirugía (Tabla R1.5.1), clasificados en el grupos de carcinoma papilar (36/69 pacientes), patología benigna (15/40 pacientes) y neoplasia maligna diferente a CPT (9/17 pacientes).

Precisión diagnóstica de la determinación del estado de BRAF^{T1799A} para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Como se muestra en la Tabla R1.6.2, la determinación del estado de BRAF^{T1799A} en las citologías de tiroides fue capaz de detectar 19 de los 36 carcinomas papilares de tiroides (Verdaderos Positivos), y no resultó positiva en ningún paciente que no diagnosticado de CPT; es decir, no dio lugar a Falsos Positivos (Tabla R1.6.2).

		HISTOPATOLOGÍA		TOTAL		
		+	-		S	E
BRAF ^{T1799A}	+	19	0	19	52,8%	100%
	-	17	24	41	VPP 100%	VPN 58,5%
TOTAL		36	24	60	PRECISIÓN 71,7%	

Tabla R1.6.2. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la determinación de BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides.

Por su parte, en los 17 pacientes restantes diagnosticados histopatológicamente con CPT, la determinación del estado BRAF^{T1799A} resultó negativa (Tabla R1.6.2), tanto en la PAAF previa como en el tejido procedente de la cirugía (Falsos Negativos).

Según estos datos, la sensibilidad diagnóstica de la determinación de BRAF^{T1799A} en citologías para detectar carcinoma papilar de tiroides fue, por tanto, del 52,8%. Los valores de Sensibilidad, (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) se encuentran en la Tabla R1.6.2. Como se aprecia, **la E y el VPP de la determinación de BRAF^{T1799A} para detectar carcinoma papilar de tiroides es del 100%.**

La precisión diagnóstica que presenta la determinación de BRAF^{T1799A} fue del 71,7% (Tabla R1.6.2).

Precisión diagnóstica de la citopatología para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

De los 36 casos de carcinoma papilar de tiroides, el diagnóstico citopatológico había detectado 20 en la citología de tiroides, que fueron confirmados histopatológicamente tras la cirugía; los otros 4 casos de CPT habían obtenido un diagnóstico citológico indeterminado (proliferación folicular), por lo que se habían sometido a cirugía de tiroides para aclarar el diagnóstico. Por tanto, los Verdaderos Positivos de la citopatología fueron 24 pacientes (Tabla R1.6.3).

		HISTOPATOLOGÍA		TOTAL	PRECISIÓN	
		+	-		S	E
CITO PATOLOGÍA	+	24	8	32	66,7%	66,7%
	-	12	16	28	VPP 75,0%	VPN 57,1%
TOTAL		36	24	60	PRECISIÓN 63,3%	

Tabla R1.6.3. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del diagnóstico citopatológico en PAAF de tiroides.

La histopatología tras la tiroidectomía reveló además 12 casos de CPT en citologías previas descartadas para malignidad (5 habían sido diagnosticados citológicamente como “no valorable” y 7 como “negativo malignidad”) (Tabla R1.5.1), que constituyeron los Falsos Negativos del diagnóstico citopatológico (Tabla R1.6.3).

En 8 pacientes cuyo diagnóstico en su citología de tiroides previa era de indeterminado, resultaron tener patologías benignas tras la cirugía (2 casos de bocio multinodular) o neoplasias malignas diferentes al carcinoma papilar (3 carcinoma folicular clásico, 1 carcinoma de Hürthle, 1 carcinoma anaplásico y 1 sarcoma de tiroides) (Tabla R1.5.1). Por tanto, el número de Falsos Positivos para el diagnóstico de CPT mediante citopatología fue de 8 (Tabla R1.6.3).

En 16 casos, el diagnóstico citológico y el quirúrgico coincidieron en que no existía evidencia de CPT (4 no valorable, 11 negativo malignidad, 1 neoplasia diferente a carcinoma papilar) (Tabla R1.5.1). Estos casos constituyeron los Verdaderos Negativos detectados por el análisis patológico de la citología previa a la cirugía (Tabla R1.6.3).

Con estos datos, la sensibilidad diagnóstica de la citopatología para detectar carcinoma papilar de tiroides fue, por tanto, del 66,7% (Tabla R1.6.3). Los valores de S, E, VPP y VPN se encuentran en la Tabla R1.6.3.

La precisión diagnóstica que presentó la citopatología fue del 63,3% (Tabla R1.6.3).

Precisión diagnóstica de la de la citopatología complementada con la determinación del estado de BRAF^{T1799A} para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Para conocer la mejora de la precisión diagnóstica obtenida implementando de forma rutinaria el diagnóstico citopatológico con la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en las citologías tiroideas, se calculó la precisión diagnóstica de ambas metodologías conjuntamente.

Combinando ambas estrategias diagnósticas, el número de casos diagnosticados de CPT (Verdaderos Positivos) de la citopatología (24 casos, correspondientes a 20 sospechas de CPT y 4 casos indeterminados de proliferación folicular, Tabla R1.6.1) se ve aumentado a 30 (Tabla R1.6.4) con los 6 casos de CPT detectados por la determinación del estado de BRAF^{T1799A} en muestras que citológicamente resultaron negativas para malignidad (5 casos) o no diagnósticas (1 caso). Es decir, la determinación de BRAF^{T1799A} rescató el 50% (6/12) de los falsos negativos de la citopatología (Tabla R1.6.1).

		HISTOPATOLOGÍA		TOTAL	S	E
		+	-			
CITO PATOLOGÍA + BRAF ^{T1799A}	+	30	8	38	83,3%	66,7%
	-	6	16	22	VPP 79,0%	VPN 72,7%
TOTAL		36	24	60	PRECISIÓN 76,7%	

Tabla R1.6.4. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del diagnóstico citopatológico complementado con la determinación del estado de BRAF^{T1799A} en PAAF de tiroides.

Los casos de Falsos Positivos y Verdaderos Negativos siguen siendo los mismos que los aportados por el diagnóstico citopatológico en solitario, ya que la determinación de BRAF^{T1799A}, al presentar una especificidad del 100%, no contribuye a aumentar los Falsos Positivos.

La sensibilidad diagnóstica del diagnóstico citopatológico se ve aumentada de esta forma con la inclusión de la determinación de BRAF^{T1799A} de 66,7% hasta un 83,3% (Tablas R1.6.4 y R1.6.5), respetando la especificidad de la citopatología, y aumentando en un 4% el valor predictivo positivo y en un 15,6% el valor predictivo negativo (Tablas R1.6.4 y R1.6.5).

La precisión diagnóstica que presenta la combinación de la citopatología tiroidea junto con la determinación de BRAF^{T1799A} en estos 60 pacientes fue del 76,7% (Tabla R1.6.4).

Tabla R1.6.5. Comparación de los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en las tres estrategias de diagnóstico de CPT.

TEST	VP	FP	FN	VN	S	E	VPP	VPN	PRECISIÓN
CITOPATOLOGÍA	24	8	12	16	66,7%	66,7%	75,0%	57,1%	63,3%
BRAF ^{T1799A}	19	0	17	24	52,8%	100%	100%	58,5%	71,7%
CITOPATOLOGÍA + BRAF ^{T1799A}	30	8	6	16	83,3%	66,7%	79,0%	72,7%	76,7%

2. DETECCIÓN PREOPERATORIA DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CITOLOGÍAS DE TIROIDES OBTENIDAS MEDIANTE PAAF

2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO: Edad y sexo

La edad media de los pacientes en estudio de nódulo tiroideo (cohorte 1), en el momento de realización de la PAAF, fue de $49,3 \pm 15,0$ años, con un mínimo de 16 y un máximo de 87 años. La Figura R2.1.1A muestra la distribución de la población por edades, encontrándose entre los 30-60 años el 65,5% de los pacientes estudiados. Este grupo se constituyó por 54 varones y 346 mujeres, con una relación hombre: mujer de 1:6,4. La estratificación de la edad de los pacientes según el sexo no dio lugar a una diferencia significativa ($p=0,540$) de edad entre los distintos grupos (Figura R2.1.1B).

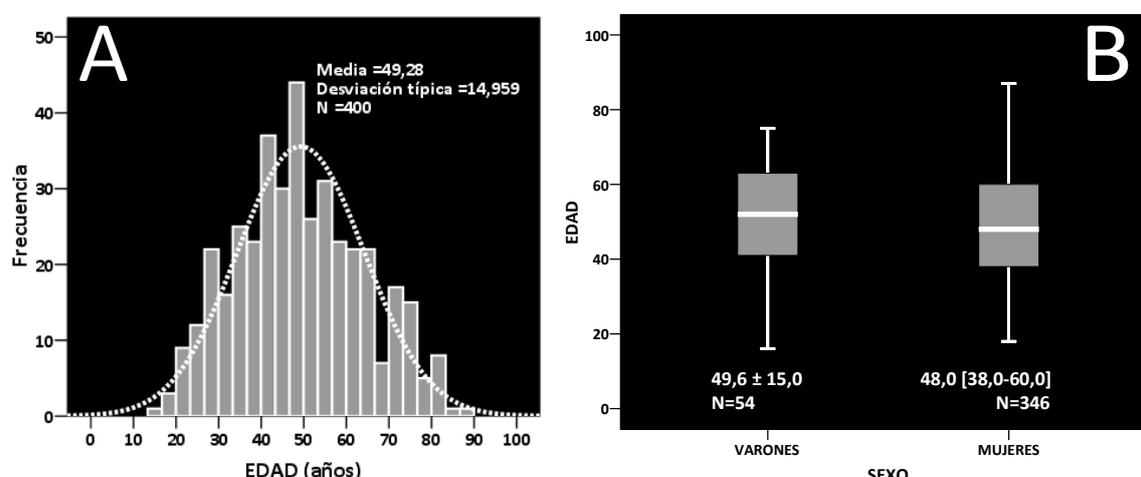


Figura R2.1.1. A. Histograma de frecuencias que muestra la distribución de la edad de los pacientes en estudio de nódulo tiroideo mediante PAAF. B. Distribución de la edad estratificada según el sexo de los pacientes en estudio de nódulo tiroideo mediante PAAF (mediana [percentil 25-percentil 75] o media ± DT).

2.2. DETECCIÓN PREOPERATORIA DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

El estado de la mutación BRAF^{T1799A} se determinó en las muestras citológicas correspondientes a 475 punciones de nódulos tiroideos, realizadas a 420 pacientes. De ellas, 54 correspondían a punciones repetidas de 48 pacientes durante el período de estudio.

De las 475 determinaciones, se obtuvo un resultado del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en 454 casos, correspondientes a 400 pacientes, que compusieron finalmente la cohorte 1.

Las 21 determinaciones restantes, correspondientes a 20 pacientes, no obtuvieron un resultado del estado de BRAF^{T1799A} debido a una insuficiente amplificación del ADN en la PCR, quedando estos pacientes fuera del estudio.

Diagnóstico citopatológico

El diagnóstico citopatológico resultó “no valorable” en 101 citologías (22,2%) (Figura R2.2.1). De estos pacientes, 30 repitieron la punción durante el período de estudio, consiguiendo que la prueba resultara diagnóstica en el 76,7% de los casos (22 pacientes obtuvieron diagnóstico de negativo malignidad y 1 de proliferación folicular). Los 7 pacientes restantes obtuvieron de nuevo una citología inadecuada para el diagnóstico.

En 315 citologías (69,4%), el diagnóstico citopatológico fue de “negativo malignidad” (Figura R2.2.1). En particular, 254 fueron diagnosticadas como “ausencia de células neoplásicas”, 60 como “bocio coloide”, y 1 como “tiroiditis granulomatosa” (ver desglose en Tabla R2.2.2).

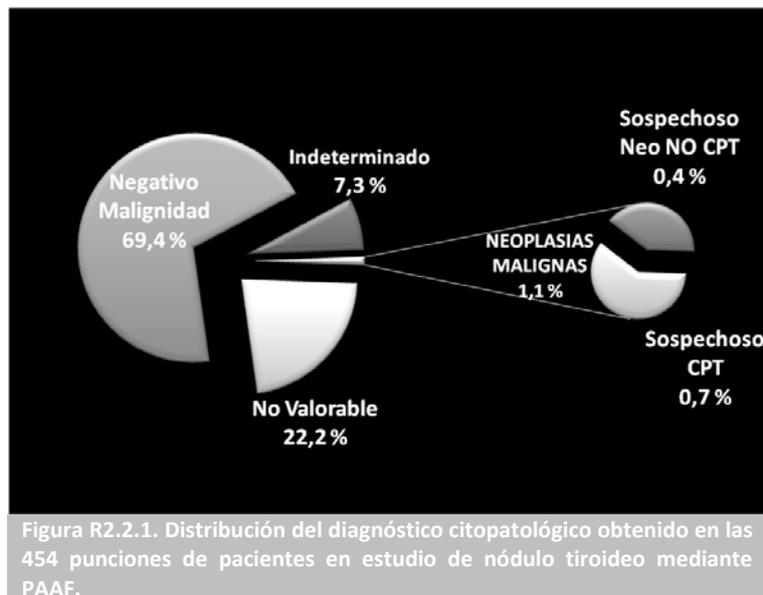
Teniendo en cuenta que algunos pacientes cuya citología resultó no diagnóstica repitieron la punción, dando lugar a un resultado informativo, el porcentaje definitivo de pacientes diagnosticados como “no valorable” fue del 17,0%, mientras que el de pacientes diagnosticados como “negativo malignidad” resultó ser de 73,8%.

En 33 pacientes (7,3%), el diagnóstico citopatológico resultó “**indeterminado**” (Figura R2.2.1); el informe reveló “proliferación folicular” en todos los casos, en uno con células de Hürthle, y en otro caso se indicó la presencia de atipias celulares (ver desglose en Tabla R2.2.2).

El diagnóstico citopatológico fue definitivamente determinante de **malignidad** en 5 pacientes (1,1%): en 3 de los casos (0,7%) el diagnóstico fue de **carcinoma papilar de tiroides**, y en los otros 2 (0,4%) fue de **neoplasia maligna diferente a carcinoma papilar** (Figura R2.2.1).

Los 33 casos diagnosticados como indeterminados (categoría que no discrimina neoplasia benigna de maligna), y los 5 detectados como neoplasia maligna fueron derivados al Servicio de Cirugía para la realización de tiroidectomía. Es decir, el diagnóstico citopatológico resultó en indicación quirúrgica en el 8,4% (38/454) de los casos.

En el resto de pacientes, la indicación fue conservadora, y en consecuencia se derivaron nuevamente al Servicio de Endocrinología, donde continuaron el seguimiento clínico de su patología tiroidea.



Estado de la mutación $BRAF^{T1799A}$ en citologías de tiroides

El estado de la mutación $BRAF^{T1799A}$ resultó positivo en 8 (1,8%) de las citologías procedentes de las 454 punciones de nódulos tiroideos realizadas (Tabla R2.2.2).

Los 3 casos de pacientes diagnosticados citológicamente con “**sospecha de carcinoma papilar**” de tiroides resultaron positivos para la presencia de la mutación $BRAF^{T1799A}$.

El estado de la mutación $BRAF^{T1799A}$ fue negativo en los 2 casos de pacientes cuya citología resultó patológicamente “**sospechosa de neoplasia maligna distinta de carcinoma papilar de tiroides**”.

De los 33 pacientes cuya citología obtuvo un diagnóstico “**indeterminado**” (proliferación folicular/atipias), con una incapacidad citopatológica para discernir entre malignidad y benignidad, 2 pacientes resultaron positivos para la mutación $BRAF^{T1799A}$ en su citología obtenida mediante PAAF.

De las 315 citologías con diagnóstico de “**negativo malignidad**”, 2 (0,4%) resultaron positivas para la mutación BRAF^{T1799A}.

De las 101 citologías diagnosticadas como “**no valorable**”, 1 (0,2%) fue positiva para la mutación BRAF^{T1799A}.

Estos 3 pacientes cuya PAAF había sido diagnosticada citológicamente como no determinante de malignidad (2 casos) o inadecuada para el diagnóstico (1 caso), pero que resultaron positivas para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}, fueron informados del resultado de esta prueba. Así, se recomendó a los pacientes la extirpación del nódulo tiroideo ante la evidencia de que la mutación BRAF^{T1799A} es específica y diagnóstica de malignidad, atendiendo a los resultados obtenidos en la primera fase del estudio y la bibliografía revisada (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xu *et al*, 2003; Fugazzola *et al*, 2004; Hayashida *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Xing, 2005^a; Zhu *et al*, 2005; Castro *et al*, 2006; Erickson *et al*, 2007). Por tanto, la determinación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} añadió un 0,6% de casos con indicación quirúrgica al diagnóstico citopatológico de la PAAF.

En resumen, de las 454 punciones analizadas, 38 citologías (8,4%) obtuvieron una indicación quirúrgica a partir del diagnóstico citopatológico. De las 416 punciones restantes, no detectadas citológicamente con sospecha de malignidad, 3 (3/416; 0,7%) fueron “rescatadas” exclusiva y específicamente como carcinomas papilares de tiroides por el resultado de la determinación de BRAF^{T1799A}. Por tanto, **la determinación de BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides reorientó el diagnóstico y la estrategia terapéutica del 0,7% de los casos que presentaban un carcinoma papilar de tiroides no detectado mediante técnicas citopatológicas** y habían sido remitidos a seguimiento clínico.

Asimismo, **la determinación de BRAF^{T1799A} confirmó el diagnóstico del carcinoma papilar de tiroides en el 100% (3/3) de los casos de sospecha citopatológica de CPT, y consiguió precisar el diagnóstico citopatológico en el 6,1% (2/33) de los casos cuyo diagnóstico citopatológico resultó indeterminado** (Tablas R2.2.2 y R2.2.3).

Tabla R2.2.2. Estado de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides según el diagnóstico citopatológico de la PAAF.

DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO		BRAF ^{T1799A}			TOTAL	
		-	+	%		
NO VALORABLE		100	1	0,2	101	101
NEGATIVO MALIGNIDAD	Ausencia Cél. neoplásicas	252	2	0,4	254	315
	Bocio coloide	60	0	0	60	
	Tiroiditis granulomatosa	1	0	0	1	
INDETERMINADO	Proliferación Folicular	29	2	0,4	31	33
	Prol. Folicular + Cél Hürthle	1	0	0	1	
	Atipias	1	0	0	1	
SOSPECHOSO CPT		0	3	0,7	3	3
SOSPECHOSO NEOPLASIA NO CPT		2	0	0	2	2
TOTAL		446	8	1,8	454	454

Tabla R2.2.3. Detección de carcinoma papilar de tiroides mediante la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides según la indicación quirúrgica de la PAAF.

CITOPATOLOGÍA			INDICACIÓN QUIRÚRGICA (IQ)		BRAF ^{T1799A} (+)			
	N	% del total		% del total	% de IQ.	N	% de CITOPATOLOGÍA	
No Valorable	101	22,2	NO	91,6	24,3	0,2	1	1,0
Negativo Malignidad	315	69,4			75,7	0,5	2	0,6
Indeterminado	33	7,3	SÍ	8,4	86,8	5,3	2	6,1
Sospecha de CPT	3	0,7			7,9	7,9	3	100,0
Sosp. Neo No CPT	2	0,4			5,3	0,0	0	0,0
Total	454	100%		100%		8		

Fiabilidad de la detección. Confirmación histopatológica

El estado de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido tiroideo procedente de la cirugía se determinó en todos los pacientes en estudio de nódulo tiroideo (cohorte 1) sometidos a tiroidectomía durante el período de estudio (01.01.2006 al 01.09.2008), tanto por indicación citopatológica (indeterminado, neoplasia maligna, presencia de la mutación BRAF^{T1799A}), como por indicación clínica (glándula tiroides con síntomas compresivos o infiltrativos, dolor, crecimiento rápido o independiente de terapia supresora del nódulo tiroideo).

En total, 20 pacientes de la cohorte 1 resultaron diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides (20/400; 5%); de ellos, 8 presentaron la mutación BRAF^{T1799A} (8/20; 40%) tanto en el tejido tumoral procedente de la tiroidectomía como en la citología previa.

De las 101 citologías tiroideas diagnosticadas como “no valorable”, 11 pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente, resultando con diagnóstico de patología benigna en 8 casos (7 bocio multinodular y 1 adenoma folicular) y de carcinoma en 3 casos (1 carcinoma anaplásico, 2 carcinomas papilares) (Tabla R2.2.4). Uno de los carcinomas papilares fue el diagnosticado por la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en la PAAF de tiroides y resultó también positivo en el tejido tumoral procedente de la pieza quirúrgica (Tabla R2.2.4).

Del grupo de 315 citologías de tiroides cuyo diagnóstico fue “negativo para malignidad”, 60 pacientes fueron intervenidos de cirugía de tiroides, 49 de los cuales presentaron una histopatología benigna (42 bocio multinodular, 6 adenoma folicular y 1 quiste tirogloso) (Tabla R2.2.4). Un paciente fue diagnosticado con carcinoma medular de tiroides y otro con carcinoma folicular (Tabla R2.2.4). Los 9 pacientes restantes presentaron carcinomas papilares tras la cirugía; 2 de ellos fueron los diagnosticados por la detección de la mutación BRAF^{T1799A} en la PAAF de tiroides, y resultaron positivos para la mutación también en el tejido tumoral procedente de la pieza quirúrgica (Tabla R2.2.4).

De los 33 pacientes con diagnóstico citopatológico “indeterminado”, 32 fueron sometidos a tiroidectomía, resultando un diagnóstico de bocio multinodular en 22 de los casos (Tabla R2.2.4). Los 10 pacientes restantes obtuvieron un diagnóstico de neoplasia maligna (detallado en la Tabla R2.2.4), que en 6 casos resultó ser carcinoma papilar de tiroides; 2 de estos casos de carcinoma papilar habían sido confirmados en la citología previa por la determinación de BRAF^{T1799A} y también resultaron positivos en el tejido tumoral procedente de la pieza quirúrgica (Tabla R2.2.4).

En los pacientes que presentaron una neoplasia maligna, la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} se realizó en el foco tumoral y en tejido normal adyacente; mientras que en los pacientes con patología benigna, la determinación se llevó a cabo en una zona representativa de la lesión y en tejido normal adyacente.

En todos los casos, el resultado del estado de la mutación BRAF^{T1799A} fue negativo en el tejido normal adyacente a las lesiones patológicas presentadas por los pacientes.

Tabla R2.2.4. Correlación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} entre PAAF y tejido tiroideo procedente de la cirugía en los pacientes sometidos a tiroidectomía de la cohorte 1.

	BRAFF ^{T1799A}		DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	BRAFF ^{T1799A}			
	N			N	+		
DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO	NO VALORABLE			11			
	-	100	Bocio Multinodular	7	0/7		
			Adenoma Folicular	1	0/1		
			Carcinoma Anaplásico	1	0/1		
			Carcinoma Papilar Variante Folicular	1	0/1		
		+	1	Carcinoma Papilar Clásico	1	1/1	
	NEGATIVO MALIGNIDAD			60			
	-	313	Bocio Multinodular	42	0/42		
			Adenoma Folicular	6	0/6		
			Quiste Tirogloso	1	0/1		
			Carcinoma Folicular	1	0/1		
			Carcinoma Medular	1	0/1		
			Carcinoma Papilar Clásico	6	0/6		
			Carcinoma Papilar Variante Folicular	1	0/1		
		+	2	Carcinoma Papilar Clásico	2	2/2	
	INDETERMINADO			32			
	-	31	Bocio Multinodular	22	0/22		
			Carcinoma Folicular	1	0/1		
			Carcinoma Medular	1	0/1		
			Neoplasia Broncopulmonar	1	0/1		
			Carcinoma Anaplásico	1	0/1		
Carcinoma Papilar Clásico			2	0/2			
Carcinoma Papilar Variante Folicular			1	0/1			
Microcarcinoma Papilar			1	0/1			
			+	2	Carcinoma Papilar Clásico	1	1/1
					Carcinoma Papilar Variante Folicular	1	1/1
SOSPECHOSO CPT			3				
	-	0		---	---		
	+	3	Carcinoma Papilar Clásico	3	3/3		
SOSPECHOSO NEOPLASIA NO CPT			2				
	-	2	Carcinoma Medular	1	0/1		
			Carcinoma Anaplásico	1	0/1		
	+	0		---	---		

En todos los pacientes, el resultado del estado de la mutación BRAF^{T1799A} hallado en la pieza quirúrgica coincidió con el obtenido previamente en la citología de tiroides, como se especifica detalladamente, desglosado a partir del diagnóstico citopatológico, en la Tabla R2.2.4.

Tal como se había demostrado en la primera fase del estudio, **existe una correlación del 100% entre el resultado del estado de BRAF^{T1799A} en la citología de tiroides previa a la tiroidectomía y en la pieza histológica procedente de la cirugía.**

Todos los casos analizados que resultaron positivos para la mutación BRAF^{T1799A} fueron sometidos a secuenciación bidireccional del producto de PCR, y en todos los pacientes, la mutación hallada fue la transversión de la timina en la posición 1799 por una adenina. Existe una correlación del 100% entre el resultado del estado de BRAF^{T1799A} obtenido mediante RFLP y mediante secuenciación.

Casos de carcinoma papilar de tiroides en la cohorte 1

Para el cálculo del porcentaje de los casos de CPT hallado en la cohorte 1, se excluyó a los 2 pacientes diagnosticados citológicamente como “neoplasia maligna diferente a carcinoma papilar de tiroides” (1 carcinoma medular y 1 carcinoma anaplásico) del total de 454 punciones analizadas (Tabla R2.2.4).

De las restantes 452 punciones susceptibles de presentar CPT, 106 pacientes en estudio de nódulo tiroideo (cohorte 1) fueron sometidos a cirugía de tiroides (106/452; 23,5%) (Tabla R2.2.5). De estos 106 pacientes intervenidos quirúrgicamente, 20 obtuvieron un diagnóstico de CPT en alguna de sus variantes histológicas (20/106; 18,9%) (Tabla R2.2.6). De los 20 pacientes con CPT, 8 resultaron positivos para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}, tanto en tejido tiroideo tumoral como en la citología previa (8/20; 40%) (Tabla R2.2.7). Es decir, la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología preoperatoria de tiroides detectó el 40% de los carcinomas papilares que aparecen en pacientes sometidos a estudio de nódulo tiroideo mediante citología de tiroides (Tabla R2.2.7), y que corresponden al 100% de los pacientes con CPT positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en esta cohorte (Tabla R2.2.4).

Tabla R2.2.5. Pacientes sometidos a cirugía de tiroides pertenecientes a la cohorte 1.

CITOPATOLOGÍA		CIRUGÍA		
DIAGNÓSTICO	Nº de casos	Nº de casos	% por categoría citológica	% del total de operados
No Valorable	101	11	10,9	10,4
Negativo Malignidad	315	60	19,0	56,6
Proliferación Folicular	33	32	97,0	30,2
Sospecha de CPT	3	3	100,0	2,8
Total	452	106	23,5	100,0

Todos los pacientes diagnosticados citológicamente con “sospecha de CPT” se sometieron a cirugía, lo que corresponde al 2,8% (3/106) de pacientes intervenidos quirúrgicamente de la cohorte (Tabla R2.2.5); se confirmó histológicamente el diagnóstico de CPT en los 3 casos (3/3) (Tabla R2.2.6). Todos resultaron positivos para la mutación BRAF^{T1799A} (Tablas R2.2.4 y R2.2.7). Estos 3 pacientes suponen el 15,0% de los pacientes diagnosticados de CPT dentro del grupo en estudio de nódulo tiroideo (Tabla R2.2.6).

Tabla R2.2.6. Casos de carcinoma papilar de tiroides en los pacientes sometidos a cirugía de la cohorte 1.

CITOPATOLOGÍA		HISTOPATOLOGÍA			
DIAGNÓSTICO	Nº de casos	Nº pacientes operados	Nº de casos de CPT	% de CPT por categoría citológica	% de CPT del total de operados
No Valorable	101	11	2	18,2	10,0
Negativo Malignidad	315	60	9	15,0	45,0
Proliferación Folicular	33	32	6	18,8	30,0
Sospecha de CPT	3	3	3	100,0	15,0
Total	452	106	20		100,0

De los 33 pacientes cuyo diagnóstico citopatológico fue “indeterminado” (incapaz de distinguir entre neoplasia tiroidea maligna o benigna), 32 se habían sometido a tiroidectomía a fecha 1 de septiembre de 2008 (32/33; 97,0%), lo que corresponde al 30,2% de los pacientes sujetos a cirugía en la cohorte (Tabla R2.2.5). Se halló un diagnóstico histopatológico de CPT en 6 casos, lo que corresponde al 18,8% (6/32) de los pacientes con citología indeterminada, y al 30,0% (6/20) de los pacientes con diagnóstico de CPT en esta cohorte (Tabla R2.2.6). De estos 6 casos, la mutación BRAF^{T1799A} se encontró presente en 2 de ellos (2/6; 33,3%. Tabla R2.2.7), coincidiendo con los pacientes detectados por la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa (Tabla R2.2.4). Estos 2 pacientes corresponden al 10,0% de los pacientes diagnosticados de CPT dentro de la cohorte en estudio de nódulo tiroideo (Tabla R2.2.7).

Tabla R2.2.7. Estado de la mutación BRAF^{T1799A} en los pacientes diagnosticados de CPT pertenecientes a la cohorte 1.

CITOPATOLOGÍA		CIRUGÍA		BRAFF ^{T1799A} +		
DIAGNÓSTICO	Nº de casos	Nº pacientes operados	Nº casos de CPT	Nº de casos	% por categoría citológica	% del total de operados
No Valorable	101	11	2	1	50,0	5,0
Negativo Malignidad	315	60	9	2	22,2	10,0
Proliferación Folicular	33	32	6	2	33,3	10,0
Sospecha de CPT	3	3	3	3	100,0	15,0
Total	452	106	20	8		40,0

Por su parte, 60 y 11 pacientes de las categorías diagnósticas sin indicación quirúrgica, “**negativo malignidad**” y “**no valorable**”, respectivamente, fueron sometidos a cirugía, que en conjunto corresponde al 67% de los pacientes intervenidos quirúrgicamente en la cohorte (60/106; 56,6%, y 11/106; 10,4%) (Tabla R2.2.5). La proporción de casos sometidos a tiroidectomía en la categoría “no valorable” fue de un 10,9% (11/101), y en la categoría “negativo malignidad” fue del 19,0% (60/315) (Tabla R2.2.5).

De los 60 pacientes cuyo análisis citológico no reveló evidencia de malignidad (“**negativo malignidad**”), y que fueron sometidos a cirugía de tiroides por motivos clínicos, se encontraron 9 casos de CPT (9/60); es decir, la proporción de malignidad en citologías negativas es del 15,0% (Tabla R2.2.6). De estos 9 pacientes, sólo los 2 que resultaron positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en la citología previa, presentaron la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tumoral (2/9; 22,2%). Estos 2 pacientes corresponden al 10,0% (2/20) de los pacientes diagnosticados de CPT dentro de la cohorte en estudio de nódulo tiroideo (Tabla R2.2.7).

De los 11 pacientes sometidos a cirugía de tiroides sin un diagnóstico en la citología (“**no valorable**”), 2 presentaron un diagnóstico histopatológico de CPT (2/11); es decir, la proporción de malignidad en la categoría “inadecuada para el diagnóstico” es del 18,2% (Tabla R2.2.6). De estos 2 pacientes, la mutación BRAF^{T1799A} se encontró sólo en el tejido tumoral tiroideo correspondiente al paciente detectado previamente en la citología (1/2; 50%) (Tabla R2.2.7). Este caso único supone el 5,0% (1/20) del diagnóstico de CPT dentro de la cohorte en estudio de nódulo tiroideo (Tabla R2.2.7).

En resumen, el porcentaje de casos diagnosticados de CPT dentro de cada categoría citológica osciló entre el 15,0% (“negativo malignidad”) y el 18,8% (“indeterminado”), a excepción de los pacientes diagnosticados con “sospecha de CPT” en la citología, que fue del 100%, ya que no hubo falsos positivos en esta categoría (Tabla R2.2.6).

La mutación BRAF^{T1799A} fue detectada en las citologías previas de 8 de los 20 casos de CPT en esta serie (40,0%; Tabla R2.2.7), correspondientes a todos los pacientes con la mutación BRAF^{T1799A} presente en tejido tiroideo tumoral de la cohorte en estudio de nódulo tiroideo mediante PAAF (Tabla R2.2.4). En consecuencia, **la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} fue capaz de confirmar preoperatoriamente el 40,0% de los casos de CPT, lo que representa el total de los casos de carcinoma papilar de tiroides con posibilidad de ser detectados mediante la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en la cohorte. Además, rescata el 27,3% (3/11) de los casos de falsos negativos que se presentan con el diagnóstico citopatológico (Tabla R2.2.7).**

2.3. PRECISIÓN DIAGNÓSTICA DE LA DETECCIÓN DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES EN MUESTRAS CITOLÓGICAS OBTENIDAS POR PAAF.

El seguimiento realizado a la cohorte 1 hasta el 1 de septiembre de 2008 permitió calcular la precisión diagnóstica de la detección de carcinoma papilar de tiroides en citologías de tiroides. De los 454 nódulos puncionados, 108 pacientes fueron intervenidos de cirugía de tiroides, con resultado de 20 CPT, como se detalla en la Tabla R2.2.4. Con objeto de no sobrevalorar los posibles verdaderos negativos ni infravalorar los falsos negativos de cualquiera de los procedimientos para detectar CPT, estos valores se han calculado considerando sólo los pacientes intervenidos quirúrgicamente, y de los que, por tanto, se dispone de confirmación histopatológica de su patología tiroidea.

Precisión diagnóstica de la determinación del estado de BRAF^{T1799A} para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Como se muestra en la Tabla R2.2.4, la determinación del estado de BRAF^{T1799A} en las citologías de tiroides detectó 8 de los 20 carcinomas papilares de tiroides, y no resultó positiva en ningún paciente que no fuera diagnosticado con CPT (no dio lugar a falsos positivos) (Tabla R2.3.1).

		HISTOPATOLOGÍA		TOTAL	S 40,0%	E 100%
		+	-			
BRAF ^{T1799A}	+	8	0	8	VPP 100%	VPN 88,0%
	-	12	88	100		
TOTAL		20	88	108	PRECISIÓN 88,9%	

Tabla R2.3.1. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la determinación de BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides.

En los restantes 12 pacientes diagnosticados histopatológicamente con carcinoma papilar de tiroides, la determinación del estado de BRAF^{T1799A} resultó negativa (falsos negativos de la prueba), debido a que la mutación BRAF^{T1799A} no estaba presente en estos casos de CPT (Tabla R2.3.1).

La sensibilidad diagnóstica que la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} presenta para detectar carcinoma papilar de tiroides de forma preoperatoria, en este grupo de 108 pacientes, es del 40,0%. Los valores de Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) se encuentran en la Tabla R2.3.1. Como se aprecia, la E y VPP de la determinación de BRAF^{T1799A} para detectar carcinoma papilar de tiroides son del 100% (Tabla R2.3.1).

La precisión diagnóstica que presenta la determinación de BRAF^{T1799A} es del 88,9% (Tabla R2.3.1).

Precisión diagnóstica de la citopatología para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

El diagnóstico citopatológico detectó 3 casos positivos para carcinoma papilar de tiroides, que fueron confirmados histopatológicamente tras la cirugía; también determinó que otros 33 pacientes debían someterse a cirugía de tiroides ante la imposibilidad de descartar malignidad en su citología de tiroides (diagnóstico citológico indeterminado), de los cuales 32 se habían sometido a cirugía de tiroides a fecha de 1 de septiembre de 2008. Como puede observarse en la Tabla R2.2.4, la histopatología determinó que, de esos 32 pacientes, sólo 6 presentaban realmente un CPT y por tanto, los verdaderos positivos de la citopatología fueron 9 pacientes, y los 26 pacientes restantes constituyen los falsos positivos de esta técnica (Tabla R2.3.2).

		HISTOPATOLOGÍA		TOTAL	S 45,0%	E 70,5%
		+	-			
CITO PATOLOGÍA	+	9	26	35	VPP 25,7%	VPN 84,9%
	-	11	62	73		
TOTAL		20	88	108	PRECISIÓN 65,7%	

Tabla R2.3.2. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del diagnóstico citopatológico en PAAF de tiroides.

La histopatología tras la tiroidectomía reveló otros 11 casos de CPT no detectados por el análisis citológico de la PAAF (2 diagnosticados citológicamente como “no valorable”, y 9 como “negativo malignidad”; Tabla R2.2.4), que constituyeron los falsos negativos del diagnóstico citopatológico (Tabla R2.3.1).

La sensibilidad diagnóstica que la citopatología presenta, por tanto, en este grupo de pacientes, para detectar carcinoma papilar de tiroides, es del 45,0% (Tabla R2.3.2). Los valores de E, VPP y VPN se encuentran en la Tabla R2.3.2.

La precisión diagnóstica que presenta el análisis anatomopatológico de la citología de tiroides es del 65,7% (Tabla R2.3.2).

Precisión diagnóstica de la citopatología complementado con la determinación del estado de BRAF^{T1799A} para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas.

Combinando ambas estrategias diagnósticas, el número de casos diagnosticados como CPT (verdaderos positivos) de la citopatología se ve aumentado de 9 a 12, ya que la determinación del estado de BRAF^{T1799A} detectó 3 casos en citologías diagnosticadas como negativas para malignidad o no diagnósticas (Tabla R2.2.4). Es decir, **la determinación de BRAF^{T1799A} rescató el 27,3% (3/11) de los falsos negativos de la citopatología** (Tabla R2.3.3).

La sensibilidad diagnóstica del diagnóstico citopatológico se ve aumentada de esta forma de un 45,0% (aplicando solamente el análisis citológico) a un 60,0% con la inclusión de la determinación de BRAF^{T1799A}, respetando la E de la citopatología (70,5%), y aumentando el VPP al 31,6%, y el VPN al 88,6% (Tablas R2.3.3 y R2.3.4).

En este grupo de pacientes la precisión diagnóstica que presenta la combinación de la citopatología tiroidea y determinación de BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides de forma preoperatoria, resultó ser del 68,5% (Tabla R2.3.3).

		HISTOPATOLOGÍA			TOTAL	S 60,0%	E 70,5%
		+	-				
CITO PATOLOGÍA + BRAF ^{T1799A}	+	12	26	38	VPP 31,6%	VPN 88,6%	
	-	8	62	70			
TOTAL		20	88	108	PRECISIÓN 68,5%		

Tabla R2.3.3. Sensibilidad (S), Especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del diagnóstico citopatológico complementado con la determinación del estado de BRAF^{T1799A} en PAAF de tiroides.

Tabla R2.3.4. Comparación de los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en las tres estrategias de diagnóstico de CPT.

TEST	VP	FP	FN	VN	S	E	VPP	VPN	PRECISIÓN
CITOPATOLOGÍA	9	26	11	62	45,0%	70,5%	25,7%	84,9%	65,7%
BRAF ^{T1799A}	8	0	12	88	40,0%	100%	100%	88,0%	88,9%
CITOPATOLOGÍA + BRAF ^{T1799A}	12	26	8	62	60,0%	70,5%	31,6%	88,6%	68,5%

3. ASOCIACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON UN FENOTIPO MÁS AGRESIVO DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES.

La cohorte 2 se constituyó con pacientes diagnosticados de carcinoma papilar en el HUVN entre el período comprendido entre el 1 de enero de 2006 y el 31 de diciembre de 2007, más los pacientes intervenidos de cirugía de tiroides con diagnóstico histopatológico de CPT procedentes del seguimiento por patología nodular tiroidea hasta el 1 de septiembre de 2008 (cohorte 1). En total fueron incluidos 106 pacientes.

3.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

3.1.1. Edad y sexo

La edad media en el momento del diagnóstico de los pacientes con CPT fue de $46,2 \pm 15,6$ años, con un mínimo de 9 y un máximo de 75 años. La Figura R3.1.1A muestra la distribución de la población por edades, encontrándose entre los 30-60 años el 63,2% de los pacientes estudiados. En este grupo se encontraban 15 varones y 91 mujeres, con una relación hombre: mujer de 1:6,1. La estratificación de la edad de los pacientes según el sexo no dio lugar a una diferencia de edad entre los distintos grupos (Figura R3.1.1B) ($p=0,399$).

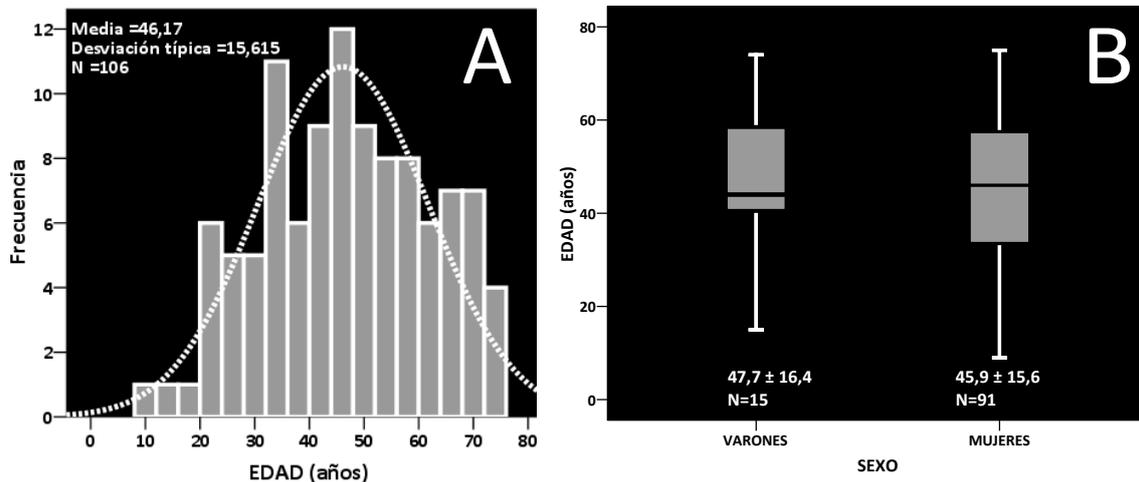


Figura R3.1.1.A. Distribución de la edad al diagnóstico de los pacientes de CPT pertenecientes a la cohorte 2. B. Distribución de la edad estratificada según el sexo de los pacientes de CPT pertenecientes a la cohorte 2.

