

Tesis doctoral

Utilidad del estudio del perfil de expresión génica mediante microarrays en el diagnóstico diferencial de benignidad o malignidad del nódulo tiroideo.



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y SUS ESPECIALIDADES

Nuria Muñoz Pérez
Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo
Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Granada, noviembre de 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: Nuria Muñoz Pérez
ISBN: 978-84-9125-508-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/42413>

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido resultado de un gran esfuerzo personal pero desde luego, en este largo camino, no he estado sola. Quiero expresar aquí mi agradecimiento a todos aquellos que de alguna forma, han hecho que esto sea posible.

En primer lugar quiero dedicar y agradecer este texto a mis padres. Podría hablar horas de todo lo que habéis hecho por mí y de la referencia que suponéis en mi vida... pero, simplemente, sin vosotros jamás hubiera llegado hasta aquí.

A mis directores: el Dr. Villar, no sólo mi director, también mi jefe de sección, mi mentor y, sobre todo, mi amigo. Y el Dr. Bueno Laraño, que me ha brindado su ayuda y apoyo en un momento de adversidad personal. A los dos mi eterno agradecimiento por vuestra labor y vuestra infinita paciencia.

También quiero expresar mi gratitud a mi jefe de servicio, el Dr. Jiménez Ríos, y al resto de mis compañeros del Servicio de Cirugía General del Hospital Virgen de las Nieves. Sin ellos nunca habría tenido el tiempo suficiente para concluir este trabajo. A todos y cada uno de vosotros, que me habéis tenido que aguantar con todo mi estrés, pero que siempre habéis tenido una palabra de ánimo para mí. De verdad, gracias de todo corazón.

Permitidme un especial recuerdo al Dr. Arcelus, al que no sólo me une la Cirugía Endocrina sino... una manzanita (🍏)... y una bonita amistad. Y al Dr. Segura, mi compañero de guardias durante los últimos años, que siempre me deja mi "ratillo" para la ciencia y con el que, por muy mal que se presente el día, siempre hay un momento de alegría. Con todo mi cariño, muchas gracias a los dos.

Este trabajo hubiera sido imposible sin la participación de un amplio equipo de profesionales a los que, además, agradezco su implicación personal:

Eugenio Coll, que se ocupó de extraer las muestras sanguíneas de los pacientes, y el resto de personal de quirófano que siempre me brindan su colaboración.

Carmen Olmedo y Ana María Comino que realizaron todas las técnicas de laboratorio descritas en este trabajo.

El profesor Armando Blanco y el Dr. Carlos Cano, del Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial, por su indispensable colaboración en el análisis de los datos de obtenidos con los microarrays.

Manuela Expósito, por su estupendo análisis estadístico. Nunca imaginé que podría pasarlo bien con este tema. Mil gracias por hacerlo comprensible, por tu disposición y, sobre todo, por tu tremenda amabilidad.

Y el Dr. Ferrón, mi jefe hasta diciembre del año pasado, que tuvo la visión de impulsar esta vía de investigación en nuestro servicio.

Otros compañeros han facilitado mi tarea, como la Dra. Becerra, que ha solventado mis dudas histológicas y citológicas y además, me ha proporcionado las ilustraciones que sobre este tema figuran el texto. La Dra. Cañadas, siempre disponible para cualquier consulta y, además, autora del análisis de la mutación BRAF^{T1799A}. La Dra. Muros, del Servicio de Medicina Nuclear, no sólo por su información sobre la técnica de la ¹⁸FDG-PET/TAC, si no por su aliento tanto en el ámbito profesional como el personal. El Dr. Fernández Valadés, que no sólo es "mi cirujano pediátrico de cabecera", sino un amigo, y el suministrador del *software* indispensable para terminar este texto sin desfallecer en el intento. El Servicio de Endocrinología, cuya colaboración no sólo ha sido fundamental en este trabajo, sino que lo

es a diario. Finalmente no me quiero olvidar de Carlos Merino (Ayudante de Biblioteca), por su diligencia en localizarme artículos históricos hasta debajo de las piedras.

Hay pocos momentos en los que se tiene la oportunidad de agradecer públicamente la labor de esas personas que diariamente facilitan tu trabajo, así que aprovecho este espacio para ello. En primer lugar tengo que dar las gracias al excelente equipo de residentes con el que tengo la fortuna de trabajar. Sin vosotros sería imposible atender la actual demanda asistencial. Pero para mí, además sois esa llama de optimismo y alegría de vivir que, ya sabéis, tanto necesito a veces. Teresa, Puri: gracias por todos los “encarguillos” que me solucionáis...y ¡por no chillarme cada vez que os los pido!. Y el personal de la “Séptima”, que, con paciencia, soporta mis eternos pases de planta.

Además del estupendo grupo de profesionales que me rodea, he tenido la suerte de contar con un círculo de personas que siempre me apoyan, me animan y me miman, demostrándome constantemente su cariño incondicional.

Mis hermanos, Bruno y Raúl: gracias por ser quién y cómo sois. Patricia que generosamente me “adopta” durante los veranos. Mis sobrinos: Jimena, Ricardo, Gonzalo, Raúl, Carlos, y el recién llegado Álvaro. Sois un regalo y un estímulo constante. Va por todos vosotros. Marta... ¡espero que celebremos también tu doctorado muy pronto!

Esther, Carmen y Susana, gracias por aquéllas vacaciones y ¡por aguantarme durante tantos años! Ana, Maribel, Charo, Pepe, Javi... Toda una vida, como dice la canción, y ¡lo que nos queda!. Mario, siempre has creído en mí, incluso cuando yo no lo hacía. Trini, que sigues ahí, a pesar de todo. Carmela y el resto de Los Nolotiles, que en poco tiempo os habéis ganado un lugar en mi corazón. Tengo mucha, mucha suerte de teneros en mi vida. Gracias por estar cuando os necesito.

No puedo dejar de mencionar a mis maestros y compañeros del Hospital Clínico San Cecilio donde me formé como cirujano general, donde comencé a apreciar la Cirugía Endocrina, y donde hice grandes amigos. Gracias a los doctores Guerrero, Tovar, Ruiz Morales, y Morales. Un especial recuerdo al Profesor Vara, y al Dr. Rosell, donde quiera que estén. Jorge, me hubiera encantado que pudieras estar aquí... A los doctores Astruc y Ruiz de Adana, que me acogieron y me enseñaron no sólo medicina y cirugía, sino a sobrevivir dentro del hospital cuando no era más que una “pardilla” con muchas ganas, y a disfrutar de cada momento fuera del mismo. A las “niñas”: la Dra. Martínez, la Dra. Cáceres y el Dr. Jiménez (Javi, ¡ya tú sabes...!), que estuvieron conmigo mientras finalizaba mi periodo de formación, en mis primeros pasos como especialista, y que por suerte, siguen ahí.

Y Don Cecilio, con el que reaprendí a operar el cuello en montones de horas de quirófano... y que, entre ligadura y ligadura, me enseñó tantas cosas de la vida.

Gracias, mil gracias a todos.

Nuria

COMUNICACIONES

COMUNICACIONES

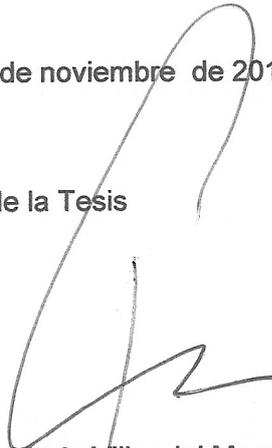
Los resultados de esta tesis doctoral se ha presentado parcialmente en los siguientes congresos:

- Utilidad de la tomografía por emisión de positrones con ¹⁸Fluorodesoxiglucosa en la valoración preoperatoria del nódulo tiroideo con citología de proliferación folicular. Villar Del Moral JM, Muñoz Pérez N, Muros Fuentes MA, Palacios Gerona H, Olmos Juárez E, Gil Loza S, Rodríguez González R, Arcelus Martínez JI, Ferrón Orihuela JA. *XVII Reunión Nacional de Cirugía. Las Palmas de Gran Canaria, 21-24 de octubre de 2009*. Disponible en *Cir Esp 2009; 86: 15-16*.
- Análisis del perfil de expresión génica en sangre periférica en pacientes con cáncer de tiroides y su modificación tras cirugía. Muñoz Pérez N, Olmedo Martín C, Villar Del Moral JM, López Domingo FJ, Comino Pardo AM, Arcelus Martínez JI, Blanco Morón A, Bueno Laraño P, Ferrón Orihuela JA. *XVII Reunión Nacional de Cirugía. Las Palmas de Gran Canaria, 21-24 de octubre de 2009*. Disponible en *Cir Esp 2009; 86: 27-28*.
- Gene expression profile in peripheral blood samples from differentiated thyroid carcinoma patients before and after surgery. Muñoz N, Olmedo C, Villar JM, López FJ, Comino A, Lupiáñez B, Arcelus JI, Coll E, Blanco A, Bueno P, Ferrón JA. *4th Biennial Congress of European Society of Endocrine Surgeons, Viena, 13-15 de mayo de 2010*.
- Gene expression analysis in thyroid tissue of patients with differentiated thyroid carcinoma. Muñoz N, Olmedo C, Villar JM, López FJ, Comino A, Lupiáñez B, Arcelus JI, Coll E, Blanco A, Bueno P, Ferrón JA. *4th Biennial Congress of European Society of Endocrine Surgeons, Viena, 13-15 de mayo de 2010*.
- Role of positron emission tomography in diagnosis of suspicious thyroid nodules. Muñoz N, Villar JM, Muros MA, Rodríguez R, Olmos E, Moreno C, Martín J, Gil S, Arcelus JI, Ferrón JA. *4th Biennial Congress of European Society of Endocrine Surgeons, Vienn, May 2010*.
- Análisis del perfil de expresión génica en muestras de tejido tiroideo de pacientes con lesiones nodulares benignas y malignas. Muñoz N, Olmedo C, Villar J, López FJ, Comino A, Arcelus JI, Blanco A, Bueno P, Rodríguez R, Martín J, Ferrón JA. *XXVIII Congreso de la Asociación Española de Cirujanos. Madrid, del 9 al 11 de Noviembre de 2010*. Disponible en *Cir Esp 2010; 88: 29*.
- Could ¹⁸F-FDG-PET/CT avoid unnecessary thyroidectomies in patients with cytological diagnosis of follicular neoplasm? N. Muñoz Pérez, J.M. Villar del Moral, M.A. Muros Fuentes, J.I. Arcelus Martínez, A. Vílchez Rabelo, N. Zambudio Carroll, A. Bustos, P. Becerra Massare, M. López de la Torre, J.A. Ferrón Orihuela. *5th Biennial Congress of European Society of Endocrine Surgeons, Gothemburg (Sweden), May 2012*. Disponible en *Langenbecks Arch Surg 2013; 398: 709-16*. Asociado a esta Tesis Doctoral.

El doctorando Nuria Muñoz Pérez y los directores de la tesis Jesús María Villar del Moral y Pablo Bueno Laraño Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 11 de noviembre de 2015

Director/es de la Tesis



Fdo.: Jesús María Villar del Moral

Doctorando



Fdo.: Nuria Muñoz Pérez



Fdo.: Pablo Bueno Laraño

RESUMEN

RESUMEN

Introducción

La patología nodular tiroidea es extremadamente prevalente y su importancia clínica radica en el diagnóstico diferencial con el cáncer tiroideo. Éste es un tumor poco frecuente y con buen pronóstico, pero cuya incidencia está aumentando en los últimos años. La ecografía y la citología, en general, diagnostican correctamente la mayoría de los casos, sin embargo, cuando el resultado citológico es de neoplasia folicular (citología indeterminada) el paciente tiene que ser sometido a una intervención quirúrgica diagnóstica. En esta situación, el diagnóstico final suele ser una lesión benigna (adenoma folicular o de células de Hürthle), pero aproximadamente el 15-45% será un cáncer (folicular, variante folicular de cáncer papilar o de células de Hürthle). Diversas pruebas de imagen han tratado de dar más información al respecto, siendo la elastografía o la ^{18}F FDG-PET/TAC bastante prometedoras. Pero hasta el momento, ni la citología ni los datos clínicos o radiológicos, proporcionan un diagnóstico que evite la cirugía.

La investigación en la biología molecular del cáncer de tiroides, incluyendo los estudios de expresión génica, ha proporcionado multitud de datos pero aún hoy, no existe un marcador único con la suficiente capacidad discriminativa entre nódulos benignos y malignos cuando la citología no es concluyente. Las combinaciones de genes y otras moléculas distribuidas comercialmente se están utilizando con cierto éxito pero a un coste que impide su generalización.

Objetivo

Discriminar preoperatoriamente la benignidad o malignidad de un nódulo tiroideo con diagnóstico citológico indeterminado mediante el estudio del perfil de expresión génica con microarrays en células del tejido tiroideo patológico y de sangre periférica, proporcionando un clasificador con utilidad para la práctica clínica. Además se evaluará la validez de la ^{18}F FDG-PET/TAC en el diagnóstico preoperatorio de estos nódulos, y se analizará la relación del perfil génica con factores pronósticos conocidos del cáncer de tiroides.

Pacientes y métodos

Se ha analizado la expresión génica, mediante microarrays de oligonucleótidos del genoma completo, de muestras de tejido nodular tiroideo y sangre periférica de pacientes intervenidos por dicha patología en nuestro centro. La participación requería que en su estudio preoperatorio figurase una citología indeterminada o sospechosa de malignidad, y/o la sospecha clínica o radiológica de patología maligna. Los resultados de la expresión génica fueron validados mediante qRT-PCR en un grupo posterior de pacientes.

Para analizar las relaciones entre el perfil génico y las variables clinicopatológicas y con valor pronóstico de los pacientes se utilizó el test de la chi cuadrado con corrección de Yates o test exacto de Fisher para las variables cualitativas, y tests paramétricos (t de Student) o no paramétricos (U-Mann Whitney) para las variables cuantitativas, tras comprobar la normalidad de la distribución mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para la construcción del clasificador se ha utilizado la regresión logística. La evaluación de éste y de la ^{18}F FDG-PET/TAC como herramienta diagnóstica se ha realizado mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, así como el área bajo la curva ROC construida con la sensibilidad y el inverso de la especificidad. El análisis de la

supervivencia se ha realizado por el método de Kaplan-Meier, y para la comparación entre los grupos se ha utilizado el test de Log-Rank. La significación se ha establecido en $p < 0,05$, y en el análisis multivariante en $p > 0,10$ como criterio de salida. Para el análisis estadístico se ha utilizado el paquete IBM® SPSS® Statistics 22.0 para Windows.

Resultados

Durante el periodo 2008-2011 fueron intervenidos nuestro centro 600 pacientes por patología nodular tiroidea. De esta población, se analizó el perfil de expresión génica en 34 de los 56 sujetos elegibles para este trabajo, distribuidos en dos grupos: 20 con lesiones finalmente malignas y 14 benignas.

En el conjunto de pacientes constituido como grupo de estudio, el perfil de expresión génica mostró 11 genes sobreexpresados en muestras de tejido tiroideo y nueve sobreexpresados y 44 infraexpresados en sangre periférica de los que presentaban patología maligna respecto a los afectos por enfermedad tiroidea benigna. Mediante qRT-PCR en un grupo posterior o grupo de validación, se confirmó que la sobreexpresión de HMGN2 en tejido se relacionaba con patología maligna ($p = 0,001$) y la de NLRC3 en sangre periférica, con benignidad ($p = 0,011$).

El clasificador obtenido indica una probabilidad de CPT del 0,98, cuando HMGN2 está expresado y NLRC3 no, mientras que la combinación contraria reduce ésta al 0,14. La aplicación de este predictor al subgrupo de 15 pacientes con citología indeterminada en la PAAF preoperatoria permite identificar correctamente la malignidad o benignidad de la mayoría de las lesiones (área bajo la curva de 0,983). El estudio ha revelado, además, que la expresión de ambos genes está inversamente relacionada entre sí.

Con esta muestra no se ha podido demostrar la utilidad de la ^{18}F FDG-PET/TAC en el diagnóstico preoperatorio. Por último, en la evaluación de ambos genes como marcadores con impacto pronóstico, sólo se ha encontrado que los pacientes que expresaron NLRC3 en sangre periférica presentaron niveles más bajos de tiroglobulina postoperatoria ($p = 0,012$) y mayor tiempo hasta la recidiva ($p = 0,040$).

Conclusiones

El estudio de expresión del perfil génico mediante microarrays permite identificar genes con diferencias de expresión en tejido tiroideo y en sangre periférica de los pacientes con cáncer tiroideo frente a los que tienen una lesión benigna. El clasificador construido proporciona una alta probabilidad estar ante una lesión maligna cuando HMGN2 está expresado en tejido y NLRC3 no lo está en sangre periférica mientras que la situación contraria predice benignidad. Con los resultados de este estudio no se puede avalar la utilidad de la ^{18}F FDG-PET/TAC en el diagnóstico preoperatorio de los pacientes con citología indeterminada.