3.1.2. Tipo histológico

El subtipo histológico más frecuente encontrado en los pacientes de carcinoma papilar de tiroides fue el histotipo clásico, presente en 50 de los 106 pacientes incluidos en este grupo (47,2%). El segundo subtipo en frecuencia fue el microcarcinoma papilar, presente en 33 pacientes (31,1%). El tercer subtipo fue la variante folicular del CPT, patrón hallado en 16 de los pacientes (15,1%). Estos tres subtipos histológicos comprendían el 93,4% de los pacientes estudiados en este grupo. Los subtipos histológicos de los pacientes restantes fueron la variante de células altas en 2 casos (1,9%), la variante esclerosante difusa en otros 2 casos (1,9%), y del resto de variantes sólo hubo 1 caso de cada uno de ellos (variante de células claras, variante sólido trabecular y variante folicular difusa), con una aportación individual al porcentaje global del 0,9%. (Figura R3.1.2)

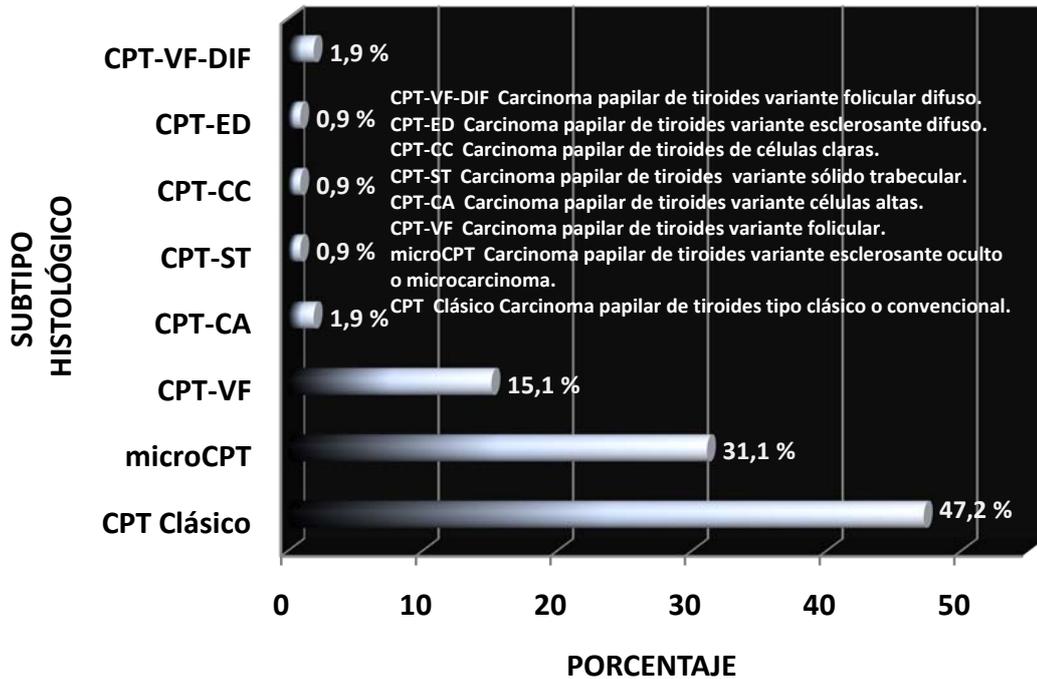


Figura R3.1.2. Frecuencia de los subtipos histológicos de carcinoma papilar de tiroides.

3.1.3. Estadificación

Para la estadificación se utilizó la nomenclatura de la AJCC (*American Join Committee on Cancer*) (Greene *et al*, 2002), como se describió en el Apartado *Metodología (epígrafe 3.4.2. Variables independientes)*, y que se encuentra detallado en el Anexo III.

De los 106 pacientes de CPT estudiados, 70 presentaron un Estadio I (66%), en el momento del diagnóstico primario, y 20 fueron clasificados como Estadio II (19%) (Figura R3.1.3). Según este sistema de estadificación, la supervivencia a 5 años de estos dos grupos es del 100% (Greene *et al*, 2002), con una frecuencia de recidiva de 59% y 7%, respectivamente (Loh *et al*, 1997). Del resto de pacientes, 14 (13%) fueron clasificados como Estadio III (supervivencia a 5 años del 95,8%), y 2 pacientes (2%) como Estadio IV (supervivencia a 5 años del 45,3%) (Greene *et al*, 2002); la recidiva de estos grupos es de 26 y 8%, respectivamente (Loh *et al*, 1997).



Figura R3.1.3. Estadificación AJCC de los pacientes de CPT

3.1.4. Grupos de riesgo

La clasificación de los pacientes en diferentes grupos de riesgo se realizó según 4 sistemas diferentes, descritos en el Apartado *Metodología (epígrafe 3.4.2. Variables independientes)*, y cuyos criterios se encuentran detallados en el Anexo II:

Índice pronóstico AMES (bajo/alto riesgo) (Cady & Rossi, 1988).

De los 106 pacientes de CPT estudiados, 88 (83%) se clasificaron como de bajo riesgo según el índice AMES (Figura R3.1.4), lo que corresponde a una supervivencia a 20 años del 99%. Los 18 pacientes restantes (17%) fueron clasificados como de alto riesgo, con una supervivencia a 20 años según el índice AMES del 61% (Cady & Rossi, 1988).

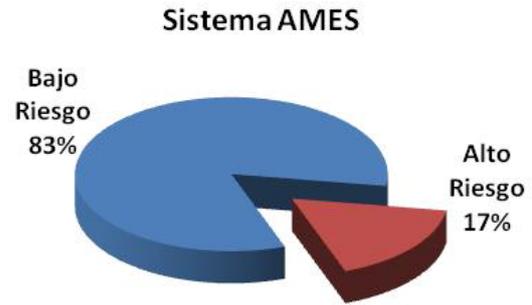
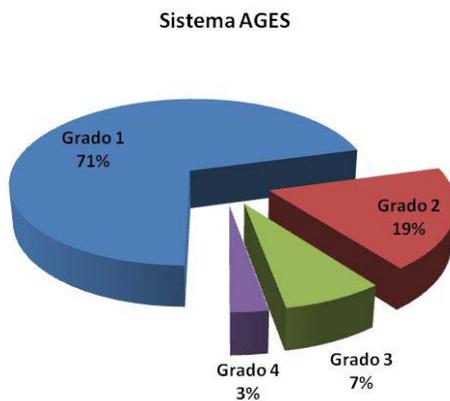


Figura R3.1.4. Grupos de riesgo de los pacientes de CPT según el sistema AMES.

Índice pronóstico AGES (Grado 1/2/3/4) (Hay et al, 1987).



De los 106 pacientes de CPT estudiados, 75 (71%) se clasificaron como de Grado 1 según el índice AGES, lo que corresponde a una supervivencia a 20 años del 99% (Figura R3.1.5). De los pacientes restantes, 20 (19%) fueron clasificados como de Grado 2, con una supervivencia a 20 años según el índice AGES del 80%; 8 pacientes (7%) fueron clasificados como Grado 3 (supervivencia a 20 años del 67%), y 3 (3%) como Grado 4 (supervivencia a 20 años del 13%) (Hay et al, 1987).

Figura R3.1. 5. Grupos de riesgo de los pacientes de CPT según el sistema AGES.

Índice pronóstico MACIS (mínimo/bajo/alto/máximo riesgo) (Hay et al, 1993).

De los 106 pacientes de CPT estudiados, 61 (58%) se clasificaron como de Riesgo Mínimo según el índice MACIS, lo que corresponde a una supervivencia a 20 años del 99% (Figura R3.1.6). De los pacientes restantes, 23 (22%) fueron clasificados como de Riesgo Bajo, con una supervivencia a 20 años del 89%; 10 pacientes (10%) fueron clasificados como Riesgo Alto (supervivencia a 20 años del 56%) y 10 (10%) como Riesgo Máximo (supervivencia a 20 años del 24%) (Hay et al, 1993).

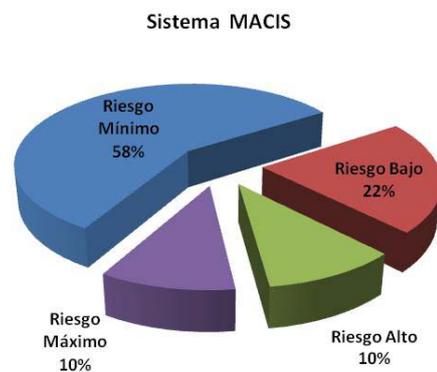


Figura R3.1.6. Grupos de riesgo de los pacientes de CPT según el sistema MACIS.

Índice del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Data (bajo/medio/alto riesgo) (Shaha *et al*, 1994).

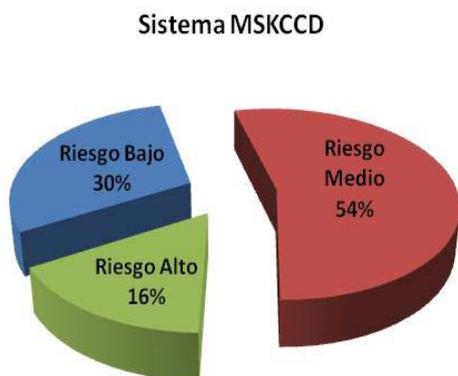


Figura R3.1.7. Grupos de riesgo de los pacientes de CPT según el sistema del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Data.

De los 106 pacientes de CPT estudiados, 53 pacientes (50%) se clasificaron como de Riesgo Medio según este sistema (Figura R3.1.7), lo que corresponde a una supervivencia del 96% a 5 años y del 85% a 20 años (Shaha *et al*, 1994). De los pacientes restantes, 29 (27%) se clasificaron como de Bajo Riesgo según este sistema, lo que corresponde a una supervivencia del 100% a 5 años y del 99% a 20 años (Shaha *et al*, 1994); 16 pacientes (15%) fueron clasificados de Alto Riesgo (Figura R3.1.7), con una supervivencia del 72% a 5 años y del 57% a 20 años (Shaha *et al*, 1994).

Índice EORTC (*European Organization for Research on Treatment of Cancer*) (Grupos 1/2/3/4/5) (Byar *et al*, 1979).

El grupo de riesgo más frecuente correspondió al Grupo 1 (46 pacientes; 43%), con una supervivencia a 5 años del 95% (Byar *et al*, 1979), seguido del Grupo 2 (34 pacientes; 32%), al que le corresponde una supervivencia a 5 años del 80% (Byar *et al*, 1979). 17 pacientes (16%) fueron clasificados como Grupo 3, y 8 pacientes (8%) en el Grupo 4 (Figura R3.1.8), con unas supervivencias asociadas de 55 y 33%, respectivamente (Byar *et al*, 1979). Sólo 1 paciente fue clasificado en el Grupo 5 (1%), con una supervivencia asociada según este sistema del 5% (Byar *et al*, 1979).

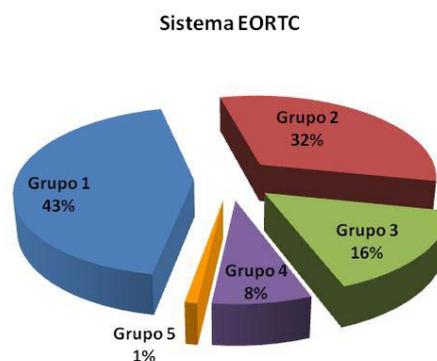


Figura R3.1.8. Grupos de riesgo de los pacientes de CPT según el sistema de la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC).

3.1.5. Tiempo de seguimiento

El tiempo de seguimiento de los pacientes con CPT (pertenecientes a la cohorte 2) varió en función de la fecha en que fueron diagnosticados. A partir de ese momento, se incluyeron en la cohorte y se llevó a cabo el seguimiento, hasta el 1 de septiembre de 2008, para recoger las variables relativas a recidiva de la enfermedad, dosis de ^{131}I , etc, tal como se ha descrito en el Apartado *Metodología* (epígrafe 3.3.1. *Seguimiento de los pacientes*).

En la población de 106 pacientes, sólo se perdieron del seguimiento 2 pacientes. De uno de ellos no se disponía de información a partir de la fecha de cirugía, y por tanto, no fue considerado para el análisis de las variables obtenidas durante el seguimiento (recidiva, dosis de ^{131}I , etc.). Del otro paciente no se disponía de información a partir de los 53 meses del seguimiento. Durante el período del que se dispone de información de este caso, recibió una sola dosis de yodo, pero tuvo que ser reintervenido quirúrgicamente una vez por la aparición

de 5 metástasis. Por tanto, se ha considerado positivo para estos parámetros (recidiva y segunda cirugía).

La mediana del tiempo de seguimiento en los 106 pacientes fue de 58,8 [25,3-90,3] meses, con un mínimo de 0 (correspondiente al paciente perdido tras la cirugía) y un máximo de 130 meses. Excluyendo al paciente perdido tras la cirugía, la mediana resulta de 55,8 [26,0-90,4] meses.

En la Figura R3.1.9 se muestra la distribución del tiempo de seguimiento, donde se observa que la mayor parte de los pacientes presentan más de 1 año de seguimiento, encontrándose a partir de los 15 meses de seguimiento el 91,5% (97 pacientes) de los casos estudiados. Para el análisis de las variables relativas al seguimiento, se seleccionaron estos 97 pacientes, con el objeto de asegurar que todos los pacientes incluidos en este subgrupo se hubieran realizado el primer rastreo tiroideo anual tras el rastreo ablativo de los 3 meses posteriores a la cirugía, tal como se indica en el protocolo de seguimiento tras la cirugía de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides, especificado en el Apartado *Metodología (epígrafe 3.3.1. Seguimiento de los pacientes)*.

Las características epidemiológicas de estos pacientes, como la edad, que fue de $45,7 \pm 15,7$ años, distribución de sexos (13 varones y 84 mujeres; relación 1:6,5) eran similares a los del grupo completo de 106 pacientes, y no diferían entre sí de forma estadísticamente significativa. La distribución en cuanto a subtipos histológicos, estado de la mutación BRAF^{T1799A}, estadificación y grupos de riesgo era similar en los 97 pacientes seleccionados con respecto a los 8 no seleccionados, y prácticamente idéntica entre el grupo original de 106 pacientes del estudio y el subgrupo de 97 para seguimiento. La mediana del tiempo de seguimiento en los 97 pacientes fue de 64,1 [28,9-91,1] meses (Figura R3.1.9B).

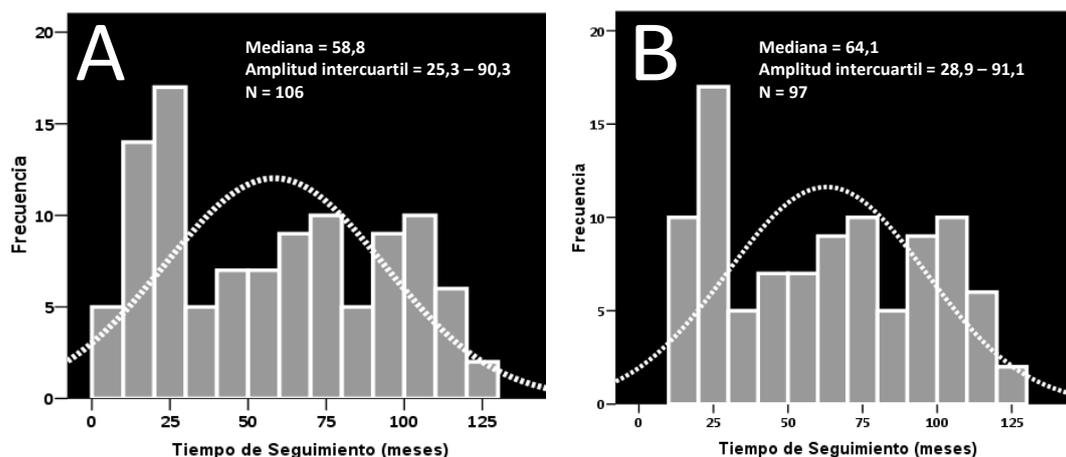


Figura R3.1.9.A. Tiempo de seguimiento de los pacientes de CPT de la cohorte 2.

B. Tiempo de seguimiento de los pacientes de CPT de la cohorte 2 seleccionados para análisis de seguimiento (mediana [percentil 25-percentil 75]).

3.1.6. Estado al final del seguimiento

Como se ha especificado en el Apartado *Metodología (epígrafe 3.4.2. Variables independientes)*, el estado al final del seguimiento contempla 3 categorías (Libre de enfermedad/Enfermo/Fallecido por enfermedad).

En el subgrupo de 97 pacientes sujetos a seguimiento para análisis de recidiva, no se produjo ningún fallecimiento por CPT (ni en el grupo completo de 106 pacientes). El 67% de los pacientes (65 casos) se encontraban libres de enfermedad a fecha 1 de septiembre de 2008, y el 33% (32 pacientes) se encontraban enfermos, de los cuales 21 se consideraron enfermos al final del estudio por no haber cumplido con los 27 meses de seguimiento necesarios para disponer de dos rastreos corporales negativos.

3.2. PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

De los 106 pacientes con CPT estudiados en la cohorte 2, 50 resultaron positivos para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido tumoral procedente de la tiroidectomía, correspondiendo por tanto a una prevalencia de 47,2% (IC_{95%}: 37,5-56,8%).

En estos 106 pacientes, también se analizó la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido sano adyacente al tumor, y el resultado fue negativo en todos los casos.

La distribución de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en los distintos subtipos de CPT se encuentra en la Tabla R3.2.1. Las variantes histológicas de células altas y células claras resultaron ser las de mayor prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A}, con un 100% de casos positivos. Las variantes folicular (56,3%) y clásica (54,0%) resultaron positivas en aproximadamente en más de la mitad de los pacientes. Los casos positivos de la variante clásica (la más frecuente, 50 casos) contribuyeron en un 25,5% al resultado global. En el caso del subtipo microcarcinoma papilar de tiroides, la positividad apareció en el 33,3% de estos pacientes (la segunda variante en frecuencia histológica, con 33 casos), con una contribución a la prevalencia global del 10,4%. Las variantes difusas (esclerosante difusa y folicular difusa), así como la variante sólido-trabecular, resultaron negativas para la mutación BRAF^{T1799A} en todos los casos analizados.

SUBTIPO HISTOLÓGICO	N	BRAE ^{T1799A}			
		-	+	% del total	% por histología
CPT Clásico	50	23	27	25,5	54,0
microCPT	33	22	11	10,4	33,3
CPT-VF	16	7	9	8,5	56,3
CPT-CA	2	0	2	1,9	100,0
CPT-CC	1	0	1	0,9	100,0
CPT-ST	1	1	0	0,0	0,0
CPT-ED	1	1	0	0,0	0,0
CPT-VF-DIF	2	2	0	0,0	0,0
TOTAL	106	56	50	47,2	

Todos los pacientes analizados que resultaron positivos para la mutación BRAF^{T1799A} fueron sometidos a secuenciación bidireccional del producto de PCR, y en todos los casos, la mutación hallada fue la transversión de la timina en la posición 1799 por adenina. Existe una correlación del 100% entre el resultado del estado de BRAF^{T1799A} obtenido mediante RFLP y secuenciación.

En este grupo, también fueron sometidos a secuenciación bidireccional las muestras tumorales de todos los pacientes con diagnóstico histopatológico de CPT variante folicular que resultaron negativas para la mutación BRAF^{T1799A}, ya que esta variante se ha asociado a la aparición de otros tipos de mutación en *braf* cercanas a esta posición, como BRAF^{K601E} (Trovisco *et al*, 2004, 2005), pero en todos los casos resultaron totalmente coincidentes con la secuencia salvaje del gen *braf* en el amplicón analizado.

3.3. ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON LAS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS DE ALTO RIESGO DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

De acuerdo con el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido tumoral de los 106 pacientes diagnosticados con CPT (cohorte 2), se diferenciaron dos grupos de casos:

Grupo BRAF^{T1799A} positivo (+): pacientes en los que se detectó, mediante RFLP y secuenciación, la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el foco tumoral de su CPT (50/106; 47,2%).

Grupo BRAF^{T1799A} negativo (-): pacientes en los que se detectó, mediante RFLP y/o secuenciación, la forma salvaje del gen *braf* en el foco tumoral de su CPT (56/106; 52,8%).

3.3.1. Descripción de las variables clinicopatológicas de los pacientes con CPT.

Tamaño tumoral

De los 106 pacientes con CPT, sólo estaba disponible el tamaño tumoral de 91 de ellos. La mediana del tamaño de la lesión de estos pacientes fue de 1,5 [0,7-2,3] cm (Figura R3.3.1). El 90% de los pacientes presentaban lesiones de 4 cm ó menos, y en el 95% de ellos el tamaño era inferior a 7 cm (sólo 4 pacientes presentaron tamaños superiores a 7 cm).

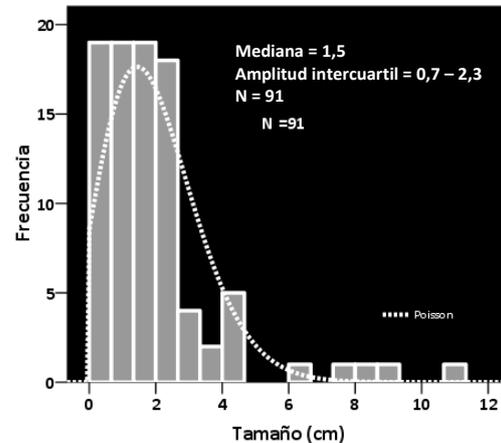


Figura R3.3.1. Distribución del tamaño tumoral en los pacientes con CPT.

Metástasis ganglionares y a distancia

De los 106 pacientes analizados, 34 (32,1%) presentaron metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico, y 3 (2,8%) mostraron metástasis distantes. Dos pacientes presentaron simultáneamente metástasis ganglionares y a distancia en el momento del diagnóstico (1,9%).

Invasión extratiroidea

La invasión de tejidos peritiroideos apareció en el 12,3% de los pacientes (13/106).

Multifocalidad

De los 106 pacientes de CPT, se disponía de información acerca de la multifocalidad de la lesión en 77 de ellos. De éstos, 23 (23/77; 29,9%) mostraron multifocalidad, con al menos 2 focos de CPT.

Se realizó un análisis de las características clinicopatológicas más relevantes (metástasis linfáticas y a distancia, extensión peritiroidea, multifocalidad, tamaño), estratificando por variante histológica. La estratificación por variable histológica no generó ninguna diferencia significativa en cuanto a la distribución de estas variables, aunque mostró una tendencia (no significativa) a la aparición de metástasis ganglionares en los pacientes con variante folicular del CPT. De los 16 pacientes con CPT-VF, 11 presentaron metástasis ganglionares (68,8%).

Otras características histopatológicas de riesgo

Otros factores patológicos clásicos de riesgo que fueron evaluados en los pacientes de CPT fueron la presencia de invasión capsular (26/56; 46,4%), vascular (14/53; 26,4%), así como la aparición de necrosis tumoral (8/57; 14,0%) y la actividad mitótica (53/55; 96,4%).

3.3.2. Asociación entre las características clinicopatológicas y el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en pacientes con CPT.

Se analizó la asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con una serie de parámetros clínicos e histopatológicos de elevado riesgo relacionados con la recidiva y agresividad del CPT. Estas características clinicopatológicas se encuentran detalladas en el Apartado *Metodología* (epígrafe 3.4.2. *Variables independientes*) (edad, sexo, tamaño tumoral, invasión extratiroidea,

multifocalidad, metástasis ganglionares y a distancia, estadio tumoral, etc.). La relación entre el estado de la mutación BRAF^{T1799A} y las características epidemiológicas, clínicas e histopatológicas más importantes se encuentran en la Tabla R3.3.2.

	N (-/+)	BRAF ^{T1799A} - (56)	BRAF ^{T1799A} + (50)	RR	IC _{95%}	valor p
Edad (años)	106 (56/50)	44,4 ± 14,6	48,1 ± 16,6	---	---	0,221
Edad superior a 60 años	106 (56/50)	7 (12,5%)	15 (30,0%)	2,4	(1,1-5,4)	0,032
Sexo masculino	106 (56/50)	6 (10,7%)	9 (18,0%)	1,7	(0,6-4,4)	0,403
Tamaño tumoral (cm)	91 (45/46)	1,2 [0,6-2,0]	1,7 [1,2-2,5]	---	---	0,016
Tamaño tumoral ≥ 1cm	91 (45/46)	27 (60,0%)	39 (84,8%)	1,4	(1,1-1,8)	0,010
Multifocalidad	77 (41/36)	9 (22,0%)	14 (38,9%)	1,8	(0,9-3,6)	0,309
Invasión extratiroidea	106 (56/50)	7 (12,5%)	6 (12,0%)	1,0	(0,3-2,7)	1,000
Metástasis ganglionares	106 (56/50)	16 (28,6%)	18 (36,0%)	1,3	(0,7-2,2)	0,532
Metástasis a distancia	106 (56/50)	2 (3,6%)	1 (2,0%)	0,6	(0,1-6,0)	1,000
Estadio tumoral (AJCC)	106 (56/50)					
I		42 (75%)	28 (56,0%)			
II		7 (12,5%)	13 (26,0%)			
III		6 (10,7%)	8 (16,0%)			
IV		1 (1,8%)	1 (2,0%)			
Estadio tumoral II-III-IV	106 (56/50)	14 (25,0%)	22 (44,0%)	1,8	(1,0-3,1)	0,043
Invasión Capsular	56 (26/30)	13 (50,0%)	13 (43,3%)	0,9	(0,5-1,5)	0,789
Invasión Vascular	53 (25/28)	8 (32,0%)	6 (21,4%)	0,7	(0,3-1,7)	0,534
Necrosis Tumoral	57 (26/31)	3 (11,5%)	5 (16,1%)	1,4	(0,4-5,3)	0,715
Actividad Mitótica	55 (27/28)					
Ausente		1 (3,7%)	1 (3,6%)			
Leve		22 (81,5%)	26 (92,9%)			
Moderada		3 (11,1%)	1 (3,6%)			
Alta		1 (3,7%)	0 (0,0%)			
Actividad Mitótica Moderada/Alta	55 (27/28)	4 (14,8%)	1 (3,6%)	0,2	(0,0-2,0)	0,193

Variables cuantitativas cuya distribución es normal: media ± DT.

Variables cuantitativas cuya distribución no es normal: mediana [percentil 25-percentil 75].

Variables categóricas: número (% de BRAF+/-).

RR: Riesgo Relativo.

Las diferencias estadísticamente significativas de la distribución de cada variable en pacientes BRAF^{T1799A} positivos y negativos se encuentran resaltadas, con la casilla del valor p sombreada y la variable en color blanco.

Edad y sexo

La edad media en los pacientes cuyo CPT resultó positivo para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} fue de 48,1 ± 16,6 años, con un 18,0% de pacientes de sexo masculino en la cohorte positiva para BRAF^{T1799A} (Tabla R3.3.2).

Aunque las variables edad y sexo como tal no resultaron asociadas con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}, se encontró que la frecuencia de la mutación BRAF^{T1799A} era mucho mayor en pacientes de avanzada edad, especialmente a partir de los 60 años, hallándose una asociación estadística entre los pacientes con más de 60 años y la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} (Tabla R3.3.2).

Al estratificar el sexo de los pacientes según si su edad era superior o no a 60 años, se encontró de forma estadísticamente significativa que la distribución de pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} era más pronunciado en el caso de las mujeres (Tabla R3.3.2), con un riesgo relativo de 2,6 (IC_{95%}: 1,1-6,3) en el estrato femenino (mujer, BRAF^{T1799A} +, mayor de 60 años). El riesgo relativo de los pacientes varones mayores de 60 años y BRAF^{T1799A} + resultó ser de 1,3 (IC_{95%}: 0,153-5,406), pero sin valor estadístico (p=1,000), probablemente debido al reducido número de varones en el grupo de estudio (15 casos).

Tamaño tumoral

La mediana del tamaño tumoral de los pacientes positivos y negativos para BRAF^{T1799A} fue similar (1,7 y 1,2 cm, respectivamente). Sin embargo, el análisis de la distribución del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en función del tamaño tumoral en estos pacientes reveló asociaciones significativas de la mutación BRAF^{T1799A} con un mayor tamaño tumoral. En particular, la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} se encontró con mayor frecuencia en carcinomas papilares de tamaño igual o superior a 1 cm ($p=0,010$), con un riesgo relativo de 1,4 (IC_{95%}: 1,1-1,8) de presentar un tamaño tumoral igual o superior a 1 cm en el grupo de los pacientes positivos para BRAF^{T1799A} (Tabla R3.3.2).

Por el contrario, la distribución de los casos positivos para la mutación BRAF^{T1799A} no resultó diferente entre microcarcinomas papilares de tiroides de tamaño comprendido entre 0-5 mm y los de 5-10 mm (RR: 1,0; IC_{95%}: 0,5-2,0; $p=1,000$), según la subclasificación de microcarcinomas papilares de tiroides propuesta por Kasai & Sakamoto (1987).

Estadio

En cuanto al estadio tumoral, como ya se indicó en el epígrafe 3.1.3. *Estadificación*, del Apartado *Resultados*, la mayor parte de los pacientes (70/106; 66%) presentaron un Estadio I (AJCC). De estos 70 pacientes, 28 (28/70; 40%) resultaron positivos para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en su tumor primario, mientras que en el resto de estratos, el número de pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} siempre era mayor que el número de pacientes negativos en el correspondiente estrato. Esto nos indujo a pensar que podía existir una asociación del estado de BRAF^{T1799A} con un estadio tumoral avanzado, así que comparamos los grupos de pacientes BRAF^{T1799A} positivos y negativos según presentaran un estadio I o superior (II, III o IV), obteniéndose una asociación significativa ($p=0,043$) entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido tumoral del CPT y un estadio superior a I, con un riesgo relativo de 1,8 (IC_{95%}: 1,0-3,1) (Tabla R3.3.2).

Las variables estadio tumoral superior a I, edad superior a 60 años y tamaño tumoral a partir de 1 cm fueron sometidas a análisis multivariante mediante regresión logística para estudiar la independencia de estas asociaciones. El resultado fue que las únicas variables asociadas estadísticamente con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} eran edad > 60 años (OR: 4,5; IC_{90%}: 1,6-12,7; $p=0,016$) y tamaño ≥ 1 cm (OR: 3,4; IC_{90%}: 1,4-8,1; $p=0,021$), ya que la variable estadio clínico sufre un efecto de colinealidad con ambas ($p<0,0001$ en los dos casos), al ser una combinación lineal de las dos. La introducción de las posibles interacciones entre estadio tumoral I con las otras dos variables (edad superior a 60 años y tamaño 1 cm o superior) en el modelo de regresión logística no dio lugar a relaciones significativas.

Subtipos histológicos

La mutación BRAF^{T1799A} se encontró distribuida de forma uniforme en pacientes con diferentes variantes histológicas de CPT (Tabla R3.2.1), no encontrándose asociación estadísticamente significativa con ninguna de las histologías presentes en el estudio, aunque el microcarcinoma papilar de tiroides mostró una tendencia (no significativa; $p=0,075$) a presentar una menor frecuencia frente a la variante clásica.

También se realizó un análisis de la relación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y las características clinicopatológicas más relevantes (metástasis linfáticas y a distancia, extensión peritiroidea, multifocalidad, tamaño), estratificando por variante histológica. La estratificación por variable histológica no generó ninguna diferencia significativa en cuanto a la distribución de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A}.

Metástasis

La aparición de metástasis regionales o a distancia en los pacientes BRAF^{T1799A} positivos (36,0% y 2,0% respectivamente) tuvo lugar con una frecuencia similar a la de los pacientes negativos para BRAF^{T1799A} (28,6% y 3,6% respectivamente, Tabla R3.3.2).

Otras características histopatológicas

Para el resto de las variables histopatológicas (multifocalidad, invasión extratiroidea, invasión capsular, invasión vascular, actividad mitótica, necrosis tumoral), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de su distribución en pacientes BRAF^{T1799A} positivos y negativos (Tabla R3.3.2).

En resumen, en el análisis bivariante **se encontró asociación significativa entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y una edad superior a 60 años, estadio clínico avanzado (superior a estadio I de la AJCC) y mayor tamaño tumoral, especialmente a partir de 1 cm de diámetro; tras el análisis multivariante, las únicas variables asociadas con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} fueron edad superior a 60 años y mayor tamaño tumoral.** Sin embargo, no se encontró asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con invasión extratiroidea, invasión capsular o vascular, necrosis tumoral, actividad mitótica, ni con la aparición de metástasis linfáticas cervicales o a distancia.

3.4. ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON LA RECIDIVA TUMORAL DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL PACIENTE CON CPT

Como se describió anteriormente (epígrafe 3.1.5. *Tiempo de seguimiento*), para el análisis de las variables relativas al seguimiento y evolución del paciente, se seleccionaron 97 pacientes con un tiempo de seguimiento igual o superior a 15 meses, para asegurar que todos los pacientes incluidos en este subgrupo se hubieran realizado el primer rastreo tiroideo anual tras el rastreo ablativo de los 3 meses posteriores a la cirugía. Las características epidemiológicas y clinicopatológicas de estos pacientes eran similares a los del grupo completo de 106 pacientes, y no diferían entre sí de forma estadísticamente significativa con éstos ni con el grupo de pacientes que no fueron seleccionados para el análisis de variables relativas al seguimiento. Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las duraciones del seguimiento de los grupos con recidiva (mediana: 63,1 [26,4-90,4] meses) y sin recidiva (mediana: 67,7 [44,4-100,3] meses) (Tabla R3.4.2).

3.4.1. Asociación entre las características clinicopatológicas de alto riesgo y la recidiva tumoral en pacientes con CPT

Como se indicó en el Apartado *Metodología* (epígrafe 3.4.1. *Variable dependiente*), la recidiva se define como la aparición de CPT durante el seguimiento post-quirúrgico.

En primer lugar, se analizó la asociación de la recidiva de CPT con los parámetros clinicopatológicos de elevado riesgo relacionados descritos en el Apartado *Metodología* (epígrafe 3.4.2. *Variables independientes*) (edad, sexo, BRAF^{T1799A}, tamaño tumoral, invasión extratiroidea, multifocalidad, metástasis ganglionares y a distancia, estadio tumoral, etc.). Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla R3.4.1.

De los 97 pacientes incluidos en el grupo de seguimiento, 22 (22,7%) presentaron recidiva de CPT. Estos 22 pacientes presentaban una edad media de 48,3 ± 17,3 años, y la relación hombre:mujer fue de 4:18. El tamaño de sus lesiones osciló entre 0,3-8,0 cm (mediana: 2,3 [0,9-4,0] cm), con un 70,6% de estos pacientes con tamaño tumoral superior a 1 cm de diámetro. De ellos, el 45,5% (10/15) presentaron multifocalidad de la lesión, y en el 31,8% (7/22) el carcinoma papilar había invadido tejido peritiroideo. El 63,6% de los pacientes con

recidiva (14/22) habían presentado metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico, y el 4,5% de ellos (1/22) también presentaba metástasis distantes (Tabla R3.4.1).

Tabla R3.4.1. Asociación entre las características clinicopatológicas de alto riesgo y la recidiva tumoral en pacientes con carcinoma papilar de tiroides.

	N (-/+)	Sin Recidiva	Con Recidiva	RR	IC _{95%}	p
Edad (años)	97 (75/22)	44,8 ± 15,2	48,9 ± 17,1	---	---	0,315
Sexo masculino	97 (75/22)	9 (12,0%)	4 (18,2%)	1,4	(0,6-3,6)	0,483
Tamaño tumoral (cm)	84 (67/17)	1,4 [0,7-2,0]	2,3 [0,9-4,0]	---	---	0,109
Tamaño tumoral ≥ 1cm	84 (67/17)	46 (68,7%)	13 (76,5%)	1,4	(0,5-3,8)	0,767
Multifocalidad	72 (57/15)	11 (19,3%)	10 (66,7%)	4,9	(1,9-12,5)	0,001
Invasión extratiroidea	97 (75/22)	5 (6,7%)	7 (31,8%)	3,3	(1,7-6,4)	0,005
Metástasis ganglionares	97 (75/22)	19 (25,3%)	14 (63,6%)	3,4	(1,6-7,2)	0,002
Metástasis a distancia	97 (75/22)	2 (2,7%)	1 (4,5%)	1,5	(0,3-7,8)	0,542
Invasión Capsular	50 (40/10)	16 (40,0%)	7 (70,0%)	2,7	(0,8-9,4)	0,155
Invasión Vascular	46 (37/9)	8 (21,1%)	5 (62,5%)	4,2	(1,2-15,2)	0,031
Necrosis Tumoral	52 (41/11)	5 (12,2%)	3 (27,3%)	2,1	(0,7-6,1)	0,343
Actividad Mitótica Mod/Alta	49 (39/10)	4 (10,3%)	1 (10,0%)	1,0	(0,2-6,2)	1,000
Tiempo seguimiento (meses)	97 (75/22)	63,1 [26,4-90,4]	67,7 [44,4-100,3]	---	---	0,312

Variables cuantitativas cuya distribución es normal: Media ± DT.

Variables cuantitativas cuya distribución no es normal: Mediana [percentil 25-percentil 75].

Variables categóricas: número (% de recidiva +/-).

RR: Riesgo Relativo.

Las diferencias estadísticamente significativas de la distribución de una determinada variable en pacientes con/sin recidiva se encuentran resaltadas, con la casilla del valor p sombreada y la variable correspondiente en color blanco.

El análisis global del grupo de 97 pacientes con más de 15 meses de seguimiento reveló asociaciones significativas de la recidiva de CPT con algunas de las características clinicopatológicas de mayor agresividad del tumor primario, como multifocalidad, invasión extratiroidea e invasión vascular, así como con la presencia de metástasis en ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico (Tabla R3.4.1).

Para el resto de las variables clinicopatológicas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su distribución en pacientes con o sin recidiva (Tabla R3.4.1). En particular, no se encontró asociación de la recidiva con el tamaño tumoral ni con la aparición de metástasis a distancia, características patológicas asociadas frecuentemente con un mayor riesgo de recidiva de enfermedad (Hughes *et al*, 1996; Rouxel *et al*, 2004; Leboulleux *et al*, 2005).

Con las cuatro variables que en el análisis bivalente mostró estadísticamente asociadas a la recidiva (multifocalidad, invasión extratiroidea, metástasis linfáticas, invasión vascular; Tabla R3.4.1), se realizó un análisis multivariante mediante regresión logística para determinar los posibles efectos de confusión. La única variable que se mantuvo como indicador pronóstico independiente de la recidiva fue la invasión extratiroidea, con una OR de 6,5 (IC_{90%}: 2,2-19,1; p=0,004), perdiéndose la relevancia estadística de todas las demás. La inclusión de otros factores pronósticos (edad, sexo, tamaño, BRAF^{T1799A}, estadio TNM/AJCC) no produjo ninguna variación en el modelo.

Tipo histológico de los pacientes con recidiva de CPT

La Tabla R3.4.2 muestra el porcentaje de pacientes que desarrollaron recidiva tumoral en función del subtipo histológico diagnosticado en el tumor primario.

Las variantes de células claras y sólido-trabecular presentaron un 100% de recidiva, mientras que las variantes de células altas y folicular difusa exhibieron una recidiva del 50% (1/2). La variante folicular del CPT presentó una proporción de recidiva del 7,1% (1/13), y los subtipos más frecuentes en la población estudiada, la variante clásica y el microcarcinoma papilar, presentaron, respectivamente, frecuencias de recidiva de 25,0% y 15,6% (Tabla R3.4.2).

Tabla R3.4.2.
Recidiva tumoral en los pacientes según el subtipo histológico.

	N (-/+)	Sin Recidiva	Con Recidiva
		N (% de subtipo histológico)	
CPT Clásico	44 (33/11)	32 (72,7%)	12 (27,3%)
microCPT	32 (27/5)	27 (84,4%)	5 (15,6%)
CPT-VF	14 (13/1)	13 (92,9%)	1 (7,1%)
CPT-CA	2 (1/1)	1 (50%)	1 (50%)
CPT-CC	1 (0/1)	0 (0,0%)	1 (100,0%)
CPT-ST	1 (0/1)	0 (0,0%)	1 (100,0%)
CPT-ED	1 (1/0)	1 (100,0%)	0 (0,0%)
CPT-VF-DIF	2 (1/1)	1 (50%)	1 (50%)

Estadificación y grupos de riesgo en los pacientes con recidiva de CPT

En el grupo de 97 pacientes seleccionado para el estudio de recidiva tumoral, ésta apareció en 22 casos (22,7%); de éstos, 14 pacientes (63,6%) fueron estadificados como Estadio I (AJCC), y 6 con Estadio III (27,3%) (Tabla R3.4.3). Los restantes 2 pacientes con recidiva presentaban Estadios II y IV. El 31,8% de los pacientes con recidiva presentaron Estadios III o IV ($p=0,038$) (Tabla R3.4.4). Los estadios con mayor proporción de recidiva tumoral fueron el III, con un 46,2% de pacientes con recidiva de CPT (6/13), y el IV, con un 50,0% (1/2) (Tabla R3.4.3).

Tabla R3.4.3. Distribución de la aparición de recidiva tumoral en los pacientes según la estadificación AJCC.

ESTADIO AJCC	RECIDIVA				TOTAL	
	NO		SÍ			
	N	%	N	%	N	%
I	51	68,0	14	63,6	65	67,0
II	16	21,3	1	4,5	17	17,5
III	7	9,3	6	27,3	13	13,4
IV	1	1,3	1	4,5	2	2,1
TOTAL	75	100,0	22	100,0	97	100,0

Para analizar la asociación entre recidiva y sistema de riesgo, cada uno de los sistemas de clasificación del riesgo fue agrupado en 2 Categorías. El criterio aplicado para realizar la agrupación fue la supervivencia asociada a cada estrato según lo publicado por los autores que establecieron estos sistemas (Cady & Rossi, 1988; Hay *et al*, 1987; Hay *et al*, 1993; Shaha *et al*, 1994; Byar *et al*, 1979). Dependiendo del sistema de clasificación del riesgo considerado, la Primera Categoría se construyó con los niveles originales a los que les correspondía una supervivencia entre 80-100%, y la Segunda Categoría, con el resto de niveles, a los que corresponde una supervivencia entre 24-67%. En el caso del índice AMES, no fue necesaria la agrupación, ya que sólo presenta 2 niveles, que coinciden con los porcentajes de supervivencia mencionados.

Atendiendo al criterio del sistema de estadificación de la AJCC, deberíamos haber establecido las categorías entre I-II-III (supervivencia 100-95,8%) y IV (supervivencia 45,3%). Sin embargo, en base al criterio de otros autores (Loh *et al*, 1997; Chen *et al*, 1998; Jukkola *et al*, 2004), y a los datos derivados del presente estudio, decidimos agrupar en una Primera Categoría los pacientes en Estadios I y II, con una proporción de recidiva de 21,5% (14/65) y 5,9% (1/17), respectivamente. Por su parte, la Segunda Categoría agrupó los Estadios III y IV, para compensar el hecho de que realmente son los de mayor porcentaje de recidiva (6/13: 46,2% y 1/2: 50,0%, respectivamente) en nuestros pacientes (Tabla R3.4.3).

De todos los sistemas analizados en este estudio para estratificación del riesgo en cáncer de tiroides, los que mejor clasificaron a nuestros pacientes en cuanto a la probabilidad de recidiva fueron el sistema AMES y el MACIS, con un riesgo relativo aproximadamente tres veces superior de presentar recidiva en los pacientes clasificados como de alto riesgo (Tabla R3.4.4).

Tabla R3.4.4. Correlación entre la clasificación del riesgo establecida para los pacientes según el diagnóstico inicial y su recidiva.

	N (-/+)	Sin Recidiva N (%)	Con Recidiva N (%)	RR	valor p	IC _{95%}
AMES				3,3	0,003	(1,7-6,4)
Bajo Riesgo	80 (67/13)	67 (89,3%)	13 (59,1%)			
Alto Riesgo	17 (8/9)	8 (10,7%)	9 (40,9%)			
MACIS				3,0	0,004	(1,5-6,0)
Mínimo-Bajo	79 (66/13)	66 (88,0%)	13 (59,1%)			
Alto-Máximo	18 (9/9)	9 (12,0%)	9 (40,9%)			
AJCC				2,6	0,038	(1,3-5,2)
I-II	82 (67/15)	67 (89,3%)	15 (68,2%)			
III-IV	15 (8/7)	8 (10,7%)	7 (31,8%)			
EORTC				2,2	0,045	(1,1-4,5)
1-2	74 (61/13)	61 (81,3%)	13 (59,1%)			
3-4-5	23 (14/9)	14 (18,7%)	9 (40,9%)			
MSKCCD				2,5	0,067	(1,1-5,5)
Bajo-Medio	76 (63/13)	63 (88,7%)	12 (54,5%)			
Alto	14 (8/6)	8 (11,3%)	6 (31,6%)			
AGES				2,1	0,064	(1,0-4,2)
1-2	69 (57/12)	57 (76,0%)	12 (54,5%)			
3-4	28 (18/10)	18 (24,0%)	10 (45,5%)			

RR: Riesgo Relativo.

Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con recidiva de CPT

Como se ha descrito en apartados anteriores, la recidiva tumoral apareció en el 22,7% de los casos (22/97). La mutación BRAF^{T1799A} se encontró presente en el tumor primario del 40,9% (9/22) de los pacientes con recidiva. El 81,8% de los pacientes con recidiva (18/22) necesitó más de una dosis de ¹³¹I, y en el 31,8% (7/22) fue necesaria una segunda cirugía. Al final del seguimiento, el 50% (11/22) de estos pacientes se encontraban enfermos. La Tabla R3.4.5 recoge el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en los 22 pacientes con recidiva, en función de las variables clínicas, histopatológicas y terapéuticas analizadas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la duración del seguimiento entre pacientes con CPT positivos para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} (mediana: 59,8 [27,3-93,8] meses) y negativos (mediana: 68,2 [29,5-94,5] meses) (Tabla R3.4.6).

La aparición de recidiva tumoral no se encontró asociada con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor original. Interesantemente, la frecuencia de recidiva en pacientes BRAF^{T1799A} negativos (13/52; 25,0%) fue mayor que en positivos (9/45; 20,0%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla R3.4.6). La estratificación por variable histológica no generó ninguna diferencia significativa en cuanto a la distribución de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en pacientes con/sin recidiva.

La presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario de estos pacientes tampoco se encontró asociada a la necesidad de nuevos tratamientos ablativos con ¹³¹I o de otras intervenciones quirúrgicas debidas a la aparición de metástasis (Tabla R3.4.6).

La relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y el estado del paciente al final del estudio se analizó en 76 pacientes con más de 27 meses de seguimiento, 11 de los cuales se encontraban enfermos. La mutación BRAF^{T1799A} se encontró presente en el tumor primario en el 54,5% de los pacientes enfermos (6/11) (Tablas R3.4.5 y R3.4.6). Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y la persistencia de enfermedad al final del seguimiento.

Tabla R3.4.5. Descripción del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en función de las variables analizadas en los 22 pacientes con recidiva de carcinoma papilar de tiroides.

	N (-/+)	BRAF ^{T1799A}	
		- (13)	+ (9)
Edad (años)	22 (13/9)	44,0 [29,5-60,0]	62,0 [36,5-67,5]
Edad superior a 60 años	22 (13/9)	2 (15,4%)	5 (55,6%)
Sexo masculino	22 (13/9)	3 (23,1%)	1 (11,1%)
Tamaño tumoral (cm)	17 (9/8)	1,5 [0,5-3,3]	2,5 [3,1-4,4]
Tamaño tumoral ≥ 1cm	17 (9/8)	6 (66,7%)	7 (87,5%)
Multifocalidad	15 (9/6)	5 (55,6%)	5 (83,3%)
Invasión extratiroidea	22 (13/9)	4 (30,8%)	3 (33,3%)
Metástasis en ganglios linfáticos	22 (13/9)	7 (53,8%)	7 (31,8%)
Metástasis a distancia	22 (13/9)	1 (7,7%)	0 (0,0%)
Invasión Capsular	10 (6/4)	4 (66,7%)	3 (75,0%)
Invasión Vascular	8 (5/3)	3 (60,0%)	2 (66,7%)
Necrosis Tumoral	11 (8/3)	2 (25,0%)	1 (33,3%)
Actividad Mitótica	10 (7/3)	1 (14,3%)	0 (0,0%)
AMES Alto Riesgo	22 (13/9)	5 (38,5%)	4 (44,4%)
MACIS Alto-Máximo	22 (13/9)	4 (30,8%)	5 (55,6%)
AJCC III-IV	22 (13/9)	3 (23,1%)	4 (44,4%)
EORTC 3-4-5	22 (13/9)	4 (30,8%)	5 (55,6%)
MSKCCD Riesgo Alto	19 (11/8)	3 (27,3%)	3 (37,5%)
AGES 3-4	22 (13/9)	4 (30,8%)	6 (66,7%)
Enfermo al final del seguimiento	22 (13/9)	5 (38,5%)	6 (66,7%)
Tiempo de seguimiento (meses)	22 (13/9)	67,7 [36,7-100,3]	58,8 [54,2-99,5]
Más de un tratamiento de ¹³¹ I	22 (13/9)	11 (84,6%)	7 (77,8%)
Segunda cirugía	22 (13/9)	2 (15,4%)	5 (55,6%)
Dosis inicial ¹³¹ I > 100 mCi	22 (13/9)	4 (30,8%)	4 (44,4%)
Dosis total ¹³¹ I (mCi)	22 (13/9)		
Hasta 100 mCi		2 (15,4%)	1 (11,1%)
100-200 mCi		5 (38,5%)	4 (44,4%)
200-300 mCi		4 (30,8%)	4 (44,4%)
Más de 300 mCi		2 (15,4%)	0 (0,0%)

Variables cuantitativas cuya distribución es normal: media ± DT.

Variables cuantitativas cuya distribución no es normal: mediana [percentil 25-percentil 75].

Variables categóricas: número (% de BRAF+/-).

Tabla R3.4.6. Asociación entre las variables relacionadas con recidiva de carcinoma papilar de tiroides y el estado de la mutación BRAF^{T1799A}.

	N (-/+)	BRAF ^{T1799A} -	BRAF ^{T1799A} +	RR	IC _{95%}	p
Recidiva tumoral	97 (52/45)	13 (25,0%)	9 (20,0%)	0,8	(0,4-1,7)	0,631
Más de un tratamiento de ¹³¹ I	97 (52/45)	11 (21,2%)	7 (15,6%)	0,7	(0,3-1,7)	0,603
Necesidad de una 2ª cirugía	97 (52/45)	2 (3,8%)	5 (11,1%)	2,9	(0,6-14,2)	0,244
Enfermo al final seguimiento	76 (42/34)	5 (11,9%)	6 (17,6%)	1,5	(0,5-4,4)	0,527
Tiempo seguimiento (meses)	97 (52/45)	68,2 [29,5-94,5]	59,8 [27,3-93,8]	---	---	0,385

Variables cuantitativas cuya distribución es normal: media ± DT.

Variables cuantitativas cuya distribución no es normal: mediana [percentil 25-percentil 75].

Variables categóricas: número (% de BRAF+/-).

RR: Riesgo Relativo.

En resumen, **no se observó asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y la recidiva** (Tabla R3.4.6).

De los 19 pacientes con RCT negativo, 8 presentaron sospecha de recidiva por elevación de tiroglobulina (Tg) o en alguna de las pruebas de imagen (ECO/TAC). De estos 8 pacientes, PET e histopatología resultaron positivos en 3 casos; estos 3 pacientes presentaron además la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario. En el 4º paciente con RCT negativo, Tg positiva y PET positivo, la histopatología tras la cirugía reveló linfadenitis, por lo que no se confirmó la recidiva (Tabla R3.4.8). La distribución de la mutación BRAF^{T1799A} entre pacientes con rastreo positivo/negativo o entre pacientes con rastreo negativo y PET positivo/negativo no resultó diferente estadísticamente.

Así, en este grupo de pacientes, 5 presentaron una recidiva confirmada en el momento del último RCT. De los 4 pacientes positivos para BRAF^{T1799A}, 3 (75%) presentaron un RCT negativo en el momento de la recidiva, aunque sin significación estadística (Tabla R3.4.9).

Tabla R3.4.9. Resultado del último RCT y del estado de BRAF^{T1799A} en el momento de la recidiva.

		BRAF ^{T1799A}		
		-	+	TOTAL
RCT	-	0	3	3
	+	1	1	2
	TOTAL	1	4	5

En resumen, **no se observaron asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y los parámetros relacionados con el tratamiento con ¹³¹I** analizados en este estudio.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

FASE 1. ESTUDIO PRELIMINAR DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} EN CARCINOMA DE TIROIDES: ESPECIFICIDAD, REPRESENTATIVIDAD Y SENSIBILIDAD

1. **Determinación de la Prevalencia y Especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma papilar.** Para determinar la especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} por el carcinoma papilar de tiroides, se comparará la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido procedente de la tiroidectomía de pacientes diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides, frente a pacientes con otras patologías tiroideas malignas (carcinoma folicular, carcinoma medular, carcinoma anaplásico, sarcoma de tiroides) y benignas (bocio multinodular, enfermedad de Graves, adenoma folicular).

La mutación BRAF^{T1799A} representa la alteración genética más frecuente implicada en la patogénesis del carcinoma papilar de tiroides esporádico, con una prevalencia media del 44%, que oscila según estudios entre el 29-83% (Xing 2005^a). En nuestro estudio preliminar, la prevalencia obtenida para carcinoma papilar de tiroides fue del 46,4%.

Tras comparar el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido procedente de la tiroidectomía de pacientes diagnosticados de carcinoma papilar de tiroides frente a pacientes con otras patologías tiroideas malignas (carcinoma folicular, carcinoma medular, carcinoma anaplásico) y benignas (bocio multinodular, enfermedad de Graves, adenoma folicular), así como en tejido tiroideo normal, hemos demostrado que la mutación BRAF^{T1799A} es específica de carcinoma papilar de tiroides.

En todos los casos, el resultado del estado de la mutación BRAF^{T1799A} fue negativo en el tejido tiroideo normal adyacente a las lesiones patológicas presentadas por los pacientes, así como en el tejido tumoral de los pacientes con carcinoma folicular (n=14), anaplásico (n=2) y sarcoma de tiroides (n=1). Tampoco se encontró presente en el tejido tiroideo patológico en los casos de pacientes con bocio multinodular (n=25), bocio difuso (n=13) o adenoma folicular (n=2). Como se describe en el *Apartado 1.3 de la Metodología*, estos 40 pacientes corresponden a la patología tiroidea benigna diagnosticada en el HUVN durante el año 2005, y fueron recogidos inicialmente a modo de pilotaje para el estudio de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en patología benigna de tiroides.

El tamaño de muestra poblacional para el Grupo 1 podría haberse ampliado hasta un máximo de 320 pacientes disponibles en el HUVN tal como se indicó en el *Apartado Metodología*; sin embargo, ya que no se encontró ningún paciente positivo para la mutación BRAF^{T1799A} en patologías benignas de tiroides, el Grupo 1, quedó finalmente constituido por los 40 pacientes seleccionados para el estudio piloto. La pertinencia de esta decisión se ha visto corroborada a lo largo del desarrollo del estudio, ya que no se detectó ningún caso positivo para la mutación BRAF^{T1799A} en los pacientes en estudio de nódulo tiroideo (cohorte 1) sometidos a cirugía y diagnosticados con patologías benignas (61 bocio, 7 adenoma folicular, 1 quiste tirogloso), analizados durante la Fase 2 de la investigación (Tabla R2.2.4). Asumiendo que la mutación BRAF^{T1799A} pudiera aparecer positiva en un máximo del 1,0% de los casos benignos, con la muestra total de 109 pacientes (Fase 1, n=40 + Fase 2, n=69) se cometería un error (precisión) de $\pm 1,9\%$ (IC_{95%}) en la estimación de la prevalencia de BRAF^{T1799A}. Como la prevalencia descrita para la mutación BRAF^{T1799A} en patología benigna, tanto en el presente trabajo como en lo publicado hasta la actualidad, es cero, estaríamos muy por debajo de ese error.

En resumen, la mutación BRAF^{T1799A} sólo se encontró presente en el tejido procedente del foco tumoral de los pacientes con carcinoma papilar de tiroides. Estos resultados concuerdan con los de otros autores, que muestran la especificidad de la mutación BRAF^{T1799A} para carcinoma papilar de tiroides (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xu *et al*, 2003; Fugazzola *et al*, 2004; Hayashida *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Xing, 2005^a; Zhu *et al*, 2005;

Castro *et al*, 2006; Erickson *et al*, 2007). En la literatura, hay muy pocos estudios que describan la presencia de esta mutación en otras patologías tiroideas, diferentes del carcinoma papilar, anaplásico o pobremente diferenciado. De hecho, en la actualidad existe un consenso general en cuanto a su restricción a carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado y pobremente diferenciado, o a carcinomas anaplásicos de tiroides originados de carcinomas papilares pre-existentes (Ciampi & Nikiforov, 2005; Xing, 2005^a).

Excepcionalmente se ha descrito la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en patología tiroidea diferente a carcinoma papilar: en 1 caso de 73 pacientes con carcinoma folicular de tiroides, (Kebebew *et al*, 2007) en una línea celular de carcinoma folicular de tiroides (Xu *et al*, 2003) y en 1 caso de hiperplasia nodular atípica (Chung *et al*, 2006).

2. Representatividad del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en muestras citológicas

Con el fin de determinar si el estado de la mutación BRAF^{T1799A} es detectable en el material procedente de citologías de tiroides, y que este resultado es fiable y representativo del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en la patología del paciente, se caracterizará el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en tejido tiroideo extraído durante la cirugía y en la citología previa del mismo paciente.

Para comprobar la detectabilidad y fiabilidad de la mutación BRAF^{T1799A} en las citologías previas de los pacientes, fue posible seleccionar 60 de los 129 pacientes incluidos en esta Fase del estudio, correspondientes a los que tenían disponible esta muestra. La mayor parte de los pacientes seleccionados (51/60; 85%) se había realizado la punción citológica en los 12 meses previos a la cirugía. Este porcentaje es incluso superior en los casos de neoplasias malignas (34/36 casos de CPT: 94,4% y 8/9 neoplasias No CPT: 88,9%), lo que nos proporciona un elevado grado de representatividad del espécimen citológico elegido para el estudio, y minimiza el error derivado de punciones realizadas en nódulos diferentes al que finalmente es diagnosticado como patológico en pacientes con patología multinodular.

No hubo discordancia del estado de la mutación BRAF^{T1799A} entre material citológico y tisular. En los 60 pacientes de la Fase 1 se encontró una correlación del 100%, para el estado de la mutación BRAF^{T1799A}, entre el resultado obtenido en la punción citológica y el tejido tumoral/patológico del paciente tras la cirugía (Tabla R2.2.4). Igualmente ocurrió con los 108 pacientes procedentes de la Fase 2 (cohorte 1, pacientes en estudio de nódulo tiroideo) sometidos a cirugía de tiroides. Por tanto, en nuestros pacientes, la mutación BRAF^{T1799A} puede detectarse de forma fiable en el material procedente de las citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF, proporcionando un resultado representativo del estado de la misma en el nódulo tiroideo puncionado. Así, la técnica desarrollada en el presente estudio constituye un método diagnóstico válido para la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en el nódulo tiroideo.

3. Precisión diagnóstica para detectar de carcinoma papilar de tiroides en muestras citológicas

Para dilucidar si la incorporación del análisis de BRAF^{T1799A} en la citología previa a la cirugía incrementa la precisión diagnóstica de la citopatología para detectar carcinoma papilar de tiroides, se calcularán los parámetros estadísticos (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y precisión diagnóstica) obtenidos al aplicar el análisis citopatológico y la determinación de BRAF^{T1799A} por separado, y se comparará con los resultados obtenidos al aplicar ambas metodologías.

En esta serie quirúrgica (n=60 pacientes seleccionados con citología previa), la sensibilidad alcanzada con el diagnóstico citopatológico es del 66,7%. La incorporación de la determinación de BRAF^{T1799A} en la citología incrementa la sensibilidad diagnóstica hasta el 83,3% (Tabla D1.1).

Tabla D1.1. Comparación de los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) en las tres estrategias de diagnóstico de CPT en las Fases 1 y 2 del estudio.

TEST	VP	FP	FN	VN	S	E	VPP	VPN	PRECISIÓN
FASE 1									
CITOPATOLOGÍA	24	8	12	16	66,7%	66,7%	75,0%	57,1%	63,3%
BRAF ^{T1799A}	19	0	17	24	52,8%	100%	100%	58,5%	71,7%
CITOPATOLOGÍA + BRAF ^{T1799A}	30	8	6	16	83,3%	66,7%	79,0%	72,7%	76,7%
FASE 2									
CITOPATOLOGÍA	9	26	11	62	45,0%	70,5%	25,7%	84,9%	65,7%
BRAF ^{T1799A}	8	0	12	88	40,0%	100%	100%	88,0%	88,9%
CITOPATOLOGÍA + BRAF ^{T1799A}	12	26	8	62	60,0%	70,5%	31,6%	88,6%	68,5%

La composición de nuestra serie quirúrgica incluye 15 pacientes con patología benigna (13 bocios multinodulares, 2 adenomas foliculares) del año 2005, frente a 45 neoplasias malignas del periodo 1998-2005 (relación patología benigna: maligna, 1:3). El total de pacientes con patología tiroidea benigna registrada en el HUVN durante el período 1998-2005, y susceptibles de someterse a PAAF (por tanto no incluye bocio difuso n=37), fue de 283 pacientes con patología benigna: 275 bocios multinodulares, 8 adenomas foliculares *versus* 95 pacientes con neoplasias malignas (relación 3:1).

El inconveniente de la decisión de no aumentar el tamaño del Grupo 1 de pacientes con patología benigna (por no haber hallado casos positivos para la mutación BRAF^{T1799A}), es que la serie quirúrgica resultó enriquecida en casos de neoplasia maligna, principalmente CPT, quedando subestimados los falsos positivos (FP) y los verdaderos negativos (VN) de la citopatología. Como consecuencia, algunos de los parámetros estadísticos calculados quedan alterados por estas diferencias, como especificidad, valor predictivo positivo y negativo. Sin embargo, no se afectan los verdaderos positivos (VP) y los falsos negativos (FN), por lo que la sensibilidad diagnóstica no resulta comprometida.

En la Fase 2 de la investigación, los valores epidemiológicos sí conservan las proporciones equivalentes a la población, ya que se consideraron todos los pacientes de nódulo tiroideo que posteriormente fueron sometidos a cirugía de tiroides durante el período de estudio.

La precisión diagnóstica (63,3% vs 65,7%) y la especificidad (66,7% vs 70,5%) halladas para el diagnóstico citopatológico en la serie quirúrgica son similares a las de la serie en estudio de nódulo tiroideo (Tabla D1.1). Sin embargo, los valores de VPP (75,0% vs 25,7%) y VPN (57,1% vs 72,7%) sí resultan alterados, quedando sobreestimado el VPP e infraestimado el VPN, por lo que estos parámetros estadísticos en la serie quirúrgica no son extrapolables a la población sometida a cirugía de tiroides en el HUVN durante el periodo 1998-2005. Este hecho no afecta de modo relevante a los resultados de nuestro estudio, cuyo objetivo principal es la detección de falsos negativos de la citopatología, y por tanto el aumento en la sensibilidad diagnóstica de la PAAF mediante la inclusión del análisis de la mutación BRAF^{T1799A}. Por tanto, queda firmemente demostrado que la sensibilidad diagnóstica de la citopatología se incrementa en un 16,6% con la incorporación de la determinación de BRAF^{T1799A} a la rutina diagnóstica, lo que hubiera corregido el 41,7% (5/12) de los FN en la serie quirúrgica, y el 27,3% (3/11) de los FN en la serie de nódulo tiroideo, aumentando la sensibilidad en un 15%, lo que representa el hallazgo más relevante que se desprende de los resultados obtenidos, y que responde al Objetivo principal (Tabla D1.1).

FASE 2. DETECCIÓN PREOPERATORIA DE CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES MEDIANTE DETERMINACIÓN DE LA MUTACIÓN BRAFT1799A EN CITOLOGÍAS DE TIROIDES OBTENIDAS MEDIANTE PAAF

Actualmente, la incidencia de cáncer de tiroides se encuentra en rápido aumento en el mundo, incluida España (Bernal *et al*, 2006; Horner *et al*, 2009; Jemal *et al*, 2009), debido en parte al incremento de “incidentalomas” de tiroides detectados al aplicar modalidades de imagen de alta tecnología como ultrasonidos, PET, TAC y RMN (Kang *et al*, 2003; Chen *et al*, 2005). Aproximadamente el 80% de los cánceres tiroideos diagnosticados en la actualidad corresponden a carcinoma papilar de tiroides (Hundahl *et al*, 1998).

La mejor herramienta para el diagnóstico precoz de lesiones tiroideas es el examen citológico mediante punción y aspiración con aguja fina (PAAF). Cuando el riesgo de malignidad de un nódulo tiroideo es elevado, habitualmente se recomienda al paciente la realización de una PAAF, que puede realizarse guiada ecográficamente o mediante palpación.

La interpretación de la PAAF de tiroides por un citopatólogo experto es la técnica *gold standard* para la detección de malignidad en nódulos tiroideos. Aunque la precisión diagnóstica de la citología mediante PAAF, interpretada como maligna o benigna es elevada incluso en manos expertas, aproximadamente el 10-30% de los nódulos tiroideos sometidos a PAAF son diagnosticados como “indeterminados o proliferación folicular” (Caruso & Mazzaferri, 1991; Gharib & Goellner, 1993; Gharib *et al*, 1993; Gharib, 2004; Baloch *et al*, 2001; Yeh *et al*, 2004), y aproximadamente el 20-40% de ellos finalmente resultan malignos tras la cirugía (Caruso & Mazzaferri, 1991), lo que supone un dilema diagnóstico para los pacientes y los médicos (Busseiners & Oertel, 1993; Cáp *et al*, 1999; Haugen *et al*, 2002; Oertel, 2002; Oertel *et al*, 2002; Hegedüs, 2004).

Nuestro trabajo refleja frecuencias similares, ya que el 7,3% de los pacientes en estudio de nódulo tiroideo se diagnosticaron como “indeterminados” (Figura R2.2.1), y de los 32 casos que se sometieron a cirugía, 10 se confirmaron histopatológicamente como neoplasias malignas (10/32; 31,3%) (Tabla R2.2.4), correspondiendo 6 de los casos a CPT (6/32; 18,8%) (Tabla R2.2.6).

La categoría no diagnóstica puede suponer hasta un 10-21% de los casos (Miller *et al*, 1985; Caruso & Mazzaferri, 1991; Gharib & Goellner, 1993; Hamburger, 1994), con un promedio de malignidad de 2-9% (McHenry *et al*, 1993; MacDonald & Yazdi, 1996; Schmidt *et al*, 1997) porcentaje que se incrementa al 37% cuando se considera sólo casos sometidos a cirugía (Chow *et al*, 2001), tal como se diseñó en el protocolo de la Fase 2 del presente trabajo. En nuestro caso, el 22,2% (101/454; Figura R2.2.1) de las citologías fueron diagnosticadas como no valorables, mientras que el porcentaje de CPT hallado en esta categoría fue del 18,2% (2/11; Tabla R2.2.6).

En la categoría benigna, que en nuestro estudio correspondió al 69,4% de los casos (315/454; Figura R2.2.1), se encontró un 18,3% (11/60; Tabla R2.2.4) de casos con neoplasia maligna.

El porcentaje de malignidad en las dos categorías sin indicación quirúrgica, considerando todas las neoplasias malignas, fue de 19,7%, con 14 de 71 casos de la cohorte 1 diagnosticados como falsos negativos por la citopatología (Tabla R2.2.4). Los resultados citológicos falsos negativos pueden retrasar el tratamiento y afectar de forma adversa al desenlace del paciente (Yeh *et al*, 2004). La 2ª revisión de la citología podría ser una solución; sin embargo, diversos investigadores han encontrado diagnósticos discordantes tras la 2ª revisión de la muestra citológica de PAAF tiroidea, en especial en la categoría indeterminada, lo cual puede influir negativamente en el manejo de pacientes con neoplasias tiroideas (Baloch *et al*, 2001; Tan *et al*, 2007).

Ya que los clínicos se han hecho dependientes de la PAAF, la interpretación de los resultados debe ser lo más precisa posible. La utilidad diagnóstica de la PAAF, como la de cualquier test diagnóstico, sólo puede calcularse de forma precisa si se lleva a cabo en todos los pacientes el procedimiento *gold standard*, que en este caso es la cirugía. En la actualidad, sólo los pacientes que presentan resultados positivos en la PAAF son sometidos a tiroidectomía total o parcial (Thyroid Carcinoma Task Force, 2001; AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules, 2006; Cooper *et al*, 2009). En las publicaciones más citadas relativas a las características diagnósticas de la PAAF, menos del 30% de los pacientes son sometidos a cirugía. Esto se debe a que la cirugía se encuentra asociada a un riesgo significativo de complicaciones, y generalmente se considera que existe una baja probabilidad de que realmente se presente malignidad. El subgrupo de pacientes con PAAF negativa que elige someterse a cirugía debido a síntomas persistentes, como hipertiroidismo o problemas respiratorios, podría no ser representativo de todos los pacientes con resultado negativo en la citología de tiroides.

Al incluir sólo un subgrupo de pacientes con citologías negativas, puede incrementarse artificialmente la sensibilidad, y disminuir la especificidad de la PAAF para detectar malignidad, debido a la reducción de los valores reales (valores C y D en la Tabla D2.1).

Tabla D2.1. Cálculo de sensibilidad y especificidad del test diagnóstico.		
HISTOPATOLOGÍA (GOLD STANDARD)		
PAAF	Positiva	Negativa
Positiva	A	B
Negativa	C	D
Sensibilidad = $A / (A + C)$		
Especificidad = $D / (B + D)$		

Se han realizado numerosos estudios para determinar la precisión de la PAAF (Gardiner *et al*, 1986; Altavilla *et al*, 1990; Caraway *et al*, 1993; Gharib & Goellner, 1993; Gharib *et al*, 1993; Hamburger, 1994; Burch *et al*, 1996; Baloch *et al*, 1998; Amrikachi *et al*, 2001; Arda *et al*, 2001; Blansfield *et al*, 2002; Yeh *et al*, 2004; Mahar *et al*, 2006; Tee *et al*, 2007; Peng & Wang, 2008; Polyzos *et al*, 2008). Sin embargo, en ninguno de ellos todos los pacientes son sometidos a cirugía (*gold standard*) independientemente del resultado en la PAAF (test). Si la sensibilidad de la PAAF se encuentra sobreestimada, significa que una determinada proporción de pacientes con neoplasias malignas de tiroides pueden haber escapado a la cirugía, retrasando de esta manera el diagnóstico, y resultando posiblemente en peor pronóstico.

En 2007, Tee y colaboradores realizaron una revisión sistemática de la literatura para determinar los parámetros diagnósticos de la PAAF en adultos con nódulos tiroideos. En este estudio, determinaron que la sensibilidad de la PAAF depende en gran medida del riesgo de malignidad en los pacientes con resultado negativo en la PAAF que son sometidos a cirugía. Asumiendo que los pacientes que no son intervenidos quirúrgicamente presentan el mismo riesgo de malignidad, la sensibilidad podría descender desde un 90% (IC_{95%}: 88-92%) hasta un 66% (IC_{95%}: 65-68%), de manera que con la PAAF se estaría perdiendo una tercera parte de los pacientes que presentan neoplasia tiroidea maligna (Tee *et al*, 2007).

En otro estudio de Kuru y colaboradores, 638 pacientes con nódulo tiroideo fueron sometidos a PAAF, y de los 486 pacientes con diagnóstico benigno, 417 (86%) fueron intervenidos quirúrgicamente, revelando una proporción de falsos negativos del 2% en pacientes con PAAF benigna, y una sensibilidad de la PAAF del 90% (Kuru, 2008). En nuestro caso, el porcentaje de falsos negativos en las categorías no quirúrgicas de la PAAF (“no valorable” y “negativo malignidad”) es bastante superior, ya que supera el 15% de los pacientes sometidos a cirugía en estas categorías (11/71; 15,5%) (Tabla R2.2.6). En la serie de Kuru, la mayor parte de los pacientes sometidos a cirugía son los que presentan un mayor tamaño del nódulo u otras características clínicas o ecográficas de malignidad, por lo que estos pacientes tampoco serían

representativos de todos los pacientes sujetos a estudio de nódulo tiroideo. El tamaño del nódulo es un factor de riesgo para malignidad (Schlinkert *et al*, 1997; Tuttle *et al*, 1998), lo que puede contribuir a la elevada sensibilidad detectada. Además, la sensibilidad de la PAAF también podría ser menor en nódulos más pequeños.

Por estas razones, en nuestro estudio, con objeto de no infravalorar los posibles falsos negativos, ni sobrevalorar los verdaderos negativos de cualquiera de los procedimientos analizados para detectar carcinoma papilar de tiroides (CPT), los valores epidemiológicos de Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor Predictivo Negativo (VPN), Valor Predictivo Positivo (VPP) y Precisión Diagnóstica se han calculado teniendo en cuenta sólo los 108 pacientes sometidos a cirugía de tiroides, y de los que, por tanto, se dispone de confirmación histopatológica de su enfermedad, en lugar de considerar los 454 nódulos puncionados. Como nuestra muestra no se seleccionó de forma aleatoria, sino que se constituyó con toda la población de estudio, al recoger todos los pacientes en estudio de nódulo tiroideo del HUVN durante el periodo 2006-2007, nuestro trabajo se encuentra exento de error aleatorio a la hora de seleccionar, tanto los pacientes para análisis de BRAF^{T1799A} en la citología, como los del grupo de pacientes sometidos a cirugía para el cálculo de los parámetros epidemiológicos.

La estimación de la S y la E en el diagnóstico de CPT mediante citopatología depende además de cómo se maneje la categoría diagnóstica indeterminada (“proliferación folicular”). Si esta categoría se considera positiva, aumenta S y disminuye E. Por el contrario, si los resultados “indeterminados” se consideran negativos, S disminuye y E aumenta. En nuestro caso, consideramos esta categoría como positiva porque nuestros pacientes diagnosticados como indeterminados son derivados a cirugía, para obtener un diagnóstico definitivo.

Así, la sensibilidad para detectar CPT mediante el análisis citopatológico de la PAAF obtenida en nuestra serie resultó ser del 45%, ya que detectó 9 pacientes de CPT de un total de 20 (Tabla R2.3.2), fracasando en la detección de los 11 casos restantes (FN). La baja sensibilidad obtenida en nuestro estudio (45%), comparada con los valores descritos en la literatura, en torno al 90% (Gardiner *et al*, 1986; Altavilla *et al*, 1990; Caraway *et al*, 1993; Gharib & Goellner, 1993; Gharib *et al*, 1993; Hamburger, 1994; Burch *et al*, 1996; Baloch *et al*, 1998; Amrikachi *et al*, 2001; Arda *et al*, 2001; Blansfield *et al*, 2002; Yeh *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Mahar *et al*, 2006; Tee *et al*, 2007; Can & Peker, 2008; Peng & Wang, 2008; Polyzos *et al*, 2008), procede presumiblemente de que 71 de los 400 pacientes de la cohorte 1 (17,8%; Tabla R2.2.6) se sometieron finalmente a cirugía de tiroides por motivos clínicos (glándula tiroides con síntomas compresivos o infiltrativos, dolor, crecimiento rápido del nódulo tiroideo o independiente de terapia supresora), y no por la indicación citopatológica de la PAAF, hallándose 11 casos de CPT en estos pacientes (FN), que representan el 55% de los casos de CPT (11/20). En otros estudios, muy pocos pacientes con diagnóstico citopatológico de ausencia de malignidad/no valorable son sometidos a cirugía, y por tanto, no puede saberse con certeza el número total de FN. Las revisiones publicadas más extensas son la de 54415 casos de Tee y colaboradores (2007) y la de 6226 casos de Amrikachi y colaboradores (2001). En la primera, el porcentaje de pacientes sometidos a cirugía en las categorías no diagnósticas es del 11,6%, y en la segunda es del 1,9%. Considerando ambos estudios, el porcentaje combinado es del 10,6%, mientras que nosotros tenemos un seguimiento quirúrgico en estas categorías no diagnósticas de casi el doble de pacientes (17,8%).

Además, en nuestro estudio referimos los valores de S, E, etc. solamente a CPT, excluyendo otras neoplasias malignas, mientras que en la literatura se suele considerar la sensibilidad de la PAAF referida al conjunto total de neoplasias tiroideas malignas. En nuestro estudio, si consideramos la S de la PAAF para detectar el total de neoplasias malignas, sería del 51,7% (15/29; Tabla R2.2.4).

La citología mediante PAAF no discrimina nódulos tiroideos benignos de malignos hasta en el 30% de los casos (Caruso & Mazzaferri, 1991; Gharib & Goellner, 1993; Gharib *et al*, 1993; Gharib, 2004; Baloch *et al*, 2001; Yeh *et al*, 2004), y pueden aparecer tanto falsos negativos como resultados citológicos discordantes. Por tanto, sería de gran utilidad disponer de nuevos marcadores diagnósticos que incrementen la precisión preoperatoria, que distingan neoplasias tiroideas benignas de malignas, mejorando el desenlace del paciente y reduciendo el coste del cuidado óptimo proporcionado a los pacientes con nódulos tiroideos.

Se han propuesto varios genes como marcadores diagnósticos preoperatorios en PAAF, tanto moleculares (*braf*, *ras*, *ret/ptc*, *pax8/ppary*) como inmunohistoquímicos (galectinas, p27(KIP1), DAP4, tiroperoxidasa). Desafortunadamente, los datos procedentes de varios estudios muestran la limitación de estos marcadores, debido a la falta de especificidad, sensibilidad o ambas (Henry *et al*, 1994; González-Cámpora *et al*, 1998; Troncone *et al*, 2000; Giannini *et al*, 2003; Salvatore *et al*, 2004; Sapio *et al*, 2007^{a,b}; Bartolazzi *et al*, 2008; Shibru *et al*, 2008; Nikiforov *et al*, 2009).

La mutación BRAF^{T1799A} es la alteración genética más frecuente en cáncer de tiroides. Aparece en el 36-65% de los carcinomas papilares de tiroides en países occidentales (Davies *et al*, 2002^a; Cohen *et al*, 2003^b; Fukushima *et al*, 2003; Kimura *et al*, 2003; Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^c; Soares *et al*, 2003; Xu *et al*, 2003; Hayashida *et al*, 2004; Kroll, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Trovisco *et al*, 2004; Xing *et al*, 2004^b; Giordano *et al*, 2005; Xing, 2005^a; Xing *et al*, 2005). Su elevada frecuencia, combinada con la especificidad por el carcinoma papilar de tiroides, hace de la mutación BRAF^{T1799A} un atractivo marcador molecular para el diagnóstico del carcinoma papilar de tiroides. Además, la especificidad (un solo codón) y la naturaleza de la mutación (un cambio único de nucleótido) permiten su fácil detección desde un punto de vista técnico. Además, las mutaciones en *braf* pueden ser detectadas en ADN genómico procedente de citologías tiroideas (Cohen *et al*, 2003^b; Salvatore *et al*, 2004; Jin *et al*, 2006; Rowe *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2007^{a,b}).

Tal como se muestra en nuestro estudio, existe una correlación del 100% entre el resultado del estado de BRAF^{T1799A} en la citología de tiroides preoperatoria y en la pieza histológica procedente de la tiroidectomía (Tablas R1.5.1 y R2.2.4). Así, la mutación BRAF^{T1799A} puede detectarse de forma fiable en el material procedente de las citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF, proporcionando un resultado representativo del estado de la misma en el nódulo tiroideo puncionado. Constituye por consiguiente un método diagnóstico válido para la determinación del estado de la mutación en el nódulo tiroideo. Esta fiabilidad y representatividad, junto con la especificidad de BRAF^{T1799A} por carcinoma papilar/anaplásico, nos permite detectarla en citologías tiroideas obtenidas mediante PAAF con una especificidad del 100%, y un valor predictivo positivo para malignidad del 100%, tal como hemos demostrado en el grupo de pacientes en estudio de nódulo tiroideo (Tabla R2.3.1).

Una vez corroborado en la Fase 1 del estudio que la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} era específica de CPT, y detectable de manera fiable en citologías tiroideas obtenidas mediante PAAF, así como que su frecuencia en nuestra población de pacientes era suficientemente alta (46,4%; Tabla R1.3.1) como para suponer un aumento en la sensibilidad de la detección de CPT en citologías, en esta Fase 2 se procedió a determinar, de forma prospectiva, el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías tiroideas en la cohorte en estudio de nódulo tiroideo durante el periodo 2006-2007, para comprobar si este análisis era capaz de detectar CPT de forma preoperatoria.

La prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en nuestra población de estudio de nódulo tiroideo durante 2006-2007 es del 40% (8/20; Tabla R2.2.7), similar a la publicada por otros grupos de investigación en países occidentales (Davies *et al*, 2002^a; Cohen *et al*, 2003^b; Kimura *et al*, 2003; Hayashida *et al*, 2004; Kroll, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Xing *et al*, 2004^b; Giordano *et al*,

2005; Xing, 2005^a; Xing *et al*, 2005). De nuestros resultados se desprende que esta frecuencia es suficiente para que la inclusión de la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} de forma rutinaria en las citologías tiroideas aumente desde un 45% hasta un 60% la sensibilidad de la técnica citopatológica para la detección de CPT (Tabla R2.3.4). En países orientales, donde la mutación BRAF^{T1799A} presenta una frecuencia muy elevada (52-87%) en CPT (Kim *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^{b,c}), el valor diagnóstico de este análisis molecular se ve intensificado, ya que aumenta mucho más la sensibilidad de la citopatología tiroidea (Kim *et al*, 2010). Así, en un área geográfica como Corea, especialmente prevalente para la mutación BRAF^{T1799A} (83%), su determinación en citologías de tiroides alcanza una elevada precisión diagnóstica en nódulos indeterminados sólo con el análisis de BRAF^{T1799A} (19/25; 76%), con una sensibilidad y especificidad también muy altas (S: 78,6-83%; E: 80-96%), consiguiendo hasta un 22% del aumento de la sensibilidad (Chung *et al*, 2006; Kim *et al*, 2010).

En nuestro estudio, demostramos que la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides, por sí sola, puede detectar casos de CPT en un 1,8% de las punciones de los pacientes que se encuentran en estudio de nódulo tiroideo. Además, es capaz de cambiar la estrategia diagnóstica y terapéutica en un 0,7% de los casos (3/416; Tablas R2.2.2 y R2.2.3). El hallazgo de casos positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en citologías diagnosticadas como exentas de malignidad, que tras el análisis histopatológico se confirman como casos de carcinoma papilar implica que, en la actualidad, al menos un 0,7% de los pacientes que no presentan citologías con indicación quirúrgica (no valorable/negativo malignidad), y que son remitidos a seguimiento, en realidad presentan un carcinoma papilar de tiroides, que es fácilmente detectable mediante la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en sus citologías de tiroides, y que pueden ser “recuperados” con esta técnica. Estos pacientes no detectados por el diagnóstico citopatológico serían los sujetos directamente beneficiados por la implantación de la técnica en la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo. Este porcentaje, aparentemente pequeño, supone realmente el 27,3% de los falsos negativos a los que da lugar el diagnóstico citopatológico de la PAAF (3/11) (Tabla R2.2.7). Para algunos autores, el pequeño porcentaje detectado dentro del grupo de pacientes diagnosticados como “negativo malignidad” sería insuficiente para justificar el análisis rutinario de la mutación BRAF^{T1799A} para el diagnóstico de CPT en PAAF, y consideran más razonable reservar el análisis para mejorar el rendimiento diagnóstico en pacientes con citología “indeterminada o no valorable” (Tang & Lee, 2010). Sin embargo, con nuestro trabajo demostramos que el cribado de todas las categorías diagnósticas de la citología rinde el mayor beneficio en las no quirúrgicas, especialmente “negativo malignidad”, donde se detectaron 2 de los 3 falsos negativos. Otro argumento a favor de que la sensibilidad del análisis de la mutación BRAF^{T1799A} para el diagnóstico de CPT es limitada es que las muestras inadecuadas para el diagnóstico citológico podrían llevar a una insuficiente recuperación del ADN del tumor en las preparaciones de ácidos nucleicos, lo que podría conducir a resultados falsos negativos (Tang & Lee, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio demostramos que se puede detectar la mutación incluso en muestras no valorables, como es el caso de los falsos negativos detectados en la Fase 2 (Tabla R2.2.2) y en la serie quirúrgica de la Fase 1 (Tabla R1.5.1). En resumen, la incorporación de la determinación de BRAF^{T1799A} al análisis histopatológico en todas las citologías de tiroides reduciría en aproximadamente un 30% los falsos negativos que se producen en la actualidad.