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	II
COMUNICACIONES	V
RESUMEN	VIII
ÍNDICE	XI
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. NÓDULO TIROIDEO	2
1.1.1. Epidemiología	2
1.1.2. Diagnóstico	3
1.1.3. El problema diagnóstico: Neoplasia folicular (NF)/ Sospechoso de neoplasia folicular (SNF)	9
1.2. CÁNCER DE TIROIDES	13
1.2.1. Epidemiología	13
1.2.2. Factores de riesgo	15
1.2.3. Tipos histológicos	17
1.2.4. Diagnóstico	19
1.2.5. Factores pronósticos de la evolución del cáncer tiroideo	19
1.2.6. Estadificación y grupos de riesgo	20
1.2.7. Tratamiento y seguimiento	21
1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER TIROIDEO DE ORIGEN FOLICULAR	23
1.3.1. Oncogenes en cáncer de tiroides	25
1.3.2. Modelo de oncogénesis	30
1.3.3. Desregulación epigenética	32
1.4. MARCADORES TUMORALES EN CÁNCER DE TIROIDES	35
1.4.1. Mutaciones somáticas como marcador tumoral	35
1.4.2. Marcadores inmunohistoquímicos	38
1.4.3. Proteómica	39
1.4.4. Metabolómica	41
1.4.5. Marcadores séricos	41
1.4.6. Marcadores relacionados con el pronóstico	45
1.5. ESTUDIOS DE PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS	48
1.5.1. Base biológica de los microarrays	48
1.5.2. Concepto de microarray	48
1.5.3. Tipos de microarrays	48
1.5.4. Microarrays de expresión	49
1.5.5. Validación de los resultados de los experimentos con microarrays	53
1.5.6. Reproducibilidad e intercambio de los resultados de los microarrays	54
1.5.7. Aplicaciones de los microarrays de expresión	55
1.5.8. Limitaciones de los estudios con microarrays de expresión genética	56
1.5.9. Perfil de expresión génica mediante microarrays y cáncer de tiroides.	56
1.6. APLICACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA	70
1.6.1. Marcadores emergentes	72
1.7. SUMARIO	73
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	75
2.1. HIPÓTESIS	75
2.2. OBJETIVOS	75

2.2.1. Objetivo principal.....	75
2.2.2. Objetivos intermedios.....	75
3. PACIENTES Y MÉTODOS	77
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	77
3.2. ÁMBITO	77
3.3. TAMAÑO MUESTRAL.....	78
3.4. SUJETOS DE ESTUDIO	78
3.4.1. Criterios de elegibilidad	78
3.4.2. Criterios de Exclusión.....	78
3.4.3. Muestra.....	78
3.5. MATERIAL BIOLÓGICO.....	80
3.5.1. Toma de muestras y conservación de sangre periférica.....	80
3.5.2. Toma de muestras y conservación del tejido tiroideo.....	80
3.5.3. Análisis del perfil de expresión génica mediante microarrays en tejido y sangre periférica.	80
3.6. VARIABLES ANALIZADAS	95
3.6.1. Variables dependientes	95
3.6.2. Variables independientes.....	96
3.6.2. ¹⁸ FDG-PET/TAC.....	97
3.6.3. Determinación de la mutación BRAF ^{V600E}	98
3.7. ANÁLISIS DE DATOS.....	98
3.7.1. Análisis descriptivo de todas las variables analizadas.....	98
3.7.2. Análisis comparativo de las variables epidemiológicas y clínicas en los distintos subgrupos	98
3.7.3. Análisis bivariante para estudiar las posibles relaciones entre las variables dependientes, diagnóstico y pronóstico, y las independientes 2 a 2	99
3.7.4. ¹⁸ FDG-PET/TAC.....	99
3.7.5. Construcción del clasificador	99
3.7.6. Análisis de la influencia de las diferentes variables sobre el pronóstico	99
4. RESULTADOS.....	101
4.1. COMPOSICIÓN DE LA SERIE DE PACIENTES	101
4.1.1. Características clínicas	101
4.1.2. Composición de la serie de pacientes con patología maligna.....	103
4.2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA	105
4.2.1. Genes expresados diferencialmente en el grupo maligno con respecto al benigno.	105
4.2.2. Validación con qRT-PCR. Capacidad predictiva de benignidad o malignidad que ha mostrado el perfil de expresión génica.....	107
4.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA CON LAS VARIABLES DEL ESTUDIO	110
4.3.1. Análisis bivariante	110
4.3.2. Análisis multivariante.....	113
4.3.3. Utilidad de la expresión génica para diagnosticar malignidad.....	114
4.3.4. ¹⁸ FDG-PET/TAC.....	115
4.3.5. Modelo predictivo.....	116
4.3.6. Análisis de la influencia de las diferentes variables sobre el pronóstico.	119
5. DISCUSIÓN	123
5.1. SUJETOS DE ESTUDIO	123
5.2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS.	125
5.2.1. HMG2	127
5.2.2. NLRC3.....	130
5.2.3. Relación entre ambos genes.....	133

5.3. PERFIL GÉNICO Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS Y CON VALOR PRONÓSTICO DE LAS LESIONES MALIGNAS.....	133
5.4. CLASIFICADOR.....	134
5.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	136
5.6. VÍAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN.....	137
6. CONCLUSIONES.....	139
7. BIBLIOGRAFÍA.....	141
ABREVIATURAS.....	173
ANEXOS.....	177
Anexo I CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE TUMORES TIROIDEOS (OMS).....	177
Anexo II CLASIFICACIONES CON VALOR PRONÓSTICO EN CDT.....	178
II.1. Clasificación AJCC/UICC (TNM). Thyroid.....	178
II.2. Sistema AMES.....	179
II.3. Sistema AGES.....	180
II.4. Sistema MACIS.....	180
II.5. Grupos de riesgo del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.....	180
II.6. Sistema EORTC (European Organization for Research on Treatment of Cancer).....	180
II.7. Sistema SAG.....	181
II.8. Grupos de riesgo de recidiva según la ATA.....	181
II.9. Sistema del NTCTCSG.....	182
II.10 Otros sistemas.....	182
Anexo III CONSENTIMIENTO.....	183
III.I. DOCUMENTO INFORMATIVO.....	183
III.II. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	184
Anexo IV GENES NOBRADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL.....	185
Anexo V DATOS EN BRUTO Y NORMALIZADOS DE LOS GENES OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO.....	193
V.I. SANGRE PERIFÉRICA.....	193
V.II. TEJIDO.....	194
Anexo VI. GENES RELACIONADOS HMNG2.....	195

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NÓDULO TIROIDEO

Se considera como tal, toda lesión bien delimitada e hipertrófica en el interior de la glándula tiroidea distinta radiológicamente del tejido tiroideo circundante⁽¹⁻³⁾. Los nódulos tiroideos son la manifestación clínica de un amplio espectro de enfermedades. La mayoría de ellos son benignos y asintomáticos, sobre todo en caso de bocio multinodular, y pueden ser solitarios o múltiples, sólidos, quísticos o mixtos⁽⁴⁾.

La importancia clínica de los nódulos tiroideos reside principalmente, aparte de los pocos casos en los que producen síntomas compresivos o son hiperfuncionantes, en la necesidad de excluir la presencia de una lesión maligna⁽⁵⁾.

1.1.1. Epidemiología

En función de las áreas geográficas, la prevalencia de nódulos tiroideos oscila en un amplio rango: 8,2-65%⁽⁶⁾.

En áreas geográficas sin deficiencia de yodo, alrededor del 4-7% de la población desarrollará un nódulo tiroideo palpable a lo largo de su vida, con una prevalencia mayor en los países donde el bocio es endémico^(4, 7). Si se utiliza la ecografía como método de exploración, esta prevalencia llega hasta el 70%⁽⁸⁻¹²⁾. En autopsias se han encontrado nódulos en el 50-70% de las realizadas a pacientes sin antecedentes de enfermedad tiroidea^(13, 14), en años previos a las campañas para mejorar la ingesta poblacional de yodo. Por el contrario, en una serie de autopsias en un área de Japón con suficiente aporte de yodo en la ingesta, no se encontró ningún nódulo⁽¹⁴⁾.

Entre los factores de riesgo para la aparición de nódulos tiroideos están⁽⁶⁾:

- la edad avanzada
- el sexo femenino
- la deficiencia de yodo
- la exposición a radiación.
- Otros: tabaco, alcohol, embarazo.

La evolución de los nódulos es variable: una media del 30% reducen en un 50% su volumen, otro 30% permanecen estables y el 20-89% crecen durante el seguimiento^(2, 15-17). En un reciente estudio multicéntrico⁽¹⁸⁾ se ha comprobado que durante el seguimiento, los nódulos asintomáticos, con aspecto ecográfico o citología benignos, mantienen estable su tamaño y tienen un bajo riesgo de cáncer (0,3%) durante al menos 5 años, disminuyendo espontáneamente el 18,5%.

La prevalencia estimada de cáncer de tiroides en nódulos tiroideos es del 5%, aunque en distintas series las cifras oscilan entre el 8-20%⁽⁴⁾. En general se asume que el riesgo de cáncer es similar para el nódulo solitario que para el bocio multinodular⁽¹⁹⁾. Sin embargo en algún estudio⁽²⁰⁾ y en un metaanálisis reciente, el riesgo de cáncer es significativamente inferior en el bocio multinodular [*Odds ratio* (OR) 0,8; 95% intervalo de confianza (IC): 0,67-0,96]⁽²¹⁾. Los pacientes con bocio multinodular y cáncer suelen ser varones, con menos edad, y con menor número de nódulos que los pacientes con nódulos benignos⁽²²⁾. La tiroiditis parece estar también en relación con más alta frecuencia de CPT y de linfoma tiroideo⁽²³⁾.

1.1.2. Diagnóstico

El objetivo del estudio diagnóstico es distinguir entre lesiones benignas y malignas, y definir qué nódulos necesitarán tratamiento quirúrgico. En las lesiones benignas, el interés se centra en diferenciar adenomas de quistes o nódulos hiperplásicos⁽⁴⁾

En la historia clínica debe constar la siguiente información⁽²⁾:

- Edad.
- Uso de medicación o suplementos que contengan yodo.
- Antecedentes familiares de enfermedad o cáncer tiroideo (neoplasia endocrina múltiple (MEN) tipo 2, cáncer medular de tiroides (CMT), Enfermedad de Cowden, poliposis colónica familiar, complejo de Carney, síndrome de McCune-Albright, carcinoma papilar familiar, acromegalia.
- Irradiación de cabeza y cuello en la infancia ya sea yatrógena⁽¹⁾ o accidental.
- Velocidad de crecimiento de la masa cervical.
- Síntomas locales asociados (disfonía, disfagia, disnea).
- Síntomas de disfunción tiroidea.

En la exploración física se debe prestar atención no sólo a la glándula tiroidea (tamaño, nodularidad y su localización, consistencia, fijación a tejidos circundantes o dolor) sino también a la exploración de las regiones ganglionares u otros datos que puedan indicar metástasis a distancia^(24, 25).

Las pruebas complementarias que se deben incluir son la determinación hormonal⁽²⁶⁾, la ecografía, la punción-aspiración con aguja fina (PAAF) y, en ocasiones, la gammagrafía.

1.1.2.1. Exámenes de laboratorio

En general, las guías clínicas y consensos están de acuerdo en que la única prueba de laboratorio inicial ante un nódulo tiroideo es la determinación de TSH pues tiene una alta sensibilidad para detectar la disfunción tiroidea, incluso subclínica^(1, 2, 4, 27-29).

Si los niveles de TSH (hormona estimulante tiroidea) están alterados, se deben medir T3 (triyodotironina), T4 (tiroxina o levotiroxina), TSI (anticuerpos estimulantes del tiroides) si la TSH está baja y AcTPO (anticuerpos antiperoxidasa tiroidea) si está alta.

La determinación de calcitonina es controvertida y su uso rutinario en el estudio del nódulo tiroideo no está totalmente aceptado. Sí se debe realizar en caso de sospecha clínica o citológica de CMT, historia familiar o sospecha de MEN tipo 2^(1, 27, 30). Los autores que recomiendan su uso sistemático argumentan que permite la detección de carcinoma medular en 1 de cada 200-300 nódulos, con mejor sensibilidad que la PAAF y en estadios más precoces^(28, 31).

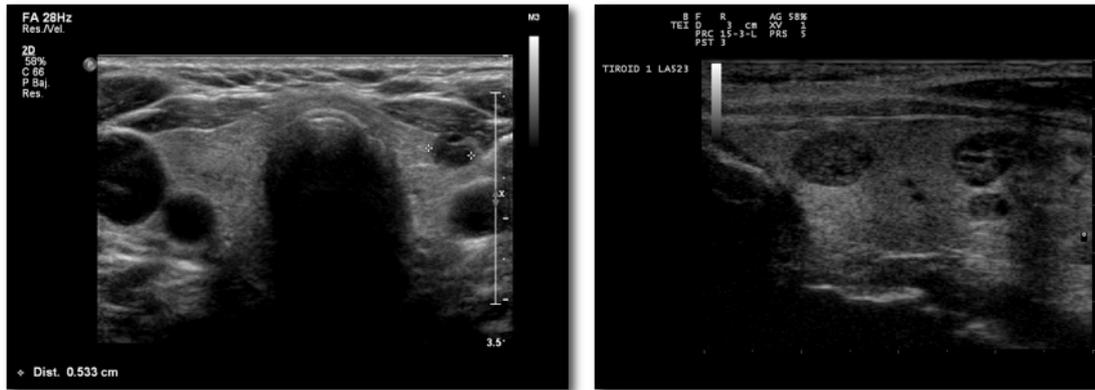
En ningún caso se recomienda la determinación de tiroglobulina (Tg) pero sí la de calcio, para descartar patología paratiroidea concomitante⁽³²⁾.

1.1.2.2. Ecografía

La ecografía es, hoy en día, la técnica de imagen más fiable para detectar nódulos en la glándula tiroides (Fig. 1) y es obligatoria ante un nódulo palpable⁽²⁸⁾.

Actualmente la ecografía de alta resolución es la modalidad más utilizada en la evaluación tiroidea por su inmediatez, su bajo coste y por no ser invasiva⁽³³⁾, siendo capaz de detectar nódulos sólidos de 3 milímetros (mm) y quísticos de 1 mm^(10, 34).

Fig. 1 Ecografía. A la izquierda glándula tiroides normal. A la derecha nódulos tiroideos



Entre las ventajas de la ecografía tenemos:

- La determinación del tamaño y la naturaleza (sólida o quística) de las lesiones⁽³⁵⁾.
- La detección de un porcentaje alto de nódulos no palpables, con una buena correlación histológica, permitiendo evitar la cirugía en un número considerable de pacientes^(8, 9, 12, 36, 37).
- La modificación del manejo clínico de los pacientes con nódulos palpables en 2/3 de los casos, bien por no identificar nódulos o sólo subcentimétricos, bien poniendo de manifiesto otros nódulos que requieren biopsia⁽³⁸⁾.
- Su utilidad como guía para procedimientos diagnósticos (PAAF) o terapéuticos (aspiración de quistes, inyección de etanol o tratamiento con láser) y para el seguimiento tras el tratamiento⁽²⁵⁾.
- El uso del Doppler con color permite identificar el flujo sanguíneo en el interior de los tumores tiroideos: este es mínimo en lesiones benignas, mientras que los tumores malignos tienen un flujo interno muy abundante^(3, 33).
- El uso de contraste intravenoso ayuda a realzar el parénquima tiroideo y el análisis de la perfusión del mismo aporta información para la distinción de tumores malignos y benignos^(2, 33).

La exploración ecográfica debe incluir la glándula tiroides, la zona dorsal e inferior a la misma, en busca de patología paratiroidea, y los compartimentos central y lateral en busca de adenopatías^(1, 2, 4, 28, 32, 39).

La elastografía es una técnica ecográfica que determina la elasticidad tisular, más alta en los tumores malignos⁽⁴⁰⁾. Aplicada a la patología tiroidea trata de mejorar el rendimiento de la ecografía convencional, aumentando su especificidad⁽⁴¹⁾, sobre todo en casos de nódulos con citología indeterminada o no diagnóstica⁽⁴⁰⁾. Los resultados obtenidos diferenciando tumores malignos de benignos son prometedores con una sensibilidad (S) y una especificidad (E) del 0,84 (IC 95%: 0,76-0,90) y 0,90

(IC 95%: 0,87-0,92) respectivamente, y un área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) o ABC de 0,92⁽⁴²⁾.

El documento de consenso de la *Society of Radiologist in Ultrasound*⁽³⁾ indica que para el estudio de la patología tiroidea se debe realizar una ecografía en escala de grises y con Doppler en color, describiendo tamaño, ecogenicidad, composición, presencia o ausencia de macro o microcalcificaciones y halo, irregularidad o no de los márgenes, y características del flujo sanguíneo intranodular. En la Tabla 1 se muestra la S y la E de las características ecográficas para la detección de cáncer⁽⁴³⁾, mientras que en la Tabla 2 exponen las diferencias ecográficas entre nódulos benignos y malignos⁽⁴⁴⁾.

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de las características ecográficas para la detección de cáncer

	Sensibilidad media	Especificidad media
Microcalcificaciones	52% (26% - 73%)	83% (69% - 96%)
Ausencia de halo	66% (46% - 100%)	54% (30% - 72%)
Márgenes irregulares	55% (17% - 77%)	79% (63% - 85%)
Hipoecogenicidad	81% (49% - 90%)	53% (36% - 66%)
Flujo intranodular aumentado	67% (57% - 74%)	81% (49% - 89%)

(Traducida de J Endocrinol Metab Clin North Am. 37, Fish *et al.*, Sonographic Imaging of Thyroid Nodules and Cervical Lymph Nodes, pp: 401-17, ©2008, con permiso de Elsevier⁽⁴³⁾).

Ninguna de las características ecográficas por sí sola tiene suficiente valor predictivo. No obstante, cuando hay más de una en el mismo nódulo la especificidad aumenta bastante, aunque a costa de una sensibilidad muy baja^(40, 44).

Tabla 2 Diferencias ecográficas entre tumores malignos y benignos

	NÓDULOS BENIGNOS	NÓDULOS MALIGNOS
Ecogenicidad	Isoecoicos	Hipoecoicos
Márgenes	Bien definidos	Irregulares
Calcificaciones	No o groseras	Microcalcificaciones
Aspecto	Homogéneo	Heterogéneo
Vascularización	Avascular o flujo periférico	Flujo central
Forma	Más ancho que alto	Más alto que ancho
Firmeza	Compresible	Rígido
Adenopatías	No	Sí

(Traducida de Lew *et al.*⁽⁴⁴⁾, Curr Opin Oncol. 22: 11-6. ©2010 Wolters Kluwer Health. Prohibido el uso promocional o comercial de este contenido en cualquier medio sin permiso del editor).

Otros patrones ecográficos relacionados con el riesgo de malignidad del nódulo tiroideo son:

- Aspecto esférico: cociente entre el diámetro anteroposterior y el transversal mayor a uno^(43, 45).

• La invasión de estructuras extratiroideas o la metástasis en ganglios linfáticos cervicales. Las características radiológicas de malignidad de los ganglios son: forma redondeada, tamaño aumentado, márgenes irregulares, estructura heterogénea, microcalcificaciones, áreas quísticas, pérdida del hilio graso y vascularización irregular intraganglionar⁽⁴⁶⁾.

1.1.2.3. PAAF

Desde los años 50 hasta ahora la PAAF ha ganado popularidad hasta convertirse en el test más seguro, eficaz y coste efectivo para evaluar las lesiones tiroideas⁽¹⁾.

Desde los estudios iniciales a la actualidad, la capacidad para detectar cáncer ha sido muy alta, con E y valor predictivo positivo (VPP) que rondan el 100%⁽⁴⁷⁻⁵⁴⁾.

El *National Cancer Institute* (NCI) organizó en 2007 una conferencia (*NCI Thyroid Fine-Needle Aspiration State of Science Conference, Bethesda, MD*, octubre de 2007) con la finalidad de unificar la terminología y los criterios morfológicos de la PAAF tiroidea, así como establecer las indicaciones para la misma y las recomendaciones de tratamiento en función de los resultados⁽⁵⁵⁾ estableciendo el conocido coloquialmente como sistema Bethesda (*The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology* o TBSRTC)⁽⁵⁶⁾ (Tablas 3 y 4). Así mismo, el Royal College of Pathologist (RCP), ha publicado un sistema de categorías similar⁽⁵⁷⁾ (Tabla 3).

Tabla 3 Clasificación del diagnóstico citológico en diferentes guías clínicas

Categoría	NCI 2008* TBSRTC ⁽⁵⁵⁾	ATA 2009 ⁽¹⁾	RCP 2009 ⁽⁵⁷⁾	SLAT 2009 ⁽⁵⁸⁾	ETA/AACE/ AME 2010 ⁽²⁷⁾
1	No diagnóstica Insatisfactoria	No diagnóstica	No diagnóstica (Thy1)	Insatisfactoria	No diagnóstica (categoría 1)
2	Benigna	Benigna	Benigna (Thy2)	Benigna	Benigna o negativa (categoría 2)
3	AUS/FLUS	Indeterminada (NF, NCH, AUS, atipia, sospechosa de malignidad)	Possible neoplasia (Thy3)	Indeterminada (patrón folicular)	Lesiones foliculares (categoría 3)
4	NF/ SNF		Sospechosa de malignidad (Thy4)	Sospechosa de malignidad	Sospechosa (categoría 4)
5	Sospechosa de malignidad				
6	Maligna	Sugerente/ diagnóstica de CPT	Maligna (Thy5)	Maligna	Maligna (categoría 5)

*Adoptada por: SFE, NCCN.

AACE: American Association of Clinical Endocrinologists; AME: Associazione Medici Endocrinology; ATA: American Thyroid Association; ETA: European Thyroid Association; RCP: The Royal College of Pathologist; NCI: National Cancer Institute; NCCN: National Comprehensive Network; TBSRTC: The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology; SFE: Société Française d'Endocrinologie; SLAT: Sociedad Latinoamericana del Tiroides. AUS: Atipia de significado incierto; FLUS: lesión folicular de significado incierto; NF: Neoplasia folicular; SNF: sospechosa de neoplasia folicular; NCH: neoplasia de células de Hürthle CPT: cáncer papilar de tiroides.

• Indicaciones⁽⁵⁹⁾

- Cualquier nódulo tiroideo palpable, que usualmente mide más de 1 cm. Los nódulos no palpables y los incidentalomas se puncionarán en función de los factores de riesgo clínicos y radiológicos.

El uso del tamaño para determinar que nódulos hay que puncionar es controvertido. Por un lado, el riesgo de malignidad de estas lesiones es bajo (13%), y por otro, en caso de cáncer, la mayor parte serán de bajo riesgo. En cualquier caso, el tamaño por sí solo no discrimina correctamente la evolución clínica de los pacientes⁽⁶⁰⁾.

- En el bocio multinodular, dado que el riesgo de cáncer es similar al del nódulo solitario⁽¹⁹⁾, la lesión a puncionar se decidirá en función de los hallazgos en las pruebas de imagen y de los factores de riesgo del paciente⁽²⁸⁾, incluyendo el nódulo de mayor tamaño⁽³⁾.

- Cualquier adenopatía sospechosa⁽²⁷⁾.
- Drenaje de quistes en pacientes sintomáticos⁽¹⁾.
- Sospecha de tiroiditis de Riedel (diagnóstico diferencial con cáncer anaplásico tiroideo o CAT)⁽²⁾.

No requieren punción, salvo criterios clínicos o radiológicos:

- Los nódulos hiperfuncionantes⁽⁵⁹⁾.
- Los nódulos puramente quísticos y los espongiiformes⁽¹⁾
- Los nódulos hemorrágicos, que son casi siempre benignos (90%)⁽²⁾.
- Las tiroiditis agudas, subagudas y crónicas que se suelen diagnosticar bien clínicamente⁽²⁾.

• Resultados

La tasa de falsos negativos (FN) ronda el 2-3%, incluso realizando PAAF ecoguiada, siendo aún mayor esta tasa cuanto más grande es el nódulo. Así mismo, el 2-3% de las citologías malignas son finalmente benignas⁽⁶¹⁾.

En el bocio multinodular el valor predictivo de la PAAF es bajo (53% de cánceres no diagnosticados preoperatoriamente, y de ellos, el 45% tiene más de 1 cm)⁽²²⁾. Se ha asociado la presencia de cáncer en pacientes con bocio multinodular y citología benigna tanto al sexo masculino como a que el estudio citológico se haya realizado por patólogos no experimentados⁽⁶²⁾.

• TBSRTC: Categorías diagnósticas

En 2009 se implantó en nuestro centro el TBSRTC⁽⁵⁶⁾. Hasta entonces los informes citológicos eran poco sistematizados, descriptivos, utilizaban la nomenclatura histológica, no eran comparables, y rara vez indicaban manejo o riesgo de malignidad. En la Tabla 4 se resumen las categorías diagnósticas y las recomendaciones de actuación en función de los hallazgos citológicos.

• Estudios auxiliares

Hay técnicas adicionales que se pueden usar para confirmar diagnósticos, y mejorar la rentabilidad de la PAAF en caso de citología indeterminada^(1, 2, 29, 55):

- CMT: inmunohistoquímica (IHQ) para Tg, antígeno carcinoembrionario (CEA) y cromogranina.
- CAT: determinación de pan-citoqueratina.
- Tumor metastático en el tiroides: factor de transcripción tiroideo-1 (TTF-1); si éste es negativo realizar IHQ para tumores de riñón, pulmón, mama, colon o melanoma, ya que son los más frecuentes.

- Linfoma: marcadores de linfocitos B y T (bien por IHQ, bien por citometría de flujo).
- Diagnóstico diferencial con lesiones paratiroideas: IHQ para TTF-1, cromogranina y paratohormona (PTH) y, determinación de PTH en el aspirado de la PAAF.
- Adenopatías: expresión de TTF-1, Tg, y/o calcitonina; además se debe valorar la determinación de Tg en el aspirado de la PAAF^(2, 55).

Los estudios moleculares si bien no están formalmente indicados, se consideran que puede ser útiles en caso de citología indeterminada^(1, 29, 30, 55, 63). Este tema será tratado con más detalle en las secciones 1.4 y 1.6.

Tabla 4 Sistema Bethesda para informar la citología tiroidea (TBSRTC)

Categoría	Diagnóstico	Origen de las muestras	Riesgo de malignidad	Recomendación
1	No diagnóstica o Insatisfactoria	Líquido de quiste Muestra acelular Otros artefactos: sangre, coágulos..	1-4%	Repetir PAAF ecoguiada
2	Benigna	Nódulo folicular: adenomatoso, coloide... Tiroiditis linfocítica o granulomatosa Otros	0-3%	Seguimiento
3	AUS/FLUS	Muestras difíciles de encuadrar en el resto de las categorías	≈5-15%	Repetir PAAF
4	NF/ SNF	CFT, AF, CPT-VF Células de Hürthle u oncocíticas	15-30% 15-45%	Hemitiroidectomía
5	Sospechosa de malignidad	Sospecha de CPT, CMT, cáncer metastásico, linfoma u otros.	60-75%	Hemitiroidectomía o tiroidectomía (total o casi total)
6	Maligna	CPT, CPDT, CMT, CAT Otros: carcinoma escamoso, de características mixtas, metastásico, linfoma no Hodgking, etc.	97-99%	Tiroidectomía total o casi total

Fuente: Cibas y Alí 2009⁽⁶⁶⁾

AUS: Atipia de significado incierto; FLUS: lesión folicular de significado incierto; NF: Neoplasia folicular; SNF: sospechosa de neoplasia folicular; CFT: carcinoma folicular de tiroides; AF: adenoma folicular; CPT-VF: CPT-variante folicular; CPT: cáncer papilar de tiroides; CPDT: carcinoma pobremente diferenciado de tiroides; CAT: cáncer anaplásico de tiroides

1.1.2.4. Biopsia con aguja gruesa (BAG)

La ventaja de la BAG es que aporta una muestra histológica en la que además de las características celulares se puede analizar la arquitectura tisular, proporcionando un diagnóstico más preciso⁽⁶⁴⁾. También permite estudios moleculares⁽⁶⁵⁾. Es una técnica segura, con una tasa baja de complicaciones, que se suele realizar bajo anestesia local y guiados por ecografía, utilizando dispositivos automáticos con agujas de 16-18-gauge⁽⁶⁴⁾.

Su indicación principal es una PAAF no valorable^(27, 64, 66-68), puesto que hasta un tercio de éstas volverán a ser no diagnósticas, frente al 1,3-3,8% de resultados no valorables en las muestras obtenidas por BAG⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. Su S para detectar cáncer es del 70-96%⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ y su E es del 80-100%^(68, 69).

También es útil cuando la sospecha, clínica o radiológica, de cáncer es alta pero la citología es benigna. En estos casos la BAG puede evitar PAAFs repetitivas

o la realización de una cirugía diagnóstica⁽⁶⁶⁾, proporcionando el diagnóstico correcto en el 64% de los casos⁽⁶⁶⁾. Algunos autores, sin embargo, la usan como una técnica complementaria a la PAAF ya que su uso conjunto aumenta la sensibilidad diagnóstica^(69, 70).

1.1.2.5. *Gammagrafía*

Actualmente sólo se indica en casos en los que se detecte un nivel de TSH bajo o suprimido, para confirmar la naturaleza funcionante de la lesión tiroidea, tanto en caso de nódulos solitarios como en bocio multinodular o difuso^(1, 2, 28).

Otras indicaciones pueden ser el bocio intratorácico o ectópico, y la recidiva de la enfermedad benigna⁽³²⁾. En áreas de bocio endémico, se podría realizar para descartar nódulos autónomos aunque la TSH esté normal⁽²⁷⁾.

1.1.2.6. *Otras técnicas diagnósticas por imagen*

La tomografía axial computadorizada (TAC) y la imagen por resonancia magnética (MRI)⁽⁷¹⁾ tienen menos sensibilidad para la detección de nódulos tiroideos y tampoco ofrecen mejor evaluación en caso de cáncer, salvo quizá cuando el cuello es grueso, ya que con ambas se puede evaluar mejor la extensión extracapsular que con la ecografía. La MRI no es capaz de detectar microcalcificaciones y la TAC sólo detecta calcificaciones groseras⁽⁷²⁾. Una nueva técnica en MRI es la imagen de difusión (DW-MRI) y mediante ésta, se ha podido predecir la extensión extratiroidea en CPT con una S, una E, y una ABC de 0,85⁽⁷³⁾.

La máxima utilidad de la TAC en la evaluación inicial de un bocio nodular es el bocio retroesternal ya que es la técnica de imagen que mejor valora la tránquea, tanto en su diámetro como en el grado de compresión⁽⁷²⁾.

La tomografía por emisión de positrones (PET) asociada a imágenes de TAC con ¹⁸F-fluorodeoxiglucosa (¹⁸FDG-PET/TAC) no está actualmente indicada para la evaluación inicial del nódulo tiroideo por su baja especificidad⁽¹⁾. Los estudios en este tema tienen resultados controvertidos, y mientras algunos autores no aprecian ninguna ventaja a su uso^(74, 75), dos metaanálisis avalan su valor predictivo en la evaluación de lesiones con citología indeterminada^(76, 77). Una captación negativa, sobre todo en nódulos de más de 1,5 cm, será predictiva de benignidad, ya que los falsos negativos (FN) se producen en tumores más pequeños, mientras que una captación positiva, incrementa la posibilidad de malignidad del 25,8% al 38,7%⁽⁷⁶⁾, aportando una S de 89%⁽⁷⁸⁾. En nuestro propio estudio, la captación focal se ha correlacionado con mayor riesgo de cáncer (p=0,009) con una S del 92,3%, con una potencial reducción de tiroidectomías diagnósticas de entre el 13 y el 25%⁽⁷⁹⁾.

1.1.3. **El problema diagnóstico: Neoplasia folicular (NF)/ Sospechoso de neoplasia folicular (SNF)**

Dado que el objetivo de esta Tesis Doctoral es el diagnóstico diferencial entre nódulos benignos y malignos y la neoplasia folicular representa la mayoría de las dudas diagnósticas preoperatorias, paso a describirla en más profundidad.

En esta categoría se encuadran los nódulos tiroideos que pueden ser un cáncer folicular (CFT), aproximadamente el 15-30%⁽⁵⁶⁾. Por tanto las muestras proceden de lesiones benignas (AF, adenoma de células de Hürthle (ACH), nódulos adenomatoides, bocio multinodular), y malignas: CFT, carcinoma de células de Hürthle (CCH) y la variante folicular del CPT (CPT-VF)^(55, 56). Aproximadamente un 20% de los casos incluidos en esta categoría no serán verdaderas neoplasias sino

nódulos hiperplásicos, por lo que se incluyó el término de sospechoso de neoplasia folicular (SNF)^(55, 56).

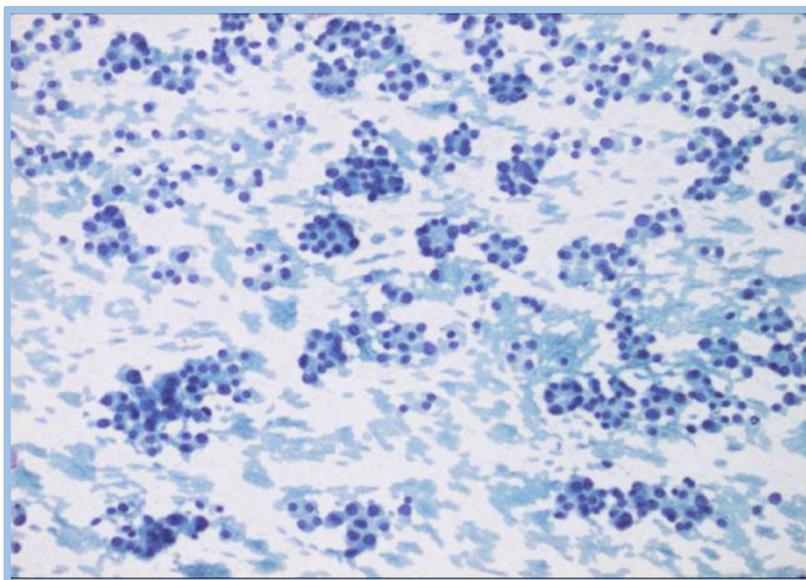
El ACH y el CCH se consideran variantes oncocíticas del AF y CFT, respectivamente. Alrededor del 16-25% de estas lesiones corresponderán a proliferaciones hiperplásicas (bocio nodular, tiroiditis linfocítica). El riesgo de malignidad es del 15-45%, sobre todo en nódulos de 3,5 cm o más^(55, 56).

Los frotis (Fig. 2) se caracterizan por una alta celularidad, casi sin coloide y con la citoarquitectura alterada, agrupándose en microfóliculos (pequeños anillos con 6-12 células foliculares⁽⁸⁰⁾ o trabéculas; las células son más grandes de lo normal. Las atipias nucleares, el pleomorfismo y las mitosis son raras. Puede haber macrofóliculos pero en escasa cantidad. Si lo que predominan son células oncocíticas, tendremos una neoplasia de células de Hürthle⁽⁵⁶⁾.

La recomendación de tratamiento en esta categoría es la lobectomía/hemitiroidectomía^(55, 56).

Las características citomorfológicas van a permitir distinguir el CFT de un nódulo de origen folicular benigno (hiperplásico) pero no de un AF^(55, 56). Para distinguir las lesiones benignas de las malignas es necesaria la evidencia histológica de invasión vascular o capsular. En este contexto, podríamos considerar a la PAAF más como un método de cribaje que como un método diagnóstico⁽⁸⁰⁾.

Fig. 2 Citología. Neoplasia folicular: Formaciones foliculares ocupadas por coloide. (Papanicolau 20x)



La biopsia intraoperatoria tampoco es muy útil para diagnosticar CFT o CCH y evita un porcentaje escaso de reintervenciones de totalización⁽⁸⁰⁾. De hecho las cifras de S y E son similares a la de la PAAF^(49, 52, 81). En nuestra propia revisión, la biopsia intraoperatoria modificó el tratamiento del 20% de nuestros pacientes con proliferación folicular (todavía no habíamos adoptado el TBSRTC) tanto a costa de falsos positivos (FP) como negativos, aportando una S del 75% y una E del 50%⁽⁵⁴⁾.

La búsqueda de factores de riesgo clínicos asociados a CFT que aumenten la S de la PAAF ha dado resultados discordantes. Diversos autores han relacionado diferentes características, como el sexo, la edad o el tamaño, con mayor riesgo de cáncer, o no han conseguido encontrar asociación ninguna:

- Baloch *et al.* 2002⁽⁸²⁾: varones, mayores 40 años y diámetro nodular de más de 3 cm.
- Williams *et al.* 2009⁽⁸³⁾: diámetro mayor de 4 cm.
- Iskandar *et al.*⁽⁸⁴⁾: ninguna característica clínica o radiológica salvo edad menor a 30 años.
- Mihai *et al.* 2009⁽⁸⁵⁾: sexo masculino, edad inferior a 30 o mayor a 60 años.
- Gheri *et al.* 2011⁽⁸⁶⁾: pacientes de edad más joven ($46 \pm 14,1$ frente a (vs.) $50 \pm 13,8$; $p < 0,05$).
- Dutta *et al.* 2011⁽⁸⁷⁾: Ninguna característica clínica o radiológica; sólo la ausencia de células foliculares normales en el frotis.
- En el caso de los tumores de células de Hürthle Sippel *et al.*⁽⁸⁸⁾ han encontrado una clara asociación con el diámetro nodular: el 55% de los cánceres de su serie medían más de 4 cm, ninguno midió menos de 2 cm y todos midieron más de 6 cm. En algún caso se ha relacionado el CCH con el sexo femenino⁽⁸⁵⁾.
- En pacientes con bocio multinodular y citología indeterminada, los nódulos pequeños y el tratamiento con T4 (a pesar de que los niveles de TSH son similares entre los que toman T4 y los que no) se asocian con un riesgo aumentado de padecer cáncer⁽⁸⁹⁾.

En cuanto a las características ecográficas, tampoco son exclusivas del CFT. Sillery *et al.* han estudiado las características radiológicas de 50 CF y han asociado con malignidad el mayor tamaño, la ausencia de halo, la hipoecogenicidad, la estructura sólida junto con el sexo masculino y la mayor edad⁽⁹⁰⁾. Para Seo *et al.*, algunos factores de riesgo coinciden: iso/hipoecogenicidad, estructura sólida o predominantemente sólida, pero también relacionan el CF con microcalcificaciones o con la calcificación periférica (*egg-shell* o cáscara de huevo)⁽⁹¹⁾.

Finalmente la captación focal en ¹⁸FDG-PET/TAC incrementa la posibilidad de malignidad del 25,8% al 38,7% aunque también hay captaciones focales, en patología benigna⁽⁷⁶⁾. En nuestro estudio, los FP fueron sobre todo en pacientes con abundancia de células oncocíticas⁽⁷⁹⁾.

Puesto que ningún dato clínico o radiológico aporta, de forma concluyente, una mejor capacidad discriminativa que la PAAF en los pacientes con resultado citológico de neoplasia folicular, uno de los retos en la investigación del cáncer tiroideo es encontrar un marcador con esta utilidad⁽⁹²⁾. La tasa de citologías indeterminadas (Bethesda 3, 4, 5), globalmente no debería ser mayor del 30%, con un riesgo de malignidad del 5% al 75% (Tabla 4), según la categoría⁽⁵⁶⁾. Sin embargo, estas cifras no son uniformes ni en la categoría diagnóstica, ni en el riesgo de malignidad, oscilando este último entre el 0-48% (Bethesda 3) y el 14-49% (Bethesda 4) según las series. Estas diferencias se atribuyen a la variabilidad inter e intraobservador de la propia técnica⁽⁹³⁾. El descubrimiento de mutaciones y moléculas con valor diagnóstico ha determinado que en las guías clínicas se aconseje utilizar marcadores moleculares para aumentar el rendimiento de la PAAF, como ya se ha comentado.

Los marcadores moleculares y genéticos asociados al cáncer tiroideo es, sin duda, un capítulo muy amplio y complejo que excede los objetivos de esta Tesis Doctoral. El campo de investigación es muy vasto y se han realizado, y se siguen haciendo, múltiples estudios encaminados a diferenciar los nódulos malignos de los benignos, e incluso tratando de dar un pronóstico sobre la agresividad tumoral. De hecho la técnica ha avanzado lo suficiente para realizar estudios genéticos utilizando el material obtenido en la PAAF⁽⁹⁴⁻¹⁰²⁾.

1.2. CÁNCER DE TIROIDES

1.2.1. Epidemiología

El cáncer de tiroides, si bien es un tumor poco común, es el más frecuente del sistema endocrino. Según los datos de la base [GLOBOCAN](#) representa el 2,1% de todos los tumores malignos diagnosticados en 2012 (298.000 casos nuevos)⁽¹⁰³⁾, siendo más frecuente en mujeres con una ratio 3:1. En EEUU se estima que en 2015 habrá 62.450 casos nuevos (3,8% de los cánceres⁽¹⁰⁴⁾).

Desde los años 90, es el cáncer que más rápidamente ha amentado su incidencia en ambos sexos, con un ritmo de crecimiento anual del 4,4%⁽¹⁰⁴⁾. Este hecho se ha atribuido a un incremento en el diagnóstico de CPT de pequeño tamaño (menores a 2 cm) más que a un crecimiento real⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾. No obstante, el aumento en la incidencia, aunque en menor grado, se ha observado en tumores de todos los tamaños⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾.

Este crecimiento no ha ido aparejado a un aumento en la mortalidad, sino todo lo contrario⁽¹⁰⁸⁾, contabilizando el 0,5% de las muertes por cáncer, con unas tasas menores del 1 por 100.000 en varones y 2 por 100.000 en mujeres⁽¹⁰³⁾.

La supervivencia global a los 5 años es del 98% (100% en enfermedad localizada, 98% con extensión locorregional y, 55% si metástasis a distancia) mientras que la supervivencia relativa a los 10 años es del 97%. La Tabla 5 muestra los cambios en incidencia y mortalidad según los datos del periodo 1992-2012 obtenidos de la base *Surveillance Epidemiology and End Results* ([SEER](#))⁽¹⁰⁹⁾. En análisis del periodo 2008-2012 en esta misma base refleja una supervivencia excelente (99,8-97,8%) en menores de 45 años, pero ésta disminuye con la edad, hasta el 71,8 y el 81,4% en mayores de 75 años, con una edad media de los fallecidos de 73 años⁽¹⁰⁹⁾.