Debido al elevado valor predictivo positivo de la mutación BRAF^{T1799A} (100%), lo que implica una muy baja posibilidad de falsos positivos para detectar CPT, como muestra nuestro estudio (Fase 1), y los de otros autores (Cohen *et al*, 2004; Hayashida *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Rowe *et al*, 2006; Salvatore *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2007²; Marchetti *et al*, 2009; Nikiforov *et al*, 2009; Zatelli *et al*, 2009), los 3 pacientes que presentaron citologías sin indicación quirúrgica (1 “no valorable” y 2 “negativo malignidad”, Tablas R2.2.2 y R2.2.4), pero resultaron positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en la citología de tiroides, de forma preoperatoria, fueron recomendados para ser intervenidos quirúrgicamente,

confirmándose el carcinoma papilar en los 3 casos. Por tanto, el diagnóstico molecular preoperatorio para detectar la mutación BRAF^{T1799A} puede, además de establecer el diagnóstico, ayudar a tomar decisiones terapéuticas tempranas relativas a la extensión de la cirugía, como un indicador de la necesidad de tiroidectomía total en lugar de lobectomía. En nuestro caso, al realizar la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} de forma preoperatoria sobre el material de la citología obtenida por el endocrinólogo en la rutina diagnóstica, conseguimos que los resultados positivos originen un cambio en el diagnóstico del paciente, y un beneficio en su tratamiento. En otros estudios, la mutación BRAF^{T1799A} se determina en el ADN de una citología obtenida por el cirujano en la sala de operaciones, tras la resección de la glándula tiroidea (Chung *et al*, 2006) o de forma retrospectiva en citologías de archivo (Cohen *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Nikiforov *et al*, 2006; Rowe *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2007^{a,b}; Marchetti *et al*, 2009). Además, nosotros hemos demostrado de esta manera que una citología obtenida de forma rutinaria contiene suficiente material genético para que pueda determinarse la mutación BRAF^{T1799A} de forma fiable y representativa del estado de la misma en el nódulo tiroideo del que proviene, sin necesidad de realizar ningún otro tipo de punción adicional, con lo que la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} podría suplementar el diagnóstico citopatológico de la PAAF sin variar la rutina operativa que va desde la toma de la muestra citológica hasta el diagnóstico de la misma, que actualmente se viene desarrollando en cualquier hospital.

En lo que se refiere a carcinoma papilar de tiroides, la relevancia diagnóstica de la mutación BRAF^{T1799A} en la rutina diagnóstica de las lesiones tiroideas es notable. Según nuestros resultados, la determinación de BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides es capaz de confirmar preoperatoriamente el diagnóstico de CPT en casos de “sospecha” citopatológica de CPT (que en nuestra cohorte 1 resultó ser 100%, Tablas R2.2.2 y R2.2.3). Además, es capaz de precisar el diagnóstico citopatológico, en al menos el 6% de los casos (2/32) de nódulos tiroideos “indeterminados”, en los que la citopatología es incapaz de distinguir entre neoplasia benigna o maligna (Tablas R2.2.2 y R2.2.3), lo que constituye la confirmación preoperatoria del 33,3% de los casos de CPT diagnosticados en la categoría citológica indeterminada (Tabla R2.2.7). La frecuencia de la mutación BRAF^{T1799A} en nódulos tiroideos con diagnóstico citológico indeterminado no está bien definida. Algunos estudios realizados en series pequeñas han revelado proporciones que varían de 1,7-16% (Cohen *et al*, 2004; Hayashida *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Xing *et al*, 2004^b; Chung *et al*, 2006; Rowe *et al*, 2006; Pizzolanti *et al*, 2007; Sapio *et al*, 2007^b; Nikiforov *et al*, 2009; Zatelli *et al*, 2009). Nosotros hemos demostrado en este estudio que la proporción de CPT en la categoría citológica indeterminada que se confirma por la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} es superior al 30%.

En total, la determinación de BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides puede identificar de forma preoperatoria y correctamente el 40,0% de los casos de CPT hallados en la cohorte en estudio del nódulo tiroideo, que es el número total de casos de CPT positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en este grupo, y por tanto, el máximo que esta técnica puede detectar (Tabla R2.2.7).

Por consiguiente, el establecimiento de la detección de la mutación BRAF^{T1799A} como herramienta complementaria en la determinación de malignidad en la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo perfecciona el diagnóstico preoperatorio de los nódulos tiroideos, no sólo en los casos de diagnóstico citopatológico indeterminado, sino también en los casos en los que la cantidad de células es insuficiente para la evaluación histopatológica, y en casos diagnosticados erróneamente como negativos para malignidad. El impacto clínico que puede tener la detección de estos falsos negativos de la citopatología puede ser bastante importante. Los sujetos cuyos tumores no son detectados mediante la citología previa sufren un retraso en el tratamiento, pueden presentar mayores proporciones de invasión capsular y vascular, y

tienen una mayor probabilidad de persistencia de la enfermedad durante el seguimiento (Yeh *et al*, 2004).

Es importante destacar que, en nuestro estudio, no hubo ningún caso de falsos positivos de la detección de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología. Todos los casos positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en la citología resultaron ser, tras la cirugía, casos de CPT positivos para BRAF^{T1799A}, independientemente de su diagnóstico citológico. En ningún caso, la mutación BRAF^{T1799A} fue positiva en patologías benignas como bocio o adenoma folicular, ni en tejido benigno circundante a la lesión.

Evidentemente, la sensibilidad del análisis de la mutación BRAF^{T1799A} para diagnosticar malignidad es limitada. Los resultados negativos que ocurren en ≈50% de los pacientes con CPT no pueden excluir la presencia de malignidad. Es decir, aproximadamente la mitad de todos los CPT no presentan la mutación, debido a que la frecuencia de la mutación BRAF^{T1799A}, tanto en nuestro grupo como en otros estudios (Davies *et al*, 2002^a; Cohen *et al*, 2003^b; Kimura *et al*, 2003; Hayashida *et al*, 2004; Kroll, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Xing *et al*, 2004^b; Giordano *et al*, 2005; Xing, 2005^a; Xing *et al*, 2005) no supera el 50% de los pacientes con CPT en países occidentales. La proporción es mucho mayor en tumores con citología indeterminada, que según algunos autores (Tang & Lee, 2010), son casos que habitualmente incluyen carcinomas foliculares de tiroides, no asociados a mutaciones oncogénicas en BRAF^{T1799A}, o variantes foliculares del CPT, en los que la frecuencia de la mutación BRAF^{T1799A} es menor (aunque esto último no afectaría en nuestro grupo de estudio, en el que la frecuencia de la mutación BRAF^{T1799A} es similar en CPT-clásico y CPT-VF; Tabla R3.2.1). Por otro lado, al igual que ocurre con el análisis citopatológico convencional, la determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF puede fallar en el caso de que el contenido de células tumorales del aspirado sea inadecuado (Cohen *et al*, 2004; Rowe *et al*, 2006; Puxeddu *et al*, 2008). De cualquier forma, es indudable que un resultado negativo del estado de la mutación BRAF^{T1799A} nunca puede excluir la malignidad del nódulo tiroideo.

Otros marcadores genéticos

Con objeto de mejorar la precisión de la biopsia de tiroides mediante PAAF, recientemente se han publicado varios estudios que evalúan la utilidad clínica del análisis de las alteraciones genéticas más frecuentes encontradas en cáncer de tiroides de origen folicular (Tabla D2.2). Esta cuestión es importante, porque como se ha comentado anteriormente, hasta el 30% de las citologías tiroideas de PAAF resultan ser indeterminadas, sospechosas o no diagnósticas. Varios investigadores han sugerido que el análisis molecular de mutaciones en los oncogenes y genes supresores de tumores más frecuentes mejora la precisión diagnóstica de la biopsia de tiroides mediante PAAF y del análisis citopatológico (Cohen *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Nikiforov *et al*, 2006; Rowe *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2007^{a,b}; Marchetti *et al*, 2009; Nikiforov *et al*, 2009; Zatelli *et al*, 2009).

La mutación BRAF^{T1799A} ha sido la alteración genética estudiada más extensamente, debido a que es la más frecuente en CPT, el cual representa la mayoría de los cánceres de tiroides (Tabla D2.2). El análisis de la mutación BRAF^{T1799A} confirmó el diagnóstico de CPT en 16-42% de citologías interpretadas como indeterminadas o no diagnósticas (Cohen *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Rowe *et al*, 2006) en estos estudios.

Uno de los primeros trabajos que intentaron averiguar la utilidad del análisis de marcadores genéticos en la citología de tiroides analiza retrospectivamente la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en PAAF para la determinación preoperatoria de CPT. Estos autores detectaron un 72% (18/25) de pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en las citologías diagnosticadas como malignas, y un 16% (5/32) en las indeterminadas (Cohen *et al*, 2004).

Tabla D2.2. Estudios recientes realizados para mejorar la precisión diagnóstica de la Citopatología mediante la incorporación de marcadores genéticos.

Autor	Año	N		Diseño	Mutaciones genéticas	Positivos por Categorías Citológicas			
		PAAF	Cirugía			CPT	IND	NM	NV
Cohen <i>et al.</i>	2004	91	91	Retro	<i>braf</i>	18/25	5/32	--	--
Salvatore <i>et al.</i>	2004	96	96	Retro	<i>braf</i> <i>ret/ptc1 ret/ptc3</i>	22/54 5/33	4/11 0/11	--	0/4 1/4
Rowe <i>et al.</i>	2006	24	24	Retro	<i>braf</i>	--	3/19	--	--
Chung <i>et al.</i>	2006	137	137	Retro	<i>braf</i>	??	4/25	??	??
Sapio <i>et al.</i>	2007 ^b	132	50	Prosp	<i>braf</i> <i>ret/ptc1 ret/ptc3</i> <i>trk</i>	--	4/37 1/37	0/48 0/48 0/48	0/46 0/46 0/46
Nikiforov <i>et al.</i>	2006	437	??	Prosp	<i>braf</i> <i>ret/ptc</i> <i>ras</i> <i>pax8/ppary</i>	5/48		2/??	3/??
Nikiforov <i>et al.</i>	2009	470	141	Prosp	<i>braf</i> <i>ret/ptc</i> <i>ras</i> <i>pax8/ppary</i>	10/22 3/22	7/52 2/52 5/52 1/52	1/12 3/12	--
Sapio <i>et al.</i>	2007 ^a	47	47	Retro	<i>braf</i> Galectina-3	--	9/47 23/47	--	--
Marchetti <i>et al.</i>	2009	111	111	Retro	<i>braf</i>	41/55	18/52	0/1	--
Zatelli <i>et al.</i>	2009	469	166	Prosp	<i>braf</i>	41/63	1/89	6/308	--

Retro: Retrospectivo

Prosp: Prospectivo

Categorías Citológicas: Diagnóstico de CPT (CPT); Indeterminado (IND); Negativo Malignidad (NM); No Valorable (NV)

?: Dato no proporcionado

--: Categoría citológica no analizada

El mismo año, otro estudio retrospectivo destaca la posible aplicación del análisis de la mutación BRAF^{T1799A} y los reordenamientos RET/PTC en citologías y tejido de 96 pacientes sometidos a cirugía con una PAAF previa (Salvatore *et al.*, 2004). La detección conjunta de estos marcadores fue capaz de detectar el 56% de los CPT de este grupo (BRAF: 38%; 26/69 + RET/PTC: 18%;6/33), con un 34% de redefinición del diagnóstico en muestras citológicas indeterminadas o insuficientes (Tabla D2.2).

Sin embargo, ninguno de estos dos grupos (Salvatore *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2004) fue capaz de detectar casos positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en las citologías diagnosticadas como “benignas”, al contrario de lo que ocurre en nuestro estudio, en el que 3 pacientes del grupo de seguimiento de nódulo tiroideo fueron correctamente re-clasificados como casos de CPT (2 casos dentro del grupo de citologías benignas y un caso en una citología no valorable).

En 2006, Rowe y colaboradores intentaron determinar la utilidad de la detección de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides “indeterminadas”, siendo capaces de confirmar el diagnóstico de CPT en el 15,8% (3/19) de los casos (Rowe *et al.*, 2006), mientras en nuestro estudio, el porcentaje de casos indeterminados que son detectados por el análisis de BRAF^{T1799A} es del 33,3% (2/6) (Tabla R2.2.7). Ese mismo año, Chung y colaboradores (2006) realizan la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías obtenidas en quirófano a 137 pacientes, obteniendo un aumento de la detección de CPT en muestras indeterminadas.

Como las alteraciones genéticas más frecuentes son mutuamente excluyentes, es de suponer que las mutaciones *braf*, *ret/ptc*, *nrk*, *ras* y *pax8-ppary* estarán presentes en aproximadamente el 90% de todos los cánceres tiroideos de origen folicular. Por lo tanto, el análisis combinado de estos cambios genéticos debería resultar en mayores proporciones de mejora de la precisión de la citopatología. Recientemente, Sapio y colaboradores llevaron a cabo un estudio prospectivo para el análisis de las mutaciones de *braf* y los reordenamientos *ret/ptc1*, *ret/ptc3* y *nrk*, encontrando que un diagnóstico de cáncer de tiroides puede ser

confirmado en el 25% (5/16) de los pacientes con citología sospechosa para CPT (Sapio *et al*, 2007^b). En este caso, la mayor parte de la detección de CPT se debe a la mutación BRAF^{T1799A} (80% de los pacientes con CPT; 4/5). Estos autores tampoco encuentran pacientes positivos para las diferentes alteraciones genéticas en el grupo de nódulos tiroideos diagnosticados como benignos o insuficientes, por lo que realmente no se modifica la orientación diagnóstica de ningún paciente (Tabla D2.2).

El valor diagnóstico predictivo del análisis de *ras* y *pax8-ppary* no está tan claro, debido a que estas alteraciones también pueden aparecer en tumores tiroideos benignos. En un estudio prospectivo de 328 muestras citológicas de PAAF de tiroides de 470 pacientes, el análisis combinado de las mutaciones *braf*, *ret/ptc*, *ntrk*, *ras* y *pax8-ppary* mostró la presencia de 32 mutaciones (18 BRAF^{T1799A}, 4 *ret/ptc1*, 1 *ret/ptc3*, 5 *Nras61*, 3 *Hras61*, 1 *pax8-ppary*) (Nikiforov *et al*, 2009). La presencia de estas mutaciones permitió la reclasificación del diagnóstico de la PAAF a malignidad en 24 casos (15 indeterminados, 4 benignos). Según este estudio, se incrementa la precisión diagnóstica de la citología por PAAF, particularmente en la categoría indeterminada, ya que el 97% de los nódulos positivos para alguna mutación resultaron finalmente malignos. Sólo se describe 1 caso de falso positivo, concretamente un adenoma folicular que resultó ser positivo para *Hras61*. Sin embargo, los autores excluyen del análisis un caso adicional de un paciente positivo para *ret/ptc3*, identificado en una glándula con varios nódulos, por la dificultad en correlacionar el estado del gen en la citología con el de la histopatología, inconveniente que no encuentran al considerar como verdaderos negativos a pacientes con microcarcinoma papilar, debido a que tenían la seguridad de haber aspirado los nódulos de mayor tamaño, que resultaron benignos. Más aún, en una publicación anterior de la misma serie, en la que se incluían 437 pacientes (371 citologías), estos autores habían descrito el caso positivo para *ret/ptc3*, excluido de este análisis, como un “nódulo hiperplásico con atipia”, y además presentaban otro caso de falso positivo para *Nras61* en un adenoma folicular, habiendo encontrado en total 18 casos positivos para las diferentes mutaciones (12 BRAF^{T1799A}, 3 *ret/ptc1*, 2 *ret/ptc3*, 1 *nras*), (Nikiforov *et al*, 2006).

Aunque los resultados de este trabajo parecen ser más impactantes que los de nuestro estudio, debido a la combinación de marcadores genéticos, con un número equivalente de pacientes y nódulos tiroideos analizados, hay que destacar que realmente, de las 31 lesiones malignas detectadas en el estudio de Nikiforov, la mayor parte (18/31; 58,1%) corresponden a casos detectados por la mutación BRAF^{T1799A}, y de los marcadores genéticos analizados, sólo BRAF^{T1799A} y *ret/ptc1* fueron específicos de malignidad, mientras que *ras* y *ret/ptc3* dieron lugar a falsos positivos en 2 casos de adenoma folicular y un nódulo hiperplásico con atipia (Nikiforov *et al*, 2006; Nikiforov *et al*, 2009). Por tanto, la adición de *ras*, lo que equivale a analizar 2 codones (12/13 y 61) en 3 genes (N, H, K), sólo incrementa la sensibilidad en un 22,6% (7/31), mientras que hace disminuir la especificidad. La incorporación de *ret/ptc1*, aunque aumenta la sensibilidad en un 12,9% (4/31) sin alterar la especificidad del 100%, presenta el problema potencial de la necesidad de aislar ARN de una calidad aceptable en las muestras citológicas, mientras que la determinación de BRAF^{T1799A} es una técnica muy sencilla y de fácil aplicación en la rutina diagnóstica, ya que tratarse de 1 mutación puntual y se realiza sobre ADN genómico. El valor de la inclusión de *ret/ptc3* no está muy claro, con un aumento de la sensibilidad del 3,2% (1/31) y un más que probable falso positivo.

Dos estudios más recientes han mostrado que la combinación de la citopatología convencional junto con el análisis de la mutación BRAF^{T1799A} en muestras citológicas mejora la detección de CPT en la categoría indeterminada, con un 34,6% (18/52) de confirmación de casos indeterminados (Marchetti *et al*, 2009) y en la benigna, con un 2% de casos rescatados dentro de esta categoría (Zatelli *et al*, 2009). El estudio de Marchetti y colaboradores (2009) sólo incluye pacientes con diagnóstico en la citología de sospecha/certeza de CPT o indeterminado. Nuestro estudio, con número equivalente de pacientes y citologías analizadas, presenta como

ventaja frente a éstos que se ha analizado la población completa en estudio de nódulo tiroideo mediante PAAF, incluyendo pacientes con diagnóstico citológico benigno y no valorable, lo que proporciona una idea más real del beneficio que se puede obtener al aplicar esta técnica a toda la población sometida a PAAF. En el estudio de Zatelli y colaboradores (2009), se seleccionan solamente los pacientes con hallazgo de características ecográficas sospechosas de malignidad (nódulos iso/hipoecoicos con márgenes sombreados con/sin microcalcificaciones), que se presentaron sólo en el 67,5% de las lesiones benignas, lo que hace que la prevalencia hallada por estos autores (64%) sea superior a la descrita para países occidentales (Davies *et al*, 2002^a; Cohen *et al*, 2003^b; Kimura *et al*, 2003; Hayashida *et al*, 2004; Kroll, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Xing *et al*, 2004^b; Giordano *et al*, 2005; Xing, 2005^a; Xing *et al*, 2005). En nuestro estudio, por el contrario, se puncionaron todos los nódulos tiroideos mayores de 15 mm si eran solitarios, y el más representativo de dicho tamaño si había varios nódulos, independientemente de sus hallazgos ecográficos. De ahí que el número de pacientes localizados en la categoría benigna sea mayor en su caso, ya que, aunque fueron clasificados como benignos, esos nódulos presentaban de base otras características de malignidad que no están presentes en todos nuestros casos de la categoría benigna.

Otra posibilidad que también ha sido explorada en la literatura para aumentar la sensibilidad de la PAAF ha sido la combinación de marcadores genéticos con inmunohistoquímicos, como es el caso de la galectina-3 (Sapio *et al*, 2007^a). En 2007, Sapio y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo, incorporando el análisis de la mutación BRAF^{T1799A} y la expresión de galectina-3 en nódulos indeterminados, mostrando que la combinación de ambos marcadores mejora S, E, VPP y VPN de la citopatología. Sin embargo, la mayor parte de los CPT diagnosticados de esta forma corresponden a positivos de BRAF^{T1799A} (9/20; 45%), y la positividad de galectina-3 no implica malignidad (6/23; 26,1% pacientes con patología benigna resultaron positivos para galectina-3), es decir, no es un marcador específico de malignidad.

Por tanto, la mutación BRAF^{T1799A} constituye en la actualidad el único marcador genético capaz de cambiar el diagnóstico de una citología tiroidea desde benignidad a certeza de carcinoma papilar de tiroides. Debido al 100% de especificidad de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} para carcinoma papilar de tiroides, el análisis molecular de esta mutación podría ser usado para la toma de decisiones clínicas. Sin embargo, a causa de que la ausencia de esta alteración genética no excluye la presencia de cáncer tiroideo, no puede erigirse como una prueba diagnóstica única, aunque sí como una técnica complementaria en la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo.

FASE 3. ASOCIACIÓN DE LA PRESENCIA DE LA MUTACIÓN BRAF^{T1799A} CON UN FENOTIPO MÁS AGRESIVO DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES

Prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en CPT.

La mutación BRAF^{T1799A} representa la alteración genética más frecuente implicada en la patogénesis del CPT esporádico. Existe un consenso general a su restricción a CPT bien diferenciado y pobremente diferenciado, o a carcinomas anaplásicos de tiroides originados de carcinomas papilares pre-existentes (Xing, 2005^a; Ciampi & Nikiforov, 2005). Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a la frecuencia global de la forma mutada de BRAF^{T1799A} (29-83%) (Xing, 2005^a; Fugazzola *et al*, 2006), su prevalencia en las variantes histológicas específicas del CPT, y su relación con los parámetros clinicopatológicos de mal pronóstico (Xing, 2005^a; Ciampi & Nikiforov, 2005). Aunque es complejo explicar tal falta de consistencia, es posible que los diferentes enfoques, así como los diferentes factores de confusión hayan jugado un papel importante en esta variabilidad de resultados. Algunas posibles explicaciones incluyen el diseño específico del estudio, la sensibilidad de la técnica de detección de la mutación, un sesgo en la selección de pacientes, tamaño de la muestra, heterogeneidad intratumoral (no sólo el patrón de crecimiento, sino también contaminación de tejido tumoral y del estado de la mutación), diferentes criterios diagnósticos, composición de histotipos en las series publicadas, y diferencias en el manejo clínico del paciente. En nuestro caso, recogimos todos los pacientes disponibles en el periodo 1998-2007 en el HUVN, así como los sometidos a cirugía de la cohorte en estudio de nódulo tiroideo hasta el 1 de septiembre de 2008, por lo que la composición de nuestra serie es representativa de la población de referencia.

Es obvio que la minuciosidad en la toma de muestras tumorales puede influir no sólo en la clasificación histológica de la variante del carcinoma papilar, sino también en las características patológicas, como la multifocalidad, extensión extratiroidea, etc., de importantes consecuencias en el pronóstico. Asumiendo la inevitable mezcla de fibras papilares notablemente fibro-vasculares en el CPT clásico, la detección de la mutación BRAF^{T1799A} claramente depende de los métodos de detección usados con más frecuencia. Este umbral de detección se hace mayor si las mutaciones en *braf* no se encuentran presentes en todas las células tumorales (Sensi *et al*, 2006), o en todos los focos tumorales, como se ha demostrado recientemente (Park *et al*, 2006; Cañadas *et al*, 2008; Lin *et al*, 2008). En nuestro caso, la obtención de muestras en microcarcinomas papilares conservados en parafina se realizó con una aguja de 0,6 mm, para asegurar el contenido de células tumorales a la hora de determinar la mutación BRAF^{T1799A}. Aunque el 90% de las mutaciones en *braf* que se encuentran en CPT corresponden a la transversión T1799A, se han descrito otras mutaciones en este gen (Trovisco *et al*, 2004; Oler *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Carta *et al*, 2006; Castro *et al*, 2006; Brzezińska *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Barzon *et al*, 2008; De Falco *et al*, 2008). Así, para evitar perder mutaciones fuera del punto caliente, y asegurar el tipo de mutación en cada caso, aplicamos dos métodos de detección (RFLP y secuenciación), que permiten la detección de sustituciones simples de nucleótidos en cualquier posición.

En nuestro estudio, de los 106 pacientes con CPT incluidos, 50 resultaron positivos para la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tejido tumoral procedente de la tiroidectomía (Tabla R3.2.1), correspondiendo por tanto a una prevalencia de 47,2% (IC_{95%}: 37,5-56,8).

Nuestra prevalencia (47,2%) es prácticamente idéntica a la prevalencia media mundial (47,3%; Tabla D3.1), y comparable con otros estudios, en particular los desarrollados en pacientes españoles, en el que la mutación BRAF^{T1799A} fue detectada en el 47,4% de los carcinomas papilares de tiroides (Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Costa *et al*, 2008).

Tabla D3.1. Prevalencia mundial de la mutación BRAF ^{V1799A} en CPT.									
ESTUDIO	BRAF ^{V1799A}			BRAF ^{V1799A}			IC _{95%}	PAÍS	
	+	N	%	+	N	%			
Abubaker <i>et al</i> , 2008	153	296	51,7	153	296	51,7	---	Arabia Saudí	
Oler <i>et al</i> , 2005	5	8	62,5	63	128	49,2	49,1-49,4	Brasil	
Oler <i>et al</i> , 2009	58	120	48,3						
Jo <i>et al</i> , 2006	102	161	63,4	496	776	63,9	63,9-64,0	Corea	
Kim <i>et al</i> , 2004	58	70	82,9						
Kim <i>et al</i> , 2005 ^a	64	79	81,0						
Kim <i>et al</i> , 2005 ^b	31	60	51,7						
Kim <i>et al</i> , 2006 ^c	149	203	73,4						
Kim <i>et al</i> , 2006 ^d	34	103	33,0						
Lee <i>et al</i> , 2006	58	100	58,0						
Guan <i>et al</i> , 2009	387	559	69,2	424	625	67,8	67,8-67,9	China	
Zhu <i>et al</i> , 2005	37	66	56,1						
Adeniran <i>et al</i> , 2006	39	92	42,4	627	1371	45,7	45,7-45,7	EE UU	
Cohen <i>et al</i> , 2003 ^b	24	35	68,6						
Cohen <i>et al</i> , 2004	36	95	37,9						
Kebebew <i>et al</i> , 2007	133	274	45,7						
Kimura <i>et al</i> , 2003	28	78	35,9						
Nikiforova <i>et al</i> , 2003 ^a	45	118	38,1						
Penko <i>et al</i> , 2004	97	232	41,8						
Vasko <i>et al</i> , 2005	21	33	63,6						
Xing, 2005 ^a	37	65	56,9						
Xing <i>et al</i> , 2004 ^a	18	30	60,0						
Xing <i>et al</i> , 2004 ^b	8	16	50,0						
Xing <i>et al</i> , 2004 ^c	14	28	50,0						
Xing <i>et al</i> , 2005	106	219	48,4						
Xu <i>et al</i> , 2003	21	56	37,5						
Costa <i>et al</i> , 2008	27	49	55,1	55	116	47,4	47,3-47,6	España	
Riesco-Eizaguirre <i>et al</i> , 2006	28	67	41,8						
Porra <i>et al</i> , 2005	38	61	62,3	38	61	62,3	---	Francia	
Smyth <i>et al</i> , 2005	13	34	38,2	13	34	38,2	---	Irlanda	
Barzon <i>et al</i> , 2008	39	83	47,0	704	1810	38,9	38,9-38,9	Italia	
Elisei <i>et al</i> , 2008	38	102	37,3						
Frasca <i>et al</i> , 2008	125	323	38,7						
Frattini <i>et al</i> , 2004	19	60	31,7						
Fugazzola <i>et al</i> , 2004	18	56	32,1						
Fugazzola <i>et al</i> , 2006	99	260	38,1						
Lupi <i>et al</i> , 2007	214	500	42,8						
Puxeddu <i>et al</i> , 2004	24	60	40,0						
Romei <i>et al</i> , 2008	28	78	35,9						
Salvatore <i>et al</i> , 2004	26	69	37,7						
Sapio <i>et al</i> , 2006	19	43	44,2						
Trovisco <i>et al</i> , 2005	55	176	31,3						
Fukushima <i>et al</i> , 2003	40	76	52,6						398
Hayashida <i>et al</i> , 2004	37	72	51,4						
Ito <i>et al</i> , 2009	242	631	38,4						
Nakayama <i>et al</i> , 2007	26	40	65,0						
Namba <i>et al</i> , 2003	49	170	28,8						
Sedliarou <i>et al</i> , 2004	4	15	26,7						
Brzezianska <i>et al</i> , 2007	12	25	48,0	17	38	44,7	44,4-45,1	Polonia	
Wojciechowska <i>et al</i> , 2006	5	13	38,5						
Domingues <i>et al</i> , 2005	4	11	36,4	74	191	38,7	38,7-38,8	Portugal	
Soares <i>et al</i> , 2003	23	50	46,0						
Soares <i>et al</i> , 2004	2	6	33,3						
Trovisco <i>et al</i> , 2004	45	124	36,3						
Sedliarou <i>et al</i> , 2004	9	31	29,0	64	122	52,5	52,1-52,8	Rusia	
Vasil'ev <i>et al</i> , 2004	55	91	60,4						
Perren <i>et al</i> , 2004	7	15	46,7	7	15	46,7	---	Suiza	
Liu <i>et al</i> , 2005	49	105	46,7	49	105	46,7	---	Taiwan	
Lima <i>et al</i> , 2004	27	84	32,1	89	226	39,4	39,3-39,5	Ucrania-BR	
Nikiforova <i>et al</i> , 2004 ^a	30	82	36,6						
Powell <i>et al</i> , 2005	18	32	56,3						
Xing <i>et al</i> , 2004 ^c	14	28	50,0						
				3271	6918	47,3	47,3-47,3	TOTAL	

En estos estudios se observa un rango de variación para la prevalencia global de la mutación BRAF^{T1799A} entre 26,7-82,9%, con una media de 47,3% (3271/6918). La amplitud de este rango es probablemente debida a la heterogeneidad de las variantes histológicas de CPT incluidas, factores epidemiológicos o de la edad del grupo analizado. Los valores más altos se han descrito en países asiáticos, como China y Corea. Agrupando los casos originarios del mismo país, se obtiene que la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} varía entre 38,2% (Irlanda) y 67,8% (China).

El estudio de Fugazzola y colaboradores (2006) recoge la prevalencia de BRAF^{T1799A} según el país de origen. Agrupando todos los datos de las diferentes cohortes, Fugazzola calcula una prevalencia de 39,6% (845/2129 casos), similar a la observada en su propia serie (38%), lo que indica una prevalencia de BRAF^{T1799A} en CPT de aproximadamente 38-40%. En la revisión de Xing (2005^a), la prevalencia calculada a partir de una serie de 29 estudios previos es del 44% (810/1856), mientras que en el meta-análisis de Lee y colaboradores, que incluye 12 estudios, se muestra una prevalencia del 49% (570/1168) (Lee *et al*, 2007). Aunque se ha propuesto que las variaciones en la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en distintas comunidades étnicas podrían ser debidas a diferencias genéticas entre razas, los pocos trabajos que abordan esta cuestión, como son el meta-análisis de Lee (Lee *et al*, 2007), y el estudio de Sedliarou y colaboradores (2004), no encuentran asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y el origen étnico de los pacientes (caucasiano/asiático), por lo que el origen de estas diferencias aún no está claro. El factor más importante, probablemente, para esta diferencia, es que muchos estudios no han estratificado por subtipo de CPT.

De acuerdo con previas observaciones, la mutación BRAF^{T1799A} se encuentra comúnmente asociada con carcinomas papilares de tiroides que muestran arquitectura papilar (CPT-Clásico, CPT-Células Altas, CPT-Warthin, microCPT), con una frecuencia que oscila entre 29-83% (Fugazzola *et al*, 2004; Ciampi & Nikiforov, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Xing, 2005^a; Xing *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2005; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Lupi *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Frasca *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009). La prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} es especialmente elevada (55-100%) en la variante más agresiva del CPT, la de células altas (Xing *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2005; Lupi *et al*, 2007), mientras que es relativamente baja (7-25%) en la variante folicular (Nikiforova *et al*, 2003^a; Fugazzola *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Trovisco *et al*, 2004; Trovisco *et al*, 2005; ; Xing, 2005^a; Xing *et al*, 2005; Castro *et al*, 2006; Fugazzola *et al*, 2006; Giannini *et al*, 2007; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Kebebew *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009). El meta-análisis de Lee y colaboradores (2007) confirma que la mutación BRAF^{T1799A} se asocia con el subtipo histológico de CPT, siendo más prevalente en los subtipos clásico (frecuencia: 59,1%; OR: 3,521) y de células altas (frecuencia: 79,1%; OR: 4,319), que en la variante folicular (frecuencia: 16,9%; OR: 0,153), lo que indica que esta mutación se encuentra asociada con el patrón de crecimiento papilar.

Los tumores con variantes histológicas generalmente consideradas más agresivas (con más metástasis y recidiva), como células altas, oncócica y variante sólida (Akslen & LiVolsi, 2000; DeLellis, 2006; Ghossein *et al*, 2007), presentan un porcentaje de mutaciones en BRAF^{T1799A} relativamente alto (Frattini *et al*, 2004; Xing *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007). En nuestra serie, esto se confirma para el caso de la variante de células altas (CPT-CA), ya que la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} se puso de manifiesto en el 100% (2/2) de los pacientes analizados, frente a un porcentaje del 54,0 % (27/50) en la variante clásica (Tabla R3.2.1). No es así en lo que se refiere a la variante sólida (CPT-ST), pues el único caso analizado resultó negativo para la mutación BRAF^{T1799A}, aunque no podemos descartar que esto se deba al limitado número de casos analizados de estas variantes más raras (7/106; Tabla R3.2.1).

Nuestro estudio incluye además un paciente con la variante de células claras; que resultó positiva para la mutación. Hasta el momento, no se ha descrito la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en esta variante de CPT.

Algunos autores reivindican que la asociación observada de la mutación BRAF^{T1799A} con la morfología papilar refleja probablemente las distintas proporciones de CPT-VF analizadas con respecto a la variante clásica (Xing *et al*, 2005). En un estudio más reciente, se examina la fuerza de la asociación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y la morfología papilar mediante el análisis de ésta en prácticamente el mismo número de CPT-Clásicos y CPT-VF; de forma notable, la mutación BRAF^{T1799A} se reveló asociada significativamente con la variante clásica (Costa *et al*, 2008). Más aún, la caracterización morfológica detallada de los 49 carcinomas papilares de tiroides en el estudio de Costa y colaboradores identificó una asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y la aparición de focos de células altas dentro de los carcinomas papilares de tiroides clásicos o mixtos (Costa *et al*, 2008). Este hallazgo enfatiza la importancia de la extensión de la muestra tumoral a la hora de establecer las correlaciones genotipo-fenotipo en carcinomas papilares de tiroides, que rara vez son tumores monomórficos. Curiosamente, la variante alta del CPT muestra la mayor proporción de mutaciones en *braf* documentada (Ciampi & Nikiforov, 2005; Xing, 2005^a). Estos resultados sugieren que posiblemente otros factores de confusión, diferentes del número de CPT-VF incluido en cada serie, pueden influir en la falta de consistencia entre publicaciones acerca de la asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y la arquitectura papilar en carcinomas papilares de tiroides de adultos. En resumen, estos datos indican que la mutación BRAF^{T1799A} juega un papel más importante en la oncogénesis de las variantes clásica y de células altas que en la variante folicular.

En el presente estudio, las variantes clásica y folicular (CPT-VF) presentaron la mutación BRAF^{T1799A} en aproximadamente el mismo porcentaje (27/50; 56,3% y 9/16; 54,0%, respectivamente; Tabla R3.2.1), al contrario de lo que ocurre en otros estudios. Se debe tener en cuenta que el número de CPT-VF incluidos es considerablemente inferior al de la variante clásica. Nuestro estudio es, probablemente, el que mayor porcentaje de pacientes con variante folicular positivos para la mutación BRAF^{T1799A} presenta, ya que las frecuencias más elevadas en esta variante histológica que se pueden encontrar en la literatura oscilan entre 35-42% (Sapio *et al*, 2006; Costa *et al*, 2008). Como consecuencia de la elevada prevalencia hallada en CPT-VF, nosotros no encontramos asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y el subtipo histológico.

Lee y colaboradores indican en su meta-análisis que la importancia diagnóstica de la mutación BRAF^{T1799A} puede ser limitada, debido a la dificultad diagnóstica que puede originarse, especialmente en el caso de la variante folicular del CPT. Morfológicamente, el diagnóstico diferencial entre un CPT variante folicular y un tumor folicular a menudo es complicado. Según estos autores, debido a que en la variante folicular la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} es baja, su utilidad como marcador diagnóstico puede ser limitada (Lee *et al*, 2007). Sin embargo, atendiendo a nuestros datos, la importancia/utilidad diagnóstica de la mutación BRAF^{T1799A} sería la misma en ambos subtipos del CPT, ya que la prevalencia de esta alteración genética en nuestros pacientes con variantes clásica y folicular es la misma (Tabla R3.2.1).

En cuanto a la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en microcarcinoma papilar, en nuestra serie encontramos una frecuencia de 33,3% (11/33) (Tabla R3.2.1), concordante con el rango observado en estudios previos (18-52%) (Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Trovisco *et al*, 2005; Lupi *et al*, 2007; Ugolini *et al*, 2007; Lee *et al*, 2009).

3.1. Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con las características clínicas e histopatológicas del carcinoma papilar de tiroides. Se estudiará la relación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con las características clínicas (edad, sexo) e histopatológicas (metástasis, invasión extratiroidea, capsular o vascular, multifocalidad, etc. VER METODOLOGÍA Apartado 3.6.2) de alto riesgo relevantes en el pronóstico del carcinoma papilar de tiroides en los pacientes diagnosticados en el HUVN durante el período 1998-2008.

Aunque los pacientes con CPT generalmente responden favorablemente y presentan un buen pronóstico, aproximadamente el 10-15% de los casos no son curados por el tratamiento inicial (tiroidectomía total y ablación post-quirúrgica de restos tiroideos con ¹³¹I). Muchos desarrollan recidiva y algunos incluso mueren de esta enfermedad (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Schlumberger, 1998; Sherman *et al*, 1998).

Se han descrito varios factores pronósticos para la identificación temprana de este pequeño, aunque no insignificante, porcentaje de pacientes de CPT (Byar *et al*, 1979; DeGroot *et al*, 1990; Hay *et al*, 1993; Mazzaferri & Jhiang, 1994; Schlumberger, 1998). Una edad avanzada, género masculino, mayor tamaño tumoral, invasión extratiroidea, multicentricidad, metástasis distantes y metástasis en nódulos linfáticos predicen una mayor proporción de recidiva tumoral, y probablemente sean los principales determinantes de un mal desenlace en pacientes con CPT (Cunningham *et al*, 1990; Mazzaferri & Jhiang, 1994; Schlumberger, 1998; Schlumberger & Pacini, 1999; Mazzaferri & Kloos, 2001; Ronga *et al*, 2002; Ward & Assumpção, 2004; Durante *et al*, 2006).

Aunque algunas de estas características clásicas se han asociado de forma consistente con un mal pronóstico, la disponibilidad de nuevos marcadores genéticos informativos, como los reordenamientos RET/PTC, la familia de genes *ras*, y más recientemente, la mutación BRAF^{T1799A}, la alteración genética más frecuente en carcinoma papilar esporádico (Xing, 2005^a), ofrece la posibilidad de mejorar la estratificación del riesgo, la predicción de recidiva y el riesgo de muerte por enfermedad en los pacientes con CPT. Entre todos los marcadores candidatos, la mutación en BRAF^{T1799A} ha sido descrita como uno de los marcadores moleculares más efectivos para predecir el desenlace clínico en CPT, aunque existe una gran controversia en los estudios publicados con respecto a la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con las características de alto riesgo del CPT.

En general, se puede afirmar que estudios con un tamaño muestral relativamente grande demuestran una asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y algún parámetro clinicopatológico (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Kebebew *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007), mientras que aquéllos con muestras más pequeñas no lo hacen (Puxeddu *et al*, 2004; Fugazzola *et al*, 2004). Sin embargo, un estudio que analizaba el estado de la mutación BRAF^{T1799A} en un elevado número de tumores benignos y malignos de tiroides no mostró asociación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con características tumorales de alto riesgo (Trovisco *et al*, 2005), debido probablemente a que se analizó dentro de cada subgrupo de variante de CPT, donde los tamaños de muestra eran relativamente pequeños. El análisis multivariante realizado en el estudio de Xing y colaboradores (2005) sugiere que la inconsistencia entre diferentes estudios en lo referente a la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con parámetros clinicopatológicos, puede deberse no sólo a diferencias en el tamaño de muestra, sino que puede haber implicados otros factores de riesgo confusores, en especial las diferentes composiciones de los subtipos de CPT, lo que particularmente afectaría a las series que no han ajustado por estos factores de riesgo al realizar el análisis estadístico.

En nuestra serie se han analizado 106 pacientes con CPT. Al recoger todos los pacientes disponibles en el período de estudio, se representan fielmente las características clínicas e histopatológicas de los pacientes diagnosticados de CPT en nuestro hospital. La frecuencia de distribución de hallazgos patológicos (tamaño tumoral, metástasis nodulares, estadio,

multifocalidad, etc.) se encuentra en consonancia con otros grandes estudios publicados (Hundahl *et al*, 1998; Hundahl *et al*, 2000). De hecho, la edad media en el momento del diagnóstico, la relación hombre/mujer, el tamaño tumoral medio, multifocalidad, prevalencia de metástasis ganglionares durante el seguimiento y metástasis distantes en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento, la recidiva y la estadificación tumoral se encuentran dentro de los rangos registrados en las mayores series de carcinomas papilares de tiroides (Rosai *et al*, 1992; Vini & Harmer, 2002; Rouxel *et al*, 2004). El número de muestras procesadas por tumor, el manejo clínico uniforme de los pacientes (tratados por el mismo equipo) y el prolongado seguimiento (mediana de seguimiento de 64 meses; Figura R3.1.9B) son un argumento en contra de cualquier desviación asimétrica de la recogida de datos clinicopatológicos.

Muchos estudios han investigado la relación de la mutación BRAF^{T1799A} con las características clinicopatológicas del CPT (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xu *et al*, 2003; Fugazzola *et al*, 2004; Kim *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^{a,b}; Liu *et al*, 2005; Powell *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Fugazzola *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^{b,c,d}; Lee *et al*, 2006; Park *et al*, 2006; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2006; Abrosimov *et al*, 2007; Durante *et al*, 2007; Kebebew *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Mitsiades *et al*, 2007; Rodolico *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008). Aunque los resultados no son totalmente consistentes, la mayoría de los estudios de varios orígenes étnicos y geográficos demuestran una asociación significativa de la mutación BRAF^{T1799A} con una o más características clinicopatológicas de alto riesgo del CPT (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Kim *et al*, 2004; Trovisco *et al*, 2005; Powell *et al*, 2005; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Fugazzola *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^{b,c}; Lee *et al*, 2006; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Durante *et al*, 2007; Kebebew *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Nakayama *et al*, 2007; Rodolico *et al*, 2007; Elisei *et al*, 2008; Frasca *et al*, 2008; Oler *et al*, 2008; Kwak *et al*, 2009; Lee *et al*, 2009; Xing, 2009; Xing *et al*, 2009).

Entre los diversos factores de riesgo, la invasión extratiroidea, las metástasis ganglionares y los estadios clinicopatológicos III/IV son los que predicen de forma más fiable la progresión, recidiva, agresividad, y en último lugar, mayor morbilidad y mortalidad del CPT (DeGroot *et al*, 1990; Mazzaferri & Jhiang, 1994; Sherman *et al*, 1998; Mazzaferri & Kloos, 2001; Sherman *et al*, 2005).