Tabla 5 Cambio en la incidencia y mortalidad por cáncer de tiroides (SEER)

	1992	1997	2003	2009	2012
Mortalidad	0.5	0,5	0.4	0,5	0,5
	1992	1997	2003	2009	2012
Incidencia	5,8	6,7	9,2	13,8	14,2

SEER 13: casos nuevos y muertes por 100.000 personas (todas las razas, ambos sexos) ajustados a edad

En España, según los datos de [GLOBOCAN](#)⁽¹¹⁰⁾, se estiman 2.059 casos nuevos de cáncer tiroideo en 2015 (2 veces más en mujeres) que corresponde al 1% del total de cánceres, y 286 fallecidos por la enfermedad (0,3%). La prevalencia en 5 años se calcula en el 1,4%.

La base [EUROCARE 5](#) (*European Cancer Registry based study on Survival and Care of cancer patients*) cifra la supervivencia a los 5 años observada en España (período 2000-2007) en el 98,1%, ligeramente superior en mujeres (98,7% vs. 95,9%)⁽¹¹¹⁾.

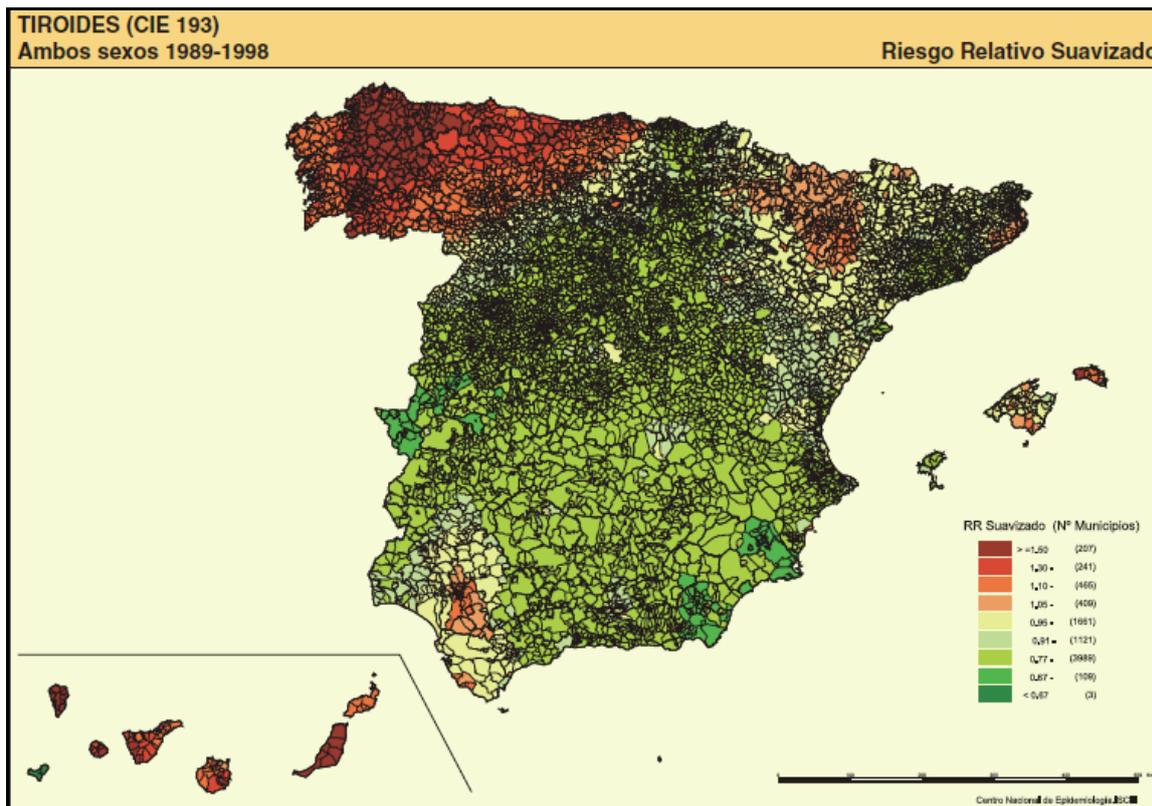
Como en el resto del mundo, en nuestro país, la incidencia de cáncer tiroideo se ha incrementado. Las cifras publicadas en el año 2000 ya duplicaban la comunicada en 1985 respecto a mujeres, y triplicaban la de los varones. El cambio

también se ha notado en la mortalidad, aumentando una media del 1,21% anual pero disminuyendo en mujeres el 0,39%⁽¹¹²⁾.

La provincia con mayor incidencia es Navarra y las zona con más mortalidad son el área noroccidental del país, y las Islas Canarias, coincidiendo con áreas tradicionales de bocio endémico⁽¹¹³⁾(Fig. 3).

Fig. 3 Mapa de mortalidad por cáncer de tiroides en España

(Fuente: López Abente *et al.* 2006: Atlas municipal de mortalidad por cáncer en España, 1989-1998.

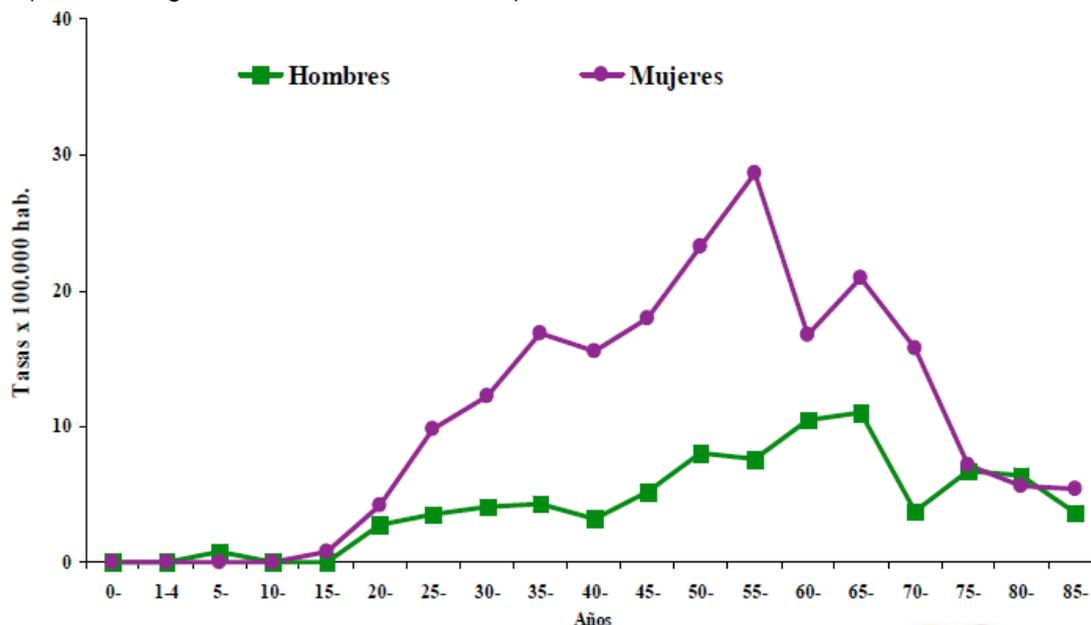


En los datos del Registro de Cáncer de Granada también se aprecia el aumento de tumores tiroideos, que pasa de 261 casos entre 1998-2002⁽¹¹⁴⁾ a 369 durante entre 2008-2012*. La incidencia* es del 11,8 y del 4,2 x 100.000 habitantes, respectivamente, diagnosticándose 19 casos nuevos al año en hombres frente a los 55 en mujeres, con un pico de edad entre los 45 y los 64 años. La variante más frecuente fue el cáncer papilar, tanto en hombres como en mujeres. La Fig. 4 muestra las tasas específicas por edad y sexo.

* Fuente: María José Sánchez Pérez. Directora del Registro de Cáncer de Granada. Escuela Andaluza de Salud Pública. Consejería de Salud. Junta de Andalucía.

La tasa cruda de mortalidad⁺ en la provincia de Granada durante 2013 fue de 0,87 por 100.000 hombres y 0,22 por 100.000 mujeres.

Fig. 4 Incidencia de cáncer de tiroides en la provincia de Granada por sexo y edad
(Fuente: Registro de Cáncer de Granada)



1.2.2. Factores de riesgo

Históricamente se ha relacionado con más riesgo de que un nódulo pueda ser maligno el vivir en zonas de bocio endémico, los antecedentes familiares de bocio, el crecimiento rápido, los síntomas compresivos, la edad o la consistencia del nódulo⁽¹¹⁵⁾. Otros factores de riesgo se resumen en la Tabla 6.

- Edad y Sexo

El cáncer de tiroides es más frecuente en mujeres^(107, 112, 116), Sin embargo los varones tienen casi el doble de riesgo de tener un cáncer cuando se les diagnostica de nódulo tiroideo^(22, 117, 118).

Los pacientes más jóvenes tienen más riesgo de malignidad cuando se les diagnostica un nódulo tiroideo⁽²²⁾. Clásicamente se ha asociado a una edad menor a 30 años y pero también por encima de los 60.

⁺ Fuente: Instituto de Salud Carlos III. Servidor interactivo de información epidemiológica Ariadna: <http://ariadna.cne.isciii.es/MapaP/>.

Tabla 6 Factores de riesgo del nódulo tiroideo para cáncer de tiroides

Edad	
Sexo	
Antecedentes familiares de bocio o cáncer tiroideo	MEN tipo 2 CMT Enfermedad de Cowden, Poliposis colónica familiar Complejo de Carney, Síndrome de McCune-Albright Carcinoma papilar familiar Acromegalia
Exposición a radiación	
Crecimiento rápido	
Síntomas locales	Disfonía Disfagia Disnea
Parálisis de cuerdas vocales	
Consistencia firme	
Fijación a tejidos circundantes	
Adenopatías/ Metástasis a distancia	

• Radiación

Es el factor de riesgo mejor estudiado como causa de cáncer tiroideo independientemente del origen de la radiación (terapéutica o accidental)⁽¹⁾ e influye sobre todo en la infancia puesto que la glándula tiroidea en la edad pediátrica es uno de los órganos más radiosensibles del organismo⁽¹¹⁹⁾.

El cáncer que con más frecuencia se asocia a la radiación ionizante es el CPT^(112, 120), con la particularidad de que su efecto sobre el riesgo se mantiene a lo largo de la vida⁽¹²¹⁻¹²³⁾.

• Yodo y bocio endémico

En áreas con déficit crónico de yodo y, por tanto, con alta incidencia de bocio, la incidencia de CFT es más alta, mientras que en áreas con exceso de yodo, hay más riesgo de CPT^(112, 116, 120).

• Antecedentes personales y familiares de patología tiroidea

Existe asociación entre enfermedad nodular tiroidea y el cáncer (OR > 5) aunque se desconoce si esta relación es causal o contextual⁽¹¹²⁾. Se ha descrito una fuerte asociación entre tiroiditis y linfoma tiroideo, y también parece haber más prevalencia de CPT⁽²³⁾. La infiltración linfocítica que se observa con frecuencia en el cáncer papilar sugiere que hay factores inmunológicos que influyen en la progresión tumoral⁽¹²⁴⁾.

Las enfermedades hereditarias asociadas a cáncer de tiroides se pueden ver en la Tabla 6⁽²⁾.

• TSH

La TSH es la principal responsable de la regulación del crecimiento y la funcionalidad de la glándula tiroidea⁽¹²⁵⁾. Niveles altos incrementan la proliferación celular y, eventualmente, el riesgo de mutaciones que conduzcan a la transformación cancerígena⁽¹⁰⁷⁾. Aunque es poco probable que la TSH por sí sola

sea capaz de causar cáncer, es más que posible que la estimulación crónica provocada por ella tenga un papel importante en la carcinogénesis.

Los datos al respecto son controvertidos. En algunos estudios se demuestra que un nivel elevado de TSH al diagnóstico es un predictor independiente de la presencia de cáncer^(118, 126, 127). Por otro lado, en el estudio EPIC, el riesgo de cáncer es inversamente proporcional a los niveles de TSH⁽¹²⁸⁾. Los pacientes con cáncer tiroideo y TSH baja portan polimorfismos de ADN (ácido desoxirribonucleico)⁽¹²⁹⁾ y este hecho conferiría al epitelio tiroideo una peor capacidad de diferenciación y una predisposición mayor a la transformación maligna.

- Otros factores de riesgo

Se han estudiado otros factores como causantes del incremento de la incidencia del cáncer tiroideo^(107, 116) como son los genéticos, los medioambientales (presencia de bifenoles policlorinados, dioxinas, o contaminantes de origen volcánico^(130, 131)), la resistencia a la insulina, la obesidad y una dieta alta en calorías y en grasas poliinsaturadas⁽¹³²⁾.

1.2.3. Tipos histológicos

Las lesiones cancerosas se desarrollan, mayoritariamente, a partir de las dos estirpes celulares que coexisten en la glándula tiroidea: las células del epitelio folicular y las células C parafoliculares, productoras de calcitonina. Los tumores de otros orígenes (Anexo I) tienen una incidencia muy baja.

Los cánceres derivados de las células foliculares incluyen: CPT, CFT, CCH, y CAT⁽¹³³⁾. A caballo entre los diferenciados y el CAT está el cáncer pobremente diferenciado (CPDT)^(134, 135), mientras que el CMT deriva de las células C. Cada uno de ellos tiene un comportamiento biológico y clínico diferente⁽¹³³⁾.

Alrededor del 80% de los casos de cáncer de tiroides corresponde al CPT y el 20% restante se distribuye entre los demás tipos histológicos⁽¹³⁶⁾. El segundo en frecuencia es el CFT.

En el Anexo I, se puede consultar la clasificación histológica de la OMS, publicada en 2004⁽¹²⁰⁾. Se resumen a continuación los tipos de cáncer más importantes por su implicación clínica.

1.2.3.1. Cáncer papilar

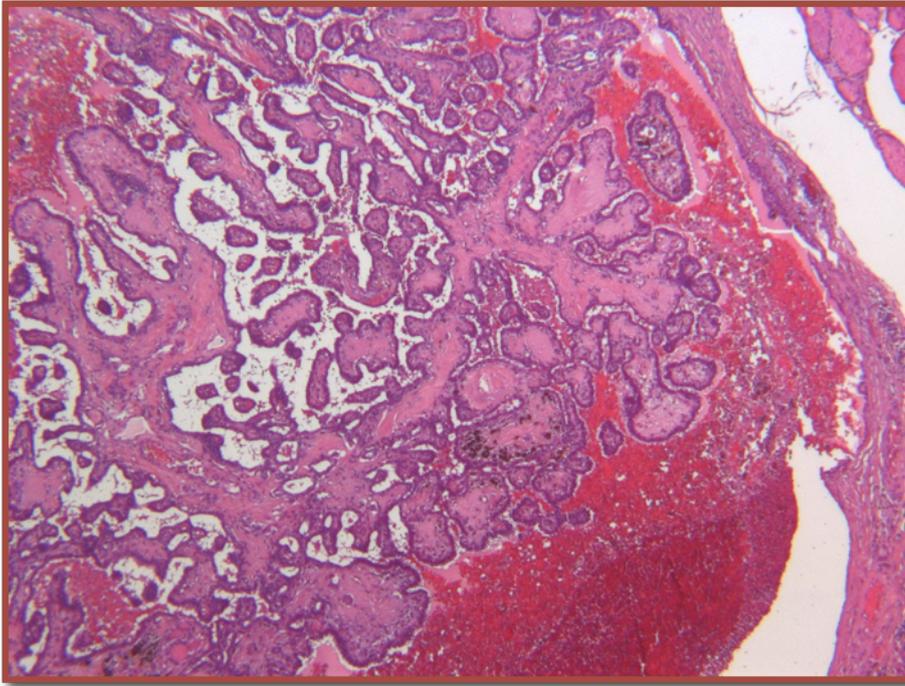
Se define como un tumor epitelial maligno que muestra diferenciación folicular y un patrón nuclear característico. Aunque son raros antes de los 15 años, son los cánceres tiroideos más frecuentes en la infancia. La mayoría se diagnostica entre los 20 y 50 años y predomina en mujeres (4:1). Su incidencia, como ya se ha comentado, está aumentando progresivamente^(105-108, 136). La supervivencia es excelente con una mortalidad global del 5%, y prácticamente del 0% en pacientes de bajo riesgo según la escala MACIS⁽¹³⁷⁾.

Desde el punto de vista patogénico es la variedad histológica más relacionada con las radiaciones ionizantes. En su evolución tiende a extenderse por los vasos linfáticos, dando lugar a una alta tasa de metástasis ganglionares regionales. Otra de sus características es la multifocalidad.

Desde el punto de vista histológico, lo que define al CPT son las alteraciones nucleares: agrandamiento, aspecto oval, alargamiento y superposición. Son frecuentes los surcos y las pseudoinclusiones. La citoarquitectura es papilar (Fig. 5).

Los cuerpos de Psamoma, patognomónicos, corresponden a láminas calcificadas concéntricas, con aspecto redondeado.

Fig. 5 Neoplasia papilar: Papilas con eje conectivo-vascular revestidas por epitelio neoplásico. (H-E 20x)



La variante más importante por su implicación clínica, es la folicular (CPT-VF) ya que simula un CFT encapsulado. Las variantes con peor pronóstico son la esclerosante difusa (diseminación ganglionar y metástasis pulmonares al diagnóstico), la de células altas, la variante columnar y la variante sólida. Esta última es la más frecuente en niños, sobre todo en los expuestos a radiación, y alrededor de 1/3 de los pacientes tienen invasión vascular y extensión extratiroidea al diagnóstico.

1.2.3.2. Cáncer folicular

Se define como un tumor epitelial maligno cuyas células muestran diferenciación folicular pero sin las alteraciones nucleares del CPT. Supone alrededor del 14,5-17% de los cánceres tiroideos con una supervivencia global a 10 años del 85%⁽¹³⁶⁾. Es más frecuente en mujeres y durante la quinta década de la vida, siendo casi inexistente en la infancia. Al contrario que el CPT, este tumor está disminuyendo en su incidencia, probablemente en relación a la suplementación de la dieta con yodo.

Raramente son multifocales y en su evolución tienden a dar metástasis a distancia (pulmón y hueso), más que en ganglios regionales.

Histológicamente son tumores con morfología muy variable (desde folículos bien formados con coloide hasta crecimiento sólido o trabecular) y ni las características celulares ni la citoarquitectura son exclusivos de las lesiones malignas. La única diferencia entre ambas es la capacidad invasiva (capsular y/o vascular).

Como la agresividad del tumor aumenta con la extensión de la invasión vascular, los tumores foliculares pueden clasificarse en:

- mínimamente invasivos (CFTmi) en los que sólo hay invasión capsular
- angionvasivos, cuando invaden los vasos capsulares o pericapsulares
- altamente invasivos (CFTai) cuando invaden tejidos y/o vasos peritiroideos.

El CFT se asocia a enfermedades hereditarias como el síndrome de Cowden, el síndrome de Weber y el complejo de Carney.

1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico es el mismo que se ha descrito para el nódulo tiroideo (capítulo 1.1.2.), aunque pueden ser necesarias otras pruebas para hacer una correcta evaluación del paciente con respecto a la extensión retroesternal, invasión a tejidos adyacentes y la presencia de metástasis a distancia. Estas pruebas, sin embargo, no se recomiendan de forma rutinaria en la evaluación inicial del paciente con cáncer de tiroides^(1, 30).

En función de las características clínicas se puede valorar la realización de TAC, MRI, ¹⁸FDG-PET/TAC, laringoscopia, endoscopia digestiva o fibrobroncoscopia.

1.2.5. Factores pronósticos de la evolución del cáncer tiroideo

Clásicamente se consideran datos de peor pronóstico la edad más avanzada, la presencia de tumor poco diferenciado, el mayor tamaño, la presencia de enfermedad residual o de metástasis^(138, 139).

La edad al diagnóstico es un factor de riesgo constantemente analizado y de hecho, figura en la mayoría de los sistemas de estadificación (Anexo II). Aunque tradicionalmente se ha estimado los 40-45 años como la edad de corte en la que el pronóstico empeora, en algún estudio⁽¹⁴⁰⁾ se estima que ésta debe ser más alta (57 años). En cualquier caso la el riesgo de mortalidad aumenta con la edad, de forma no lineal, y drásticamente a partir de los 45 años⁽¹⁴¹⁾. Actualmente sigue siendo el factor pronóstico más importante de mortalidad específica^(140, 141), incluso en tumores pequeños (≤ 2 cm o T1)⁽¹⁴²⁾.

Tran Cao *et al.*⁽¹⁴³⁾, por otro lado, consideran que se ha dado demasiada importancia al efecto protector de la edad en los pacientes menores de 45 años con metástasis tanto regionales como a distancia. Basan su afirmación, analizado datos del registro SEER, en que cuando comparan pacientes con E I y E II, los primeros tienen un riesgo de mortalidad 11 veces menor que los segundos, diferencia que no existe entre los pacientes ≥ 45 años al realizar la misma comparación.

Recientemente se han revisado los factores de riesgo de mortalidad tradicionalmente considerados en CPT y CFT⁽¹⁴⁴⁾. Las conclusiones se resumen a continuación:

- Como ya se ha expuesto, la edad de 45 años como punto de corte está siendo cuestionada. Hay datos indicando que el corte puede ser a una edad mayor o bien, que la edad es un riesgo continuo, aumentando progresivamente con los años.
- El valor del sexo es controvertido, habiendo estudios para todos los gustos.

- En cuanto a la afectación ganglionar, si bien es un claro factor de riesgo para la recidiva, su efecto en la mortalidad está por demostrar, así como el valor del vaciamiento central profiláctico.

- El papel de otros factores como la TSH o los marcadores moleculares, (BRAF, RAS, RET/PTC, PAX8-PPAR γ) como factores pronósticos está siendo objeto de investigación. Tanto niveles elevados de TSH como la presencia de las mutaciones mencionadas, parecen relacionarse con la evolución del cáncer tiroideo y podrían determinar la extensión de la cirugía y/o la necesidad de tratamiento ablativo.

1.2.6. Estadificación y grupos de riesgo

Durante las últimas décadas, se han propuesto distintos sistemas de estadificación para el CDT (Anexo II; Tabla 7). Éstos se basan en los factores de riesgo identificados con valor pronóstico.

El más antiguo es el realizado por la *European Organization for Research on Treatment of Cancer* (EORTC)⁽¹⁴⁵⁾ pero posteriormente se han desarrollado otros: AMES⁽¹⁴⁶⁾, Clinical Class⁽¹⁴⁷⁾, AGES⁽¹⁴⁸⁾, MACIS⁽¹³⁷⁾, SAG⁽¹⁴⁹⁾, Ohio⁽¹⁵⁰⁾, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center⁽¹⁵¹⁾, Noguchi⁽¹⁵²⁾, National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Group (NTCTCSG)⁽¹³⁹⁾ y, finalmente, la clasificación TNM (tamaño y extensión, ganglios y metástasis) de la *American Joint Committee on Cancer/ Union for International Cancer Control* (AJCC/UICC)⁽¹⁵³⁾ cuya última edición (7ª) fue publicada en 2010.

La mayoría de los esquemas, identifican bien al 70-85% de los pacientes con bajo riesgo de mortalidad pero ninguno de ellos consigue predecir a corto plazo el riesgo de mortalidad o la posibilidad de mantenerse libre de enfermedad^(1, 138).

Dentro de esas mínimas diferencias, parece que los 5 mejores son AJCC/UICC (TNM), AGES, EORTC, MACIS y AMES⁽¹³⁸⁾.

La actual clasificación TNM, que divide a los tumores T1 en dos subgrupos (T1a: ≤ 1 cm y T1b: > 1 y ≤ 2 cm), se hace eco de críticas a versiones previas que incluían a todos los carcinomas menores de 2 cm en uno solo. Dado que el tamaño influye en la presencia de extensión extracapsular y metástasis ganglionares⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾, y, por tanto en la supervivencia libre de enfermedad, parece importante diferenciar ambos grupos. En cualquier caso, esta diferencia, no queda reflejada en el estadiaje final.

La *American Thyroid Association* (ATA), por su parte, ha propuesto un sistema de estadificación para determinar el riesgo de recidiva (Anexo II), que incluye no solo el tratamiento quirúrgico inicial, sino también el resultado de la ablación⁽¹⁾.

Se recomienda usar la clasificación TNM en todos los pacientes con cáncer tiroideo^(1, 30), por su capacidad para predecir la mortalidad y por su gran disponibilidad, lo que permite la comparación entre distintas series⁽¹³⁸⁾. También se recomienda utilizar la estadificación del riesgo de recidiva de la ATA⁽³⁰⁾.

Tabla 7 Comparación de diferentes factores de riesgo usados en sistemas de estadiaje
(Reproducida y modificada con permiso de John Wiley and Sons, Inc: Brierley *et al.* *Cancer*, 79: 2414–2423A, ©1997)

Clasificación	EORTC	UICC/ AJCC		AMES	MACIS	Clinical			Noguchi	MSK
		AGES				Class	Ohio	SAG		
Histología	Todos	Todos	Papilar	CDT	Papilar	CDT	CDT	Papilar	Papilar	CDT
Grado	No	No	Si	No	No	No	No	Si	No	No
Edad (años)	Cont	<45	Cont	<41 hombre <51 mujer	Cont	<45	No	<70	Variable	<45
Género Mejor pronóstico	Si (Mujer)	No	No	Si (Mujer)	No	No	No	Si (Mujer)	Si (Hombre)	No
Tamaño (cm)	No	≤1 1-4 >4	Cont	<5 ≥5	Cont	≤1 1-4 >4	≤1.5 1.5-4.4 ≥4.5	No	<3 cm	≤1 1-4 >4
Extensión extratiroidea	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si
Enfermedad residual	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	No
Ganglios	No	Si	No	No	No	Si	Si	No	Si	No
Multifocal	No	No	No	No	No	No	Si	No	No	No
Metástasis	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si
Validación	Si	nc	Si	nc	Si	nc	nc	nc	nc	nc

Cont: continuo; CDT: diferenciado; nc: desconocida.

EORTC: *European Organization for Research and Treatment of Cancer*; UICC: *International Union Against Cancer*; AJCC: *American Joint Committee on Cancer*; AGES: *Age, Grade, Extrathyroid extent and Size*; AMES: *Age, Metastases, Extrathyroid extension, and Size*; MACIS: *Metastases, Age, Completeness of resection, Invasion, and Size*; SAG: *Sex, Age, and Grade*; MSK: *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*.

1.2.7. Tratamiento y seguimiento

El tratamiento del cáncer tiroideo requiere un equipo multidisciplinar y coordinado⁽¹⁵⁷⁾. Los objetivos son la extirpación completa de toda la masa tumoral con la mínima morbilidad, proporcionar las muestras necesarias para un correcto estadiaje, facilitar el tratamiento ablativo con yodo radioactivo (¹³¹I), permitir el seguimiento a largo plazo y minimizar el riesgo de recidiva⁽¹⁾.

Según las guías clínicas, el tratamiento del cáncer diferenciado tiroideo se basa en 3 acciones: cirugía (tiroidectomía total o casi total, con linfadenectomía dirigida al compartimento afectado, diagnosticado preoperatoriamente), tratamiento ablativo y supresión de TSH con T4^(1, 28-30, 158-161).

El seguimiento se realiza mediante exploración física, ecografía cervical, determinación de tiroglobulina y rastreo corporal total con radioyodo (RCT).

La Tg es un marcador tumoral específico y sensible para el seguimiento de los cánceres diferenciados (CDT) pero para su interpretación correcta, se debe medir la TSH y también los niveles de anticuerpos antiTg (AcTg). La desaparición de éstos es sugerente de remisión.

Durante el seguimiento, el 10-15% de los pacientes presentarán Tg elevada con RCT negativo. Este hecho se puede explicar bien por un mecanismo de desdiferenciación celular, por el cual se pierde la capacidad de transportar yoduros

pero se mantiene la de secreción, o bien porque el volumen tumoral es insuficiente para ser detectado por el RCT. En estos casos, la ^{18}F FDG-PET es de utilidad, con una sensibilidad y especificidad elevadas para detectar recidiva locorregional y metástasis a distancia⁽¹⁶²⁾. La sensibilidad de esta exploración mejora cuando la Tg es muy alta o tras estímulo con TSH.

1.3. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER TIROIDEO DE ORIGEN FOLICULAR

Las variaciones en el tamaño de la glándula tiroidea son el resultado bien de una mayor demanda por parte del organismo, mediada por la TSH o bien, por una alteración del equilibrio entre los factores de crecimiento que actúan a nivel local y la expresión de sus receptores, la mayoría de los cuales están relacionados con protooncogenes^(163, 164). Éstos son genes que codifican las proteínas estimuladoras de la proliferación celular normal: factores de crecimiento, receptores de dichos factores y proteínas nucleares. Los oncogenes, por su parte, pueden ser dominantes o recesivos y pueden inducir la oncogénesis o fracasar en su supresión. Los genes supresores controlan el crecimiento celular de forma recesiva y cuando pierden su capacidad funcional, se produce un crecimiento incontrolado⁽¹⁶⁵⁾.

Los cambios genéticos celulares, provocados por la radiación o por toxinas, pueden ser alteraciones puntuales en los pares de bases (mutaciones) que inducen mediante diversos mecanismos [inserciones, deleciones, reordenamientos, o translocaciones (amplificación de ciertos genes)] la modificación estructural en la proteína codificada. Ésto altera el proceso regulador normal y convierte a los protooncogenes en oncogenes, siendo el resultado final un crecimiento celular incontrolado y la formación de tumores malignos o benignos⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾.

Las mutaciones somáticas afectan a una única célula en cualquier momento tras la fertilización, y una vez transformada, da lugar a un tumor monoclonal mientras que las mutaciones germinales, se originan en un progenitor y pasan al descendiente a través de la célula germinal⁽¹⁶⁶⁾.

Desde el punto de vista molecular la función de la glándula tiroidea se regula en varios niveles:

- El primer nivel es la TSH que actúa directa e indirectamente sobre la glándula tiroidea y se considera el mayor estimulador de la función de la misma^(163, 164, 169).

- El segundo nivel lo constituyen sustancias estimuladoras del crecimiento que actúan localmente: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor transformador de crecimiento- α (TGF- α), factores de crecimiento insulínicos (IGFs), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento hepatocítico (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor inhibidor de TGF- α ^(163, 164). También influyen en la regulación del crecimiento tiroideo los factores que controlan la adhesión celular y la integridad del parénquima⁽¹⁶³⁾.

- El último nivel de control son los mecanismos de apoptosis que regulan la muerte celular⁽¹⁶³⁾.

Así pues, la proliferación celular depende tanto de los protooncogenes que estimulan el crecimiento como de los genes inhibidores del mismo (tanto por inhibición directa como por estimulación de la diferenciación celular y/o apoptosis)^(166, 167), siendo un factor clave en la transducción de señales la fosforilación de proteínas⁽¹⁶⁷⁾.

Las vías de señalización implicadas en la carcinogénesis tiroidea (Fig. 6) son^(170, 171):

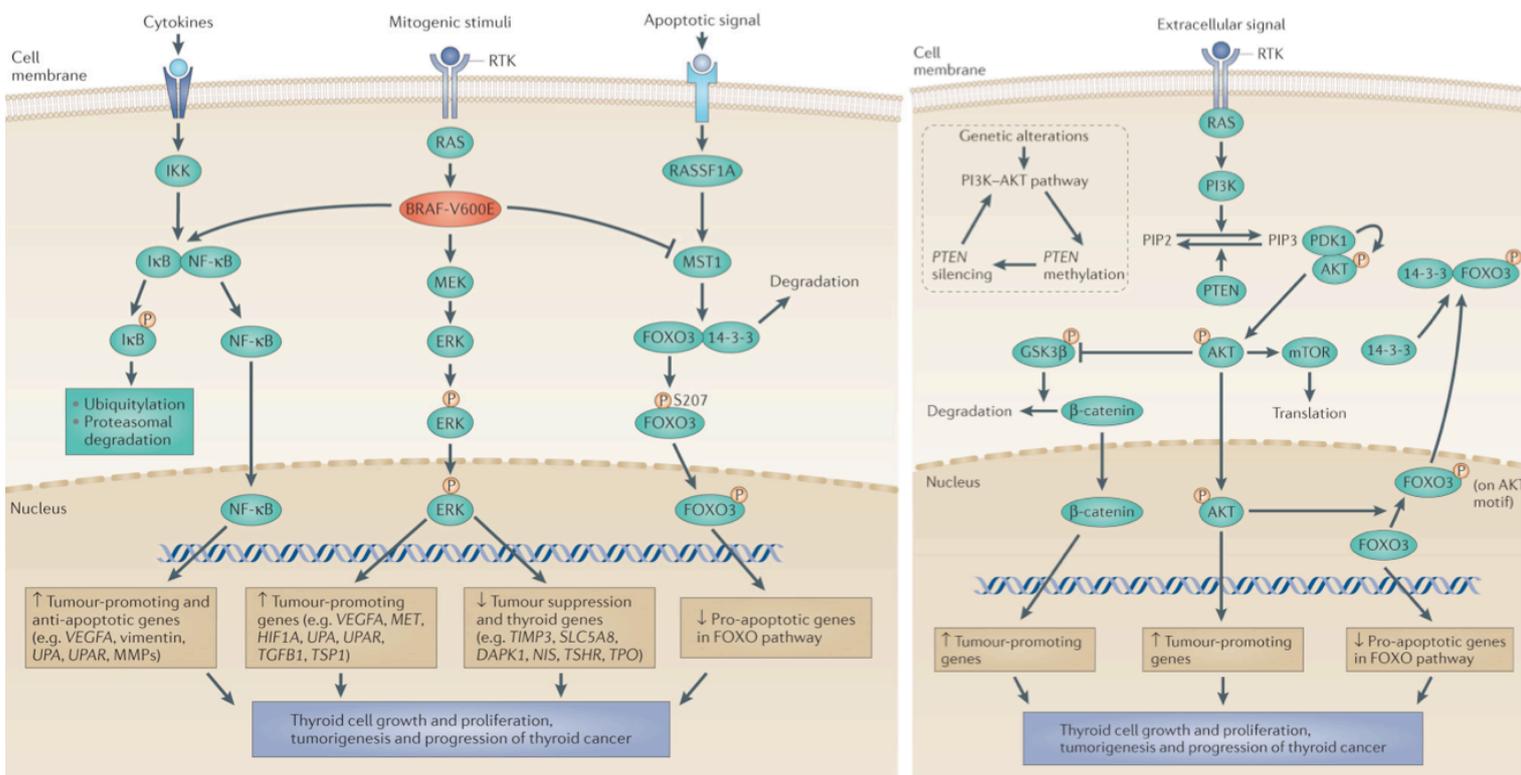
- Vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)⁽¹⁷²⁾: interviene en la regulación de la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular. Una vez activada, emite señales a través de la membrana celular, activando a su

vez y de forma secuencial, a factores de transcripción nuclear. RAS (unida a guanosina trifosfato o GTP) es el transductor inicial que activa a RAF (MAP-quinasa-quinasa). Ésta, mediante fosforilación, activa a MEK (MAP-quinasa-quinasa) y ésta, finalmente, a ERK (MAP-quinasa). Mientras que RAF y MEK son citoplasmáticas, ERK es capaz de translocarse al núcleo, donde puede fosforilar a un gran número de factores de transcripción nucleares (c-jun o c-myc). Numerosos miembros de esta vía de señalización se han identificado como protooncogenes.

• Vía fosfatidilinositol (PI) 3-quinasa/ proteína quinasa B (PI3K/AKT)^(170, 171): su activación conduce a la proliferación y a la inhibición de la apoptosis. Señales extracelulares estimulan a receptores tirosina quinasa (RTK), éstos a RAS y éste a PI3K que cataliza la transformación del fosfatidilinositol bifosfato en trifosfato. El resultado es la fosforilación de AKT que, de esta forma, puede activar oncogenes en el núcleo celular y otras vías de señalización [por ejemplo (p.ej.) mTOR] en el citoplasma. De las tres isoformas de AKT, sólo la 1 y la 2 se han encontrado en cáncer tiroideo, relacionándose la presencia de AKT1 en el núcleo celular con la invasión y las metástasis de CFT.

Fig. 6 Vías de señalización implicadas en el cáncer de tiroides

(Reproducidas con permiso de Macmillan Publishers Ltd: [Nat Rev Cancer](https://doi.org/10.1038/nrnc1303) 13 (3): 184-199, ©2013)



• Vía *Wingless* (Wnt)-β-catenina^(170, 171): esta vía se relaciona con el desarrollo tumoral y la renovación epitelial. En los tumores tiroideos las mutaciones relacionadas con ella están en las proteínas de andamiaje como son la axina, la β-catenina, y la codificada por el gen APC (poliposis adenomatosa familiar). Mutaciones en el gen que codifica a la β-catenina (CTNNB1) son frecuentes en CAT

(66%) y CPDT (25%) pero no se encuentran en CDT. La activación de esta vía también puede venir a través de PI3K/AKT o RET/PTC.

- Vía factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas (NF- κ B)^(170, 171): interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria ligada a génesis tumoral. En las células de cáncer tiroideo controla las vías antiapoptóticas y de proliferación. NF- κ B es un factor de transcripción que induce niveles de expresión de distintos oncogenes. Por otro lado, mutaciones de varios miembros de la vía MAPK (RET/PTC, RAS y BRAF^{T1799A}) pueden activarla.

- Vía factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α)^(170, 171): se sabe que la hipoxia es un estímulo muy importante para el metabolismo, crecimiento y progresión tumoral. Cuando HIF-1 α se une a HIF-1 β se forma el factor de transcripción HIF1 que favorece la expresión de factores de crecimiento como VEGF y MET, y por tanto, la angiogénesis. Por otro lado, tanto MAPK como PI3K/AKT estimulan esta vía. HIF-1 α está presente en tumores tiroideos, sobre todo agresivos como el CAT pero no en tejido normal.

- Vía RASSF1-MST1-FOXO3⁽¹⁷¹⁾: su misión principal es como inhibidor tumoral, estimulando la apoptosis. RASSF1 es miembro de la familia RAS. Éste, en respuesta a las señales de apoptosis, se une y activa a MST1 (también STK4) lo que conduce a la translocación de FOXO3 al núcleo celular donde induce la transcripción de genes proapoptóticos. Esta vía está afectada en cáncer tiroideo, e incluso en AF, mediante la silenciación epigenética (hipermetilación del precursor de RASSF1), la inhibición directa de BRAF^{V600E}, y la activación de PI3K/AKT.

1.3.1. Oncogenes en cáncer de tiroides

Los productos de los oncogenes* se dividen en diferentes familias de proteínas con funciones celulares específicas: factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento (de membrana o intracelulares) o proteínas de transducción de señales y activadores o inhibidores nucleares de la transcripción. En la Tabla 8 se muestran las mutaciones más frecuentemente detectadas en los distintos tipos histológicos de cáncer tiroideo con su prevalencia^(99, 170, 173-175).

1.3.1.1. TSH-R

En la actualidad parece que las mutaciones de TSH-R y de las proteínas G (GSP o GNAS) no estarían relacionadas con la carcinogénesis, salvo en una mínima proporción de casos. Dado que estas mutaciones se han encontrado en nódulos tóxicos, se considera que conferirían características hiperfuncionantes a las neoplasias^(165, 176).