Curiosamente, entre las varias características clinicopatológicas del CPT, muchos estudios han mostrado que la mutación BRAF^{T1799A} se encuentra más frecuentemente asociada a estos tres predictores de riesgo. En una revisión reciente, cuando se agrupan todos los estudios que proporcionan suficiente información para calcular el número de casos analizados, se encuentra una clara asociación significativa de la mutación BRAF^{T1799A} con invasión extratiroidea, metástasis ganglionares y estadios avanzados (III/IV), con *odds ratio* (OR) de 2,50 (IC_{95%}: 2,11-2,97), 1,83 (IC_{95%}: 1,58-2,13) y 2,14 (IC_{95%}: 1,79-2,56), respectivamente (Xing, 2007).

Cuatro estudios recientes, procedentes de Estados Unidos (Nikiforova *et al*, 2003^a; Adeniran *et al*, 2006), España (Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006) e Italia (Frasca *et al*, 2008) mostraron una asociación significativa de la mutación BRAF^{T1799A} con invasión extratiroidea y estadios avanzados (III-IV). El estudio italiano reveló además asociación con metástasis ganglionares (Frasca *et al*, 2008). Esta asociación con metástasis ganglionares, invasión extratiroidea y estadios avanzados también se ha descrito en un gran estudio multicéntrico internacional (Xing *et al*, 2005), un meta-análisis (Lee *et al*, 2007) y un estudio reciente de 500 casos de CPT en una cohorte italiana homogénea, procedente de una única institución, que representa el mayor estudio hasta la fecha para determinar la relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y los resultados clinicopatológicos (Lupi *et al*, 2007). Curiosamente, en este estudio también se encuentra significativamente asociada a la pérdida de la cápsula tumoral. Se ha demostrado

que los tumores de CPT que pierden la cápsula están asociados con un mayor riesgo de metástasis y recidiva (Ivanova *et al*, 2002; Kakudo *et al*, 2004; Lupi *et al*, 2007).

Otro reciente estudio norteamericano confirma la asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con metástasis ganglionares y estadios avanzados (III-IV) (Kebebew *et al*, 2007). En tres estudios coreanos (Kim *et al*, 2004, 2006^d; Lee *et al*, 2006) y uno de la Clínica Mayo (Jin *et al*, 2006) se describe una asociación significativa de la mutación BRAF^{T1799A} con metástasis ganglionares o invasión extratiroidea; uno de ellos muestra además una asociación independiente de la mutación con la aparición de metástasis ganglionares incluso en el análisis multivariante ajustado por factores confusores (Kim *et al*, 2006^d).

En síntesis, la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con características clinicopatológicas relacionadas con un fenotipo más agresivo del CPT ha sido ampliamente explorada, con resultados contradictorios. Recientemente, dos extensas revisiones han abordado esta controvertida cuestión, demostrando que las relaciones más consistentes son las observadas entre la mutación BRAF^{T1799A} y una mayor edad, así como con un estadio tumoral más avanzado en el momento del diagnóstico (Puxeddu & Moretti, 2007; Xing, 2007). La asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} con las metástasis ganglionares parece ser menos uniforme, lo que probablemente refleja el hecho de que la disección de cuello a menudo varía en los diferentes pacientes y estudios.

Edad

En nuestros pacientes, tal como ocurre en el estudio multicéntrico del grupo de Fugazzola (2006), y la serie de Elisei y colaboradores (2008), encontramos que la mutación BRAF^{T1799A} presenta una frecuencia significativamente superior en pacientes de edad avanzada, en particular, en aquéllos mayores de 60 años (Tabla R3.3.2). La asociación de BRAF^{T1799A} con una mayor edad de presentación del CPT lo confirma como el oncogén más prevalente en los pacientes adultos con CPT (Nikiforova *et al*, 2003^a; Kim *et al*, 2005^a; Trovisco *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Kebebew *et al*, 2007; Nakayama *et al*, 2007; Puxeddu & Moretti, 2007; Rodolico *et al*, 2007), no sin cierta controversia al respecto (Fugazzola *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Brzezianska *et al*, 2007; Lee *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008; Lee *et al*, 2009), y en concordancia con la baja prevalencia de esta alteración genética en niños (Kumagai *et al*, 2004; Penko *et al*, 2005; Powell *et al*, 2005). La mutación BRAF^{T1799A}, por tanto, es un fenómeno asociado a CPT adulto, y rara vez aparece en la población pediátrica (Kumagai *et al*, 2004; Penko *et al*, 2005; Xing, 2005^a; Ciampi & Nikiforov, 2007).

Este hallazgo es consistente con los datos de que una avanzada edad al diagnóstico es un factor de mal pronóstico en muchos sistemas de estadificación (Hay *et al*, 1987; Cady & Rossi, 1988; Hay *et al*, 1993; Greene *et al*, 2002). Sin embargo, hay que resaltar que, al igual que en el caso de Elisei y colaboradores (2008), en nuestro estudio sólo obtenemos significación estadística cuando la edad de los pacientes se analiza dividiendo el grupo de estudio en 2 categorías (mayores/menores de 60 años), pero no cuando la edad se analiza como una variable continua.

Sexo

Nuestros pacientes no mostraron diferencias significativas en la presencia de la mutación con relación al sexo, tal como ocurre en la práctica totalidad de los estudios previos (Fugazzola *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Liu *et al*, 2005; Fugazzola *et al*, 2006; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Brzezianska *et al*, 2007; Lee *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Frasca *et al*, 2008; Lee *et al*, 2009), y son pocos los que indican una asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con el sexo masculino (Xu *et al*, 2003; Kim *et al*, 2006^c). Sin embargo, sólo estos dos estudios han relacionado la mutación BRAF^{T1799A} con el sexo masculino, por lo que la

inconsistencia de esta observación, no detectada en otros estudios, podría ser debida a un sesgo de selección (Puxeddu & Moretti, 2007).

Tamaño tumoral

Un mayor tamaño tumoral ha sido descrito como uno de los principales determinantes de mal pronóstico en pacientes con CPT (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Schlumberger & Pacini, 1999; Tzavara *et al*, 1999; Mazzaferri & Kloos, 2001; Leboulleux *et al*, 2005; Machens *et al*, 2005). La asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con un mayor tamaño tumoral se ha publicado en muchos estudios (Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^{c,d}; Frasca *et al*, 2008; Kim *et al*, 2008; Lin *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009; Oler & Cerutti, 2009). En un estudio mayor, sin embargo, se encontró asociada con un tamaño tumoral de CPT menor (Xing *et al*, 2005).

En nuestros pacientes, existe una fuerte asociación estadística entre la mutación BRAF^{T1799A} y el tamaño del tumor primario, especialmente marcada en los carcinomas papilares de tiroides con tamaño igual o superior a 1 cm (Tabla R3.3.2).

El hecho de que la mutación BRAF^{T1799A} se haya encontrado asociada tanto a mayor tamaño tumoral (Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c; Nakayama *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008; Lin *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009; Oler & Cerutti, 2009), como a menor tamaño (Xing *et al*, 2005), mientras que algunos estudios no han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de tumores positivos/negativos para la mutación BRAF^{T1799A} (Xu *et al*, 2003; Puxeddu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008), puede hacernos llegar a la conclusión de que la mutación BRAF^{T1799A} no influye significativamente en el crecimiento del tumor.

Sin embargo, considerando otros resultados, que posiblemente la relacionan con mayor agresividad o invasividad tumoral, la conclusión podría ser más amplia: la mutación BRAF^{T1799A} no favorece el crecimiento tumoral, pero en igualdad de condiciones de crecimiento, puede inducir una activación más temprana de la invasividad tumoral (Puxeddu & Moretti, 2007). De acuerdo con esta idea, varios estudios han detectado una asociación significativa entre la mutación BRAF^{T1799A} y la invasión extratiroidea (Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Lee *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Nakayama *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009), siendo cuatro de estos estudios de los de mayor tamaño muestral de todas las series (Xing *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008). En nuestro estudio no somos capaces de detectar la asociación con invasión extratiroidea, como ocurre en las restantes publicaciones (Puxeddu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009).

Estadio

La mayoría de los estudios en la literatura describen una asociación positiva de la mutación BRAF^{T1799A} con estadios clínicos avanzados (III/IV) en el momento del diagnóstico (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Kebebew *et al*, 2007; Lee *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Nakayama *et al*, 2007; Elisei *et al*, 2008), con una OR de 2,143 en el meta-análisis de Lee y colaboradores (2007) y una OR de 2,14 en la revisión de Xing (2007). Este patrón se mantiene en las series coreanas, que en general presentan una prevalencia inusualmente elevada de la mutación BRAF^{T1799A}, en torno al 80-90% (Kim *et al*, 2004; Chung *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c), y que se han excluido de este análisis (Xing, 2007).

Sin embargo, no todos los estudios alcanzan esta asociación (Fugazzola *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005; Fugazzola *et al*, 2006; Brzezianska *et al*, 2007; Ito *et al*, 2009).

Nuestros pacientes muestran una asociación significativa de la mutación BRAF^{T1799A} con un estadio tumoral avanzado (superior a Estadio I de la AJCC), cuando estas variables se analizan de forma bivalente (Tabla R3.3.2). En nuestro estudio, sólo se encuentra asociación entre BRAF^{T1799A} y estadio avanzado cuando se considera éste como superior a Estadio I (AJCC). Haciendo esta clasificación (I frente a II/III/IV), la OR que obtendríamos de nuestros datos sería de 2,4 (IC_{95%}: 1,0-5,4; p=0,043), correspondiente al valor de RR: 1,8 mostrado en la Tabla R3.3.2, similar a la calculada en el meta-análisis del grupo de Lee (2007) y en la revisión de Xing (2007). Al agrupar la variable en dos categorías (I/II frente a III/IV), como se encuentra en la mayor parte de las publicaciones, no encontramos tal asociación. Probablemente, es debido a que la mayor parte de nuestros pacientes (85%) presentan un estadio I (66%) o II (19%) (Figura R3.1.3), mientras que con estadios III y IV sólo hay 16 pacientes, frente a un total de 106 (15%). Por tanto, un número tan pequeño de pacientes en la categoría máxima (III/IV), puede haber provocado que no se alcance la significación estadística, a pesar de que, a partir del estadio II, se observa una tendencia a un mayor número de pacientes en el grupo de positivos para la mutación BRAF^{T1799A} (Tabla R3.3.2).

Por otro lado, cuando analizamos el parámetro “Estadio superior a I” junto a las otras variables que resultaron estadísticamente significativas en el análisis bivalente (edad superior a 60 años, tamaño tumoral a partir de 1 cm), mediante regresión logística multivariante, para estudiar la independencia de estas asociaciones, el resultado fue que las únicas variables asociadas estadísticamente con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} fueron edad superior a 60 años (OR: 4,5; IC_{90%}: 1,6-12,7; p=0,016) y tamaño de 1 cm o más (OR: 3,4; IC_{90%}: 1,4-8,1; p=0,021), ya que la variable estadio clínico sufre un efecto de colinealidad con ambas (p<0,0001 en los dos casos), al ser una combinación lineal de las dos. Este efecto es razonable si tomamos en consideración que “edad superior a 45 años” y “tamaño tumoral mayor de 1 cm” son parámetros básicos en el sistema de estadificación TNM de la AJCC para obtener un estadio II, que en nuestro caso es el estrato de la variable estadio con mayor proporción relativa de pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} (Tabla R3.3.2).

Agresividad y subtipo histológico

Es importante señalar que, en la literatura se describe una mayor frecuencia de la mutación BRAF^{T1799A} en los subtipos de CPT conocidos por ser particularmente agresivos. Esta cuestión fue analizada específicamente en el estudio de Xing y colaboradores (2005), que claramente mostró el orden: CPT-CA > CPT-Clásico >> CPT-VF, cuando se clasifican de acuerdo con la prevalencia de características clinicopatológicas de agresividad del tumor, tales como invasión extratiroidea, metástasis ganglionares, estadios tumorales avanzados III/IV y recidiva tumoral. De forma concordante, el mismo orden se mantiene para la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en estos subtipos de CPT (Xing *et al*, 2005). Para este autor, la estrecha asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con los subtipos agresivos de CPT constituye, por sí misma, una fuerte evidencia del papel que juega la mutación BRAF^{T1799A} en la agresividad del CPT. Esta evidencia puede, de hecho, sugerir que la mutación BRAF^{T1799A} es un importante, quizás primordial, factor para el desarrollo de la variante de células altas del CPT; sin embargo, este paralelismo podría explicarse también por la intervención de otros factores patogénicos, que ocurrieran con más frecuencia en el CPT-CA, independientes de la mutación BRAF^{T1799A}.

Algunos estudios también encuentran una relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y las características histopatológicas de alto riesgo del CPT dentro de subtipos específicos, como el CPT-Clásico (Kim *et al*, 2004, 2006^c; Kebebew *et al*, 2007) y el CPT-VF (Lupi *et al*, 2007).

Se ha sugerido que las discrepancias en el valor pronóstico de BRAF^{T1799A} entre los diferentes estudios podrían deberse a la inclusión de diferentes subtipos histológicos de cáncer de tiroides, multifocalidad, factores epidemiológicos, y estudios de cohortes demasiado pequeñas (Fugazzola *et al*, 2006; Park *et al*, 2006; Lupi *et al*, 2007). De hecho, muchas de las cohortes

estudiadas eran pequeñas, los tumores no estaban estratificados por subtipo histológico, y la prevalencia muestra una marcada discordancia geográfica.

En un estudio reciente, Kebebew y colaboradores (2007) analizaron 347 pacientes de cáncer de tiroides (245 CPT, 29 CPT-variante folicular y 73 carcinomas foliculares de tiroides), estratificados por subtipo, que habían sido sometidos a tratamiento similar durante un período de seguimiento relativamente largo (6 años). Se realizó un análisis multivariante para evaluar los posibles efectos confusores de otros factores, encontrando que, en los subtipos clásico y variante folicular, la mutación BRAF^{T1799A} resultó asociada a una mayor edad al diagnóstico, clasificación AMES de alto riesgo, y de forma independiente, a enfermedad persistente y recurrente. Considerando solamente la variante clásica, la mutación BRAF^{T1799A} resultó asociada a una mayor edad al diagnóstico, metástasis ganglionares y distantes, mayor estadio TNM/AJCC y mayor proporción de persistencia y recidiva de enfermedad. Estos resultados sugieren, por tanto, que la mutación BRAF^{T1799A} está asociada a un comportamiento más agresivo del tumor y que puede ser un marcador independiente de enfermedad persistente y recurrente en el caso del CPT de tipo clásico.

En un estudio más reciente, Oler y Cerutti (2009) han determinado la prevalencia de la mutación en una cohorte brasileña de 120 pacientes, y su relación con los parámetros clinicopatológicos, estratificando por subtipos. Estos autores encuentran una elevada prevalencia global (48%) de la mutación BRAF^{T1799A} en CPT. Al estratificar por subtipo histológico, la prevalencia es significativamente mayor en la variante clásica (66%), comparada con la variante folicular (21%), lo que se encuentra dentro del rango previamente descrito en la literatura, tanto para la variante clásica (38-69%), como para la folicular (0-32%) (Nikiforova *et al*, 2003^a; Fugazzola *et al*, 2004; Salvatore *et al*, 2004; Trovisco *et al*, 2005; Xing, 2005^b; Xing *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2005; Castro *et al*, 2006; Fugazzola *et al*, 2006; Kebebew *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008). Los resultados de este estudio indican que, cuando los pacientes con CPT de tipo clásico se agrupan junto con los de variante folicular, la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} se encuentra asociada con invasión extratiroidea, metástasis ganglionares y elevado riesgo de recidiva tumoral y mortalidad. En estos pacientes no existe asociación con edad, sexo masculino, tamaño tumoral ni multifocalidad. Al examinar por separado los pacientes con variante folicular, estos autores no encuentran relación entre BRAF^{T1799A} y los parámetros clinicopatológicos analizados, mientras que en los pacientes de CPT de tipo clásico, la mutación BRAF^{T1799A} se encuentra relacionada con tamaño tumoral, invasión extratiroidea, metástasis ganglionares, riesgo de recidiva tumoral y mortalidad.

En nuestro estudio, para comprobar que los resultados obtenidos no estaban influidos por el subtipo histológico, realizamos un análisis de la relación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} y las características clinicopatológicas más importantes (metástasis linfáticas y a distancia, extensión peritiroidea, multifocalidad, tamaño), estratificando por variante histológica. La estratificación por variable histológica no generó diferencias significativas en cuanto a la distribución de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en ninguna de las variables analizadas. En nuestros pacientes, esto puede ser debido a que la prevalencia de la mutación en los subtipos clásico y folicular es prácticamente la misma, así como la distribución de metástasis ganglionares, distantes, etc. en estos pacientes también es similar.

En la cohorte de Oler y Cerruti (2009) sólo se encontró asociación con BRAF^{T1799A} y tamaño tumoral con el subtipo clásico de CPT. Sin embargo, también se detectó la mutación en el 38,1% de los tumores de menos de 1 cm. Los autores atribuyen este hallazgo a que la mayor parte de sus microcarcinomas papilares con *braf* mutado eran metastásicos (71,4%). En nuestro caso, si bien es cierto que aparece la mutación BRAF^{T1799A} en el 33,3% de los casos de microCPT (Tabla R3.2.1), una prevalencia similar a la descrita por Oler y Cerruti en microCPT, éstos sólo correspondían a pacientes con metástasis en el 18,2% (2/11). Por tanto, no

podemos justificar la relación de BRAF^{T1799A} de con una mayor agresividad en este subtipo histológico, atendiendo a la presencia de metástasis en esos pacientes.

Varios estudios muestran que a menudo existen componentes de CPT en carcinomas anaplásicos de tiroides que portan la mutación BRAF^{T1799A} y, en tales casos, ambos componentes, papilares y anaplásicos, normalmente mantienen la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} (Nikiforova *et al*, 2003^a; Begum *et al*, 2004; Quiros *et al*, 2005; Takano *et al*, 2007). Esto sugiere que la mutación BRAF^{T1799A} podría jugar un papel en la estimulación de la progresión de carcinoma papilar a anaplásico. En nuestro caso, no podemos aportar evidencia al respecto, ya que los 4 pacientes (2 en la Fase 1 y 2 en la Fase 2) con carcinoma anaplásico analizados en este estudio resultaron negativos para la mutación BRAF^{T1799A}.

Metástasis Ganglionares

Como se ha mencionado anteriormente, en muchos estudios se ha descrito la asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico (Kim *et al*, 2004; Xing *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006^{c,d}; Kebebew *et al*, 2007; Lee *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Nakayama *et al*, 2007; Abubaker *et al*, 2008; Frasca *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009). Otros estudios, incluido el meta-análisis, no encuentran esta asociación (Puxeddu *et al*, 2004; Liu *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009).

En nuestros pacientes, no hallamos asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con la aparición de metástasis linfáticas cervicales,

En concordancia con el papel de la mutación BRAF^{T1799A} en las metástasis ganglionares, varios estudios han observado una elevada prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} en los nódulos linfáticos metastatizados de CPT (Oler *et al*, 2005; Vasko *et al*, 2005; Giannini *et al*, 2007; Rodolico *et al*, 2007; Cañadas *et al*, 2008; Costa *et al*, 2008). En uno de estos estudios se encontró además que la presencia la mutación BRAF^{T1799A} en los nódulos linfáticos metastatizados estaba asociada con un mayor tamaño de las metástasis y con extensión extranodular (Rodolico *et al*, 2007). Curiosamente, en estos estudios, la mutación BRAF^{T1799A} se encontró en ocasiones en las metástasis ganglionares pero no en el tumor primario, lo que sugiere que esta mutación puede aparecer *de novo* en células de CPT metastatizadas a los ganglios linfáticos (Park *et al*, 2006; Cañadas *et al*, 2008; Lin *et al*, 2008).

Metástasis Distantes

Ya que las metástasis distantes del CPT son infrecuentes, particularmente en pacientes adultos, pocos estudios han presentado suficiente número de casos para poder encontrar una asociación significativa (Namba *et al*, 2003; Kebebew *et al*, 2007). En nuestro caso, con solamente 3 pacientes con metástasis distantes en el momento del diagnóstico, y sólo 1 positivo para la mutación BRAF^{T1799A}, esta relación tampoco aparece (Tabla R3.3.2), al igual que han descrito otros autores (Liu *et al*, 2005; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009).

Otros Parámetros Histopatológicos

En nuestros pacientes, no encontramos asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con invasión extratiroidea, multifocalidad, invasión capsular, invasión vascular, necrosis tumoral o actividad mitótica.

Muchos investigadores han encontrado asociación entre la invasión extratiroidea y la BRAF^{T1799A} (Nikiforova *et al*, 2003^a; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Jo *et al*, 2006; Lee *et al*, 2006; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Lee *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Nakayama *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008; Oler *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008; Kwak *et al*, 2009; Lee *et al*, 2009; Oler & Cerutti, 2009; Xing *et al*, 2009). El análisis multivariante estratificando por subtipo histológico hizo perder la asociación en dos de estos estudios (Lupi *et al*, 2007; Xing *et al*, 2009), aunque

en otros dos la relación permaneció independiente (Frasca *et al*, 2008; Kwak *et al*, 2009). Al igual que en nuestro caso, otros no encuentran ninguna asociación (Namba *et al*, 2003; Kim *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^{a,b}; Liu *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c; Abrosimov *et al*, 2007; Durante *et al*, 2007; Kebebew *et al*, 2007; Zuo *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009).

La multifocalidad del tumor es un factor pronóstico controvertido en CPT (Gulcelik *et al*, 2007). La mutación BRAF^{T1799A} se ha detectado en los distintos focos de tumores de CPT multicéntrico, y en las metástasis concomitantes, demostrando en algunos casos una distribución heterogénea (Park *et al*, 2006; Cañadas *et al*, 2008; Lin *et al*, 2008). Sólo un estudio describe una asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y la multicentricidad en el análisis bivalente, que se pierde en el multivariante (Lupi *et al*, 2007). En contraste, dos estudios muestran asociación entre la ausencia de multifocalidad y la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} (Trovisco *et al*, 2005; Costa *et al*, 2008).

La connotación negativa de la invasión vascular no está aceptada incuestionablemente (Gulcelik *et al*, 2007). Cuatro estudios han explorado la relación de la invasión capsular con la mutación BRAF^{T1799A} (Trovisco *et al*, 2005; Lee *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008), y sólo uno encontró una asociación significativa en el análisis bivalente (Elisei *et al*, 2008).

Aunque la mayoría de los estudios discutidos anteriormente apoyan la existencia de una asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y los factores clinicopatológicos clásicos de alto riesgo, algunos estudios no han conseguido obtener una asociación significativa (Fugazzola *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2005; Park *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2006; Abrosimov *et al*, 2007; Durante *et al*, 2007; Mitsiades *et al*, 2007; Min *et al*, 2008). No hay una explicación definitiva para esta inconsistencia de resultados, pero el relativamente pequeño número de casos en la mayoría de los estudios “negativos” podría ser responsable. De hecho, en algunos de estos estudios se observa una tendencia de la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con las características clinicopatológicas de alto riesgo, aunque sin alcanzar relevancia estadística (Fugazzola *et al*, 2004; Zhu *et al*, 2005; Min *et al*, 2008).

Además, entre distintos estudios existen variaciones en la extensión de la enfermedad en el momento del diagnóstico inicial (p. ej. un CPT en un estadio temprano con pequeño tamaño tumoral tiene menos probabilidad de estar asociado a características patológicas agresivas), variaciones en el nivel de detalle de la descripción patológica en los registros de los pacientes, y variaciones en los criterios y protocolos usados para la recolección de datos, podrían contribuir, al menos parcialmente, a la discordancia y heterogeneidad de resultados.

En nuestro caso, es conveniente resaltar que no fue posible obtener información acerca de multifocalidad, invasión vascular y capsular, necrosis tumoral y actividad mitótica en todos los pacientes, ya que estos datos no se encontraban disponibles. Debido a este hecho, no podemos descartar la posibilidad de haber perdido significación estadística en las asociaciones de la mutación BRAF^{T1799A} con esos parámetros.

Las variaciones en los criterios diagnósticos usados por diferentes patólogos, particularmente los criterios para definir los diversos subtipos de CPT, también podrían haber contribuido a que algunos de los hallazgos no resultaran consistentes (Xing, 2007), considerando el hecho de que la prevalencia de la mutación BRAF^{T1799A} es muy variable entre los diferentes subtipos de CPT, cada uno de los cuales está asociado con diferentes niveles de agresividad, como se ha discutido anteriormente. De hecho, en el estudio de Xing y colaboradores (2005), en el cual los subtipos de CPT se incluyeron en el análisis de regresión logística multivariante, se perdía la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con algunas de las características clinicopatológicas previamente descrita.

3.2. Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con la recidiva tumoral. Se estudiará la relación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario y la recidiva tumoral durante la evolución de la enfermedad en los pacientes con carcinoma papilar de tiroides que hayan completado 15 de meses de seguimiento.

Asociación entre las características clinicopatológicas de alto riesgo y la recidiva tumoral

El análisis de nuestros pacientes durante una mediana de seguimiento de 64,1 meses (Figura R3.1.9) reveló asociaciones significativas de la recidiva de CPT con algunas de las características clinicopatológicas del tumor primario de mayor agresividad, como multifocalidad, invasión extratiroidea e invasión vascular, así como con la presencia de metástasis en ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico (Tabla R3.4.1). Sin embargo, tras el análisis multivariante mediante regresión logística para determinar los posibles efectos confusores, la única variable que se mantuvo como indicador pronóstico independiente de la recidiva fue la extensión extratiroidea, con una OR de 6,5 (IC_{90%}: 2,2-19,1; p=0,004), perdiéndose la relevancia estadística de todas las demás. La inclusión de otros factores pronósticos (edad, sexo, tamaño, BRAF^{T1799A}, estadio TNM) no produjo ninguna variación en el modelo. Por tanto, según nuestros datos, la presencia de extensión extratiroidea en el tumor primario es de gran valor en la identificación de pacientes con un elevado riesgo de recidiva de carcinoma papilar, por lo que este parámetro debe ser tomado en consideración en la planificación del tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

Recidiva, estadio y sistemas de estratificación del riesgo

Al contrario que muchos otros tumores sólidos, el riesgo de recidiva y el de muerte por cáncer de tiroides no siempre son concordantes (Mazzaferrri & Kloos, 2001). El sistema de estadificación de la AJCC (Greene *et al*, 2002), ampliamente usado en oncología, está diseñado para estratificar el riesgo de muerte, pero no necesariamente el de recidiva. Es valorable el esfuerzo realizado por diversos autores por encontrar el mejor sistema de puntuación pronóstica para predecir el desenlace de los pacientes con CPT; sin embargo, los resultados de estos estudios indican que ninguno de los sistemas es completamente fiable (Kingma *et al*, 1991; Voutilainen *et al*, 2003; D'Avanzo *et al*, 2004). Algunos autores demuestran claramente que el sistema de estadificación TNM, no está adaptado para predecir recidiva, ya que no considera de forma adecuada las metástasis ganglionares (Leboulleux *et al*, 2005; Elisei *et al*, 2008), que es de hecho uno de los principales problemas clínicos en el desenlace de los pacientes con CPT (Hay *et al*, 1993; Voutilainen *et al*, 2003).

Nosotros hemos observado que, de todos los sistemas analizados en este estudio para clasificación del riesgo en cáncer de tiroides, los que mejor clasificaron a los pacientes en cuanto a la probabilidad de recidiva fueron el sistema AMES y el MACIS (Tabla R3.4.4), con aproximadamente un riesgo relativo tres veces superior de presentar recidiva en los pacientes clasificados de "alto riesgo" que en los clasificados de "bajo riesgo". Sin embargo, el 59,1% de los pacientes clasificados que presentaron recidiva habían sido clasificados de "bajo riesgo" con ambos sistemas, por lo que ni AMES ni MACIS fueron capaces de pronosticar más del 40,9% de las recidivas de forma acertada. Más aún, ninguno de los sistemas de estratificación del riesgo clasificó correctamente a más de la mitad de los pacientes con recidiva (Tabla R3.4.4).

Asociación de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} con recidiva de CPT

El valor predictivo de la mutación BRAF^{T1799A} para recidiva de CPT ha sido investigado específicamente en varios estudios recientes (Fugazzola *et al*, 2004; Xing *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006^c; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2006; Kebebew *et al*, 2007; Abubaker *et al*,

2008; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Oler *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009; Xing *et al*, 2009).

El primer gran estudio multicéntrico analiza retrospectivamente, en 219 pacientes con CPT procedentes de USA, Ucrania e Italia, la relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y varias características patológicas de agresividad, como invasión extratiroidea, metástasis ganglionares, estadios tumorales avanzados y subtipos histológicos agresivos, tras un periodo de seguimiento clínico medio de 15 meses (Xing *et al*, 2005). Este trabajo demuestra una estrecha asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con la recidiva de CPT, incluso en el subgrupo de pacientes con estadios clinicopatológicos iniciales de bajo grado I/II, que generalmente tiene bajo riesgo de recidiva. Tras el análisis multivariante ajustado por todos los factores clinicopatológicos confusores clásicos, incluyendo subtipo tumoral e historia de tratamiento con radioyodo, la OR resultante fue de 4,0 (IC_{95%}: 1,1-14,1; p=0,03) en pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} (Xing *et al*, 2005). De modo similar, un estudio coreano posterior en una serie de 203 pacientes con CPT-Clásico, demostró con el análisis univariante una estrecha asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con recidiva tumoral; sin embargo, esta asociación se pierde tras aplicar un análisis multivariante ajustado por los parámetros clinicopatológicos edad, sexo, tamaño tumoral, extensión extratiroidea, multifocalidad y metástasis ganglionares (Kim *et al*, 2006^c).

Un estudio español constituido por 67 pacientes de CPT con un periodo de seguimiento de 3 años (mediana), también encuentra una fuerte asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} y la recidiva de CPT (Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006). Otro estudio italiano observa una tendencia a la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con la recidiva de CPT, aunque sin alcanzar significación estadística (Fugazzola *et al*, 2004).

Posteriormente, otro gran estudio norteamericano también muestra en el análisis multivariante una asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con recidiva o persistencia de CPT-Clásico independiente de factores clinicopatológicos de riesgo, incluso en CPT en Estadio I (Kebebew *et al*, 2007), confirmando los resultados de Xing y colaboradores (2005). Aunque los tiempos de seguimiento medios, regiones geográficas y orígenes étnicos de los pacientes son muy diferentes entre ambos estudios, el patrón de la relación de la mutación BRAF^{T1799A} con la recidiva de CPT es muy similar.

Por tanto, independientemente del nivel de riesgo asociado a factores étnicos, geográficos y clínicos pre-existentes, la mutación BRAF^{T1799A} parece añadir un incremento al riesgo de recidiva de CPT; siendo la OR global de estos cinco estudios para el riesgo de CPT asociado a la mutación BRAF^{T1799A} es 2,65 (IC_{95%}: 1,77-3,96; p<0,001) (Xing, 2007).

Estudios posteriores realizados en pacientes de diversos orígenes étnicos y geográficos de todo el mundo han confirmado estos hallazgos (Abubaker *et al*, 2008; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009; Xing *et al*, 2009), mostrando elevadas OR para persistencia/recidiva de CPT que oscilan entre 1,91-5,40 (Xing, 2010). Basándose en los estudios que han hallado asociación entre recidiva y la mutación BRAF^{T1799A} las probabilidades predictivas positivas y negativas de este marcador molecular para predecir recidiva de CPT son 28% y 87%, respectivamente (Xing, 2010). Estos datos apoyan la idea de que la mutación BRAF^{T1799A} podría jugar un importante papel en la formación, progresión y agresividad del CPT.

En nuestro caso, los pacientes proceden de una única institución y han sido tratados y seguidos de forma uniforme de acuerdo a los criterios establecidos por la Unidad de Tiroides del HUVN, con lo que se asegura la homogeneidad de los casos. En los pacientes de cáncer de tiroides (tumores mayores de 1 cm), se realiza rutinariamente tiroidectomía total o casi total, más tratamiento ablativo de restos tiroideos con ¹³¹I a los 3 meses en los de alto riesgo (>1cm y restos tiroideos o extratiroideos demostrados en el rastreo tras tiroidectomía total) (Pacini *et al*, 2007). Además, según protocolo de la Unidad de Tiroides del HUVN, en la identificación de

recidiva de cáncer de tiroides hemos considerado principalmente las técnicas usadas de forma rutinaria para identificación de cáncer de tiroides, como es el rastreo de cuerpo completo con radioyodo, pero considerando también aquéllos casos detectados por otros métodos (PET/TC, ecografía, cirugía, TAC), según criterio de la Unidad de Tiroides del HUVN en los casos de duda. Para el análisis relativo a recidiva seleccionamos a 97 pacientes con más de 15 meses de seguimiento, del total de 106 pacientes de CPT. Con ello aseguramos que todos los pacientes incluidos en el grupo de seguimiento habían recibido al menos la dosis ablativa de restos tiroideos (3 meses), y se habían sometido al primer rastreo (12 meses tras la dosis ablativa). El tiempo de seguimiento de nuestros pacientes ha sido relativamente largo (mediana de seguimiento=64,1 meses), encontrándose entre los cuatro estudios con un periodo de seguimiento más largo de la bibliografía (Fugazzola *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c; Kebebew *et al*, 2007; Elisei *et al*, 2008), lo que es fundamental para poder observar la recidiva de tumores con velocidad de crecimiento lenta.

La aparición de recidiva tumoral en nuestros pacientes no se encontró estadísticamente asociada con la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario. De 97 pacientes del grupo de seguimiento, apareció recidiva tumoral en 22 casos (22,7%), y sólo 9 (9/22; 40,9%) eran positivos para la mutación BRAF^{T1799A} en su tumor primario. De hecho, se produjo una tendencia a presentar menos recidiva en los pacientes BRAF^{T1799A} positivos (9/45; 20,0%) que en los negativos (13/52; 25,0%) (Tablas R3.4.5 y R3.4.6). La estratificación por subtipo histológico no generó ninguna diferencia significativa en cuanto a la distribución de la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en pacientes con/sin recidiva.

La presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario de estos pacientes tampoco se encontró asociada a la necesidad de nuevos tratamientos ablativos con ¹³¹I o de otras intervenciones quirúrgicas debidas a la aparición de metástasis (Tablas R3.4.5 y R3.4.6).

En resumen, atendiendo a los hallazgos obtenidos en nuestra investigación, la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} no constituye un factor predictivo de recidiva de CPT.

Valor pronóstico de la mutación BRAF^{T1799A} para persistencia de la enfermedad

En la literatura hay pocos estudios con un tiempo de seguimiento relativamente largo que hayan analizado la activación del oncogén *braf* y el desenlace de los pacientes de CPT: 6 años (Fugazzola *et al*, 2006; Kebebew *et al*, 2007), 7,3 años (Kim *et al*, 2006^c), 11,7 años (Costa *et al*, 2008) y 15 años (Elisei *et al*, 2008), con resultados discrepantes, encontrando asociación en tres estudios (Kim *et al*, 2006^c; Kebebew *et al*, 2007; Elisei *et al*, 2008). En la serie de Elisei y colaboradores (2008), con 15 años de tiempo de seguimiento medio, el más largo hasta el momento, la mutación BRAF^{T1799A} actúa como un factor de mal pronóstico para el desenlace de los pacientes con CPT (libres de enfermedad frente a enfermos o fallecidos por la enfermedad). Interesantemente, su estudio demuestra que la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} representa un factor de riesgo para el fracaso del tratamiento de los pacientes de CPT, independientemente de todos los demás factores pronósticos de riesgo negativos y, en particular, de la extensión del tumor en el momento de la intervención quirúrgica. Además, demuestra que los pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} no tienen solamente un peor desenlace en términos de persistencia de la enfermedad, sino que también presentan una supervivencia menor (Elisei *et al*, 2008).

En nuestro caso, con una mediana de seguimiento de 5,3 años, no se ha evidenciado una relación entre la mutación BRAF^{T1799A} y el desenlace del paciente. De nuestro grupo de 97 pacientes en seguimiento, ninguno falleció a causa del CPT. De los 76 pacientes con más de 27 meses de seguimiento, el 14,5% (11/76) se encontraban enfermos al final del periodo de estudio (Tabla R3.4.6). Aunque este porcentaje es equiparable al descrito en el estudio de Elisei y colaboradores (2008), donde la persistencia de enfermedad es mucho mayor en pacientes *braf* positivos (*braf* +: 21,1% vs *braf* -: 7,8%), en nuestros pacientes la distribución de

la mutación BRAF^{T1799A} en el grupo de enfermos se encuentra más equilibrada (*braf* +: 17,6% vs *braf* -: 11,9%), lo que ha provocado la ausencia de significación estadística.

Asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con la pérdida de la avidéz por radioyodo.

Actualmente, el pilar principal del tratamiento médico para el CPT tras tiroidectomía es la terapia ablativa con radioyodo; para la recidiva de CPT, también se limita en gran medida a la terapia con radioyodo. Sin embargo, el cáncer de tiroides puede perder la avidéz por radioyodo, una causa principal del fracaso del tratamiento con radioyodo y de la morbilidad y mortalidad asociadas (Ain, 2000; Sherman *et al*, 2005; Cooper *et al*, 2009).

Aunque se conocen varios factores clinicopatológicos asociados con un mayor riesgo de recidiva de cáncer de tiroides, no se ha identificado ningún factor que prediga la pérdida de la avidéz por radioyodo en el tumor recurrente (Xing, 2007). Como se ha discutido anteriormente, existe un mayor porcentaje de recidiva en tumores positivos para la mutación BRAF^{T1799A} (Xing *et al*, 2005; Kebebew *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Oler & Cerutti, 2009); también se ha señalado que la mayor parte de estas recidivas presentan una baja avidéz por ¹³¹I, y por tanto, son predictores de un mal pronóstico, debido a que el tratamiento con ¹³¹I no es efectivo (Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Mian *et al*, 2008).

El estudio de Xing y colaboradores (2005) muestra una interesante asociación entre la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario y la pérdida de avidéz por radioyodo en el tumor recurrente. Así, los pacientes con tumores primarios positivos para la mutación BRAF^{T1799A}, necesitaron tratamientos más agresivos para la recidiva de CPT, incluyendo cirugía y terapia con radiación externa, mientras que los pacientes cuyo tumor primario era negativo para la mutación BRAF^{T1799A}, sólo requirieron repetición del tratamiento con radioyodo en la mayor parte de los casos. En muchos casos, el tratamiento para la recidiva tumoral fracasó en el grupo positivo, y los pacientes continuaron presentando enfermedad persistente, mientras que los pacientes del grupo negativo para la mutación BRAF^{T1799A} se encontraban todos curados de la recidiva, normalmente con una sola repetición de la terapia con radioyodo (Xing *et al*, 2005).

Dos estudios ha descrito una tendencia a la asociación entre la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario o en la lesión recurrente, y la pérdida de avidéz por radioyodo en el tumor recurrente, que debido presumiblemente al pequeño número de casos estudiados, no alcanza significación estadística (Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Mian *et al*, 2008). Estos autores muestran que los tumores positivos para la mutación presentan mayor riesgo de recidiva, y sugieren además que pueden haberse desdiferenciado, ya que la captación de ¹³¹I es nula en la mayoría de las recidivas positivas para la mutación BRAF^{T1799A}, debido probablemente a la internalización la proteína NIS.

Esta idea es consistente con las publicaciones recientes que muestran las fuertes asociaciones entre la mutación BRAF^{T1799A} y el silenciamiento de genes en CPT, como el transportador apical de yoduro SLC5A8 (Porra *et al*, 2005) y la enzima tiroperoxidasa (TPO), clave en la metabolización del yodo (Giordano *et al*, 2005). Además, se ha demostrado *in vitro* que *braf* disminuye la actividad de los promotores de *nis*, *tshr* (receptor de TSH) y *tpo* (Mitsutake *et al*, 2005; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Liu *et al*, 2007). Los datos clínicos se correlacionan con resultados obtenidos en ratones transgénicos en los que se muestra que la mutación BRAF^{T1799A} es capaz de iniciar la formación del CPT y promover la agresividad mediante una disminución de la expresión de *tpo*, *nis* y *tiroglobulina* (Knauf *et al*, 2005). De acuerdo con estas evidencias, el papel de la mutación BRAF^{T1799A} como factor de mal pronóstico podría estar relacionado con un proceso de desdiferenciación.

En nuestro estudio, no encontramos asociación entre el estado de BRAF^{T1799A} y recidiva tumoral, ni tampoco con la necesidad de nuevos tratamientos ablativos con ¹³¹I o de dosis mayores de ¹³¹I. El porcentaje de pacientes positivos para la mutación BRAF^{T1799A} que necesitó

más de una dosis de tratamiento con ^{131}I fue inferior a la de los negativos (15,6% vs 21,2%, Tabla R3.4.7), aunque esta diferencia no resultó estadísticamente significativa. Tampoco se encontraron diferencias en las dosis iniciales o totales de ^{131}I recibidas por los pacientes incluidos en el estudio, en función de la presencia de la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ en el tumor original.

Al igual que en la serie de Riesco-Eizaguirre y colaboradores (2006), en la que el 66,7% (6/9) de los pacientes positivos para $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ presentaban rastreos negativos en el momento de la recidiva, el 75% de nuestros pacientes (3/4; Tabla R3.4.9) presentaban un rastreo corporal total negativo, aunque esta tendencia no alcanzó significación estadística, presumiblemente debido al pequeño número de casos.

Una idea interesante sería estudiar el estado de la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ en las metástasis que no captaron ^{131}I en el rastreo corporal total, en los casos que se produjera exéresis de la misma. Ya que en nuestro estudio hemos analizado la presencia de la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ solamente en el tumor primario, no podemos asegurar si los pacientes con rastreos positivos o negativos correspondían a metástasis positivas/negativas para el estado de la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$.

En resumen, al contrario que en otros estudios, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre la presencia de la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ y los parámetros relacionados con el tratamiento con ^{131}I medidos en este estudio.

Conclusiones generales de la Fase 3

Los datos del presente estudio confirman la asociación entre la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ y algunos de los parámetros clinicopatológicos hallados por otros autores, en lo que se refiere al tamaño tumoral, en especial a partir de 1cm, y a una edad superior a 60 años (Namba *et al*, 2003; Nikiforova *et al*, 2003^a; Xu *et al*, 2003; Fugazzola *et al*, 2004; Kim *et al*, 2004; Puxeddu *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^{a,b}; Liu *et al*, 2005; Powell *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Xing *et al*, 2005; Adeniran *et al*, 2006; Fugazzola *et al*, 2006; Jin *et al*, 2006; Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^{b,c,d}; Lee *et al*, 2006; Park *et al*, 2006; Riesco-Eizaguirre *et al*, 2006; Sapio *et al*, 2006; Abrosimov *et al*, 2007; Durante *et al*, 2007; Kebebew *et al*, 2007; Lupi *et al*, 2007; Mitsiades *et al*, 2007; Rodolico *et al*, 2007; Frasca *et al*, 2008).