1.3.1.2. RAS

La familia *ras* está formada por cuatro protooncogenes (H-ras, K-ras A, K-ras B, y N-ras) que codifican proteínas de membrana GTP-asa. Las mutaciones de *ras* son el segundo hallazgo más frecuente en cáncer tiroideo, más en tumores foliculares que papilares (20-50% de CFT y 30-45% de CPT-VF, 20-40% de CPDT y

* Los oncogenes y las proteínas que codifica se expresarán en mayúsculas y los protooncogenes en minúsculas.

20-30% de CAT) y en áreas con deficiencia de yodo. Su presencia en AF (20-25%) y en algunos nódulos hiperplásicos sugiere que son un paso inicial en el proceso de la carcinogénesis.

La activación del oncogen RAS activa las vías MAPK y PI3K/AKT^(170, 177) influyendo en la regulación del ciclo celular, el crecimiento, la migración y la apoptosis. Estudios *in vitro* parecen demostrar que la activación de RAS es por sí sola insuficiente para determinar el crecimiento tumoral, pero predispondría a la adquisición de alteraciones genéticas o epigenéticas que finalmente llevarían a la transformación neoplásica⁽¹⁷⁸⁾.

En general las neoplasias con mutaciones en RAS suelen ser indolentes, de crecimiento lento y asociados a buen pronóstico^(177, 179) pero se consideran predictores de mal pronóstico en pacientes con CPT^(124, 165, 177, 180). Con menos frecuencia, estas mutaciones están presentes en tumores de alto grado de malignidad (CMT, CPDT, CAT) en cuyo caso suele haber otras mutaciones coexistentes: p53, CTNNB1, PIK3CA, PTEN o AKT1⁽¹⁷⁷⁾.

1.3.1.3. RET/PTC

El protooncogen *ret* (*rearrangement during transfection*) fue el primer receptor tirosina quinasa activado identificado en cáncer de tiroides. Codifica al receptor de membrana para el factor de crecimiento neurotrófico de células gliales. La ganancia de función de *ret* está involucrada en el CMT (tanto esporádico como familiar, incluyendo las neoplasias endocrinas múltiples)⁽¹²⁴⁾.

Del reordenamiento RET/PTC se han descrito hasta 15 tipos relacionados con el CPT, de los cuales los más frecuentes son RET/PTC1 y RET/PTC3. Todos ellos actúan activando las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT⁽¹²⁴⁾. Aunque se ha detectado en algún tumor tiroideo benigno, el reordenamiento RET/PTC es bastante específico de CPT^(99, 124). Se ha identificado en el 10-20% de los CPT⁽¹⁷⁴⁾ y se considera un proceso inicial en la oncogénesis ya que se ha encontrado en CPT oculto; también se ha asociado con niños y adultos jóvenes, exposición a radiación y metástasis linfáticas^(99, 165, 174, 181). Al contrario que los CPT con mutaciones en BRAF y RAS, los tumores con RET/PTC1 raramente progresan a pobremente diferenciado o anaplásico⁽⁹⁹⁾ mientras que los RET/PTC3 se asocian a mayor tamaño, variantes más agresivas y estadio más avanzado⁽¹³⁰⁾.

1.3.1.4. c-MET

Otro receptor de tirosina quinasa relacionado con la carcinogénesis tiroidea es c-MET, que codifica al receptor para el factor de crecimiento hepatocítico (HGF). Su sobreexpresión es frecuente en CPT (70-90%) y en CPDT y se asocia a la multicentricidad mientras que su infraexpresión tiene que ver con mayor riesgo de metástasis a distancia.

La vía HGF-MET modula la motilidad celular y la capacidad de invasión, y estimula la angiogénesis, indicando su papel en la progresión tumoral. Esta vía se activa por diferentes mecanismos, incluyendo la sobreexpresión de c-MET o mutaciones puntuales en su dominio quinasa lo que estimula a otras vías (MAPK; PI3K/AKT, NF-κB) favoreciendo la proliferación, la invasión, la migración, la supervivencia tumoral y las metástasis. Se considera un evento tardío en la génesis tumoral tiroidea porque su sobreexpresión se ha visto en los tumores más agresivos^(124, 165, 182, 183).

1.3.1.5. *NTRK1*

Los oncogenes TRK, se forman mediante los reordenamientos del gen *NTRK1* (receptor neurotrófico tirosina quinasa, también TRKA) que codifica al receptor de alta afinidad del factor de crecimiento nervioso (NGF), localizado en el cromosoma 1. Se han descrito 4 reordenamientos: TRK, TRK-T1, TRK-T2 y TRK-T3^(165, 184). Es el segundo reordenamiento cromosómico más comúnmente identificado en la génesis de tumores tiroideos, considerándose un evento temprano de este proceso. Es propio del CPT pero no es muy prevalente (5-13%)^(124, 184). Activa a diversas proteínas (RAS, PI3K) y a través de ellas a vías de señalización como MAPK, afectado, finalmente, a la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Todas las oncoproteínas TRK mantienen el dominio *NTRK1* tirosina quinasa, imprescindible para su actividad⁽¹⁸⁴⁾.

Tabla 8. Mutaciones presentes en distintos tipos de cáncer

Tumor	Mutación	Prevalencia (%)
CPT	BRAF ^{T1799A} (clásico y células altas)	40–45
	RET/PTC (1, 3, 6)	10–20
	RAS	10–20
	TRK	<5
	p53	
	PTEN	raro
CPT-VF	BRAF ^{K601E}	
	RAS	
	RET/PTC	
	PAX8-PPAR γ	1-5
	EIF1AX	
CFT	RAS	40–50
	PAX8-PPAR γ	30–35
	PIK3CA	<10
	PTEN	<10
	BRAF K601E	
	TSH-R	
CPDT	RAS	25–30
	β -Catenina (CTNNB1)	10–20
	p53	20–30
	BRAF	10–15
	AKT1	15
CAT	TP53	70–80
	β -Catenina (CTNNB1)	60–70
	RAS	40–50
	BRAF	20–30
	PIK3CA	20
	PTEN	>10
CMT	Hereditario: RET	>95
	Esporádico: RET	40–50

EIF1AX: Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A, X-Linked

1.3.1.6. HER2

El papel de *c-erb-2* (también ERBB2) es controvertido. Codifica al receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 con actividad tirosina quinasa que, tras activarse, termina estimulando vías de señalización intracelulares como MAPK. Su sobreexpresión, además de en el cáncer de mama (donde se asocia a peor pronóstico y mayor riesgo de recidiva) se ha detectado en cánceres tiroideos, tanto diferenciados como no diferenciados⁽¹⁸⁵⁾ pero no se han encontrado mutaciones o amplificaciones⁽¹²⁴⁾. Su sobreexpresión *in vitro* se relaciona con un aumento de *myc*, por lo que se piensa que HER2 jugaría un papel importante en el crecimiento agresivo de los tumores indiferenciados tiroideos⁽¹⁸⁵⁾.

1.3.1.7. PAX8-PPAR γ 1

El reordenamiento PAX8-PPAR γ 1, consecuencia de la translocación t(23)(q13;p25) da lugar a la fusión del factor de transcripción tiroideo PAX8 con los dominios A a F del receptor del activador de proliferación de peroxisomas γ 1 (PPAR γ 1). La proteína de fusión PAX8/PPAR γ 1 parece actuar inhibiendo la actividad transcripcional de PPAR γ 1 y, por tanto, favoreciendo el crecimiento y dificultando la diferenciación celular.

Su incidencia en CFT oscila entre el 30-35%^(178, 186) aunque en series más recientes es menos frecuente^(187, 188). También se detectado en AF (hasta en el 6%), pero no en tejido normal, ni en CCH o CAT^(178, 186), si bien Boos *et al.*⁽¹⁸⁷⁾ lo han encontrado en CPDT. Su hallazgo en CPT-VF es controvertido (5-38%)⁽⁹⁹⁾. Así, Klemke *et al.* no lo han encontrado en ningún CPT-VF^(189, 190) mientras que Anderson *et al.*⁽¹⁸⁸⁾ encontraron que todos los pacientes de su serie con esta mutación tuvieron un cáncer, fundamentalmente CPT-VF.

No todos los estudios^(187, 188) relacionan la mutación PAX8-PPAR γ 1 con CFT claramente invasivos y con más posibilidad de enfermedad avanzada y de metástasis a distancia⁽¹⁷⁸⁾. También se ha asociado a menor tamaño o menor edad de presentación⁽⁹⁹⁾.

Parece haber variabilidad geográfica o étnica ya que en pacientes japoneses o coreanos prácticamente no se suele encontrar y por tanto, la génesis tumoral del CFT en dichos sujetos dependerá de otros factores⁽¹⁹¹⁻¹⁹³⁾.

1.3.1.8. BRAF

BRAF es una serina treonina quinasa, miembro de las RAF quinasas (ARAF, BRAF, CRAF). Los genes RAF son descritos como oncogenes, ya que son los efectores de las oncoproteínas RAS. La mutación más frecuente es la que resulta de la transversión de timina por adenina en el nucleótido 1799 lo que conduce a la sustitución de valina por glutamina en la posición 600 de la proteína (V600E) cuyo efecto final es una activación crónica de la vía MAPK y la transformación cancerosa^(194, 195). Inicialmente se descubrió en melanomas, cáncer de colon y otros tumores sólidos pero posteriormente se identificó en CPT^(196, 197) donde la prevalencia es aproximadamente del 37-58% siendo la mutación genética más frecuente en el cáncer tiroideo^(130, 131, 195, 198, 199).

Se considera específica de CPT puesto que no se ha encontrado en tumores benignos ni foliculares. Su presencia en CPDT y en CAT, sobre todo en aquéllos que conservan áreas bien diferenciadas, sugiere que estos últimos derivarían de un CPT. Además de en la variante clásica, se ha detectado en la de células altas^(99, 181, 194).

Su prevalencia está sujeta a variabilidad geográfica, siendo más alta en zonas con alta ingesta de yodo o exposición a contaminantes de erupciones volcánicas^(130, 131).

Varias revisiones han evaluado su valor como predictor de mal pronóstico^(194, 195, 200), y aunque los resultados no son totalmente consistentes entre los diversos estudios, sí que parece haber una relación entre BRAF^{V600E} y la presencia de invasión capsular, extensión extratiroidea, estadio más avanzado en el momento del diagnóstico o la presencia de metástasis (regionales o a distancia). También suelen ser pacientes de más edad^(131, 201).

Otro aspecto que podría justificar el comportamiento más agresivo de los tumores con esta mutación es que en éstos, la expresión de las proteínas relacionadas con la diferenciación tiroidea (TPO, NIS) está significativamente disminuida⁽²⁰²⁻²⁰⁴⁾ mientras que la de proteínas relacionadas con fenotipos poco diferenciados como el transportador de glucosa 1 (GLUT1), está aumentada^(203, 205). Esto podría justificar la disminución en la captación de yodo o la avidéz por la ¹⁸F-FDG.

Se han descrito muchas más mutaciones en BRAF^(194, 195, 201), incluyendo inserciones, deleciones o reordenamientos: BRAF^{K601E} (CFT, CPT-VF, AF), BRAF^{T599del} (AF), BRAF^{T599dup} (CPT clásico), reordenamiento AKAP/BRAF, BRAF^{V599ins}, BRAF^{V600E+K601del}, BRAF^{600D+FGLAT601-605ins}.

1.3.1.9. p53

El gen supresor p53 tiene un papel fundamental en la evolución de tumores indolentes a agresivos y su mutación está presente mayoritariamente en tumores pobremente diferenciados o indiferenciados. En condiciones normales, p53 favorece la detención del ciclo celular a través de p21 y la apoptosis, evitando la replicación de células con el ADN dañado. El gen mutado condiciona una pérdida de función lo que lleva a la inestabilidad genómica, al fallo en la reparación del ADN y, consiguientemente a la progresión tumoral⁽¹²⁴⁾. En una serie reciente se ha observado mutación de p53 en el 27% de CPDT y en el 42% de los CAT⁽²⁰⁶⁾. Curiosamente la expresión de la proteína p53, no refleja el estado mutacional del gen, habiéndose encontrado expresada en tumores relativamente indolentes o en patología benigna y en relación con infiltrados de células inflamatorias⁽²⁰⁷⁾.

1.3.1.10 Otros: PTEN. PI3KCA

Las mutaciones germinales del gen supresor PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) conducen al síndrome de Cowden. Su mecanismo de acción es activando la vía PI3K/AKT cuando la proteína codificada por él está infraexpresada o inactivada. Sin ser muy comunes, estas mutaciones se relacionan fundamentalmente con el CFT, aunque también se han descrito en AF, muy raramente en CPT, y con algo de más frecuencia en CAT^(170, 173-175).

Las mutaciones activadoras o las amplificaciones del gen PI3KCA, que codifica la subunidad catalítica de PI3K y que activan la vía PI3K/AKT, también se han encontrado en cáncer de tiroides, fundamentalmente en CFT, y con menos frecuencia en CPT o CAT^(170, 173, 174).

1.3.1.11. Sumario

Las alteraciones genéticas que afectan al CPT (mutaciones en BRAF y RAS, los reordenamientos RET/PTC y de TRK) son mutuamente excluyentes entre sí y en total, se dan en el 70% de estos tumores^(99, 124). En cuanto al CFT parece que

procedería de 2 eventos oncogénicos diferentes y que no se solapan entre sí: mutaciones de *ras* y el reordenamiento PAX8-PPAR γ 1^(178, 186, 191).

Es curioso notar que en estudios a largo plazo se ha apreciado un aumento de la frecuencia de mutaciones en RAS y BRAF, a costa de un descenso en el reordenamiento RET/PTC, lo que podría implicar un descenso en la exposición a radiación ionizante frente a otros factores ambientales (dietéticos o químicos)^(130, 131).

1.3.2. Modelo de oncogénesis

El desarrollo y progresión del cáncer se caracteriza por una acumulación de alteraciones genéticas aleatorias como consecuencia de una prevalente inestabilidad genómica. En el caso del cáncer tiroideo lo que predomina es la inestabilidad cromosómica⁽²⁰⁸⁾ produciéndose un incremento secuencial en el número de anormalidades en el ADN (tanto en el porcentaje de casos con anormalidades, como en el número de anormalidades por caso) en la progresión desde el tumor bien diferenciado al anaplásico. Dado que HRAS y BRAF mutados son capaces de provocar inestabilidad cromosómica en líneas celulares *in vitro*, se podría concluir que la activación oncogénica de la vía de las MAP quinastas daría lugar a la inestabilidad genómica en las células cancerosas tiroideas y a nuevas mutaciones somáticas durante la progresión tumoral⁽¹²⁴⁾.

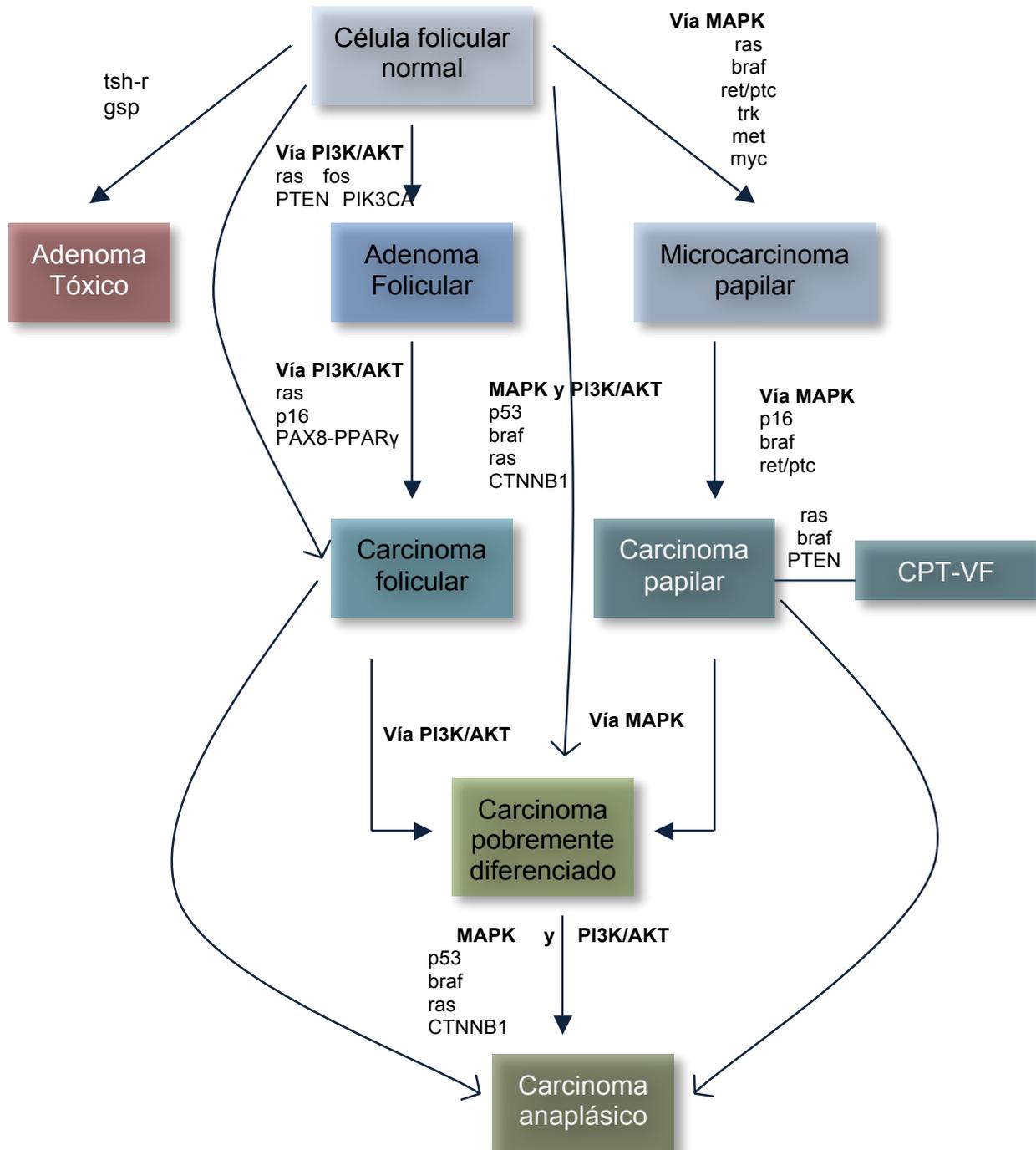
Los cambios genéticos y epigenéticos en la vía MAPK están implicados en la carcinogénesis de numerosos tumores humanos y, en concreto, por lo que respecta al cáncer tiroideo, tres de sus miembros (RET, RAS y RAF) están implicados en el 70% de los CPT, considerándose un evento inicial en el proceso. Las mutaciones que la activan e inician la transformación neoplásica tienen que ver con BRAF, RAS y RET/PTC que inician una serie de cambios moleculares secundarios que sinergizan y amplifican su actividad oncogénica^(170, 171).

A finales de los 90, Wynford-Thomas (Wynford-Thomas 1997) describe las bases genéticas de la transformación de las células foliculares del tiroides en cancerosas, construyendo un modelo secuencial (Fig. 7). Primero se produciría una mutación en los componentes de las vías de señalización relacionadas con el crecimiento: TSH-R y GSP (que darían lugar a tumores benignos), RAS (que afecta a señales de transducción), y los receptores de factores de crecimiento: RET y TRK. El efecto de RAS, vía activación de MAPK y PI3K/AKT, sería un incremento el estímulo al crecimiento celular, mientras que los reordenamientos en RET y TRK favorecerían la desdiferenciación y transformación de las células tiroideas.

Siguiendo este modelo, la progresión tumoral se relacionaría con la inactivación de los inhibidores del ciclo celular (p16, p15, p21, p27) y, la transformación en cáncer anaplásico tendría que ver con la mutación de p53, junto con el cambio del patrón de expresión génica de la célula hacia un fenotipo mesenquimal. Ambos factores, la mutación de p53 y la desdiferenciación son necesarias en la misma célula para la transformación anaplásica y explicaría, la escasa frecuencia de este tipo de tumor.