En nuestros pacientes, la recidiva tumoral de CPT está asociada a multifocalidad, invasión extratiroidea, metástasis linfáticas, e invasión vascular, cuando éstas se analizan de forma separada, pero la única asociación independiente con recidiva tumoral es la extensión extratiroidea del tumor.

Sin embargo, de nuestros resultados no puede inferirse que la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$ confiera un comportamiento/fenotipo más agresivo, reflejado en características histopatológicas de mayor riesgo, como multifocalidad, invasión capsular/vascular, extensión extratiroidea, etc., así como presencia de metástasis regionales o distantes en el momento del diagnóstico del CPT positivo para la mutación $\text{BRAF}^{\text{T1799A}}$, ni un mayor riesgo de recidiva tumoral o persistencia de enfermedad en los pacientes de CPT.

CONSIDERACIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Relevancia clínica del estado de la mutación BRAF^{T1799A} como complemento de la evaluación clinicopatológica del riesgo en cáncer de tiroides.

Actualmente, la evaluación clinicopatológica tradicional constituye la base sobre la que se establece la estratificación del riesgo en pacientes con cáncer de tiroides (Sherman *et al*, 2007; Cooper *et al*, 2009). Varias características clinicopatológicas son factores clásicos de alto riesgo, incluyendo la edad al diagnóstico, sexo masculino, tamaño tumoral elevado, invasión extratiroidea, metástasis en ganglios linfáticos, metástasis a distancia y estadios avanzados de la enfermedad (DeGroot *et al*, 1990; Mazzaferri & Jhiang, 1994; Sherman *et al*, 1998; Mazzaferri & Kloos, 2001; Tanaka *et al*, 2005; Mazzaferri, 2006^a; Sherman *et al*, 2007). Cada uno de estos factores de riesgo ha demostrado su asociación con un elevado riesgo de progresión, recidiva e incluso morbilidad y mortalidad del cáncer de tiroides. En el caso del CPT, el subtipo histológico es un factor adicional importante en la evaluación del riesgo, asociados con agresividad tumoral en el orden: CPT-CA > CPT-Clásico > CPT-VF (Chan, 1990; Xing, 2005^a; Keelawat & Poumsuk, 2006; Lang *et al*, 2006; Michels *et al*, 2007), como se ha comentado anteriormente.

Para reducir la morbilidad y mortalidad del CPT, y optimizar el manejo de los pacientes afectos, se establece de forma rutinaria la extensión inicial de la enfermedad y la predicción del riesgo de recidiva. En la actualidad, la estratificación del riesgo es la principal consideración en la determinación de la agresividad con la que manejar el cáncer de tiroides, incluyendo tanto la extensión del tratamiento inicial, como la decisión de tratar con ablación con radioyodo tras la tiroidectomía, así como el grado de vigilancia en el seguimiento posterior del paciente y la frecuencia con la que se han de realizar los análisis de control durante este seguimiento. Sin embargo, la fiabilidad de estas estrategias basadas en criterios histopatológicos puede ser cuestionable, particularmente en pacientes con estadios clinicopatológicos tradicionalmente bajos (Mazzaferri & Kloos, 2001; Mazzaferri, 2006^b).

Teniendo en cuenta que la incidencia del cáncer de tiroides se encuentra en aumento, debido especialmente al diagnóstico de más casos de CPT de pequeño tamaño, sería de gran ayuda poder complementar los sistemas actuales de estratificación del riesgo con marcadores moleculares, como se ha sugerido respecto a la mutación BRAF^{T1799A}, en particular para la toma de decisiones quirúrgicas y de manejo clínico (Xing, 2007).

Algunos cirujanos proponen la disección de los nódulos del compartimento central del cuello como medida profiláctica en el momento de la cirugía inicial, debido a que el uso postoperatorio de ultrasonidos y niveles de tiroglobulina están detectando enfermedad que no era detectada en el pasado. En esta situación, sería muy útil contar con un parámetro independiente de persistencia/recidiva de enfermedad, como sería el estado de la mutación BRAF^{T1799A}, que identificara los casos con mayor riesgo de recidiva/persistencia, para justificar el vaciamiento del compartimento central en los pacientes cuyo tumor se encuentra localizado en tiroides, sin afectación linfática. Para el grupo de Xing y colaboradores, con una dilatada trayectoria científica estudiando la mutación BRAF^{T1799A} en CPT, su asociación con la recidiva tumoral está plenamente confirmada. Estos autores sugieren la implementación del análisis preoperatorio de la mutación BRAF^{T1799A} en la citología de tiroides, como complemento útil y objetivo a los parámetros pronósticos utilizados normalmente, para predecir la agresividad de la enfermedad en el momento de decidir la extensión de la cirugía y la necesidad de terapia adyuvante (Xing, 2007; Xing *et al*, 2009; Xing, 2010).

La percepción general que se extrae de la revisión de la literatura es que la mutación BRAF^{T1799A} es un indicador de pronóstico adverso para el CPT. Sin embargo, su aplicación en la rutina clínica para la estratificación pronóstica se encuentra obstaculizada por los datos

discrepantes de los estudios de correlación, que no generan una evidencia clínica con suficiente solidez para ser reconocida uniformemente por la comunidad científica.

Estas discrepancias se han atribuido a la heterogeneidad de las variantes histológicas del CPT, edad del grupo analizado, diferencias genéticas subyacentes de las poblaciones consideradas y en términos de tamaño muestral. Otra posible explicación es la extensión y duración de la enfermedad en el momento en que los pacientes entran en el estudio, es decir, el momento del tratamiento inicial, debidas a las diferencias geográficas en el momento de detección del cáncer de tiroides (Puxeddu *et al*, 2008). De hecho, los países caracterizados por un sistema de salud gratuito y fácilmente accesible, conscientes de la enfermedad tiroidea debida la difusión del bocio endémico, y con uso serio de la ultrasonografía de tiroides, pueden presentar un mayor número de carcinomas de tiroides detectados incidentalmente, de forma temprana, que pueden no haber expresado su potencial agresivo por completo, posibilitando un tratamiento quirúrgico inicial más completo. La situación podría ser diferente en países donde los tumores más frecuentemente detectados son aquéllos que se reconocen cuando son clínicamente evidentes.

De nuestros resultados, como de los de muchos autores (Nikiforova *et al*, 2003^a; Namba *et al*, 2003; Puxeddu *et al*, 2004; Sedliarou *et al*, 2004; Liu *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Fugazzola *et al*, 2006; Jo *et al*, 2006; Kim *et al*, 2006^c; Sapio *et al*, 2006; Zuo *et al*, 2007; Costa *et al*, 2008; Elisei *et al*, 2008; Frasca *et al*, 2008; Ito *et al*, 2009; Kwak *et al*, 2009) no puede inferirse una asociación consistente entre el estado de la mutación BRAF^{T1799A} y un comportamiento tumoral más agresivo, lo que sugiere que BRAF^{T1799A} *per se* es insuficiente para inducir ese fenotipo.

La elevada prevalencia de las mutaciones *braf* (20-52%) descrita en microcarcinomas papilares, que normalmente representan hallazgos incidentales y son considerados de buen pronóstico entre los carcinomas tiroideos, parece argumentar también en contra de la utilidad de la detección de BRAF^{T1799A} en la estratificación del riesgo en CPT. (Nikiforova *et al*, 2003^a; Sedliarou *et al*, 2004; Kim *et al*, 2005^b; Liu *et al*, 2005; Trovisco *et al*, 2005; Lee *et al*, 2006). Incluso en microcarcinomas papilares de comportamiento agresivo inusual, no se ha evidenciado correlación entre la mutación BRAF^{T1799A} y la agresividad tumoral (Kim *et al*, 2005^b; Min *et al* 2008; Lee *et al*, 2009).

El hecho de que las mutaciones *braf* se encuentren también presentes en muchos carcinomas papilares de tiroides esporádicos de adultos sin evidencia de desdiferenciación, que son curados mediante protocolos de manejo estándar, mostrando una expectativa de supervivencia similar a la de la población de la misma edad, proporciona más apoyo a la idea de que la mutación BRAF^{T1799A} por sí sola es insuficiente para conferir un fenotipo totalmente agresivo.

La aparición de mutaciones de *braf* en las formas histológicas más agresivas de los tumores tiroideos (CPT pobremente diferenciados y carcinomas anaplásicos), originados en CPT pre-existentes (Begum *et al*, 2004; Quiros *et al*, 2005; Takano *et al*, 2007; Ciampi & Nikiforov, 2005; Xing, 2005^a), constituye una evidencia molecular de una progresión escalonada desde carcinomas papilares a pobremente diferenciados y a anaplásicos, dentro de un modelo multietapa de oncogénesis de las células foliculares tiroideas, pero no significa necesariamente que la activación de *braf per se* sea la fuerza conductora que subyace en la desdiferenciación celular y el comportamiento tumoral (Costa *et al*, 2008).

Por tanto, a pesar de la creciente evidencia a favor de la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con un peor pronóstico de CPT, todavía existen discrepancias en los diferentes estudios que obligan a que la toma de decisiones basada en el estado mutacional de BRAF^{T1799A} sea considerada cuidadosamente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES GENERALES

Fase 1. Estudio preliminar de la mutación BRAF^{T1799A} en carcinoma de tiroides: especificidad y representatividad

La determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas por punción y aspiración con aguja fina (PAAF), detecta y preoperatoriamente carcinoma papilar de tiroides de forma específica.

Fase 2. Detección preoperatoria de carcinoma papilar de tiroides mediante determinación de la mutación BRAF^{T1799A} en citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF

La identificación de casos de carcinoma papilar de tiroides positivos para la mutación BRAF^{T1799A}, que no fueron detectados por el diagnóstico citopatológico, incrementa la sensibilidad de la estrategia diagnóstica mediante PAAF, modificando la orientación diagnóstica y terapéutica de estos pacientes. En consecuencia, su implantación en la rutina diagnóstica del nódulo tiroideo proporcionaría un gran beneficio en el rescate de casos categorizados como ausentes de malignidad (falsos negativos).

Fase 3. Estudio de la asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con un fenotipo más agresivo de carcinoma papilar de tiroides

En nuestros pacientes, la presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario se asocia a mayor edad al diagnóstico y tamaño tumoral, pero no a la recidiva de carcinoma papilar de tiroides.

La presencia de la mutación BRAF^{T1799A} en el tumor primario está asociada independientemente a los parámetros clinicopatológicos de riesgo tamaño tumoral y edad superior a 60 años. La asociación de la mutación BRAF^{T1799A} con estadio AJCC superior a I no es independiente de los dos parámetros anteriores (edad y tamaño).

La recidiva de carcinoma papilar de tiroides se encuentra asociada significativamente con algunas de las características clinicopatológicas de mayor agresividad del tumor primario, como multifocalidad, invasión extratiroidea metástasis ganglionares e invasión vascular, aunque el único indicador pronóstico de recidiva independiente es la invasión extratiroidea.

La mutación BRAF^{T1799A} *per se* no confiere un fenotipo más agresivo al carcinoma papilar de tiroides, reflejado en:

- características histopatológicas de mayor riesgo, como multifocalidad, invasión capsular/vascular o extratiroidea, necrosis tumoral o actividad mitótica, así como presencia de metástasis ganglionares o distantes en el momento del diagnóstico.
- un mayor riesgo de recidiva tumoral o persistencia de enfermedad en los pacientes de carcinoma papilar.
- dosis terapéuticas de ¹³¹I requeridas.

CONCLUSIONES INDIVIDUALES

El análisis de los resultados del presente estudio y su contraste con los publicados al respecto en la literatura científica permiten, a nuestro juicio, formular las siguientes conclusiones:

1. La **mutación BRAF^{T1799A}** es específica de **carcinoma papilar de tiroides**, ya que, en todos los casos, el resultado fue negativo en el tejido tiroideo normal adyacente a las lesiones patológicas presentadas por los pacientes, así como en el tejido tumoral de los pacientes con carcinoma folicular, anaplásico y sarcoma de tiroides. Tampoco se encontró presente en el tejido tiroideo patológico en los casos de pacientes con bocio multinodular, bocio difuso o adenoma folicular.
2. La **mutación BRAF^{T1799A}** puede detectarse de forma fiable en el material procedente de las **citologías de tiroides obtenidas mediante PAAF**, proporcionando un resultado representativo de su estado en el nódulo tiroideo puncionado, ya que el resultado del estado de BRAF^{T1799A} en la citología de tiroides preoperatoria se correlaciona al 100% con el de la pieza histológica procedente de la tiroidectomía.
3. La **determinación de la mutación BRAF^{T1799A}** en citologías de tiroides obtenidas mediante **PAAF detecta preoperatoriamente el 40,0% de los casos de carcinoma papilar de tiroides** que se diagnostican en **pacientes en estudio de nódulo tiroideo**.
4. La **determinación de la mutación BRAF^{T1799A}** en citologías de tiroides obtenidas mediante **PAAF confirma preoperatoriamente el diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides** en el **33,3%** de los casos **indeterminados** en la PAAF, y hasta el **100%** de los casos diagnosticados como **sospecha de carcinoma papilar** en la PAAF.
5. La **determinación de la mutación BRAF^{T1799A}** en citologías de tiroides obtenidas mediante **PAAF rescata el 27,3%** de los casos de **falsos negativos** que se presentan con el diagnóstico citopatológico, ya que **redefine** el diagnóstico citopatológico **benigno** o **no valorable** de esos casos.
6. La **determinación de la mutación BRAF^{T1799A}** en citologías de tiroides obtenidas mediante **PAAF detecta carcinoma papilar de tiroides no sospechado** en el **0,7%** de los pacientes que se encuentran en estudio de nódulo tiroideo.
7. La inclusión de la determinación del estado de la mutación BRAF^{T1799A} de forma rutinaria en las citologías tiroideas aumenta la **sensibilidad** de la técnica citopatológica para la **detección de carcinoma papilar de tiroides** desde un **45%** hasta un **60%**.
8. La **mutación BRAF^{T1799A}** presenta una **prevalencia en carcinoma papilar de tiroides del 47,2%** (IC_{95%}: 37,5-56,8%).
9. La **mutación BRAF^{T1799A}** en carcinoma papilar de tiroides está asociada de forma independiente a **edad superior a 60 años**.
10. La **mutación BRAF^{T1799A}** está asociada de forma independiente a **mayor tamaño tumoral, especialmente a partir de 1 cm de diámetro** en los pacientes de carcinoma papilar de tiroides.

11. La **mutación BRAF^{T1799A}** está asociada a **estadio AJCC superior a I** en los pacientes de carcinoma papilar de tiroides, aunque no de forma independiente de edad y tamaño tumoral.
12. La **mutación BRAF^{T1799A}** en carcinoma papilar de tiroides **no** se encuentra asociada con **invasión extratiroidea, invasión capsular o vascular, necrosis tumoral, actividad mitótica, ni con la aparición de metástasis ganglionares o a distancia.**
13. La recidiva tumoral de carcinoma papilar de tiroides está asociada de forma bivariante a multifocalidad, invasión extratiroidea, metástasis ganglionares, e invasión vascular, pero la **única asociación independiente con recidiva tumoral es la invasión extratiroidea del tumor.**
14. La recidiva tumoral de carcinoma papilar de tiroides no está asociada a tamaño tumoral ni a la presencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.
15. De todos los **Sistemas para Estratificación del Riesgo** en cáncer de tiroides analizados en este estudio (AJCC, AMES, AGES, MACIS, EORTC, MSKCCD), los que mejor clasifican en cuanto a la probabilidad de recidiva son el sistema **AMES** y el **MACIS**, con un **riesgo relativo** aproximadamente **tres veces superior** de presentar recidiva en los pacientes clasificados como de alto riesgo.
16. La **mutación BRAF^{T1799A}** en el tumor primario **no** se encuentra asociada a **recidiva tumoral** en los pacientes de carcinoma papilar de tiroides.
17. La **mutación BRAF^{T1799A}** en el tumor primario **no** se encuentra asociada a **persistencia de enfermedad** en los pacientes de carcinoma papilar de tiroides.
18. La **presencia de la mutación BRAF^{T1799A}** **no** está asociada con la **efectividad del tratamiento con ¹³¹I**, medida en base a los parámetros dosis inicial/total de ¹³¹I administrada, repetición del tratamiento, rastreo negativo en el momento de la recidiva y necesidad ulterior de cirugía.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS USADOS EN ESTA TESIS

AACE/AME	<i>American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi</i>
ADN	ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint on Cancer Committee</i>
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
CAT	carcinoma indiferenciado de tiroides o anaplásico
CDT	carcinoma diferenciado de tiroides
CFT	carcinoma folicular de tiroides
CMT	carcinoma medular de tiroides
CPT	carcinoma papilar de tiroides
CPT-CC	Carcinoma papilar de tiroides de células claras.
CPT Clásico	Carcinoma papilar de tiroides tipo clásico o convencional.
CPT-ED	Carcinoma papilar de tiroides variante esclerosante difuso.
CPT-TC	Carcinoma papilar de tiroides variante células altas.
CPT-VF	Carcinoma papilar de tiroides variante folicular.
CPT-VF-DIF	Carcinoma papilar de tiroides variante folicular difuso.
dNTP	deoxinucleótidos trifosfato
DT	desviación típica
ECO	ecografía
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ETA	<i>European Thyroid Association</i>
EUROCARE	<i>EUROpean CAncer REgistry-based study on survival and CARE of cancer patients</i>
FT4	hormona T4 libre
GDP	guanosina difosfato (<i>guanosine diphosphate</i>)
GTP	guanosina trifosfato (<i>guanosine triphosphate</i>)
Gln	glutamina
IC_{95%}	intervalo de confianza del 95%
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
met	receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
min	minutos
microCPT	carcinoma papilar de tiroides variante esclerosante oculto o microcarcinoma
NIS	transportador de Na/I ⁻ , <i>sodium/iodide symporter</i>
PAAF	punción y aspiración con aguja fina
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PET	tomografía por emisión de positrones
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa (<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PKA	proteína quinasa A
ras	gen <i>RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1</i>
ret	receptor de membrana para el factor de crecimiento neurotrópico derivado de células gliales
rhTSH	TSH recombinante humana
RMN	resonancia magnética nuclear
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
seg	segundos
SLC5	familia del simporter de sodio (<i>sodium solute symporter</i>)
SLC5A8	gen del transportador de yodo (<i>solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8</i>)
TAC	tomografía axial computerizada
Tg	tiroglobulina
TPO	tiroperoxidasa
TSH	hormona estimulante del tiroides, <i>thyroid-stimulating hormone</i>
TSHr	receptor de TSH
TTF-1	factor de transcripción de tiroides-1 (<i>thyroid transcription factor-1</i>)
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>

REFERENCIAS

- AACE/AME Task Force on Thyroid Nodules. American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocr Pract.* 2006;12(1):63-102.
- Abrosimov A, Saenko V, Rogounovitch T, Namba H, Lushnikov E, Mitsutake N, Yamashita S. Different structural components of conventional papillary thyroid carcinoma display mostly identical BRAF status. *Int J Cancer.* 2007;120(1):196-200.
- Abubaker J, Jehan Z, Bavi P, Sultana M, Al-Harbi S, Ibrahim M, Al-Nuaim A, Ahmed M, Amin T, Al-Fehaily M, Al-Sanea O, Al-Dayel F, Uddin S, Al-Kuraya KS. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population. *Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(2):611-8.
- Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, Steward DL, Fidler JP, Giordano TJ, Biddinger PW, Nikiforov YE. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2006;30(2):216-22.
- Ain KB. Management of undifferentiated thyroid cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2000;14(4):615-29.
- Akslen LA, LiVolsi VA. Prognostic significance of histologic grading compared with subclassification of papillary thyroid carcinoma. *Cancer.* 2000;88(8):1902-8.
- Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype--papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocr Pathol.* 2007;18(1):1-7.
- Alexander EK, Heering JP, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Cibas ES, Marqusee E. Assessment of nondiagnostic ultrasound-guided fine needle aspirations of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):4924-7.
- Alexander EK, Hurwitz S, Heering JP, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Cibas ES, Larsen PR, Marqusee E. Natural history of benign solid and cystic thyroid nodules. *Ann Intern Med.* 2003;138(4):315-8.
- Altavilla G, Pascale M, Nenci I. Fine needle aspiration cytology of thyroid gland diseases. *Acta Cytol.* 1990;34(2):251-6.
- Amrikachi M, Ramzy I, Rubinfeld S, Wheeler TM. Accuracy of fine-needle aspiration of thyroid. *Arch Pathol Lab Med.* 2001;125(4):484-8.
- Aratake Y, Umeki K, Kiyoyama K, Hinoura Y, Sato S, Ohno A, Kuribayashi T, Hirai K, Nabeshima K, Kotani T. Diagnostic utility of galectin-3 and CD26/DPPIV as preoperative diagnostic markers for thyroid nodules. *Diagn Cytopathol.* 2002;26(6):366-72.
- Arda IS, Yildirim S, Demirhan B, Firat S. Fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Arch Dis Child.* 2001;85(4):313-7.
- Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Ippolito A, Perrotti N, Vigneri R, Filetti S. Early diagnosis by genetic analysis of differentiated thyroid cancer metastases in small lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(5):1638-41.
- Au AY, McBride C, Wilhelm KG Jr, Koenig RJ, Speller B, Cheung L, Messina M, Wentworth J, Tasevski V, Learoyd D, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ. PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) disrupts normal PAX8 or PPARgamma transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology.* 2006;147(1):367-76.
- Baloch ZW, Abraham S, Roberts S, LiVolsi VA. Differential expression of cytokeratins in follicular variant of papillary carcinoma: an immunohistochemical study and its diagnostic utility. *Hum Pathol.* 1999;30(10):1166-71.
- Baloch ZW, Hendreen S, Gupta PK, LiVolsi VA, Mandel SJ, Weber R, Fraker D. Interinstitutional review of thyroid fine-needle aspirations: impact on clinical management of thyroid nodules. *Diagn Cytopathol.* 2001;25(4):231-4.
- Baloch ZW, LiVolsi VA. Encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with bone metastases. *Mod Pathol.* 2000;13(8):861-5.
- Baloch ZW, LiVolsi VA. Prognostic factors in well-differentiated follicular-derived carcinoma and medullary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2001;11(7):637-45.
- Baloch ZW, Sack MJ, Yu GH, Livolsi VA, Gupta PK. Fine-needle aspiration of thyroid: an institutional experience. *Thyroid.* 1998;8(7):565-9.

- Bartolazzi A, Orlandi F, Saggiorato E, Volante M, Arecco F, Rossetto R, Palestini N, Ghigo E, Papotti M, Bussolati G, Martegani MP, Pantellini F, Carpi A, Giovagnoli MR, Monti S, Toscano V, Sciacchitano S, Pennelli GM, Mian C, Pelizzo MR, Rugge M, Troncone G, Palombini L, Chiappetta G, Botti G, Vecchione A, Bellocco R; Italian Thyroid Cancer Study Group (ITCSG). Galectin-3-expression analysis in the surgical selection of follicular thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration cytology: a prospective multicentre study. *Lancet Oncol.* 2008;9(6):543-9.
- Barzon L, Masi G, Boschin IM, Lavezzo E, Pacenti M, Casal Ide E, Toniato A, Toppo S, Palù G, Pelizzo MR. Characterization of a novel complex BRAF mutation in a follicular variant papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(1):77-80.
- Baskin HJ. *Thyroid Ultrasound and Ultrasound-Guided FNA Biopsy.* Boston: Kluwer Academic Publishers; 2000. p. 71-86.
- Basolo F, Molinaro E, Agate L, Pinchera A, Pollina L, Chiappetta G, Monaco C, Santoro M, Fusco A, Miccoli P, Elisei R, Capezzone M, Pacini F. RET protein expression has no prognostic impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2001;145(5):599-604.
- Batsakis JG, Nishiyama RH, Rich CR. Microlithiasis (calcospherites) and carcinoma of the thyroid gland. *Arch Pathol.* 1960;69:493-8.
- Begum S, Rosenbaum E, Henrique R, Cohen Y, Sidransky D, Westra WH. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implications for tumor origin, diagnosis and treatment. *Mod Pathol.* 2004;17(11):1359-63.
- Belfiore A, Giuffrida D, La Rosa GL, Ippolito O, Russo G, Fiumara A, Vigneri R, Filetti S. High frequency of cancer in cold thyroid nodules occurring at young age. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1989;121(2):197-202.
- Belfiore A, La Rosa GL, La Porta GA, Giuffrida D, Milazzo G, Lupo L, Regalbuto C, Vigneri R. Cancer risk in patients with cold thyroid nodules: relevance of iodine intake, sex, age, and multinodularity. *Am J Med.* 1992 Oct;93(4):363-9.
- Bell B, Mazzaferri EL. Familial adenomatous polyposis (Gardner's syndrome) and thyroid carcinoma. A case report and review of the literature. *Dig Dis Sci.* 1993;38(1):185-90.
- Benbassat CA, Mechlis-Frsh S, Hirsch D. Clinicopathological characteristics and long-term outcome in patients with distant metastases from differentiated thyroid cancer. *World J Surg.* 2006;30(6):1088-95.
- Bernal M, Gómez GJ, Gómez FJ, Fraj M, Royo A. Cambios recientes en la incidencia y mortalidad del cáncer en España. *Oncología* 2006; 29(3):23-9. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-48352006000300003&lng=es&nrm=iso
- Björkman U, Ekholm R, Elmqvist LG, Ericson LE, Melander A, Smeds S. Induced unidirectional transport of protein into the thyroid follicular lumen. *Endocrinology.* 1974;95(6):1506-17.
- Blansfield JA, Sack MJ, Kukora JS. Recent experience with preoperative fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules in a community hospital. *Arch Surg.* 2002;137(7):818-21.
- Bongarzone I, Butti MG, Coronelli S, Borrello MG, Santoro M, Mondellini P, Pilotti S, Fusco A, Della Porta G, Pierotti MA. Frequent activation of ret protooncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 1994;54(11):2979-85.
- Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilotti S, Pierotti MA. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(5):2006-9.
- Bongarzone I, Monzini N, Borrello MG, Carcano C, Ferraresi G, Arighi E, Mondellini P, Della Porta G, Pierotti MA. Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI alpha of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 1993;13(1):358-66.
- Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49(17):4682-9. Erratum in: *Cancer Res* 1990;50(4):1352.
- Brander A, Viikinkoski P, Tuuhea J, Voutilainen L, Kivisaari L. Clinical versus ultrasound examination of the thyroid gland in common clinical practice. *J Clin Ultrasound.* 1992;20(1):37-42.

- Brennan MD, Bergstralh EJ, van Heerden JA, McConahey WM.
Follicular thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome.
Mayo Clin Proc. 1991;66(1):11-22.
- Brierley JD, Panzarella T, Tsang RW, Gospodarowicz MK, O'Sullivan B.
A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example.
Cancer. 1997;79(12):2414-23.
- Bronner MP, LiVolsi VA.
Oxyphilic (Askanazy/Hürthle cell) tumors of the thyroid. Microscopic features predict biologic behavior.
Surg Pathol. 1988;1:137-50.
- Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL.
BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma.
Cancer Res. 2002;62(23):6997-7000.
- Brown RA, Al-Moussa M, Beck J.
Histometry of normal thyroid in man.
J Clin Pathol. 1986;39(5):475-82.
- Brzezińska E, Pastuszek-Lewandoska D, Wojciechowska K, Migdalska-Sek M, Cyniak-Magierska A, Nawrot E, Lewiński A.
Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population.
Neuro Endocrinol Lett. 2007;28(4):351-9.
- Burch HB, Burman KD, Reed HL, Buckner L, Raber T, Ownbey JL.
Fine needle aspiration of thyroid nodules. Determinants of insufficiency rate and malignancy yield at thyroidectomy.
Acta Cytol. 1996;40(6):1176-83.
- Busseniers AE, Oertel YC.
"Cellular adenomatoid nodules" of the thyroid: review of 219 fine-needle aspirates.
Diagn Cytopathol. 1993;9(5):581-9.
- Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M.
A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group.
Eur J Cancer. 1979;15(8):1033-41.
- Cabanes A, Pérez B, Aragonés N, Pollán N, López-Abente G.
La situación del Cáncer en España. Vigilancia epidemiológica del Cáncer. Monitorización de la situación del Cáncer en España.
Madrid: Instituto de Salud Carlos III. Centro Nacional de Epidemiología; 2009.
- Cabanne F, Gérard-Marchant R, Heimann R, Williams ED.
Malignant tumors of the thyroid gland. Problems of histopathologic diagnosis. Apropos of 692 lesions collected by the thyroid cancer Cooperative Group of the O.E.R.T.C.
Ann Anat Pathol (Paris). 1974;19(2):129-48.
- Cady B.
Papillary carcinoma of the thyroid gland: treatment based on risk group definition.
Surg Oncol Clin N Am. 1998;7(4):633-44.
- Cady B, Rossi R.
An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma.
Surgery. 1988;104(6):947-53.
- Cailleux AF, Baudin E, Travagli JP, Ricard M, Schlumberger M.
Is diagnostic iodine-131 scanning useful after total thyroid ablation for differentiated thyroid cancer?
J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(1):175-8.
- Can AS, Peker K.
Comparison of palpation-versus ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsies in the evaluation of thyroid nodules.
BMC Res Notes. 2008;1:12.
- Canchola AJ, Horn-Ross PL, Purdie DM.
Risk of second primary malignancies in women with papillary thyroid cancer.
Am J Epidemiol. 2006;163(6):521-7.
- Cañadas Garre M, Cabrera Cazorla E, Becerra Massaré P, Vera Sánchez M, Muros de Fuentes M, Jiménez Gámiz P, López de la Torre Casares M, Villar del Moral J, Garrido Torres-Puchol F, Concha López Á, Ferrón Orihuela A, Llamas Elvira JM.
Heterogeneous Distribution of BRAFT1799A Mutation in the Primary Tumour and Metastases of Papillary Thyroid Carcinomas.
Eur J Nucl Med Mol Imaging 2008; 34 (S2): S389.
- Cáp J, Ryska A, Rehorková P, Hovorková E, Kerekes Z, Pohnetalová D.
Sensitivity and specificity of the fine needle aspiration biopsy of the thyroid: clinical point of view.
Clin Endocrinol (Oxf). 1999;51(4):509-15.
- Caraway NP, Sneige N, Samaan NA.
Diagnostic pitfalls in thyroid fine-needle aspiration: a review of 394 cases.
Diagn Cytopathol. 1993;9(3):345-50.
- Carcangiu ML.
Minimally Invasive Follicular Carcinoma.
Endocr Pathol. 1997;8(3):231-234.

- Carcangiu ML, Bianchi S.
Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. Clinicopathologic study of 15 cases.
Am J Surg Pathol. 1989;13(12):1041-9.
- Carcangiu ML, Sibley RK, Rosai J.
Clear cell change in primary thyroid tumors. A study of 38 cases.
Am J Surg Pathol. 1985^a;9(10):705-22.
- Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G, Rosai J.
Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases.
Am J Clin Pathol. 1985^b;83(2):135-58.
- Carcangiu ML, Zampi G, Pupi A, Castagnoli A, Rosai J.
Papillary carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 241 cases treated at the University of Florence, Italy.
Cancer. 1985^c;55(4):805-28.
- Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J.
Papillary thyroid carcinoma: a study of its many morphologic expressions and clinical correlates.
Pathol Annu. 1985^d;20(Pt 1):1-44.
- Carcangiu ML, Zampi G, Rosai J.
Poorly differentiated ("insular") thyroid carcinoma. A reinterpretation of Langhans' "wuchernde Struma".
Am J Surg Pathol. 1984;8(9):655-68.
- Carmeci C, Jeffrey RB, McDougall IR, Nowels KW, Weigel RJ.
Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid masses.
Thyroid. 1998 Apr;8(4):283-9.
- Carta C, Moretti S, Passeri L, Barbi F, Avenia N, Cavaliere A, Monacelli M, Macchiarulo A, Santeusano F, Tartaglia M, Puxeddu E.
Genotyping of an Italian papillary thyroid carcinoma cohort revealed high prevalence of BRAF mutations, absence of RAS mutations and allowed the detection of a new mutation of BRAF oncoprotein (BRAF(V599Ins)).
Clin Endocrinol (Oxf). 2006;64(1):105-9.
- Caruso D, Mazzaferri EL.
Fine needle aspiration biopsy in the management of thyroid nodules.
Endocrinologist. 1991;1:194-202.
- Caruso G, Tabbari B, Lucchi I, Tison V.
Fine needle aspiration cytology in a case of diffuse sclerosing carcinoma of the thyroid.
Acta Cytol. 1990;34(3):352-4.
- Castro MR, Gharib H.
Continuing controversies in the management of thyroid nodules.
Ann Intern Med. 2005;142(11):926-31.
- Castro MR, Gharib H.
Thyroid fine-needle aspiration biopsy: progress, practice, and pitfalls.
Endocr Pract. 2003;9(2):128-36.
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M.
PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma.
J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(1):213-20.
- Castro P, Roque L, Magalhães J, Sobrinho-Simões M.
A subset of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma harbors the PAX8-PPARgamma translocation.
Int J Surg Pathol. 2005;13(3):235-8.
- Cersosimo E, Gharib H, Suman VJ, Goellner JR.
"Suspicious" thyroid cytologic findings: outcome in patients without immediate surgical treatment.
Mayo Clin Proc. 1993;68(4):343-8.
- Chan JK.
Papillary carcinoma of thyroid: classical and variants.
Histol Histopathol. 1990;5(2):241-57
- Chan JK, Saw D.
The grooved nucleus. A useful diagnostic criterion of papillary carcinoma of the thyroid.
Am J Surg Pathol. 1986;10(10):672-9.
- Chan JK, Tsui MS, Tse CH.
Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: a histological and immunohistochemical study of three cases.
Histopathology. 1987;11(2):191-201.
- Chem KT, Rosai J.
Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases.
Am J Surg Pathol. 1977;1(2):123-30.
- Chen AY, Jemal A, Ward EM.
Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005.
Cancer. 2009;115(16):3801-7.
- Chen H, Nicol TL, Zeiger MA, Dooley WC, Ladenson PW, Cooper DS, Ringel M, Parkerson S, Allo M, Udelsman R.
Hürthle cell neoplasms of the thyroid: are there factors predictive of malignancy?
Ann Surg. 1998;227(4):542-6.
- Chen YK, Ding HJ, Chen KT, Chen YL, Liao AC, Shen YY, Su CT, Kao CH.
Prevalence and risk of cancer of focal thyroid incidentaloma identified by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for cancer screening in healthy subjects.
Anticancer Res. 2005;25(2B):1421-6.

- Cheung CC, Carydis B, Ezzat S, Bedard YC, Asa SL. Analysis of ret/PTC gene rearrangements refines the fine needle aspiration diagnosis of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001^a;86(5):2187-90.
- Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol.* 2001^b;14(4):338-42.
- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG. Detection of the PAX8-PPAR gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):354-7.
- Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid.* 2001;11(12):1147-51.
- Chow SM, Law SC, Chan JK, Au SK, Yau S, Lau WH. Papillary microcarcinoma of the thyroid-Prognostic significance of lymph node metastasis and multifocality. *Cancer.* 2003;98(1):31-40.
- Chung KW, Yang SK, Lee GK, Kim EY, Kwon S, Lee SH, Park do J, Lee HS, Cho BY, Lee ES, Kim SW. Detection of BRAFV600E mutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cytopathology diagnosis, especially in BRAFV600E mutation-prevalent area. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65(5):660-6.
- Ciampi R, Giordano TJ, Wikenheiser-Brokamp K, Koenig RJ, Nikiforov YE. HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2007;14(2):445-52.
- Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of the BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2005;16(3):163-72.
- Ciampi R, Nikiforov YE. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology.* 2007;148(3):936-41.
- Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest.* 2005;115(1):94-101.
- Civantos F, Albores-Saavedra J, Nadji M, Morales AR. Clear cell variant of thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1984;8(3):187-92.
- Clark OH. Predictors of thyroid tumor aggressiveness. *West J Med.* 1996;165(3):131-8.
- Clark JR, Lai P, Hall F, Borglund A, Eski S, Freeman JL. Variables predicting distant metastases in thyroid cancer. *Laryngoscope.* 2005;115(4):661-7.
- Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Parrella P, Chowers I, Merbs SL, Pe'er J, Sidransky D. Lack of BRAF mutation in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003^a;44(7):2876-8.
- Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, Sidransky D, Westra WH. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res.* 2004;10(8):2761-5.
- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003^b;95(8):625-7.
- Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Estève J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F; EURO CARE Working Group. EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol.* 2003;14 Suppl 5:v128-49.
- Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Pacini F, Schlumberger M, Sherman SI, Steward DL, Tuttle RM. American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2009;19(11):1167-214.
- Corvi R, Berger N, Balczon R, Romeo G. RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene.* 2000;19(37):4236-42.
- Costa AM, Herrero A, Fresno MF, Heymann J, Alvarez JA, Cameselle-Teijeiro J, García-Rostán G. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(4):618-34.
- Costante G, Crocetti U, Schifino E, Ludovico O, Capula C, Nicotera M, Arturi F, Filetti S. Slow growth of benign thyroid nodules after menopause: no need for long-term thyroxine suppressive therapy in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest.* 2004;27(1):31-6.
- Craver LF.

- Cancer of the thyroid and its present-day treatment: embodying the experience of the Memorial Hospital of New York.
Ann Surg. 1925;82(6):833-53.
- Crile G Jr, Hazard JB.
Relationship of the age of the patient to the natural history and prognosis of carcinoma of the thyroid.
Ann Surg. 1953;138(1):33-8.
- Cross S, Wei JP, Kim S, Brams DM.
Selective surgery and adjuvant therapy based on risk classifications of well-differentiated thyroid cancer.
J Surg Oncol. 2006;94(8):678-82.
- Christophe D, Gérard C, Juvenal G, Bacolla A, Teugels E, Ledent C, Christophe-Hobertus C, Dumont JE, Vassart G.
Identification of a cAMP-responsive region in thyroglobulin gene promoter.
Mol Cell Endocrinol. 1989;64(1):5-18.
- Cunningham MP, Duda RB, Recant W, Chmiel JS, Sylvester JA, Fremgen A.
Survival discriminants for differentiated thyroid cancer.
Am J Surg. 1990;160(4):344-7.
- Curtis RE, Rowlings PA, Deeg HJ, Shriner DA, Socie G, Travis LB, Horowitz MM, Witherspoon RP, Hoover RN, Sobocinski KA, Fraumeni JF Jr, Boice JD Jr.
Solid cancers after bone marrow transplantation.
N Engl J Med. 1997;336(13):897-904.
- D'Avanzo A, Ituarte P, Treseler P, Kebebew E, Wu J, Wong M, Duh QY, Siperstein AE, Clark OH.
Prognostic scoring systems in patients with follicular thyroid cancer: a comparison of different staging systems in predicting the patient outcome.
Thyroid. 2004;14(6):453-8.
- Danese D, Sciacchitano S, Farsetti A, Andreoli M, Pontecorvi A.
Diagnostic accuracy of conventional versus sonography-guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules.
Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA.
Mutations of the BRAF gene in human cancer.
Nature. 2002^a;417(6892):949-54.
- Davies L, Welch HG.
Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002.
JAMA. 2006;295(18):2164-7.
- Davies T, Marians R, Latif R.
The TSH receptor reveals itself.
J Clin Invest. 2002^b;110(2):161-4.
- De Falco V, Giannini R, Tamburrino A, Ugolini C, Lupi C, Puxeddu E, Santoro M, Basolo F.
Functional characterization of the novel T599I-VKSRdel BRAF mutation in a follicular variant papillary thyroid carcinoma.
J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(11):4398-402.
- de Martynoff G, Pohl V, Mercken L, van Ommen GJ, Vassart G.
Structural organization of the bovine thyroglobulin gene and of its 5'-flanking region.
Eur J Biochem. 1987;164(3):591-9.
- DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormick M, Straus FH.
Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma.
J Clin Endocrinol Metab. 1990;71(2):414-24.
- DeLellis RA.
Pathology and genetics of thyroid carcinoma.
J Surg Oncol. 2006;94(8):662-9.
- DeLellis, RA, Lloyd, RV, Heitz, PU, Eng, C.
Tumours of Endocrine Organs. Pathology and Genetics.
Lyon: World Health Organization IARC Press; 2004.
- Dhillon AS, Kolch W.
Oncogenic B-Raf mutations: crystal clear at last.
Cancer Cell. 2004;5(4):303-4.
- Di Cristofaro J, Marcy M, Vasko V, Sebag F, Fakhry N, Wynford-Thomas D, De Micco C.
Molecular genetic study comparing follicular variant versus classic papillary thyroid carcinomas: association of N-ras mutation in codon 61 with follicular variant.
Hum Pathol. 2006;37(7):824-30.
- Domingues R, Mendonça E, Sobrinho L, Bugalho MJ.
Searching for RET/PTC rearrangements and BRAF V599E mutation in thyroid aspirates might contribute to establish a preoperative diagnosis of papillary thyroid carcinoma.
Cytopathology. 2005;16(1):27-31.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS.
'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification.
Nucleic Acids Res. 1991;19(14):4008.
- Duntas LH.
The role of selenium in thyroid autoimmunity and cancer.
Thyroid. 2006;16(5):455-60.

- Duntas L, Grab-Duntas BM.
Risk and prognostic factors for differentiated thyroid cancer.
Hell J Nucl Med. 2006;9(3):156-62.
- Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, Caillou B, Ricard M, Lumbroso JD, De Vathaire F, Schlumberger M.
Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy.
J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(8):2892-9.
- Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, Barbi F, Avenia N, Scipioni A, Verrienti A, Tosi E, Cavaliere A, Gulino A, Filetti S, Russo D.
BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism.
J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(7):2840-3. Epub 2007 May 8.
- Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Höög A, Frisk T, Larsson C, Zedenius J.
Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors.
J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(9):4440-5.
- Elisei R, Romei C, Vorontsova T, Cosci B, Veremeychik V, Kuchinskaya E, Basolo F, Demidchik EP, Miccoli P, Pinchera A, Pacini F.
RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults.
J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(7):3211-6.
- Elisei R, Ugolini C, Viola D, Lupi C, Biagini A, Giannini R, Romei C, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F.
BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study.
J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(10):3943-9.
- Ericson LE, Engström G.
Quantitative electron microscopic studies on exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle cell.
Endocrinology. 1978;103(3):883-92.
- Erickson LA, Jin L, Nakamura N, Bridges AG, Markovic SN, Lloyd RV.
Clinicopathologic features and BRAF(V600E) mutation analysis in cutaneous metastases from well-differentiated thyroid carcinomas.
Cancer. 2007;109(10):1965-71.
- Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE.
Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia.
Clin Endocrinol (Oxf). 1999;50(4):529-35.
- Evans HL.
Columnar-cell carcinoma of the thyroid. A report of two cases of an aggressive variant of thyroid carcinoma.
Am J Clin Pathol. 1986;85(1):77-80.
- Evans HL.
Encapsulated papillary neoplasms of the thyroid. A study of 14 cases followed for a minimum of 10 years.
Am J Surg Pathol. 1987;11(8):592-7.
- Ezzat S, Sarti DA, Cain DR, Braunstein GD.
Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography.
Arch Intern Med. 1994;154(16):1838-40.
- Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL.
Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules.
Thyroid. 1996;6(5):409-16.
- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J.
The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene.
J Biol Chem. 1997;272(30):18779-89.
- Falvo L, Catania A, D'Andrea V, Marzullo A, Giustiniani MC, De Antoni E.
Prognostic importance of histologic vascular invasion in papillary thyroid carcinoma.
Ann Surg. 2005;241(4):640-6.
- Farid NR, Szkudlinski MW.
Minireview: structural and functional evolution of the thyrotropin receptor.
Endocrinology. 2004;145(9):4048-57.
- Fatourechi V, Hay ID.
Treating the patient with differentiated thyroid cancer with thyroglobulin-positive iodine-131 diagnostic scan-negative metastases: including comments on the role of serum thyroglobulin monitoring in tumor surveillance.
Semin Nucl Med. 2000;30(2):107-14.
- Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM.
The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults.
J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(3):1170-5.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM.
GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide.
Lyon: IARC CancerBase No. 5. version 2.0, IARC Press; 2004.
- Ferlay J, Bray F, Sankila R, Parkin DM.

- EUCAN: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence in the European Union 1998, version 5.0. Lyon: IARC CancerBase No. 4., IARCPress; 1999.
- Filetti S, Durante C, Torlontano M. Nonsurgical approaches to the management of thyroid nodules. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2(7):384-94.
- Filie AC, Chiesa A, Bryant BR, Merino MJ, Sobel ME, Abati A. The Tall cell variant of papillary carcinoma of the thyroid: cytologic features and loss of heterozygosity of metastatic and/or recurrent neoplasms and primary neoplasms. *Cancer.* 1999;87(4):238-42.
- Fisher DA, Polk DH. Development of the thyroid. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1989;3(3):627-57
- Flint A, Davenport RD, Lloyd RV. The tall cell variant of papillary carcinoma of the thyroid gland. Comparison with the common form of papillary carcinoma by DNA and morphometric analysis. *Arch Pathol Lab Med.* 1991;115(2):169-71.
- Flint A, Davenport RD, Lloyd RV, Beckwith AL, Thompson NW. Cytophotometric measurements of Hürthle cell tumors of the thyroid gland. Correlation with pathologic features and clinical behavior. *Cancer.* 1988;61(1):110-3.
- Franklyn JA, Daykin J, Young J, Oates GD, Sheppard MC. Fine needle aspiration cytology in diffuse or multinodular goitre compared with solitary thyroid nodules. *BMJ.* 1993;307(6898):240.
- Franssila KO. Is the differentiation between papillary and follicular thyroid carcinoma valid? *Cancer.* 1973;32(4):853-64.
- Frasca F, Nucera C, Pellegriti G, Gangemi P, Attard M, Stella M, Loda M, Vella V, Giordano C, Trimarchi F, Mazzone E, Belfiore A, Vigneri R. BRAF(V600E) mutation and the biology of papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2008;15(1):191-205.
- Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene.* 2004;23(44):7436-40.
- French CA, Alexander EK, Cibas ES, Nose V, Laguette J, Faquin W, Garber J, Moore F Jr, Fletcher JA, Larsen PR, Kroll TG. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol.* 2003;162(4):1053-60.
- Friedman NB. Cellular involution in the thyroid gland; significance of Hürthle cells in myxedema, exhaustion atrophy, Hashimoto's disease and the reactions to irradiation, thiouracil therapy and subtotal resection. *J Clin Endocrinol Metab.* 1949;9(9):874-82.
- Fugazzola L, Mannavola D, Cirello V, Vannucchi G, Muzza M, Vicentini L, Beck-Peccoz P. BRAF mutations in an Italian cohort of thyroid cancers. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004;61(2):239-43.
- Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, Faviana P, Mannavola D, Moretti S, Rossi S, Sculli M, Bottici V, Beck-Peccoz P, Pacini F, Pinchera A, Santeusano F, Elisei R. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(2):455-64.
- Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I. Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Oncogene.* 1996;13(5):1093-7.
- Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, Sekikawa K, Hagiwara K, Takenoshita S. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene.* 2003;22(41):6455-7.
- Fujimoto Y, Obara T, Ito Y, Kodama T, Aiba M, Yamaguchi K. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. Clinical importance, surgical treatment, and follow-up study.
- Galen RS, Gambino SR. Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnoses. New York: John Wiley & Sons; 1975, 1-14.
- Galloway JW, Sardi A, DeConti RW, Mitchell WT Jr, Bolton JS. Changing trends in thyroid surgery. 38 years' experience. *Am Surg.* 1991;57(1):18-20.

- Gamboa-Domínguez A, Candanedo-González F, Uribe-Uribe NO, Angeles-Angeles A. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. A cytohistologic correlation. *Acta Cytol.* 1997;41(3):672-6.
- Gardiner GW, de Souza FM, Carydis B, Seemann C. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid gland: results of a five-year experience and discussion of its clinical limitations. *J Otolaryngol.* 1986;15(3):161-5.
- Gardner RE, Tuttle RM, Burman KD, Haddady S, Truman C, Sparling YH, Wartofsky L, Sessions RB, Ringel MD. Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(3):309-12.
- Gharib H. Changing trends in thyroid practice: understanding nodular thyroid disease. *Endocr Pract.* 2004;10(1):31-9.
- Gharib H. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: advantages, limitations, and effect. *Mayo Clin Proc.* 1994;69(1):44-9.
- Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med.* 1993; 118:282-9.
- Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *Endocr Pract.* 1995;1(6):410-7.
- Gharib H, Goellner JR, Johnson DA. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-year experience with 11,000 biopsies. *Clin Lab Med.* 1993;13(3):699-709.
- Gharib H, Papini E. Thyroid nodules: clinical importance, assessment, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(3):707-35, vi.
- Gharib H, Papini E, Paschke R. Thyroid nodules: a review of current guidelines, practices, and prospects. *Eur J Endocrinol.* 2008;159(5):493-505.
- Ghossein RA, Leboeuf R, Patel KN, Rivera M, Katabi N, Carlson DL, Tallini G, Shaha A, Singh B, Tuttle RM. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma without extrathyroid extension: biologic behavior and clinical implications. *Thyroid.* 2007;17(7):655-61.
- Giannini R, Faviana P, Cavinato T, Elisei R, Pacini F, Berti P, Fontanini G, Ugolini C, Camacci T, De Ieso K, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F. Galectin-3 and oncofetal-fibronectin expression in thyroid neoplasia as assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunochemistry in cytologic and pathologic specimens. *Thyroid.* 2003;13(8):765-70.
- Giannini R, Ugolini C, Lupi C, Proietti A, Elisei R, Salvatore G, Berti P, Materazzi G, Miccoli P, Santoro M, Basolo F. The heterogeneous distribution of BRAF mutation supports the independent clonal origin of distinct tumor foci in multifocal papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3511-6.
- Gibson WG, Croker B, P Cox C. C-cell populations in normal children and young adults. *Lab Invest.* 1980; 42: 119-20.
- Gibson WG, Peng TC, Croker BP. Age-associated C-cell hyperplasia in the human thyroid. *Am J Pathol.* 1982;106(3):388-93.
- Gibson WC, Peng TC, Croker BP. C-cell nodules in adult human thyroid. A common autopsy finding. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(3):347-50.
- Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, Zhu Z, Ciampi R, Roh M, Shedden K, Gauger P, Doherty G, Thompson NW, Hanash S, Koenig RJ, Nikiforov YE. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene.* 2005;24(44):6646-56.
- Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol.* 1987;31(5):587-90.
- Gómez-Morales M, Alvaro T, Muñoz M, Garcia del Moral R, Aguilar D, Caballero T, Aneiros J. Diffuse sclerosing papillary carcinoma of the thyroid gland: immunohistochemical analysis of the local host immune response. *Histopathology.* 1991;18(5):427-33.
- González-Cámpora R, Galera-Ruiz D, Armas-Padrón JR, Ota-Salaverri C, Galera-Davidson H. Dipeptidyl aminopeptidase IV in the cytologic diagnosis of thyroid carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 1998;19(1):4-8.
- Gray A, Doniach I.

- Morphology of the nuclei of papillary carcinoma of the thyroid.
Br J Cancer. 1969;23(1):49-51.
- Grebe SK, Hay ID.
Thyroid cancer nodal metastases: biologic significance and therapeutic considerations.
Surg Oncol Clin N Am. 1996;5(1):43-63.
- Green WL. Physiology of the thyroid gland and its hormones.
En: Green WL, ed.
The thyroid.
New York: Elsevier; 1987: 1-46.
- Greene FL.
Cancer staging, prognostic factors, and our surgical challenges.
Am Surg. 2005;71(8):615-20.
- Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M.
AJCC Cancer Staging Manual, 6^a ed.
Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 2002.
- Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I, Pierotti MA, Della Porta G, Fusco A, Vecchio G.
PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas.
Cell. 1990;60(4):557-63.
- Guan H, Ji M, Bao R, Yu H, Wang Y, Hou P, Zhang Y, Shan Z, Teng W, Xing M.
Association of High Iodine Intake with the T1799A BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer.
J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(5):1612-7.
- Guitar GE, DeLellis RA.
Multinucleate giant cells in papillary thyroid carcinoma. A morphologic and immunohistochemical study.
Am J Clin Pathol. 1996;106(6):765-8.
- Gulcelik MA, Gulcelik NE, Kuru B, Camlibel M, Alagol H.
Prognostic factors determining survival in differentiated thyroid cancer.
J Surg Oncol. 2007;96(7):598-604.
- Hagag P, Strauss S, Weiss M.
Role of ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy in evaluation of nonpalpable thyroid nodules.
Thyroid. 1998;8(11):989-95.
- Hall TL, Layfield LJ, Philippe A, Rosenthal DL.
Sources of diagnostic error in fine needle aspiration of the thyroid.
Cancer. 1989;63(4):718-25.
- Hamberger B, Gharib H, Melton LJ 3rd, Goellner JR, Zinsmeister AR.
Fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. Impact on thyroid practice and cost of care.
Am J Med. 1982;73:381-4.
- Hamburger JI.
Diagnosis of thyroid nodules by fine needle biopsy: use and abuse.
J Clin Endocrinol Metab. 1994;79(2):335-9.
- Hamburger JI, Husain M.
Semiquantitative criteria for fine-needle biopsy diagnosis: reduced false-negative diagnoses.
Diagn Cytopathol. 1988;4(1):14-7.
- Hapke MR, Dehner LP.
The optically clear nucleus. A reliable sign of papillary carcinoma of the thyroid?
Am J Surg Pathol. 1979;3(1):31-8.
- Haq M, Harmer C.
Differentiated thyroid carcinoma with distant metastases at presentation: prognostic factors and outcome.
Clin Endocrinol (Oxf). 2005;63(1):87-93.
- Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL.
N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma.
Surgery. 1994;116(6):1010-6.
- Harach HR.
Mixed follicles of the human thyroid gland.
Acta Anat (Basel). 1987;129(1):27-30.
- Harach HR, Franssila KO.
Occult papillary carcinoma of the thyroid appearing as lung metastasis.
Arch Pathol Lab Med. 1984;108(7):529-30.
- Haugen BR, Woodmansee WW, McDermott MT.
Towards improving the utility of fine-needle aspiration biopsy for the diagnosis of thyroid tumours.
Clin Endocrinol (Oxf). 2002;56(3):281-90.
- Hawk WA, Hazard JB.
The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid.
Cleve Clin Q. 1976;43(4):207-15.
- Hay ID.
Papillary thyroid carcinoma.
Endocrinol Metab Clin North Am. 1990;19(3):545-76.
- Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS.
Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989.
Surgery. 1993;114(6):1050-7; discussion 1057-8.

- Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery*. 1987;102(6):1088-95.
- Hay ID, McConahey WM, Goellner JR. Managing patients with papillary thyroid carcinoma: insights gained from the Mayo Clinic's experience of treating 2,512 consecutive patients during 1940 through 2000. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2002^a;113:241-60.
- Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, Maurer MS, McIver B, Mullan BP, Oberg AL, Powell CC, van Heerden JA, Goellner JR. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg*. 2002^b;26(8):879-85.
- Hayashi Y, Sasao T, Takeichi N, Kuma K, Katayama S. Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. A histopathological study of four cases. *Acta Pathol Jpn*. 1990;40(3):193-8.
- Hayashida N, Namba H, Kumagai A, Hayashi T, Ohtsuru A, Ito M, Saenko VA, Maeda S, Kanematsu T, Yamashita S. A rapid and simple detection method for the BRAF(T1796A) mutation in fine-needle aspirated thyroid carcinoma cells. *Thyroid*. 2004;14(11):910-5.
- Hecker KH, Roux KH. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*. 1996;20(3):478-85.
- Hegedüs L. Clinical practice. The thyroid nodule. *N Engl J Med*. 2004;351(17):1764-71.
- Henry JF, Denizot A, Porcelli A, Villafane M, Zoro P, Garcia S, De Micco C. Thyroperoxidase immunodetection for the diagnosis of malignancy on fine-needle aspiration of thyroid nodules. *World J Surg*. 1994;18(4):529-34.
- Hicks MJ, Batsakis JG. Tall cell carcinoma of the thyroid gland. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1993;102(5):402-3.
- Hirabayashi RN, Lindsay S. Carcinoma of the thyroid gland: a statistical study of 390 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1961;21:1596-610.
- Hirokawa M, Inagaki A, Kobayashi H, Kanahara T, Manabe T, Sonoo H. Expression of cytokeratin 19 in cytologic specimens of thyroid. *Diagn Cytopathol*. 2000;22(3):197-8.
- Hoie J, Stenwig AE, Kullmann G, Lindegaard M. Distant metastases in papillary thyroid cancer. A review of 91 patients. *Cancer*. 1988;61(1):1-6.
- Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlander N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/, based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009. Última entrada: 23 de enero de 2010.
- Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, Wang Y, Trink A, El-Naggar AK, Tallini G, Vasko V, Xing M. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2007^a;13(4):1161-70.
- Hou P, Liu D, Xing M. Functional characterization of the T1799-1801del and A1799-1816ins BRAF mutations in papillary thyroid cancer. *Cell Cycle*. 2007^b;6(3):377-9.
- Hubbard SR. Oncogenic mutations in B-Raf: some losses yield gains. *Cell*. 2004;116(6):764-6.
- Hughes CJ, Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Impact of lymph node metastasis in differentiated carcinoma of the thyroid: a matched-pair analysis. *Head Neck*. 1996;18(2):127-32.
- Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, Shah JP, Fremgen AM, Stewart AK, Hölzer S. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer*. 2000;89(1):202-17.
- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*. 1998;83(12):2638-48.

- Hurlimann J, Gardiol D, Scazziga B. Immunohistology of anaplastic thyroid carcinoma. A study of 43 cases. *Histopathology*. 1987;11(6):567-80.
- Ide M. Immunoelectron microscopic localization of thyroglobulin in the human thyroid gland. *Acta Pathol Jpn*. 1984;34(3):575-84.
- Ilgan S, Karacalioglu AO, Pabuscu Y, Atac GK, Arslan N, Ozturk E, Gunalp B, Ozguven MA. Iodine-131 treatment and high-resolution CT: results in patients with lung metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(6):825-30.
- Imamura Y, Kasahara Y, Fukuda M. Multiple brain metastases from a diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. *Endocr Pathol*. 2000;11(1):97-108.
- Ingbar SH. The thyroid gland. En: Williams RH, Wilson JD, Foster DW, eds. *Williams Textbook of endocrinology*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 1985.
- Ishizaka Y, Kobayashi S, Ushijima T, Hirohashi S, Sugimura T, Nagao M. Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. *Oncogene*. 1991;6(9):1667-72.
- Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Yokozawa T, Matsuzuka F, Kuma S, Kuma K, Miyauchi A. An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid*. 2003;13(4):381-7.
- Ito Y, Yoshida H, Maruo R, Morita S, Takano T, Hirokawa M, Yabuta T, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, Kihara M, Uruno T, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Miyauchi A. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in a Japanese population: its lack of correlation with high-risk clinicopathological features and disease-free survival of patients. *Endocr J*. 2009;56(1):89-97. Epub 2008 Oct 8.
- Ivanova R, Soares P, Castro P, Sobrinho-Simões M. Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. *Virchows Arch*. 2002;440(4):418-24.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(4):225-49.
- Jin L, Sebo TJ, Nakamura N, Qian X, Oliveira A, Majerus JA, Johnson MR, Lloyd RV. BRAF mutation analysis in fine needle aspiration (FNA) cytology of the thyroid. *Diagn Mol Pathol*. 2006;15(3):136-43.
- Jo YS, Li S, Song JH, Kwon KH, Lee JC, Rha SY, Lee HJ, Sul JY, Kweon GR, Ro HK, Kim JM, Shong M. Influence of the BRAF V600E mutation on expression of vascular endothelial growth factor in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3667-70.
- Johannessen JV, Sobrinho-Simões M. The origin and significance of thyroid psammoma bodies. *Lab Invest*. 1980;43(3):287-96.
- Johnson NA, Tublin ME. Postoperative surveillance of differentiated thyroid carcinoma: rationale, techniques, and controversies. *Radiology*. 2008 Nov;249(2):429-44.
- Johnson TL, Lloyd RV, Thompson NW, Beierwaltes WH, Sisson JC. Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1988;12(1):22-7.
- Joseph UA, Jhingran SG. Graves' disease and concurrent thyroid carcinoma. The importance of thyroid scintigraphy in Graves' disease. *Clin Nucl Med*. 1995;20(5):416-8.
- Jukkola A, Bloigu R, Ebeling T, Salmela P, Blanco G. Prognostic factors in differentiated thyroid carcinomas and their implications for current staging classifications. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(3):571-9.
- Kabel PJ, Voorbij HA, De Haan M, van der Gaag RD, Drexhage HA. Intrathyroidal dendritic cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;66(1):199-207.
- Kakudo K, Tang W, Ito Y, Mori I, Nakamura Y, Miyauchi A. Papillary carcinoma of the thyroid in Japan: subclassification of common type and identification of low risk group. *J Clin Pathol*. 2004;57(10):1041-6.
- Kang KW, Kim SK, Kang HS, Lee ES, Sim JS, Lee IG, Jeong SY, Kim SW.

- Prevalence and risk of cancer of focal thyroid incidentaloma identified by 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for metastasis evaluation and cancer screening in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(9):4100-4.
- Kasai N, Sakamoto A.
New subgrouping of small thyroid carcinomas. *Cancer.* 1987;60(8):1767-70.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A.
Diagnostic and prognostic value of angiogenesis-modulating genes in malignant thyroid neoplasms. *Surgery.* 2005^a;138(6):1102-9; discussion 1109-10.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A.
Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasms. *World J Surg.* 2006^a;30(5):767-74.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A.
ECM1 and Tmprss4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Ann Surg.* 2005^b;242(3):353-61; discussion 361-3.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, McMillan A.
Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms. *Cancer.* 2006^b;106(12):2592-7.
- Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh QY, Shih D, Bastian B, Griffin A.
The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg.* 2007;246(3):466-70; discussion 470-1.
- Keelawat S, Poumsuk U.
Association between different variants of papillary thyroid carcinoma and risk-group according to AMES (age, metastasis, extent and size) classification system. *J Med Assoc Thai.* 2006;89(4):484-9.
- Khurana KK, Truong LD, LiVolsi VA, Baloch ZW.
Cytokeratin 19 immunolocalization in cell block preparation of thyroid aspirates. An adjunct to fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(5):579-83.
- Kim DW, Jo YS, Jung HS, Chung HK, Song JH, Park KC, Park SH, Hwang JH, Rha SY, Kweon GR, Lee SJ, Jo KW, Shong M.
An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006^a;91(10):4070-6.
- Kim J, Giuliano AE, Turner RR, Gaffney RE, Umetani N, Kitago M, Elashoff D, Hoon DS.
Lymphatic mapping establishes the role of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg.* 2006^d;244(5):799-804.
- Kim JY, Cho H, Rhee BD, Kim HY.
Expression of CD44 and cyclin D1 in fine needle aspiration cytology of papillary thyroid carcinoma. *Acta Cytol.* 2002;46(4):679-83.
- Kim KH, Kang DW, Kim SH, Seong IO, Kang DY.
Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma in a Korean population. *Yonsei Med J.* 2004;45(5):818-21.
- Kim KH, Suh KS, Kang DW, Kang DY.
Mutations of the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma and in Hashimoto's thyroiditis. *Pathol Int.* 2005^a;55(9):540-5.
- Kim MJ, Kim HJ, Hong SJ, Shong YK, Gong G.
Diagnostic utility of galectin-3 in aspirates of thyroid follicular lesions. *Acta Cytol.* 2006^b;50(1):28-34.
- Kim SW, In Lee J, Kim JW, Ki CS, Oh YL, Choi YL, Shin JH, Kim HK, Jang HW, Chung JH.
BRAFV600E Mutation Analysis in Fine-Needle Aspiration Cytology Specimens for Evaluation of Thyroid Nodule: A Large Series in a BRAFV600E-Prevalent Population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010. En prensa.
- Kim TY, Kim WB, Kim ES, Ryu JS, Yeo JS, Kim SC, Hong SJ, Shong YK.
Serum thyroglobulin levels at the time of 131I remnant ablation just after thyroidectomy are useful for early prediction of clinical recurrence in low-risk patients with differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005^c;90(3):1440-5.
- Kim TY, Kim WB, Rhee YS, Song JY, Kim JM, Gong G, Lee S, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK.
The BRAF mutation is useful for prediction of clinical recurrence in low-risk patients with conventional papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006^c;65(3):364-8.
- Kim TY, Kim WB, Song JY, Rhee YS, Gong G, Cho YM, Kim SY, Kim SC, Hong SJ, Shong YK.
The BRAF mutation is not associated with poor prognostic factors in Korean patients with conventional papillary thyroid microcarcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005^b;63(5):588-93.
- Kim N, Lavertu P.
Evaluation of a thyroid nodule. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003;36(1):17-33.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA.

- High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(7):1454-7.
- Kingma G, van den Bergen HA, de Vries JE. Prognostic scoring systems in differentiated thyroid carcinoma: which is the best? *Neth J Surg.* 1991;43(3):63-6.
- Kini SR. *Thyroid Cytopathology. An atlas and text.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
- Kini SR, Miller JM, Hamburger JI, Smith-Purslow MJ. Cytopathology of follicular lesions of the thyroid gland. *Diagn Cytopathol.* 1985;1(2):123-32.
- Klinck GH, Winship T. Psammoma bodies and thyroid cancer. *Cancer.* 1959;12(4):656-62.
- Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Res.* 1998^a;58(2):198-203.
- Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Molecular analysis of new subtypes of ELE/RET rearrangements, their reciprocal transcripts and breakpoints in papillary thyroid carcinomas of children after Chernobyl. *Oncogene.* 1998^b;16(5):671-5.
- Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Demidchik E, Rabes HM. A novel type of RET rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8).
- Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene.* 1999;18(30):4388-93.
- Knauf JA, Kuroda H, Basu S, Fagin JA. RET/PTC-induced dedifferentiation of thyroid cells is mediated through Y1062 signaling through SHC-RAS-MAP kinase. *Oncogene.* 2003;22(28):4406-12.
- Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 2005;65(10):4238-45.
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):292-306.
- Kouvaraki MA, Shapiro SE, Fornage BD, Edeiken-Monro BS, Sherman SI, Vassilopoulou-Sellin R, Lee JE, Evans DB. Role of preoperative ultrasonography in the surgical management of patients with thyroid cancer. *Surgery.* 2003;134(6):946-54; discussion 954-5.
- Kroll TG. Molecular events in follicular thyroid tumors. *Cancer Treat Res.* 2004;122:85-105.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected] *Science.* 2000;289(5483):1357-60. Erratum in: *Science* 2000;289(5484):1474.
- Kumagai A, Namba H, Saenko VA, Ashizawa K, Ohtsuru A, Ito M, Ishikawa N, Sugino K, Ito K, Jeremiah S, Thomas GA, Bogdanova TI, Tronko MD, Nagayasu T, Shibata Y, Yamashita S. Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4280-4.
- Kumarasinghe MP. Cytomorphologic features of diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. A report of two cases in children. *Acta Cytol.* 1998;42(4):983-6.
- Kuo CS, Lin CY, Hsu CW, Lee CH, Lin HD. Low frequency of rearrangement of TRK protooncogene in Chinese thyroid tumors. *Endocrine.* 2000;13(3):341-4.
- Kuru B. The sensitivity and the false negative rate of fine needle aspiration biopsy in thyroid nodule. *Ann Surg.* 2008;248(2):343-4; author reply 344. Comment on: *Ann Surg.* 2007 Nov;246(5):714-20.
- Kwak JY, Kim EK, Chung WY, Moon HJ, Kim MJ, Choi JR. Association of BRAFV600E mutation with poor clinical prognostic factors and US features in Korean patients with papillary thyroid microcarcinoma.
- Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam AK, Wan KY. Classical and follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study on clinicopathologic features and long-term outcome. *World J Surg.* 2006;30(5):752-8.
- Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinoma: their implications for cancer staging.

- Larsen PR.
Thyroid-pituitary interaction: feedback regulation of thyrotropin secretion by thyroid hormones.
N Engl J Med. 1982;306(1):23-32.
- Laskin WB, James LP.
Occult papillary carcinoma of the thyroid with pulmonary metastases.
Hum Pathol. 1983;14:83-5.
- Lazzereschi D, Mincione G, Coppa A, Ranieri A, Turco A, Baccheschi G, Pelicano S, Colletta G.
Oncogenes and antioncogenes involved in human thyroid carcinogenesis.
J Exp Clin Cancer Res. 1997;16(3):325-32.
- Leboulleux S, Rubino C, Baudin E, Caillou B, Hartl DM, Bidart JM, Travagli JP, Schlumberger M.
Prognostic factors for persistent or recurrent disease of papillary thyroid carcinoma with neck lymph node metastases and/or tumor extension beyond the thyroid capsule at initial diagnosis.
J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(10):5723-9.
- Lee JH, Lee ES, Kim YS.
Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: a meta-analysis.
Cancer. 2007;110(1):38-46.
- Lee HJ, Choi J, Hwang TS, Shong YK, Hong SJ, Gong G.
Detection of BRAF mutations in thyroid nodules by allele-specific PCR using a dual priming oligonucleotide system.
Am J Clin Pathol. 2010;133(5):802-8.
- Lee JH, Lee ES, Kim YS, Won NH, Chae YS.
BRAF mutation and AKAP9 expression in sporadic papillary thyroid carcinomas.
Pathology. 2006;38(3):201-4.
- Lee NT, Nayfeh SN, Chae CB.
Induction of nuclear protein factors specific for hormone-responsive region during activation of thyroglobulin gene by thyrotropin in rat thyroid FRTL-5 cells.
J Biol Chem. 1989;264(13):7523-30.
- Lee TK, Myers RT, Marshall RB, Bond MG, Kardon B.
The significance of mitotic rate: a retrospective study of 127 thyroid carcinomas.
Hum Pathol. 1985;16(10):1042-6.
- Lee X, Gao M, Ji Y, Yu Y, Feng Y, Li Y, Zhang Y, Cheng W, Zhao W.
Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in high aggressive papillary thyroid microcarcinoma.
Ann Surg Oncol. 2009;16(2):240-5.
- Liddle GW, Liddle RA.
Endocrinology.
En: David W. Smith, Samuel O. Their, eds.
Pathophysiology: The Biological Principles of Disease. Philadelphia: WB Saunders; 1981.
- Lima J, Trovisco V, Soares P, Máximo V, Magalhães J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simões M.
BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas.
J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(9):4267-71.
- Lin JD, Huang MJ, Juang JH, Chao TC, Huang BY, Chen KW, Chen JY, Li KL, Chen JF, Ho YS.
Factors related to the survival of papillary and follicular thyroid carcinoma patients with distant metastases.
Thyroid. 1999^a;9(12):1227-35.
- Lin JD, Hsueh C, Chao TC, Weng HF.
Expression of sodium iodide symporter in benign and malignant human thyroid tissues.
Endocr Pathol. 2001;12(1):15-21.
- Lin JD, Liou MJ, Chao TC, Weng HF, Ho YS.
Prognostic variables of papillary and follicular thyroid carcinoma patients with lymph node metastases and without distant metastases.
Endocr Relat Cancer. 1999^b;6(1):109-15.
- Lin X, Finkelstein SD, Zhu B, Silverman JF.
Molecular analysis of multifocal papillary thyroid carcinoma.
J Mol Endocrinol. 2008;41(4):195-203.
- Liu RT, Chen YJ, Chou FF, Li CL, Wu WL, Tsai PC, Huang CC, Cheng JT.
No correlation between BRAFV600E mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinomas in Taiwan.
Clin Endocrinol (Oxf). 2005;63(4):461-6.
- LiVolsi VA.
Surgical Pathology of the Thyroid (Major Problems in Pathology). Philadelphia: Saunders; 1990.
- LiVolsi VA, Albores-Saavedra J, Asa SL, et al.
Papillary carcinoma.
En: DeLellis RA, Lloyd R, LiVolsi VA, Eng C, eds.
Pathology and Genetics of Tumours of the Endocrine Organs and Paraganglia. Lyon, France: World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press; 2004:57-66.
- LiVolsi VA, Brooks JJ, Arendash-Durand B.
Anaplastic thyroid tumors. Immunohistology.
Am J Clin Pathol. 1987;87(4):434-42.
- Ljungberg O, Bondeson L, Bondeson AG.
Differentiated thyroid carcinoma, intermediate type: a new tumor entity with features of follicular and parafollicular cell carcinoma.
Hum Pathol. 1984;15(3):218-28.

- Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: a retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(11):3553-62.
- Lope Carvajal V, Pollán Santamaría M, Pérez-Gómez B, Aragonés Sanz N, Suárez Rodríguez B, Carrasco Gimeno JM, Rodríguez Fernández S, Ramis Prieto R, Boldo Pascua E, López-Abente G. Incidencia y mortalidad por cáncer de tiroides en España. *Boletín Epidemiológico Semanal* 2004; 12(15):161-72.
- López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Lope V, Suárez B et al. Plan Integral del Cáncer. Situación del cáncer en España.
- Lucot H, David JF, Boneu A, Combes PF, Cabarrot E, Daly N. Thyroid trabecular carcinoma. A clinicopathological entity of poor prognosis? (author's transl). *Bull Cancer.* 1979;66(3):279-86.
- Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(11):4085-90.
- MacDonald L, Yazdi HM. Nondiagnostic fine needle aspiration biopsy of the thyroid gland: a diagnostic dilemma. *Acta Cytol.* 1996 40(3):423-8.
- Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer.* 2005;103(11):2269-73.
- Mahar SA, Husain A, Islam N. Fine needle aspiration cytology of thyroid nodule: diagnostic accuracy and pitfalls. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2006;18(4):26-9.
- Malchoff CD, Malchoff DM. Familial nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer Control.* 2006;13(2):106-10.
- Marques AR, Espadilha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(8):3947-52.
- Mansberger AR Jr, Wei JP. Surgical embryology and anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Surg Clin North Am.* 1993;73(4):727-46.
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet.* 1998;19(1):87-90.
- Marchetti I, Lessi F, Mazzanti CM, Bertacca G, Elisei R, Coscio GD, Pinchera A, Bevilacqua G. A morpho-molecular diagnosis of papillary thyroid carcinoma: BRAF V600E detection as an important tool in preoperative evaluation of fine-needle aspirates. *Thyroid.* 2009;19(8):837-42.
- Marqusee E, Benson CB, Frates MC, Doubilet PM, Larsen PR, Cibas ES, Mandel SJ. Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Ann Intern Med.* 2000;133(9):696-700.
- Maruyama M, Kato R, Kobayashi S, Kasuga Y. A method to differentiate between thyroglobulin derived from normal thyroid tissue and from thyroid carcinoma based on analysis of reactivity to lectins. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122(8):715-20.
- Maxon HR III. The role of 131I in the treatment of thyroid cancer. *Thyroid Today.* 1993; 16:1-9.
- Mazzaferri EL. An overview of the management of thyroid cancer. En: Mazzaferri EL, Harmer C, Mallick UK, Kendall-Taylor P, eds. *Practical Management of Thyroid Cancer: A Multidisciplinary Approach.* London: speinger-Verlag; 2006^a:1-28.
- Mazzaferri EL. Managing small thyroid cancers. *JAMA.* 2006^b;295(18):2179-82.
- Mazzaferri EL. Papillary thyroid carcinoma: factors influencing prognosis and current therapy. *Semin Oncol.* 1987;14(3):315-32.
- Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med.* 1994;97(5):418-28. Erratum in: *Am J Med* 1995;98(2):215.
- Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1447-63.
- Mazzaferri EL, Robbins RJ, Spencer CA, Braverman LE, Pacini F, Wartofsky L, Haugen BR, Sherman SI, Cooper DS, Braunstein GD, Lee S, Davies TF, Arafah BM, Ladenson PW, Pinchera A.

- A consensus report of the role of serum thyroglobulin as a monitoring method for low-risk patients with papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(4):1433-41.
- McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF.
Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc.* 1986;61(12):978-96.
- McHenry CR, Slusarczyk SJ, Askari AT, Lange RL, Smith CM, Nekl K, Murphy TA.
Refined use of scintigraphy in the evaluation of nodular thyroid disease. *Surgery.* 1998;124(4):656-61; discussion 661-2.
- McHenry CR, Walfish PG, Rosen IB.
Non-diagnostic fine needle aspiration biopsy: a dilemma in management of nodular thyroid disease. *Am Surg.* 1993;59(7):415-9.
- Meier DA, Kaplan MM.
Radioiodine uptake and thyroid scintiscanning. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001;30(2):291-313, viii.
- Meissner WA, Adler A.
Papillary carcinoma of the thyroid; a study of the pathology of two hundred twenty-six cases. *AMA Arch Pathol.* 1958;66(4):518-25.
- Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruhoff M, Orntoft T, Fusco A, Santoro M.
The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest.* 2005;115(4):1068-81.
- Merino MJ, Monteagudo C.
Tall cell carcinoma of the thyroid: an aggressive variant of papillary cancer. *Pathol Case Rev.* 1997;2:196-99.
- Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Rugge M, Pelizzo MR, Mazzarotto R, Casara D, Nacamulli D, Mantero F, Opocher G, Busnardo B, Girelli ME.
Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no 131I uptake. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(1):108-16.
- Michels JJ, Jacques M, Henry-Amar M, Bardet S.
Prevalence and prognostic significance of tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol.* 2007;38(2):212-9.
- Miller FD, Kaplan DR.
Neurotrophin signalling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(8):1045-53.
- Miller JM, Hamburger JI, Kini SR.
Thyroid needle biopsy. *Arch Intern Med.* 1985 Apr;145(4):764-5.
- Min HS, Choe G, Kim SW, Park YJ, Park do J, Youn YK, Park SH, Cho BY, Park SY.
S100A4 expression is associated with lymph node metastasis in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Mod Pathol.* 2008;21(6):748-55.
- Minoletti F, Butti MG, Coronelli S, Miozzo M, Sozzi G, Pilotti S, Tunnaccliff A, Pierotti MA, Bongarzone I.
The two genes generating RET/PTC3 are localized in chromosomal band 10q11.2. *Genes Chromosomes Cancer.* 1994;11(1):51-7.
- Mitchell JD, Kirkham N, Machin D.
Focal lymphocytic thyroiditis in Southampton. *J Pathol.* 1984;144(4):269-73.
- Mitsiades CS, Negri J, McMullan C, McMillin DW, Sozopoulos E, Fanourakis G, Voutsinas G, Tseleni-Balafouta S, Poulaki V, Batt D, Mitsiades N.
Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(3):1070-8.
- Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C Jr, Knauf JA, Zhang L, Taira K, Fagin JA.
BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology.* 2006;147(2):1014-9.
- Mittendorf EA, Wang X, Perrier ND, Francis AM, Edeiken BS, Shapiro SE, Lee JE, Evans DB.
Followup of patients with papillary thyroid cancer: in search of the optimal algorithm. *J Am Coll Surg.* 2007;205(2):239-47.
- Mitsutake N, Knauf JA, Mitsutake S, Mesa C Jr, Zhang L, Fagin JA.
Conditional BRAFV600E expression induces DNA synthesis, apoptosis, dedifferentiation, and chromosomal instability in thyroid PCCL3 cells. *Cancer Res.* 2005;65(6):2465-73.
- Mojica WD, Khoury T.
Presence of the BRAF V600E point mutation in morphologically benign appearing thyroid inclusions of cervical lymph nodes. *Endocr Pathol.* 2006;17(2):183-9.
- Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII. Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Mortalidad por cáncer y otras causas en España. Año 2007. Madrid: ISCIII, 2007.
http://www.isciii.es/htdocs/centros/epidemiologia/e_pi_cancer_mortalidad.jsp
Último acceso: 1 de febrero de 2010.

- Mortensen JD, Woolner LB, Bennett WA.
Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands.
J Clin Endocrinol Metab. 1955;15(10):1270-80.
- Motomura T, Nikiforov YE, Namba H, Ashizawa K, Nagataki S, Yamashita S, Fagin JA.
ret rearrangements in Japanese pediatric and adult papillary thyroid cancers.
Thyroid. 1998;8(6):485-9.
- Müller MJ, Seitz HJ.
Pleiotypic action of thyroid hormones at the target cell level.
Biochem Pharmacol. 1984^a;33(10):1579-84.
- Müller MJ, Seitz HJ.
Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part II: Lipid metabolism in hypo- and hyperthyroidism.
Klin Wochenschr. 1984^b;62(2):49-55.
- Müller MJ, Seitz HJ.
Thyroid hormone action on intermediary metabolism. Part III. Protein metabolism in hyper- and hypothyroidism.
Klin Wochenschr. 1984^c;62(3):97-102.
- Musholt TJ, Musholt PB, Khaladj N, Schulz D, Scheumann GF, Klempnauer J.
Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma.
Surgery. 2000;128(6):984-93.
- Nakabashi CC, Guimarães GS, Michaluart P Jr, Ward LS, Cerutti JM, Maciel RM.
The expression of PAX8-PPARgamma rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma.
Clin Endocrinol (Oxf). 2004;61(2):280-2.
- Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M.
Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma.
Genes Chromosomes Cancer. 1999;25(2):97-103.
- Nakayama H, Yoshida A, Nakamura Y, Hayashi H, Miyagi Y, Wada N, Rino Y, Masuda M, Imada T.
Clinical significance of BRAF (V600E) mutation and Ki-67 labeling index in papillary thyroid carcinomas.
Anticancer Res. 2007;27(5B):3645-9.
- Nam-Goong IS, Kim HY, Gong G, Lee HK, Hong SJ, Kim WB, Shong YK.
Ultrasonography-guided fine-needle aspiration of thyroid incidentaloma: correlation with pathological findings.
Clin Endocrinol (Oxf). 2004;60(1):21-8.
- Namba H, Gutman RA, Matsuo K, Alvarez A, Fagin JA.
H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms.
J Clin Endocrinol Metab. 1990^a;71(1):223-9.
- Namba H, Matsuo K, Fagin JA.
Clonal composition of benign and malignant human thyroid tumors.
J Clin Invest. 1990^b;86(1):120-5.
- Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, Ohtsuru A, Saenko VA, Kanematsu T, Yamashita S.
Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers.
J Clin Endocrinol Metab. 2003;88(9):4393-7.
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA.
Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis.
Mol Endocrinol. 1990^c;4(10):1474-9.
- Naruse T, Koike A, Kanemitsu T, Kato K.
Minimal thyroid carcinoma: a report of nine cases discovered by cervical lymph node metastases.
Jpn J Surg. 1984;14(2):118-21.
- Nelkin BD, de Bustros AC, Mabry M, Baylin SB.
The molecular biology of medullary thyroid carcinoma. A model for cancer development and progression.
JAMA. 1989;261(21):3130-5.
- Nguyen GK, Ginsberg J, Crockford PM.
Fine-needle aspiration biopsy cytology of the thyroid. Its value and limitations in the diagnosis and management of solitary thyroid nodules.
Pathol Annu. 1991;26 Pt 1:63-91.
- Nikiforov YE.
RET/PTC rearrangement in thyroid tumors.
Endocr Pathol. 2002;13(1):3-16.
- Nikiforov YE, Erickson LA, Nikiforova MN, Caudill CM, Lloyd RV.
Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior.
Am J Surg Pathol. 2001;25(12):1478-84.
- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA.
Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children.
Cancer Res. 1997;57(9):1690-4.
- Nikiforov YE, Steward DL, Nikiforova MN, Zhu Z, Haugen BR, Klopper JP, Fagin JA, Fidler JP, Robinson-Smith TM, Weber K.
Role of molecular testing for mutations in improving the fine needle aspiration (FNA) diagnosis of thyroid nodules.