La acumulación progresiva y sinérgica de alteraciones genéticas amplificaría el poder oncogénico de cada una de ellas. Así, las alteraciones que afectan a PIK3/AKT (RAS, PIK3KA, PTEN) coexisten con las que afectan a MAPK (BRAF, RAS y RET/PTC) conforme los tumores son más indiferenciados, mientras que son mutuamente excluyentes entre sí en carcinomas bien diferenciados. El proceso de desdiferenciación se aceleraría con la presencia de mutaciones adicionales en p53, CTNNB1, o ALK^(171, 209).

Fig. 7 Modelo de oncogénesis



Fuentes: Wynford-Thomas 1997⁽²¹⁰⁾, Kebebew 2005⁽¹⁶⁶⁾, Eszlinger 2010⁽²⁰⁹⁾ y Xing 2013⁽¹⁷¹⁾

Se podría decir, por tanto, que el cáncer tiroideo es un modelo de neoplasia sólida, en la que hay unos defectos genéticos que inician la transformación tumoral (como RET/PTC, RAS o BRAF) y otros relacionados con la progresión tumoral. Estos incluyen alteraciones de los factores de crecimiento y sus receptores, de los reguladores del ciclo celular y de las moléculas de adhesión, que son capaces de modificar el comportamiento de la célula transformada, promoviendo la invasión tumoral y aumentando el potencial metastásico del mismo⁽¹²⁴⁾.

Los estudios en proteómica, sin embargo, parecen cuestionar la teoría secuencial, al menos en lo referente a la progresión adenoma-carcinoma folicular, tras encontrar dos patrones de expresión proteica diferentes en ambas entidades. Este hecho junto con el hallazgo del punto de activación del daño en el ADN y la evidencia de la inestabilidad genómica en CFT y no en el AF sugieren que ambas lesiones evolucionan de forma diferente⁽²¹⁰⁾.

Finalmente, la investigación en células madre, ha dado lugar a una nueva hipótesis para explicar la carcinogénesis^(211, 212). Hay alguna evidencia de que una pequeña proporción de células tumorales tienen propiedades de células madre (TIC: *tumor-initiating cells*), y serían estas células las que iniciarían y mantendrían el crecimiento tumoral. No hay certeza de si son verdaderas células madre o sólo han adquirido sus propiedades. En diversos estudios se han encontrado poblaciones de este tipo en líneas celulares de cáncer tiroideo. Se postula que las TIC derivarían de las células madre normales cuando se activan los oncogenes pero también podrían venir de células progenitoras, o de células maduras desdiferenciadas, en cuyo caso adquirirían sus propiedades de TIC a través del proceso de transición de epitelial a mesenquimal. Así, dentro de un grupo de células tumorales, sólo las TICs son carcinogénicas y, según el nivel de diferenciación de las mismas, darán lugar a diferentes tipos de cáncer tiroideo: el CAT podría originarse directamente de las células madre, puesto que es indiferenciado mientras que el CDT podría formarse a partir de células madre bipotenciales. El origen del CMT, también diferenciado, serían las células progenitoras C.

1.3.3. Desregulación epigenética

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de los procesos epigenéticos en el desarrollo y progresión de los tumores. Estos procesos regulan la expresión génica en las células sin alterar la secuencia de ADN, generalmente mediante silenciamiento genético. Hay tres mecanismos epigenéticos: metilación de los residuos de citosina del ADN, modificaciones translacionales de las histonas y la remodelación de nucleosomas⁽²¹³⁾. Otro mecanismo epigenético es la expresión de los microARN (miRNA) o ARN (ácido ribonucleico) no codificantes⁽²¹⁴⁾.

Entre los genes supresores en los que se ha demostrado hipermetilación están PTEN, RASSF1A, TIMP3, DAPK1, (RAR β 2)^(215, 216), y RAP1GAP⁽²¹⁴⁾. Otros genes afectados son: CALCA, CDH1, FGFR2, NIS, p16, la metiltransferasa nuclear RIZ1, los transportadores de yodo SLC5A8 (apical o AIT) y SLC26A4 (NIS), o TSH-R^(215, 216). La mutación BRAF^{V600E} se ha asociado a esta metilación aberrante en algunos genes (DAPK, RAR β 2, TIMP3, SLC5A8), incluyendo a los que codifican moléculas tiroideas como NIS, Tg, o TPO. Esta asociación de alteraciones en genes reparadores de ADN aumentaría la agresividad del tumor⁽¹⁷⁰⁾. La silenciamiento epigenético de TTF-1 mediante la metilación se ha encontrado en más de la mitad de los tumores tiroideos indiferenciados, pero no en tiroides normal ni en CPT⁽²¹⁷⁾.

Aunque con menos frecuencia la hipometilación de ADN también se ha relacionado con la génesis tumoral. Rodríguez-Rodero *et al.*⁽²¹⁸⁾ han encontrado genes supresores y oncogenes hipometilados en CPT y CFT, pero en mucho menor número que en CMT o CAT, concluyendo que este proceso estaría relacionado con los tumores indiferenciados.

En cuanto a la acetilación de histonas, parecen influir en la sobreexpresión de p53 y p27 y, en la pérdida de expresión de NIS, TPO, Tg, RAR β . Actualmente, la remodelación de nucleosomas no se ha relacionado con el cáncer tiroideo^(215, 216).

- *MicroRNAs*

Los micro ARN (miRNA) son una nueva clase de moléculas reguladoras, de pequeño tamaño que no se transcriben a proteínas. Funcionan como reguladores negativos de la expresión genética en todos los procesos implicados en la carcinogénesis: diferenciación, proliferación y supervivencia celular. Se calcula que un solo miRNA puede regular más de 200 genes y que cada gen tiene dianas para múltiples miRNAs. Si la unión del miRNA a la molécula de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) es perfecta, la síntesis proteica continúa. En caso contrario, se produce la represión de la translación y por tanto se inhibe la síntesis de proteínas (Fig. 8). Es la unión imperfecta lo que permite a un miRNA regular a múltiples genes⁽²¹⁹⁾.

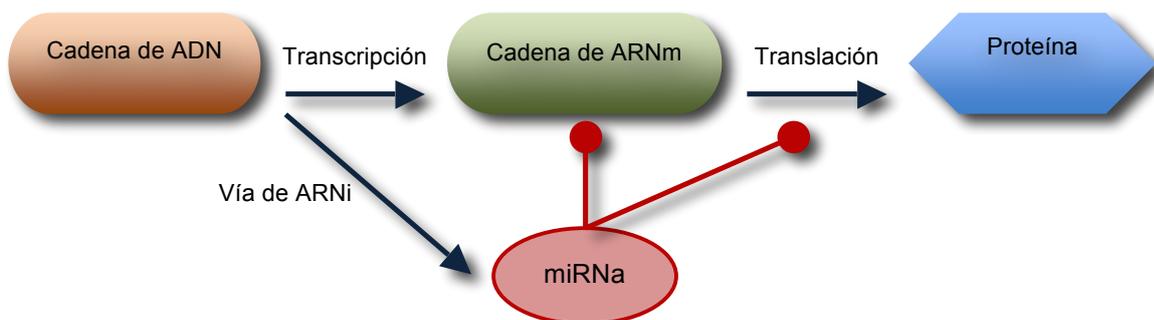
Los perfiles de expresión de miRNA son específicos de cada tejido, por tanto, los tumores derivados de las células C (CMT) son significativamente diferentes de los originados de las células foliculares. Incluso entre los tumores derivados de las mismas células los perfiles varían bastante⁽²¹⁹⁾.

De estas moléculas, de unos 20-24 nucleótidos, ya hay 1.881 secuencias* descritas en humanos ([mirBase.org](http://mirbase.org)).

Desde el punto de vista oncogénico, la sobreexpresión de miRNAs se traduce en la inhibición (regulación a la baja) de los genes supresores de tumores mientras que la infraexpresión condicionaría a la estimulación de los oncogenes, con el consiguiente efecto en el ciclo celular, en la proliferación, la apoptosis y otros mecanismos carcinogénicos⁽¹⁰¹⁾. Así pues, podemos decir que hay dos tipos de miRNA⁽²²⁰⁾:

- onco-miRs: que promueven la carcinogénesis
- microRNAs supresores tumorales: que antagonizan la progresión del cáncer.

Fig. 8 Regulación de la expresión génica mediada por miRNA



En general, se podría decir que los tumores menos agresivos o bien diferenciados suelen tener regulados al alza los onco-miRs (miR-221, miR-222, miR-146b), estimulando la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis. Por el contrario, los tumores indiferenciados (CAT, CPDT) se caracterizan por una supresión

* Disponible en http://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_summary.pl?org=hsa (acceso: septiembre de 2015)

importante de los miRNAs supresores, situación que favorece la dediferenciación⁽²²⁰⁾, que no es más que la transformación del tejido epitelial en mesenquimal, promovida por la infraexpresión de las familias de miRNAs -200 y -30⁽²²¹⁾.

El uso de estas moléculas como marcador tumoral viene dado por varias de sus características: son reguladores del ARNm, actúan en múltiples genes, no necesitan convertirse en proteínas para realizar su acción y por tanto su expresión se correlaciona bastante bien con el estado funcional del gen. Además son más estables y mantienen su perfil de expresión en muestras conservadas en parafina⁽²²²⁾.

Los miRNA más consistentemente sobreexpresados en cáncer tiroideo son miR-221, miR-222 y miR-146b, junto con miR-155 y miR-181b⁽²²²⁾.

Muy recientemente se ha desarrollado una plataforma comercial utilizable en muestras de PAAF (*ThyraMIR Thyroid miRNA Classifier*; Interpace Diagnostics. PDI, Inc). Este panel analiza la expresión de 10 miRNA: miR-29b-1-5p, miR-31-5p, miR-138-1-3p, miR-139-5p, miR-146b-5p, miR-155, miR-204-5p, miR-222-3p, miR-375, y miR-551b-3p, pero su validez ha sido estudiada junto con un panel de mutaciones somáticas por lo que su capacidad discriminadora por sí sola no ha sido comprobada⁽²²³⁾. En esta cohorte, que incluía 35 cánceres y 74 patologías benignas, hubo 15 FN, y 6 FP atribuibles al clasificador de miRNA.

1.4. MARCADORES TUMORALES EN CÁNCER DE TIROIDES

Un marcador tumoral es cualquier factor medible, que refleje distintos aspectos de la biología tumoral, proporcionando, además, información diagnóstica y/o del pronóstico⁽¹⁶⁶⁾. Así pues, la utilidad de los marcadores es tan amplia como⁽²²⁴⁾:

- Identificar pacientes en riesgo de desarrollar un tumor específico.
- Realizar un diagnóstico precoz del tumor primario y sus metástasis.
- Contribuir a tipificar el tumor.
- Contribuir a proporcionar un pronóstico en su evolución.
- Monitorizar la progresión del tumor, tanto del primario como del metastásico.
- Monitorizar la respuesta al tratamiento.
- Contribuir al conocimiento de la patogenia tumoral.
- Sugerir acciones diagnósticas o terapéuticas.

Generalmente son proteínas anormales, detectables mediante inmunohistoquímica o inmunocitoquímica. Otras técnicas son: el aislamiento directo del gen, la determinación de la determinación del ARNm mediante Northern Blot, la conversión de ARNm en ADN complementario (ADNc) mediante la transcriptasa inversa (RT), para su posterior amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tras estas técnicas se pueden realizar diversos procedimientos para analizar mutaciones: polimorfismo conformacional de hebra única, y secuenciación directa del ADN⁽¹⁶⁶⁾.

La aplicación de la biología molecular en el campo del diagnóstico del cáncer de tiroides se ha desarrollado para intentar aumentar la sensibilidad de la PAAF en lesiones indeterminadas y evitar cirugías diagnósticas innecesarias, o proporcionar un pronóstico de la enfermedad que pueda guiar el tratamiento quirúrgico más adecuado. Tanto es así, que los estudios moleculares comienzan a aparecer en las guías clínicas como método auxiliar en caso de citología indeterminada^(1, 30, 161).

Hasta ahora no se ha encontrado ningún marcador que por sí sólo tenga esta capacidad, si bien, desde la simple determinación de Tg o calcitonina sérica a los modernos análisis genómicos, proteómicos⁽²²⁴⁾ o metabolómicos^(225, 226) se ha avanzado mucho.

En la actualidad, las técnicas para los estudios cromosómicos o de genoma, derivan principalmente de la tecnología de los microarrays. El ARN es extraído, purificado, amplificado, marcado e hibridado para el análisis de la expresión génica, resultando en un mapa de genes con diferentes grados de activación, o como grupos de marcadores moleculares específicos con diferentes grados de expresión (sobre o infraexpresados)⁽²²⁴⁾. Los estudios con microarrays se describen en la sección 1.6. A continuación se expone un resumen sobre marcadores basados en otros métodos.

1.4.1. Mutaciones somáticas como marcador tumoral

Las mutaciones somáticas y los reordenamientos que con más frecuencia se han utilizado como marcadores de malignidad en cáncer de tiroides tienen que ver con las vías MAPK o PI3K-AKT. Éstas pueden ser detectadas tanto en el tejido

como en muestras citológicas obtenidas por PAAF. Como ya se ha expuesto (sección 1.3.1.11), estas mutaciones suelen estar asociadas a un tipo histológico y son mutuamente excluyentes entre sí⁽⁹⁹⁾. Hasta el 80% de las citologías malignas, el 21% de las citologías indeterminadas y el 3,5% de citologías benignas, tienen una mutación somática detectable, con una probabilidad de malignidad postest del 100% cuando la mutación BRAF o los reordenamientos RET/PTC están presentes. Este valor cae al 70% en caso de mutaciones en RAS o PAX8-PPAR γ ⁽²²⁷⁾.

Múltiples estudios han evaluado la validez de las mutaciones somáticas para distinguir nódulos benignos de malignos, usando sólo una mutación o combinaciones de ellas^(93, 194, 228), siendo los que han utilizado un panel con varias de estas mutaciones quienes han obtenido mejores resultados, diagnosticando correctamente el 61-75% de los nódulos con citología indeterminada (Tabla 9).

Tabla 9 Utilidad de la determinación de mutaciones somáticas en la PAAF con citología indeterminada

	Nikiforov 2009 ⁽²²⁹⁾	Moses 2010 ⁽²³⁰⁾	Ohori 2010 ⁽²³¹⁾	Cantara 2010 ⁽²³²⁾	Nikiforov 2011 ⁽²³³⁾				Eszlinger 2014 ⁽²³⁴⁾		
N	86	426	117	235	967* (513)				310 ⁺		
Muestras^{a,b,c}	PAAF	PAAF	PAAF	PAAF	PAAF				PAAF (retrospectivo)		
Indeterminadas	52	110	117	41	247 AUS + 214 NF				164 (141)		
Sospechosas	-	27	-	54	52				-		
Malignas:	22	57	-	-	-				57 (42)		
Benignas:	12	257	-	87	-				89 (70)		
No diagnósticas	-	2	-	53	-				-		
Mutaciones					Total	AUS	NF	SM	253⁺	141^a	
Indeterminadas	52^a	110^b	117 AUS	41^b							
N-, H-, KRAS	5	NRAS: 8 KRAS: 0	NRAS: 7 HRAS: 1	3	61	19	34	8	NRAS: 13 HRAS: 3	12 3	
BRAF	7	3	3	2	17	5	2	10	22	0	
RET/PTC1-3	2	1	-	2	1	0	0	1	1	0	
PAX8/PPAR γ	1	-	1	0	4	1	2	1	8	6	
Histología final											
Indeterminadas											
CPT	17	19	20	7	33	6	9	18	44	2	
CPT-VF	0	0	0	0	77	29	40	8	9	4	
CFT	4	8	0	0	11	0	9	2	32	19	
AF:	4	29	18	26	114	46	61	7	156	139	
ACC:	0	27	0	0	0	0	0	0	0	0	
CCH:	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
DB:	27	46	79	8	278	166	95	17	69	0	
S (%)	71	38	60	85,7	80,4 ^c	56,9	63	57	68	43,9	18,2
E (%)	100	95	100	97	100 ^c	97,7	99	97	96	90,4	85,7
FP	0	4	0	1	0 ^c	9	3	5	1	18	17
FN	6	21	8	1	0 ^c	47	13	25	9	37	18

a: las muestras indeterminadas incluyen neoplasias foliculares y sospechosos de malignidad. b: las muestras indeterminadas no incluyen a las sospechosas de malignidad. c: solamente muestras sospechosas. *: de la muestra total, sólo 513 muestras de PAAF fueron confirmadas histológicamente tras cirugía. +: En el estudio de Eszlinger *et al.*, se han eliminado para los cálculos las 57 muestras no analizables metodológicamente. Entre paréntesis la cifra usada para los cálculos.

Los resultados de S,E, FP, FN se refieren sólo a la categoría indeterminada, salvo que se especifique otro dato.

CPT: cáncer papilar de tiroides; CFT: cáncer folicular de tiroides; AF: adenoma folicular; ACC: adenoma de células de Hürthle; CCH: carcinoma de células de Hürthle; DB: otros diagnósticos correspondientes a lesiones benignas.

En nuestro medio, aunque no hemos tenido acceso a paneles de mutaciones, sí se ha determinado la mutación BRAF^{T1799A} en muestras de PAAF, encontrando positividad en el 47,2% de los casos de CPT, sin asociarse a un fenotipo más agresivo. La sensibilidad de la PAAF, en nuestro caso, mejoró del 45% al 60%^(96, 198).

Estos test están encaminados a diagnosticar cáncer (*ruling in test*) ya que son muy específicos pero poco sensibles (Tabla 9). Las razones que expliquen esta baja sensibilidad pueden ser^(93, 235):

- Baja frecuencia de mutaciones en CFT.
- Alta incidencia de CPT en la población de estudio con citología indeterminada, con baja o nula incidencia de CFT.
- Variaciones en la prevalencia de la mutación BRAF en función de áreas geográficas.
- Diferencias en la obtención de muestras: segundas PAAFs, material conservado congelado, muestras de PAAF *ex vivo* de la pieza obtenida quirúrgicamente.
- Baja celularidad en las muestras obtenidas.
- Heterogeneidad de los tumores analizados con subpoblaciones celulares no mutadas.

Para minimizar estos problemas y lograr unos resultados lo más comparables posibles, parece necesario homogeneizar las categorías diagnósticas citológicas, paso que parece ir en buena dirección tras la publicación del sistema Bethesda⁽⁵⁶⁾. Lo siguiente es conseguir que las muestras utilizadas por el citólogo y las usadas para el diagnóstico molecular sean las mismas⁽²²⁸⁾, lo que parece viable pues se ha demostrado que el material obtenido y procesado en una PAAF convencional es utilizable para el diagnóstico molecular⁽²³⁴⁾.

Si nos centramos la categoría AUS/FLUS (Bethesda 3), la ausencia de mutaciones hace disminuir el riesgo de malignidad hasta el 5,6%, y al 14% la categoría NF/SNF (Bethesda 4)⁽²³³⁾. En este estudio el VPN permanece bajo en comparación con la citología sola, debido a la baja sensibilidad, pues recordemos que sólo alrededor de la mitad de los tumores presentan mutaciones somáticas detectables.

En la búsqueda de mejorar la capacidad de discriminación y el coste efectividad de estos test mutacionales se ha aplicado una metodología diferente: la siguiente generación de secuenciación (NGS o *Next-generation sequencing*)⁽²⁰⁹⁾. De esta forma se detectan alteraciones genéticas secuenciando de miles a millones de fragmentos cortos de ácidos nucleicos de forma paralela y coste efectiva, permitiendo el análisis completo del genoma, el exoma y el transcriptoma o de zonas específicas; también permite cuantificar el porcentaje de alelos mutados, y por tanto del porcentaje de las células afectadas por la mutación⁽²⁰⁹⁾.