- Proceedings of the 77th annual meeting of the American Thyroid Association [abstract].
Thyroid. 2006; 16(9):922.
- Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, Fagin JA, Falciglia M, Weber K, Nikiforova MN.
Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules.
J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(6):2092-8.
- Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE.
PAX8-PPARgamma rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses.
Am J Surg Pathol. 2002^a;26(8):1016-23.
- Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE.
Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas.
Int J Surg Pathol. 2002^b;10(1):15-22.
- Nikiforova MN, Ciampi R, Salvatore G, Santoro M, Gandhi M, Knauf JA, Thomas GA, Jeremiah S, Bogdanova TI, Tronko MD, Fagin JA, Nikiforov YE.
Low prevalence of BRAF mutations in radiation-induced thyroid tumors in contrast to sporadic papillary carcinomas.
Cancer Lett. 2004^a;209(1):1-6.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE.
BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas.
J Clin Endocrinol Metab. 2003^a;88(11):5399-404.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE.
RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma.
J Clin Endocrinol Metab. 2003^b;88(5):2318-26.
- Nikiforova MN, Nikiforov YE.
Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis.
Expert Rev Mol Diagn. 2008;8(1):83-95.
- Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE.
Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells.
Science. 2000;290(5489):138-41.
- Nikiforova MN, Zhaowen Z, Robinson-Smith T et al.
Molecular testing of thyroid FNA samples: feasibility and significance for preoperative diagnosis of thyroid tumors (abstract).
Mod Pathol. 2004^b;17(Suppl 1):77A.
- Oertel YC.
A pathologist trying to help endocrinologists to interpret cytopathology reports from thyroid aspirates.
J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(4):1459-61.
- Oertel YC, Burman K, Boyle L, Ringel M, Wartofsky L, Shmookler B, Yeganeh F, Van Nostrand D.
Integrating fine-needle aspiration into a daily practice involving thyroid disorders: the Washington Hospital Center approach.
Diagn Cytopathol. 2002;27(2):120-2.
- Oler G, Camacho CP, Hojaj FC, Michaluart P Jr, Riggins GJ, Cerutti JM.
Gene expression profiling of papillary thyroid carcinoma identifies transcripts correlated with BRAF mutational status and lymph node metastasis.
Clin Cancer Res. 2008;14(15):4735-42.
- Oler G, Cerutti JM.
High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinomas: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes.
Cancer. 2009;115(5):972-80.
- Oler G, Ebina KN, Michaluart P Jr, Kimura ET, Cerutti J
Investigation of BRAF mutation in a series of papillary thyroid carcinoma and matched-lymph node metastasis reveals a new mutation in metastasis.
Clin Endocrinol (Oxf). 2005;62(4):509-11.
- Oppenheimer JH.
Thyroid hormone action at the nuclear level.
Ann Intern Med. 1985;102(3):374-84
- Ordóñez NG, El-Naggar AK, Hickey RC, Samaan NA.
Anaplastic thyroid carcinoma. Immunocytochemical study of 32 cases.
Am J Clin Pathol. 1991;96(1):15-24.
- Ostrowski ML, Merino MJ.
Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma: a reassessment and immunohistochemical study with comparison to the usual type of papillary carcinoma of the thyroid.
Am J Surg Pathol. 1996;20(8):964-74.
- O'Toole K, Fenoglio-Preiser C, Pushparaj N.
Endocrine changes associated with the human aging process: III. Effect of age on the number of calcitonin immunoreactive cells in the thyroid gland.
Hum Pathol. 1985;16(10):991-1000.
- Pacini F, Schlumberger M, Dralle E, Elisei R, Smit JWA, Wiersinga F, The European Thyroid Task Force.

- Consenso europeo para el tratamiento de los pacientes con carcinoma tiroideo diferenciado del epitelio folicular. *Endocrinol Nutr.* 2007;54(7):390.e1-e16. (Fuente: *Eur J Endocrinol.* 2006;14:787-803).
- Pacini F, Capezzone M, Elisei R, Ceccarelli C, Taddei D, Pinchera A.
Diagnostic 131-iodine whole-body scan may be avoided in thyroid cancer patients who have undetectable stimulated serum Tg levels after initial treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1499-501.
- Pacini F, Molinaro E, Castagna MG, Agate L, Elisei R, Ceccarelli C, Lippi F, Taddei D, Grasso L, Pinchera A.
Recombinant human thyrotropin-stimulated serum thyroglobulin combined with neck ultrasonography has the highest sensitivity in monitoring differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3668-73.
- Pacini F, Vorontsova T, Demidchik EP, Molinaro E, Agate L, Romei C, Shavrova E, Cherstvoy ED, Ivashkevitch Y, Kuchinskaya E, Schlumberger M, Ronga G, Filesi M, Pinchera A.
Post-Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(11):3563-9.
- Papotti M, Botto Micca F, Favero A, Palestini N, Bussolati G.
Poorly differentiated thyroid carcinomas with primordial cell component. A group of aggressive lesions sharing insular, trabecular, and solid patterns. *Am J Surg Pathol.* 1993;17(3):291-301.
- Park SY, Park YJ, Lee YJ, Lee HS, Choi SH, Choe G, Jang HC, Park SH, Park do J, Cho BY.
Analysis of differential BRAF(V600E) mutational status in multifocal papillary thyroid carcinoma: evidence of independent clonal origin in distinct tumor foci. *Cancer.* 2006;107(8):1831-8.
- Patchefsky AS, Hoch WS.
Psammoma bodies in diffuse toxic goiter. *Am J Clin Pathol.* 1972;57(5):551-6.
- Peng Y, Wang HH.
A meta-analysis of comparing fine-needle aspiration and frozen section for evaluating thyroid nodules. *Diagn Cytopathol.* 2008;36(12):916-20.
- Penko K, Livezey J, Fenton C, Patel A, Nicholson D, Flora M, Oakley K, Tuttle RM, Francis G.
BRAF mutations are uncommon in papillary thyroid cancer of young patients. *Thyroid.* 2005;15(4):320-5.
- Pepper GM, Zwickler D, Rosen Y.
Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid nodule. Results of a start-up project in a general teaching hospital setting. *Arch Intern Med.* 1989;149(3):594-6.
- Perren A, Schmid S, Locher T, Saremaslani P, Bonvin C, Heitz PU, Komminoth P.
BRAF and endocrine tumors: mutations are frequent in papillary thyroid carcinomas, rare in endocrine tumors of the gastrointestinal tract and not detected in other endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(4):855-60.
- Peyssonaux C, Eychène A.
The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell.* 2001;93(1-2):53-62.
- Pisani T, Giovagnoli MR, Intrieri FS, Vecchione A.
Tall cell variant of papillary carcinoma coexisting with chronic lymphocytic thyroiditis. A case report. *Acta Cytol.* 1999;43(3):435-8.
- Pittman JA Jr.
Thyrotropin-releasing hormone. *Adv Intern Med.* 1974;19:303-25.
- Pizzolanti G, Russo L, Richiusa P, Bronte V, Nuara RB, Rodolico V, Amato MC, Smeraldi L, Sisto PS, Nucera M, Bommarito A, Citarrella R, Lo Coco R, Cabibi D, Lo Coco A, Frasca F, Gulotta G, Latteri MA, Modica G, Galluzzo A, Giordano C.
Fine-needle aspiration molecular analysis for the diagnosis of papillary thyroid carcinoma through BRAF V600E mutation and RET/PTC rearrangement. *Thyroid.* 2007;17(11):1109-15.
- Polyzos SA, Kita M, Goulis DG, Benos A, Flaris N, Leontsini M, Avramidis A.
Epidemiologic analysis of thyroid fine needle aspiration biopsies over a period of 18 years (1987-2004). *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116(8):496-500.
- Porra V, Ferraro-Peyret C, Durand C, Selmi-Ruby S, Giroud H, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, Peix JL, Bournaud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F, Dante R, Rousset B.
Silencing of the tumor suppressor gene SLC5A8 is associated with BRAF mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):3028-35.
- Powell N, Jeremiah S, Morishita M, Dudley E, Bethel J, Bogdanova T, Tronko M, Thomas G.
Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol.* 2005;205(5):558-64.
- Puxeddu E, Durante C, Avenia N, Filetti S, Russo D.
Clinical implications of BRAF mutation in thyroid carcinoma. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(4):138-45.

- Puxeddu E, Moretti S.
Clinical prognosis in BRAF-mutated PTC.
Arq Bras Endocrinol Metabol. 2007;51(5):736-47.
- Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Rossi ED, Fadda G, Cavaliere A, Ribacchi R, Falorni A, Pontecorvi A, Pacini F, Pinchera A, Santeusanio F.
BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas.
J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(5):2414-20.
- Puxeddu E, Moretti S, Giannico A, Martinelli M, Marino C, Avenia N, Cristofani R, Farabi R, Reboldi G, Ribacchi R, Pontecorvi A, Santeusanio F.
Ret/PTC activation does not influence clinical and pathological features of adult papillary thyroid carcinomas.
Eur J Endocrinol. 2003;148(5):505-13.
- Qubain SW, Nakano S, Baba M, Takao S, Aikou T.
Distribution of lymph node micrometastasis in pN0 well-differentiated thyroid carcinoma.
Surgery. 2002;131(3):249-56.
- Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA, Xu X.
Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations.
Cancer. 2005;103(11):2261-8.
- Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S.
Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications.
Clin Cancer Res. 2000;6(3):1093-103.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE.
Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status.
Nature. 2002;418(6901):934.
- Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH Jr, Stephenson JR.
Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1983;80(14):4218-22.
- Reading CC, Charboneau JW, Hay ID, Sebo TJ.
Sonography of thyroid nodules: a "classic pattern" diagnostic approach.
Ultrasound Q. 2005;21(3):157-65.
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Horner MJ, Howlander N, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (eds).
SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/
- Based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2007.
- Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlander N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (eds).
SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute. Bethesda, MD.
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/
Based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2008.
- Riesco-Eizaguirre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P.
The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane.
- Robinson MJ, Cobb MH.
Mitogen-activated protein kinase pathways.
Curr Opin Cell Biol. 1997;9(2):180-6.
- Rocha AS, Risberg B, Magalhães J, Trovisco V, de Castro IV, Lazarovici P, Soares P, Davidson B, Sobrinho-Simões M.
The p75 neurotrophin receptor is widely expressed in conventional papillary thyroid carcinoma.
Hum Pathol. 2006;37(5):562-8.
- Rodolico V, Cabibi D, Pizzolanti G, Richiusa P, Gebbia N, Martorana A, Russo A, Amato MC, Galluzzo A, Giordano C.
BRAF V600E mutation and p27 kip1 expression in papillary carcinomas of the thyroid <or=1 cm and their paired lymph node metastases.
Cancer. 2007;110(6):1218-26.
- Romei C, Ciampi R, Faviana P, Agate L, Molinaro E, Bottici V, Basolo F, Miccoli P, Pacini F, Pinchera A, Elisei R. 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):511-20.
- Ronga G, Filesi M, Montesano T, Melacrinis FF, Di Nicola A, Ventroni G, Antonaci A, Vestri AR.
Death from differentiated thyroid carcinoma: retrospective study of a 40-year investigation.
Cancer Biother Radiopharm. 2002;17(5):507-14.
- Rosai J.
Chapter 9. Thyroid Gland.
En: Rosai and Ackerman's Surgical Pathology, 9^a ed. St. Louis, MO: Mosby, 2004.
- Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA.
Tumors of the Thyroid Gland.
En: Atlas of Tumor Pathology. 3rd series, fascicle 5. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1992: 207-245.

- Rosai J, Saxén EA, Woolner L. Undifferentiated and poorly differentiated carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 1985;2(2):123-36.
- Rosai J, Zampi G, Carcangiu ML. Papillary carcinoma of the thyroid. A discussion of its several morphologic expressions, with particular emphasis on the follicular variant. *Am J Surg Pathol.* 1983;7(8):809-17.
- Ross, DM. Diagnostic approach to and treatment of thyroid nodules. I. In: Rose BD, ed. *Wellesley (MA): UpToDate; 2005.*
- Roux KH. Using mismatched primer-template pairs in touchdown PCR. *Biotechniques.* 1994;16(5):812-4.
- Rouxel A, Hejblum G, Bernier MO, Boëlle PY, Ménégau F, Mansour G, Hoang C, Aurengo A, Leenhardt L. Prognostic factors associated with the survival of patients developing loco-regional recurrences of differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5362-8.
- Rowe LR, Bentz BG, Bentz JS. Utility of BRAF V600E mutation detection in cytologically indeterminate thyroid nodules. *Cytojournal.* 2006;3:10.
- Russell WO, Ibanez ML, Clark RL, White EC. Thyroid carcinoma. Classification, intraglandular dissemination, and clinicopathological study based upon whole organ sections of 80 glands. *Cancer.* 1963;16:1425-60.
- Russell JP, Powell DJ, Cunnane M, Greco A, Portella G, Santoro M, Fusco A, Rothstein JL. The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. *Oncogene.* 2000;19(50):5729-35.
- Saad AG, Kumar S, Ron E, Lubin JH, Stanek J, Bove KE, Nikiforov YE. Proliferative activity of human thyroid cells in various age groups and its correlation with the risk of thyroid cancer after radiation exposure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2672-7.
- Saggiorato E, Aversa S, Deandrea D, Arecco F, Mussa A, Puligheddu B, Cappia S, Conticello S, Papotti M, Orlandi F. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas. *J Endocrinol Invest.* 2004;27(4):311-7.
- Sakamoto A, Kasai N, Sugano H. Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer.* 1983;52(10):1849-55.
- Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer AM, Bauchinger M. Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60(11):2786-9.
- Salvatore G, De Falco V, Salerno P, Nappi TC, Pepe S, Troncone G, Carlomagno F, Melillo RM, Wilhelm SM, Santoro M. BRAF is a therapeutic target in aggressive thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1623-9.
- Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, Nikiforov YE, Troncone G, Palombini L, Basolo F, Santoro M. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):5175-80.
- Sanicola M, Hession C, Worley D, Carmillo P, Ehrenfels C, Walus L, Robinson S, Jaworski G, Wei H, Tizard R, Whitty A, Pepinsky RB, Cate RL. Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6238-43.
- Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, Pierotti MA, Vecchio G, Fusco A. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene.* 1994;9(2):509-16.
- Sapio MR, Guerra A, Posca D, Limone PP, Deandrea M, Motta M, Troncone G, Caleo A, Vallefucio P, Rossi G, Fenzi G, Vitale M. Combined analysis of galectin-3 and BRAFV600E improves the accuracy of fine-needle aspiration biopsy with cytological findings suspicious for papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2007^a;14(4):1089-97.
- Sapio MR, Posca D, Raggioli A, Guerra A, Marotta V, Deandrea M, Motta M, Limone PP, Troncone G, Caleo A, Rossi G, Fenzi G, Vitale M. Detection of RET/PTC, TRK and BRAF mutations in preoperative diagnosis of thyroid nodules with indeterminate cytological findings. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007^b;66(5):678-83.
- Sapio MR, Posca D, Troncone G, Pettinato G, Palombini L, Rossi G, Fenzi G, Vitale M.

- Detection of BRAF mutation in thyroid papillary carcinomas by mutant allele-specific PCR amplification (MASA).
Eur J Endocrinol. 2006;154(2):341-8.
- Sawka AM, Thepamongkhol K, Brouwers M, Thabane L, Browman G, Gerstein HC.
Clinical review 170: A systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer.
J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(8):3668-76.
- Scheumann GF, Gimm O, Wegener G, Hundeshagen H, Dralle H.
Prognostic significance and surgical management of locoregional lymph node metastases in papillary thyroid cancer.
World J Surg. 1994;18(4):559-67; discussion 567-8.
- Schlinkert RT, van Heerden JA, Goellner JR, Gharib H, Smith SL, Rosales RF, Weaver AL.
Factors that predict malignant thyroid lesions when fine-needle aspiration is "suspicious for follicular neoplasm".
Mayo Clin Proc. 1997;72(10):913-6.
- Schlumberger MJ.
Papillary and follicular thyroid carcinoma.
N Engl J Med. 1998;338(5):297-306
- Schlumberger M, Pacini F.
Nodular thyroid disease. Thyroid nodule.
En: *Thyroid tumors.*
Paris: Nucleon; 1999. p. 13-30.
- Schmidt T, Riggs MW, Speights VO Jr.
Significance of nondiagnostic fine-needle aspiration of the thyroid.
South Med J. 1997;90(12):1183-6.
- Schröder S, Bay V, Dumke K, Kremens B, Müller-Gärtner HW, Böcker W, Kastendieck H.
Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. S-100 protein immunocytochemistry and prognosis.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1990;416(4):367-71.
- Schröder S, Böcker W.
Clear-cell carcinomas of thyroid gland: a clinicopathological study of 13 cases.
Histopathology. 1986;10(1):75-89.
- Schröder S, Böcker W, Dralle H, Kortmann KB, Stern C.
The encapsulated papillary carcinoma of the thyroid. A morphologic subtype of the papillary thyroid carcinoma.
Cancer. 1984^a;54(1):90-3.
- Schröder S, Pfannschmidt N, Dralle H, Arps H, Böcker W.
The encapsulated follicular carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 35 cases.
Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1984^b;402(3):259-73.
- Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V.
Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret.
Nature. 1994;367(6461):380-3.
- Sedliarou I, Saenko V, Lantsov D, Rogounovitch T, Namba H, Abrosimov A, Lushnikov E, Kumagai A, Nakashima M, Meirmanov S, Mine M, Hayashi T, Yamashita S.
The BRAFT1796A transversion is a prevalent mutational event in human thyroid microcarcinoma.
Int J Oncol. 2004;25(6):1729-35.
- Selzer G, Kahn LB, Albertyn L.
Primary malignant tumors of the thyroid gland: a clinicopathologic study of 254 cases.
Cancer. 1977;40(4):1501-10.
- Sensi M, Nicolini G, Petti C, Bersani I, Lozupone F, Molla A, Vegetti C, Nonaka D, Mortarini R, Parmiani G, Fais S, Anichini A.
Mutually exclusive NRASQ61R and BRAFV600E mutations at the single-cell level in the same human melanoma.
Oncogene. 2006;25(24):3357-64.
- Shaha AR.
Thyroid carcinoma: implications of prognostic factors.
Cancer. 1998;83(3):401-2; discussion 403-4.
- Shaha AR, Loree TR, Shah JP.
Intermediate-risk group for differentiated carcinoma of thyroid.
Surgery. 1994;116(6):1036-40; discussion 1040-1.
- Shaha AR, Loree TR, Shah JP.
Prognostic factors and risk group analysis in follicular carcinoma of the thyroid.
Surgery. 1995;118(6):1131-6; discussion 1136-8.
- Sheils OM, O'early JJ, Uhlmann V, Lättich K, Sweeney EC.
ret/PTC-1 Activation in Hashimoto Thyroiditis.
Int J Surg Pathol. 2000;8(3):185-189.
- Sherman SI, Angelos P, Ball DW, Beenken SW, Byrd D, Clark OH, Daniels GH, Dilawari RA, Ehya H, Farrar WB, Gagel RF, Kandeel F, Kloos RT, Kopp P, Lamonica DM, Loree TR, Lydiatt WM, McCaffrey J, Olson JA Jr, Ridge JA, Robbins R, Shah JP, Sisson JC, Thompson NW; National Comprehensive Cancer Network.
Thyroid carcinoma.
J Natl Compr Canc Netw. 2005;3(3):404-57.
- Sherman SI, Angelos P, Ball DW, Byrd D, Clark OH, Daniels GH, Dilawari RA, Ehya H, Farrar WB, Gagel

- RF, Kandeel F, Kloos RT, Kopp P, Lamonica DM, Loree TR, Lydiatt WM, McCaffrey J, Olson JA Jr, Ridge JA, Shah JP, Sisson JC, Tuttle RM, Urist MM; National Comprehensive Cancer Network Thyroid Carcinoma Panel.
Thyroid carcinoma.
J Natl Compr Canc Netw. 2007;5(6):568-621.
- Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, Haugen BR, Ho M, Klein I, Ladenson PW, Robbins J, Ross DS, Specker B, Taylor T, Maxon HR 3rd.
Prospective multicenter study of thyroid carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group.
Cancer. 1998;83(5):1012-21.
- Shibru D, Chung KW, Kebebew E.
Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers.
Curr Opin Oncol. 2008;20(1):13-8.
- Shvero J, Gal R, Avidor I, Hadar T, Kessler E.
Anaplastic thyroid carcinoma. A clinical, histologic, and immunohistochemical study.
Cancer. 1988;62(2):319-25.
- Simon D, Goretzki PE, Witte J, Röher HD.
Incidence of regional recurrence guiding radicality in differentiated thyroid carcinoma.
World J Surg. 1996;20(7):860-6; discussion 866.
- Smanik PA, Furminger TL, Mazzaferri EL, Jhiang SM.
Breakpoint characterization of the ret/PTC oncogene in human papillary thyroid carcinoma.
Hum Mol Genet. 1995;4(12):2313-8.
- Smyth P, Finn S, Cahill S, O'Regan E, Flavin R, O'Leary JJ, Sheils O.
ret/PTC and BRAF act as distinct molecular, time-dependant triggers in a sporadic Irish cohort of papillary thyroid carcinoma.
Int J Surg Pathol. 2005;13(1):1-8.
- Soares P, Fonseca E, Wynford-Thomas D, Sobrinho-Simões M.
Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms?
J Pathol. 1998;185(1):71-8.
- Soares J, Limbert E, Sobrinho-Simões M.
Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study of 10 cases.
Pathol Res Pract. 1989;185(2):200-6.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijão T, Rebocho AP, Fonseca E, Vieira de Castro I, Cameselle-Teijeiro J, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simões M.
BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas.
Virchows Arch. 2004;444(6):572-6.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Máximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simões M.
BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC.
Oncogene. 2003;22(29):4578-80.
- Sobrinho-Simões M .
Poorly differentiated carcinomas of the thyroid.
Endocr Pahol. 1996; 7(2):99-102.
- Solomon A, Gupta PK, LiVolsi VA, Baloch ZW.
Distinguishing tall cell variant of papillary thyroid carcinoma from usual variant of papillary thyroid carcinoma in cytologic specimens.
Diagn Cytopathol. 2002;27(3):143-8.
- Somerville H, Steinbeck K, Delbridge L, Stevens M.
Thyroid cancer after neck irradiation during childhood.
Lancet. 2005;366(9488):805.
- Sosa JA, Udelsman R.
Total thyroidectomy for differentiated thyroid cancer.
J Surg Oncol. 2006;94(8):701-7.
- Sterling K.
Thyroid hormone action at the cell level (first of two parts).
N Engl J Med. 1979;300(3):117-23.
- Strate SM, Lee EL, Childers JH.
Occult papillary carcinoma of the thyroid with distant metastases.
Cancer. 1984;54(6):1093-100.
- Stulak JM, Grant CS, Farley DR, Thompson GB, van Heerden JA, Hay ID, Reading CC, Charboneau JW.
Value of preoperative ultrasonography in the surgical management of initial and reoperative papillary thyroid cancer.
Arch Surg. 2006;141(5):489-94; discussion 494-6.
- Suarez HG, du Villard JA, Severino M, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, Monier R.
Presence of mutations in all three ras genes in human thyroid tumors.
Oncogene. 1990;5(4):565-70.
- Suen KC.
How does one separate cellular follicular lesions of the thyroid by fine-needle aspiration biopsy?
Diagn Cytopathol. 1988;4(1):78-81.
- Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL.
Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia.

- J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(11):4116-22.
- Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL.
Oncogene profile of papillary thyroid carcinoma.
Surgery. 1999;125(1):46-52.
- Sugg SL, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Ezzat S, Asa SL.
ret/PTC-1, -2, and -3 oncogene rearrangements in human thyroid carcinomas: implications for metastatic potential?
J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(9):3360-5.
- Takano T, Ito Y, Hirokawa M, Yoshida H, Miyauchi A.
BRAF V600E mutation in anaplastic thyroid carcinomas and their accompanying differentiated carcinomas.
Br J Cancer. 2007;96(10):1549-53.
- Tallini G.
Molecular pathobiology of thyroid neoplasms.
Endocr Pathol. 2002;13(4):271-88.
- Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, Carcangiu ML, Fusco A.
RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes.
Clin Cancer Res. 1998;4(2):287-94.
- Tan GH, Gharib H.
Thyroid incidentalomas: management approaches to nonpalpable nodules discovered incidentally on thyroid imaging.
Ann Intern Med. 1997;126(3):226-31.
- Tan GH, Gharib H, Reading CC.
Solitary thyroid nodule. Comparison between palpation and ultrasonography.
Arch Intern Med. 1995;155(22):2418-23.
- Tan YY, Kebebew E, Reiff E, Caron NR, Ogilvie JB, Duh QY, Clark OH, Ljung BM, Miller T.
Does routine consultation of thyroid fine-needle aspiration cytology change surgical management?
J Am Coll Surg. 2007;205(1):8-12.
- Tanaka K, Sonoo H, Hirono M, Ohkubo S, Nomura T, Ikeda M, Nakajima K, Kurebayashi J.
Retrospective analysis of predictive factors for recurrence after curatively resected papillary thyroid carcinoma.
Surg Today. 2005;35(9):714-9.
- Tang KT, Lee CH.
BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications.
J Chin Med Assoc. 2010;73(3):113-28.
- Tanoue T, Nishida E.
Molecular recognitions in the MAP kinase cascades.
Cell Signal. 2003;15(5):455-62.
- Tee YY, Lowe AJ, Brand CA, Judson RT.
Fine-needle aspiration may miss a third of all malignancy in palpable thyroid nodules: a comprehensive literature review.
Ann Surg. 2007;246(5):714-20.
- Teng KK, Hempstead BL.
Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems.
Cell Mol Life Sci. 2004;61(1):35-48.
- Terry JH, St John SA, Karkowski FJ, Suarez JR, Yassa NH, Platica CD, Marti JR.
Tall cell papillary thyroid cancer: incidence and prognosis.
Am J Surg. 1994;168(5):459-61.
- Thomas GA, Bunnell H, Cook HA, Williams ED, Nerovnya A, Cherstvoy ED, Tronko ND, Bogdanova TI, Chiappetta G, Viglietto G, Pentimalli F, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Vecchio G.
High prevalence of RET/PTC rearrangements in Ukrainian and Belarussian post-Chernobyl thyroid papillary carcinomas: a strong correlation between RET/PTC3 and the solid-follicular variant.
J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(11):4232-8.
- Thyroid Carcinoma Task Force.
AAACE/AAES medical/surgical guidelines for clinical practice: management of thyroid carcinoma. American Association of Clinical Endocrinologists. American College of Endocrinology.
Endocr Pract. 2001;7(3):202-20.
- Tielens ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW.
Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study.
Cancer. 1994;73(2):424-31.
- Tollin SR, Fallon EF, Mikhail M, Goldstein H, Yung E.
The utility of thyroid nuclear imaging and other studies in the detection and treatment of underlying thyroid abnormalities in patients with endogenous subclinical thyrotoxicosis.
Clin Nucl Med. 2000^a;25(5):341-7.
- Tollin SR, Mery GM, Jelveh N, Fallon EF, Mikhail M, Blumenfeld W, Perlmutter S.
The use of fine-needle aspiration biopsy under ultrasound guidance to assess the risk of malignancy in patients with a multinodular goiter.
Thyroid. 2000^b;10(3):235-41.
- Triggiani V, Ciampolillo A, Maiorano E.
Papillary thyroid carcinoma, diffuse sclerosing variant, with abundant psammoma bodies.
Acta Cytol. 2003;47(6):1141-3.
- Troncone G, Fulciniti F, Zeppa P, Vetrani A, Caleo A, Palombini L.

- Cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) expression in thyroid cells obtained by fine-needle aspiration biopsy: a preliminary report. *Diagn Cytopathol.* 2000;23(2):77-81.
- Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Máximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhães J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch.* 2005;446(6):589-95.
- Trovisco V, Soares P, Preto A, Castro P, Máximo V, Sobrinho-Simões M. Molecular genetics of papillary thyroid carcinoma: great expectations. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(5):643-53.
- Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simões M. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol.* 2004;202(2):247-51.
- Tubiana M, Schlumberger M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Caillou B, Travagli JP, Parmentier C. Long-term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer.* 1985;55(4):794-804.
- Tuttle RM, Leboeuf R, Martorella AJ. Papillary thyroid cancer: monitoring and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(3):753-78, vii.
- Tuttle RM, Lemar H, Burch HB. Clinical features associated with an increased risk of thyroid malignancy in patients with follicular neoplasia by fine-needle aspiration. *Thyroid.* 1998;8(5):377-83.
- Tzavara I, Vlassopoulou B, Alevizaki C, Koukoulis G, Tzanela M, Koumoussi P, Sotsiou F, Thalassinou N. Differentiated thyroid cancer: a retrospective analysis of 832 cases from Greece. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999;50(5):643-54.
- Ugolini C, Giannini R, Lupi C, Salvatore G, Miccoli P, Proietti A, Elisei R, Santoro M, Basolo F. Presence of BRAF V600E in very early stages of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2007;17(5):381-8.
- Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, Kastner P, Zurnadzhy L, Tronko N, Hutzler P, Thomas G. Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):4272-9.
- van den Brekel MW, Hekkenberg RJ, Asa SL, Tomlinson G, Rosen IB, Freeman JL. Prognostic features in tall cell papillary carcinoma and insular thyroid carcinoma. *Laryngoscope.* 1997;107(2):254-9.
- Vander JB, Gaston EA, Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules. Final report of a 15-year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med.* 1968;69(3):537-40.
- Vasil'ev EV, Rumiantsev PO, Saenko VA, Il'in AA, Poliakova Elu, Nemtsova MV, Zaletaev DV. Molecular analysis of structural abnormalities in papillary thyroid carcinoma gene. *Mol Biol (Mosk).* 2004;38(4):642-53.
- Vasko V, Ferrand M, Di Cristofaro J, Carayon P, Henry JF, de Micco C. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2745-52.
- Vasko VV, Gaudart J, Allasia C, Savchenko V, Di Cristofaro J, Saji M, Ringel MD, De Micco C. Thyroid follicular adenomas may display features of follicular carcinoma and follicular variant of papillary carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(6):779-86.
- Vasko V, Hu S, Wu G, Xing JC, Larin A, Savchenko V, Trink B, Xing M. High prevalence and possible de novo formation of BRAF mutation in metastasized papillary thyroid cancer in lymph nodes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5265-9.
- Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Samaan NA. Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer.* 1990;66(2):321-30.
- Vickery AL Jr. Thyroid papillary carcinoma. Pathological and philosophical controversies. *Am J Surg Pathol.* 1983;7(8):797-807.
- Vini L, Harmer C. Management of thyroid cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(7):407-14.
- Voutilainen PE, Siironen P, Franssila KO, Sivula A, Haapiainen RK, Haglund CH. AMES, MACIS and TNM prognostic classifications in papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* 2003;23(5b):4283-8.

- Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004;116(6):855-67.
- Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Thibodeau SN. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res*. 2003;63(17):5209-12.
- Wang Y, Ji M, Wang W, Miao Z, Hou P, Chen X, Xu F, Zhu G, Sun X, Li Y, Condouris S, Liu D, Yan S, Pan J, Xing M. Association of the T1799A BRAF mutation with tumor extrathyroidal invasion, higher peripheral platelet counts, and over-expression of platelet-derived growth factor-B in papillary thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(1):183-90.
- Ward LS, Assumpção LV. Thyroid cancer: prognostic factors and treatment. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(1):126-36.
- Wenig BM, Thompson LD, Adair CF, Shmookler B, Heffess CS. Thyroid papillary carcinoma of columnar cell type: a clinicopathologic study of 16 cases. *Cancer*. 1998;82(4):740-53.
- Williams D, Baverstock K. Chernobyl and the future: too soon for a final diagnosis. *Nature*. 2006;440(7087):993-4.
- Wittekind C, Compton CC, Greene FL, Sobin LH. TNM residual tumor classification revisited. *Cancer*. 2002;94(9):2511-6.
- Wojciechowska K, Lewinski A. BRAF mutations in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Regul*. 2006;40(4):129-38.
- Woolner LB. Thyroid carcinoma: pathologic classification with data on prognosis. *Semin Nucl Med*. 1971;1(4):481-502.
- Wolfe HJ, Voelkel EF, Tashjian AH Jr. Distribution of calcitonin-containing cells in the normal adult human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974;38(4):688-94.
- Wolfe HJ, DeLellis RA, Voelkel EF, Tashjian AH Jr. Distribution of calcitonin-containing cells in the normal neonatal human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content. *J Clin Endocrinol Metab*. 1975;41(06):1076-81.
- Wynford-Thomas D. Origin and progression of thyroid epithelial tumours: cellular and molecular mechanisms. *Horm Res*. 1997;47(4-6):145-57.
- Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007;28(7):742-62.
- Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005^a;12(2):245-62.
- Xing M. Genetic-targeted therapy of thyroid cancer: a real promise. *Thyroid*. 2009;19(8):805-9.
- Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;321(1):86-93.
- Xing M. The T1799A BRAF mutation is not a germline mutation in familial nonmedullary thyroid cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005^b;63(3):263-6.
- Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, Kim M, Tufaro A, Ladenson P, Zeiger M, Tufano R. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(18):2977-82.
- Xing M, Cohen Y, Mambo E, Tallini G, Udelsman R, Ladenson PW, Sidransky D. Early occurrence of RASSF1A hypermethylation and its mutual exclusion with BRAF mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*. 2004^a;64(5):1664-8.
- Xing M, Tokumaru Y, Wu G, Westra WB, Ladenson PW, Sidransky D. Hypermethylation of the Pendred syndrome gene SLC26A4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*. 2003^a;63(9):2312-5.
- Xing M, Tufano RP, Tufaro AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, Byrne PJ, Wang J, Sidransky D, Ladenson PW. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004^b;89(6):2867-72.
- Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, Tong BC, Tallini G, Udelsman R, Califano JA, Ladenson PW, Sidransky D.

- Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res.* 2003^b;63(9):2316-21.
- Xing M, Vasko V, Tallini G, Larin A, Wu G, Udelsman R, Ringel MD, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004^c;89(3):1365-8.
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(12):6373-9.
- Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res.* 2003;63(15):4561-7.
- Yamashita T, Hosoda Y, Kameyama K, Aiba M, Ito K, Fujimoto Y. Peculiar nuclear clearing composed of microfilaments in papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer.* 1992;70(12):2923-8.
- Yeh MW, Demircan O, Ituarte P, Clark OH. False-negative fine-needle aspiration cytology results delay treatment and adversely affect outcome in patients with thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2004;14(3):207-15.
- Zatelli MC, Trasforini G, Leoni S, Frigato G, Buratto M, Tagliati F, Rossi R, Cavazzini L, Roti E, degli Uberti EC. BRAF V600E mutation analysis increases diagnostic accuracy for papillary thyroid carcinoma in fine-needle aspiration biopsies. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(3):467-73.
- Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3603-10.
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol.* 2003;120(1):71-7.
- Zhu XL, Zhou XY, Zhu XZ. [BRAFV599E mutation and RET/PTC rearrangements in papillary thyroid carcinoma] *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2005;34(5):270-4.
- Zuo H, Nakamura Y, Yasuoka H, Zhang P, Nakamura M, Mori I, Miyauchi A, Kakudo K. Lack of association between BRAF V600E mutation and mitogen-activated protein kinase activation in papillary thyroid carcinoma. *Pathol Int.* 2007;57(1):12-20.

ANEXOS

CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE TUMORES TIROIDEOS Y PARATIROIDEOS SEGÚN LA OMS**Carcinomas de tiroides**

- Carcinoma papilar
 - variante folicular
 - variante macrofolicular
 - variante oncocítica
 - variante de células claras
 - variante esclerosante difusa
 - variante de células altas
 - variante de células columnares
 - variante sólida
 - carcinoma cribiforme
 - carcinoma papilar con estroma de tipo fascitis
 - carcinoma papilar con componente insular focal
 - carcinoma papilar con células escamosas o carcinoma mucoepidermoide
 - carcinoma papilar con carcinoma de células fusiformes y gigantes
 - carcinoma combinado papilar y medular
 - microcarcinoma papilar
- Carcinoma folicular
- Carcinoma pobremente diferenciado
- Carcinoma indiferenciado (anaplásico)
- Carcinoma de células escamosas
- Carcinoma mucoepidermoide
- Carcinoma mucoepidermoide esclerosante con eosinofilia
- Carcinoma mucinoso
- Carcinoma medular de tiroides
- Carcinoma mixto de células foliculares y medulares
- Tumor fusocelular con diferenciación tímica (SETTLE)
- Carcinoma mostrando diferenciación tímica (CASTLE)

Adenomas tiroideos y tumores relacionados

- Adenoma folicular
- Tumor trabecular hialinizante

Otros tumores tiroideos

- Teratoma
- Linfoma primario y plasmacitoma
- Timoma ectópico
- Angiosarcoma
- Tumores de músculo liso
- Peripheral nerve sheath tumours
- Paraganglioma
- Solitary fibrous tumour
- Enfermedad de Rosai-Dorfman
- Tumor de células foliculares dendríticas
- Histiocitosis de células de Langerhans
- Tumores secundarios del tiroides

Tumores paratiroides

- Carcinoma de paratiroides
- Adenoma de paratiroides
- Tumores secundarios de paratiroides

WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs.

Edited by Ronald A DeLellis, Ricardo V Lloyd, Philipp U Heitz and Charis Eng

ISBN 9 28322 416 7

October 2004

GRUPOS DE RIESGO EN CÁNCER DE TIROIDES

Sistema AMES

- A** **Edad**
M **Metástasis distante**
E **Extensión del tumor primario**
S **Tamaño mayor de 5 cm.**

Bajo riesgo: supervivencia a 20 años 99%

Hombre de 40 años o menor sin metástasis.

Mujer de 50 años o menor sin metástasis.

Mayores de estas edades: papilar intratiroideo, folicular con mínima invasión vascular.

Primarios de <5,0 cm.

No metástasis a distancia.

Alto riesgo: supervivencia a los 20 años 61%

Todos los pacientes con metástasis a distancia.

Papilar extratiroideo, folicular con invasión capsular mayor.

Tumores primarios de 5 cm. o más en pacientes mayores (hombre > 40 años, mujer > 50 años).

Cady B, Rossi R.

An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma.

Surgery. 1988;104(6):947-53.

Sistema AGES

- A** **Edad al diagnóstico**
 (0.05 x año sí mayor de 40 años)
 + 0 si menor de 40 años
- G** **Grado histopatológico del tumor**
 + 1 si grado histológico 2
 + 3 si grado histológico 3 ó 4.
- E** **Extensión del tumor**
 + 1 si extratiroidea
 + 3 si diseminación a distancia.
- S** **Tamaño del tumor:**
 + 0,2 x tamaño del tumor (máximo diámetro en cm)

Gradación AGES

Supervivencia según puntuación AGES (a 20 años)

Grupo 1 = 0-3,99	99%
Grupo 2 = 4-4,99	80%
Grupo 3 = 5-5,99	67%
Grupo 4 = ≥ 6	13%

Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey WM.

Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system.

Surgery. 1987;102(6):1088-95.

Sistema MACIS

M (Metástasis distancia)	Positivo	3
	Negativo	0
A (Age = edad)	< 39 años	3,1
	Mayor de 40 años 0,08 x edad en año	0
C completeness = amplitud de la resección:	Incompleta	1
	Completa	0
I nvasión local	Positiva	1
	Negativa	0
S ize (Tamaño)	0,3 x tamaño en cm	

Gradación MACIS**Supervivencia según puntuación MACIS (a 20 años)**

Riesgo mínimo:	< 6,0	99%
Riesgo bajo:	6,01 a 6,99	89%
Riesgo alto:	7,00 a 7,99	56%
Riesgo máximo:	≥ a 8,0	24%

Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS.

Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989.

Surgery. 1993;114(6):1050-7; discussion 1057-8.

Grupos de riesgo del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Data

	Bajo riesgo	Riesgo medio	Riesgo medio	Alto riesgo
Edad (años)	<45	<45	>45	>45
Metástasis	M0	M+	M0	M+
Tamaño	T1, T2	T3, T4	T1, T2	T3, T4
Tipo y grado	Papilar	Folicular y/o alto grado	Papilar	Folicular y/o alto grado
Supervivencia a 5 años (%)	100	96	96	82
Supervivencia a 20 años (%)	99	85	85	57

Shaha AR, Loree TR, Shah JP.

Intermediate-risk group for differentiated carcinoma of thyroid.

Surgery. 1994;116(6):1036-40; discussion 1040-1.

Sistema EORTC (*European Organization for Research on Treatment of Cancer*):

Edad

Sexo

Tipo celular

Tumor anaplásico

Estadio del tumor

Número de sitios metastásicos

Puntuación:

Edad + sexo masculino:	(+12 puntos)
Medular o folicular poco diferenciado:	(+10 puntos)
Tipos de células anaplásicas:	(+45 puntos)
Tumor localmente invasivo por fuera del tiroides:	(+10 puntos)
Metástasis a distancia:	(+15 puntos)
Metástasis múltiples:	(+15 puntos)

Gradación:

Grupo 1:	< 50 puntos
Grupo 2:	50-65 puntos
Grupo 3:	66-83 puntos
Grupo 4:	84-108 puntos
Grupo 5:	≥ 109 puntos

Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon J, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M.

A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group.

Eur J Cancer. 1979;15(8):1033-41.

SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN EN CÁNCER DIFERENCIADO DE TIROIDES

CLASIFICACIÓN TNM

Unión Internacional Contra el Cáncer (*American Joint Committee on Cancer*).

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, Morrow M.
AJCC Cancer Staging Manual, 6ª ed.
Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 2002.

CATEGORÍA	DEFINICIÓN
Tumor primario (T)^a	
TX	El tumor primario no puede identificarse.
T0	No evidencia de tumor primario.
T1	Tumor de 2 cm. o menos en su dimensión mayor, limitado al tiroides.
T2	Tumor de más de 2 cm., pero no más de 4 cm. en su dimensión mayor, limitado al tiroides.
T3	Tumor de más de 4 cm. en su dimensión mayor o cualquier tumor con mínima extensión extratiroidea (Ej. extensión al músculo esternotiroideo o a tejidos blandos peritiroideos).
T4a ^b	Tumor de cualquier tamaño que sobrepasa la cápsula tiroidea para invadir tejidos blandos subcutáneos, larínge, tráquea, esófago o nervio recurrente laríngeo.
T4b ^b	Tumor que invade la fascia prevertebral o infiltra la arteria carótida o vasos mediastínicos.
Ganglios linfáticos (N)^c	
NX	Ganglios linfáticos regionales no puede identificarse.
N0	No metástasis regionales en ganglios linfáticos.
N1	Metástasis en ganglios linfáticos regionales.
N1a	Metástasis en el nivel IV (pretraqueal, paratraqueal, prelaríngea/ ganglios delfianos).
N1b	Metástasis ganglionar cervical unilateral, bilateral o contralateral o en mediastino superior.
Metástasis a distancia (M)	
MX	Las metástasis no pueden identificarse.
M0	No metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia.

^a Todas las categorías pueden subdividirse:

(I) tumor solitario

(II) tumor multicéntrico (el más grande determina la clasificación).

^b Todos los anaplásicos son considerados T4:

T4a carcinoma anaplásico intratiroideo (resecable)

T4b carcinoma anaplásico extratiroideo (irresecable).

^c Los ganglios regionales son: compartimento cervical central, lateral y mediastino superior.

ESTADIO TNM

ESTADIO	T	N	M
Papilar o folicular menor de 45 años			
Estadio I	cualquier T	cualquier N	M0
Estadio II	cualquier T	cualquier N	M1
Papilar o folicular de 45 años o mayor			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Estadio IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4	N1b	M0
Estadio IVB	T4b	cualquier N	M0
Estadio IVC	cualquier T	cualquier N	M1
Carcinoma Medular			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1a	M0
	T2	N1a	M0
	T3	N1a	M0
Estadio IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1	N1b	M0
	T2	N1b	M0
	T3	N1b	M0
	T4	N1b	M0
Estadio IVB	T4b	cualquier N	M0
Estadio IVC	cualquier T	cualquier N	M1
Carcinoma Anaplásico ^a			
Estadio IVA	T4a	cualquier N	M0
Estadio IVB	T4b	cualquier N	M0
Estadio IVC	cualquier T	cualquier N	M1

^a Cualquier cáncer anaplásico es considerado estadio IV.