El resultado de esta metodología aplicada la patología tiroidea, es el panel ThyroSeq®, que sólo necesita 5 nanogramos (ng) de ADN y permite analizar RAS, CTNNB1, PIK3CA, BRAF, RET, PTEN, TSH-R, AKT1, p53, y GNAS. Los autores demuestran que es aplicable tanto a las muestras obtenidas en PAAF convencional, como muestras conservadas en parafina⁽²⁰⁹⁾. Los resultados son buenos, confirmado la presencia de mutaciones en 30-83% de los cánceres analizados (CPT, CPT-VF, CFT, CCH, CPDT, CAT, CMT). El 68% de estos tumores tenían al menos una mutación puntual mientras que el 9% contenían más de una. Estos últimos fueron

tumores mal diferenciados o diferenciados con comportamiento agresivo. Los tumores poco diferenciados presentaron un perfil distinto, y en algún caso, mutaciones múltiples.

Posteriormente se ha ampliado este panel (ThyroSeq V2), con TERT, genes de fusión (analizando RNA), y genes para estimar la cantidad de tipos celulares en las muestras⁽²³⁶⁾. Con este panel aplicado a pacientes con lesiones con citología Bethesda 4, se ha diagnosticado malignidad con una S del 90%, y una E del 93. En la serie, además se ha comprobado que los pacientes con mutaciones en TERT, HRAS, BRAF^{V600E}, p53 y PIK3CA, y cualquier gen de fusión, tienen un 100% de riesgo de malignidad.

Otros grupos han usado esta metodología con buenos resultados^(237, 238).

1.4.2. Marcadores inmunohistoquímicos

La IHQ estudia la expresión de proteínas y su localización dentro de la célula. Actualmente se han identificado un gran número de antígenos específicos para el tejido tiroideo, permitiendo caracterizar algunas de las enfermedades que afectan a la glándula tiroidea⁽²³⁹⁾. La ventaja de la inmunohistoquímica es, fundamentalmente, su disponibilidad en casi cualquier laboratorio, permitiendo realizar la evaluación de marcadores de forma relativamente fácil, barata, y reproducible, siendo una ayuda importante para mejorar los resultados de la citología⁽²⁴⁰⁾.

Las proteínas tiroideas específicas con utilidad como marcadores para diferenciar las distintas patologías son⁽²³⁹⁾:

- Tg: está presente en todos los CDT y confirma el origen folicular de cualquier tumor tiroideo, incluyendo los tumores metastásicos. Su expresión se correlaciona con el grado de diferenciación tumoral, siendo negativa en los CAT.

- TPO: su negatividad en la tinción con el anticuerpo monoclonal MoAB47 se considera marcador de malignidad en los tumores derivados de células foliculares. Es más sensible en el diagnóstico de CPT que en el CFT.

- TTF-1 (también NKX2.1): está expresado con mucha intensidad en cánceres diferenciados, estando ausente o disminuida en CAT o CPDT. En el CPT su presencia se relaciona con tumores más agresivos.

- TTF-2 (también FOXE1): se encuentra tanto en células foliculares tiroideas normales como en células C. En los cánceres tiroideos está ampliamente expresado excepto en CAT. Su valor diagnóstico está por determinar.

- NIS (SLC26A4 o pendrina) y SLC5A8 (AIT) son negativos en la mayoría de los cánceres diferenciados tiroideos. En algunos casos de sobreexpresión de NIS en CPT, la tinción fue positiva a nivel intracelular.

- PAX8: está muy frecuentemente expresado en cáncer de tiroides derivado del epitelio folicular. En CMT se ha encontrado expresión del mismo en algún caso.

Los cánceres anaplásicos muestran negatividad para todas las proteínas específicas del tiroides y positividad para citoqueratinas. La negatividad para CEA y calcitonina excluyen CMT, y la negatividad para el antígeno leucocitario común (CLA) excluye linfoma.

En la tabla 10⁽¹⁹⁴⁾ se puede ver una relación de los marcadores más frecuentemente detectados por inmunohistoquímica y con más capacidad discriminativa entre tumores tiroideos benignos y malignos.

Tabla 10 Marcadores inmunohistoquímicos en cáncer de tiroides

	TB	CPT	CFT	CAT	CAM
Galectina-3	4,5-11%	72,6-98,9%	21-66%	100%	0
HBME	2,3-31,5%	85-94%	50-88%	0%	0
CK19	0-16,9%	72-96,7%	21-50%	0-25%	20%
HMWCK	59,7%	59,7%	0%	-	-
Ciclina D1	66,9%	66,9%	40%	-	-
Pérdida de p27	83,4%	43,4- 83,4%	60%	-	-
CITED1	87%	87%	50%	5,5%	-
FN1	91%	91%	50%	1,9%	-
p16	-	30,4%	-	-	-
p21	-	30,4%	-	-	-

TB: Tumores benignos. HBME1: Anticuerpo mesotelial Hector Battifora 1. CK19: citoqueratina 19; HMWCK: citoqueratina de alto peso molecular. p27: proteína quinasa inhibidora dependiente de ciclina; CITED1: gen que codifica la proteína MSG1 (gen específico del melanocito 1). FN1: fibronectina

Fuentes ⁽²⁴¹⁻²⁴⁴⁾: de Matos 2005, Prasad 2005, Park 2007, Obiols 2008.

La galectina-3 (GAL-3), es el marcador inmunohistoquímico más estudiado⁽²⁴⁵⁾. Si bien no se considera un buen test de cribaje preoperatorio para el diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo, sí parece ser muy útil como test auxiliar en casos complejos ya que su expresión está reducida o ausente en los tumores benignos⁽²⁴⁶⁾. En general la expresión focal sería indicativa de tumor benigno mientras que la difusa hablaría más de lesión maligna⁽²⁴⁷⁾. Existe un test comercial (*Galectin-3 ThyroTest Kit*, Mabtech, Space Milan, Italia) que combina la evaluación morfológica y fenotípica de las células tiroideas y ha demostrado una exactitud del 88% en detección de malignidad en muestras de PAAF, mejorando estos resultados cuando el tejido se obtiene mediante BAG⁽¹⁹⁴⁾.

Como no se ha encontrado un marcador histoquímico único que proporcione un diagnóstico definitivo de malignidad, se han investigado combinaciones de ellos⁽²⁴⁷⁾. De éstas, la más estudiada ha sido HBME-1, GAL-3 y CK19 demostrando una S del 85%, y E del 97% en un reciente metaanálisis⁽²⁴⁸⁾.

Se han evaluado otras moléculas en este ámbito, incluyendo la determinación por IHQ de BRAF, que parece ser más sensible que la determinación molecular⁽²⁴⁷⁾.

1.4.3. Proteómica

El término proteómica se refiere al análisis global del proteoma, compuesto por todas las proteínas expresadas en un momento dado y un estado fisiológico concreto de una entidad biológica específica^(249, 250). Dado que conocemos que el cáncer se inicia a nivel del genoma pero que también que alcanza el nivel proteómico, los datos obtenidos del análisis genómico y de expresión génica no nos proporcionan una visión completa del problema⁽²⁵¹⁾.

En la Tabla 11^(194, 251) se resumen los resultados de estudios proteómicos realizados en muestras de tejido tiroideo.

Tabla 11 Estudios proteómicos en tejido tiroideo

Autor (ref.)	N	Comparación	Resultados
Srisomsap 2002 ⁽²⁵²⁾	34	Tejido normal, tejido patológico benigno, CFT y CPT	11 proteínas con diferencias de expresión entre tejido neoplásico y no neoplásico. Catepsina B es la proteína más distintiva entre tejido neoplásico y no neoplásico.
Torres-Cábala 2004 ⁽²⁵³⁾	94	Tejido normal y patológico	CPT: citocromo C, S100C, galectina 1, catepsina B, superóxido dismutasa, precursor de catepsina D. CFT: poliubiquitina, tioredoxinperoxidasa 2, glutatión S-transferasa, catepsina B, VDAC1
Brown 2006 ⁽²⁵⁴⁾	8	Tejido normal y CPT	Sobreexpresión de galectina 3, CK-19 y catepsina B.
Torres-Cabala2006 ⁽²⁵⁵⁾	33	Tejido normal patológico benigno, CFT y CPT. Muestras de PAAF	CPT: S100C, galectina 1 y 3, catepsina B y precursor de catepsina D. CFT (100%): VDAC1, catepsina B.
Braunschweig 2007 ⁽²⁵⁶⁾	144	Tejido normal, AF, CFT, CPT, CAT y CMT	8 proteínas detectadas (ErbB2, anexina IV, IL- 11, caspasa 9, RAR α , FGF-7, STAT5a, c-myc) con expresión diferente en los distintos tejidos estudiados.
Giusti 2008 ⁽²⁵⁷⁾	13	PAAF <i>ex vivo</i> . Tejido normal y CPT (clásico y células altas)	Proteínas exclusivas de cada variedad histológica.
Netea-Maier 2008 ⁽²⁵⁸⁾	11	CFT vs. AF	CFT>AF: histona H2B, CK7 CFT<AF: CK8 78 kDa, proteína regulada por glucosa, calreticulina, anexina A3, β -actina.
Sofiadis 2010 ⁽²⁵⁹⁾	98	Tejido normal, CPT, CPT con antecedentes de irradiación, CFT y AF.	Sobreexpresión de S100A6 en CPT vs. CFT, AF y tejido normal ($p<0,001$).
Kashat 2010 ⁽²⁶⁰⁾	48	<u>Líneas celulares</u> (CPT, y CAT) <u>Pacientes:</u> tejido y sangre (PTC y variantes, CPDT y CAT) <u>Ratones</u>	6 proteínas: nucleolina, CYR61 (CCN1), clusterina, enolasa 1, biotinidasa y PTMA, detectadas en pacientes con cáncer en comparación con los controles. Nucleolina sólo expresada en CAT
Krause 2011 ⁽²¹⁰⁾	27	Tejido normal, AF, CFT	Expresión proteica: 6 sobreexpresadas en CFT vs. AF y tejido normal: proteína SET, tioredoxina, amiloide- β A4, S100-A6, precursor de catepsina B, nucleósido difosfato quinasa A.
Sofiadis 2012 ⁽²⁶¹⁾	109	Tejido normal, CPT, CPT con antecedentes de irradiación, CFT y AF.	Proteína 14-3-3 (isoformas β/α , ϵ , y ζ/δ), anexina 5, tubulina cadena α 1B, peroxirredoxina 6, precursor de α 1-antitripsina, proteína ligada al selenio 1 y precursor de disulfuro isomerasa.

Fuentes: Krause 2009⁽²⁵¹⁾ y Cañadas Garre 2014⁽¹⁹⁴⁾.

AF: adenoma folicular, CFT: cáncer folicular de tiroides, CPT: cáncer papilar de tiroides, CAT: cáncer anaplásico de tiroides, CPDT: cáncer pobremente diferenciado de tiroides, CMT: cáncer medular de tiroides. kDa: dalton

Proteínas: Anexo IV

Estos estudios son limitados debido a las dificultades técnicas⁽²⁵¹⁾:

- En el proteoma tiroideo hay un rango muy amplio (de más de 10 órdenes de magnitud) en la cantidad de proteínas medibles.
- Amplias variaciones en la cantidad de Tg que hay cada muestra de tejido tiroideo (baja en las estructuras microfoliculares y alta en las macrofoliculares).
- La heterogenicidad de la propia muestra: folículos, estroma, vasos, eritrocitos, etc.
- Diversidad en la clasificación de las muestras tisulares.

- Necesidad de un personal altamente adiestrado y unos instrumentos costosos⁽²⁶²⁾.
- Dificultad de realización y escasa reproductibilidad⁽²⁶²⁾.

La unión de los datos proteómicos junto con los de perfil de expresión génica proporcionan una herramienta para profundizar en la biología molecular de los procesos patológicos, enlazando los eventos en la expresión de genes con las vías funcionales y revelando nuevas dianas para el diagnóstico y el tratamiento⁽²⁵¹⁾.

1.4.4. Metabolómica

Se define como el estudio, cualitativo y cuantitativo, de los metabolitos en un organismo, célula o tejido. De los miles (unos 41.993)^{*} de metabolitos conocidos, sólo algunos se han reconocido como marcadores moleculares.^(225, 226)

Hay algún estudio metabolómico en cáncer de tiroides⁽²²⁵⁾ que ha obtenido un perfil que define al AF, e incluso, dos marcadores específicos: *scyllo*- y mio-inositol. Otros estudios han encontrado diferencias significativas entre tejido normal y neoplásico, y entre nódulos benignos y malignos en función del perfil lipídico.

En cualquier caso será necesario conjugar los estudios metabólicos con los genéticos, transcriptómicos y proteómicos para un mejor conocimiento de los mecanismos de progresión del cáncer tiroideo⁽²²⁶⁾

1.4.5. Marcadores séricos

La búsqueda de un marcador sérico hasta ahora no ha dado muchos resultados⁽²¹⁶⁾. Algunos de los más estudiados se exponen a continuación.

1.4.5.1. TSH circulante

Boelaert *et al.*⁽¹¹⁸⁾, investigaron el valor predictivo de ésta, y encontraron que el riesgo de malignidad aumentaba con el incremento en su concentración, de tal forma que la prevalencia de cáncer pasaba del 2,8% cuando la TSH estaba por debajo de lo normal, al 29,6%, cuando estaba por encima ($p < 0,001$) con una OR ajustada de 11,18 ($p < 0,001$; IC 95%: 3,23-38,63). En esta misma línea han trabajado Haymart *et al.*⁽¹²⁶⁾, encontrando hasta un 46% de cánceres entre los pacientes que tienen niveles por encima de lo normal, y una relación significativa entre los niveles más altos de TSH y el estadio tumoral. Estos hallazgos han sido confirmados en un metaanálisis de 28 estudios (42.032 pacientes y 5.786 cánceres) concluyendo que los niveles altos de TSH se asocian con más riesgo de padecer cáncer tiroideo (hasta 3 veces más). Este riesgo se mantiene incluso dentro del rango normal (aumenta en dos veces con niveles entre 0,65 y 4 mU/l).

Por el contrario, en el estudio EPIC⁽¹²⁸⁾ con más de 500.000 pacientes y 357 casos de cánceres diferenciados tiroideos, los niveles de TSH circulantes fueron más bajos en los pacientes con lesiones malignas, con una media de 6,4 años entre la extracción de la muestra de sangre y el desarrollo tumoral. Este hallazgo, coherente con algún estudio genético, en el que los niveles bajos de TSH se asocian

* The Human Metabolome Database-HMDB v3.6 (<http://www.hmdb.ca>); acceso en septiembre de 2015.

a alteraciones del ADN⁽¹²⁹⁾, abriría una incógnita sobre el valor del tratamiento supresor de TSH en pacientes con CDT.

1.4.5.2. ARNm del receptor de TSH

Un paso más allá de la medición de la TSH ha sido medir el ARNm del TSH-R mediante reacción en cadena de la polimerasa tras transcripción inversa a tiempo real (qRT-PCR) en muestras de sangre venosa⁽²⁶³⁾. Se detectó con más frecuencia en CPT que en CFT, en tumores poco o nada diferenciados, y en bocio multinodular. En pacientes con citología indeterminada mejoró el diagnóstico preoperatorio al aplicar los niveles detectables del marcador (el VPP pasa del 75% al 90%) junto con los hallazgos ecográficos (97% S, 84% E, 88% VPP, 95% VPN y 91% de exactitud global de la prueba). Los autores del estudio obtuvieron cifras indetectables del marcador en el primer día postoperatorio tras tiroidectomía total en todos los pacientes con patología benigna, y en el 85% de los cánceres. Los casos restantes de patología maligna (15%), en los que no había descendido el marcador, fueron finalmente diagnosticados de persistencia o recidiva de la enfermedad durante el primer año. Según estos resultados, el ARNm de TSH-R podría ser de utilidad en el seguimiento de los pacientes tratados por carcinoma tiroideo, sobre todo en caso de presencia de AcTg⁽¹⁷⁴⁾. El test fue desarrollado y comercializado por la *Cleveland Clinic* pero no ha sido validado por estudios fuera de esta institución⁽²⁶⁴⁾.

1.4.5.3. Tg

El uso de la Tg como marcador de progresión tumoral es incuestionable, a pesar de la interferencia de los anticuerpos y la variabilidad en la sensibilidad de los distintos métodos para su determinación. Intentando evitar el efecto de los anticuerpos, se ha medido su ARNm (ARNmTg) en suero, mediante RT-PCR. Sin embargo, su utilidad se ha visto limitada por⁽²⁶⁵⁻²⁶⁷⁾:

- la inestabilidad de la molécula de ARN, que provoca una gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad,
- la presencia de ARNm-Tg de origen extratiroideo, y
- la pérdida de expresión de Tg en algunas recidivas.

En el estudio EPIC ya mencionado⁽¹²⁸⁾, detectaron niveles preoperatorios de Tg más altos en los pacientes que desarrollaron cáncer que en los casos control, con una correlación muy positiva entre lesión maligna y niveles de Tg, sobre todo para CFT. En cualquier modo no consiguen tener cifras de S o E suficientemente altas para avalar su uso como método diagnóstico preoperatorio.

1.4.5.4. Proteómica

Los estudios proteómicos en suero son una forma especial de proteómica. Se ha demostrado que la actividad de las exoproteasas contribuyen a generar péptidos séricos específicos de un cáncer. Es decir, diferentes tipos de tumor segregan distintas proteasas que mediante su acción catalítica, pueden generar un único perfil peptídico⁽²⁶⁸⁾. El resultado son proteínas de bajo peso molecular que muestran, de forma indirecta, la actividad enzimática de las células tumorales y que podrían servir como marcadores tanto en el diagnóstico como en la clasificación de la enfermedad⁽²⁶⁹⁾.

Siguiendo esta línea de investigación, Villanueva *et al.*⁽²⁶⁸⁾ han desarrollado un clasificador (*12-peptide thyroid cancer signature*) con el que diferenciaron a un paciente con cáncer del que no lo tenía con una S del 95% y una E del 95%. Los

péptidos implicados fueron: fibrinopéptido A, complemento C3f, precursor del complemento C4, cadena pesada H4 del inhibidor de la inter-alfa-tripsina, apolipoproteínas A-I, A-IV, C-I, E, precursor de clusterina, bradiquinina, quininógeno HMW, factor XIIIa y precursor de transtiretrina. También Linkov *et al.*⁽²⁷⁰⁾ han conseguido un panel de marcadores que incluye a IL-8, HGF, MIG, IL-12p40, con una ABC del 80.3% (IC 95%: 0,62-0,90).

Por su parte, Moretz *et al.*⁽²⁶⁹⁾ lograron diferenciar CPT de enfermedad benigna tiroidea, basándose sobre todo en que la proteína de 11.101 daltons (Da) estaba infraexpresada en CPT. Aunque es un estudio piloto con una muestra pequeña, refleja la potencialidad de los estudios proteómicos en suero.

De mucha mayor envergadura es el estudio de Wang *et al.*, con 101 muestras de suero (CPT y alguna muestra de otros tipos de cáncer tiroideo, tejido normal y enfermedad benigna tiroidea)⁽²⁷¹⁾. Sus resultados son también prometedores, encontrando varios perfiles de expresión proteica (Tabla 12).

Tabla 12 Perfiles de expresión proteica en suero

Perfil de expresión	m/z (Da)*
CPT vs. tejido sano	Sobreexpresados en CPT: 2672 Sobreexpresados en tejido sano: 6651, 3319, 5597, 6837, 6855, 6984
CPT vs. enfermedad benigna	Sobreexpresados en CPT: 8762, 4530, 14 115, 4538 Sobreexpresados en enfermedad benigna: 3938, 2799
Estadio I-II vs. III-IV	Sobreexpresados en I-II: 228, 2210, 2085 Sobreexpresados en III-IV: -
CPT vs. no CPT	4138, 5842, 11 680, 13 953

*Proteína según su masa en daltons (Da) en el espectrómetro de masas

Otras proteínas estudiadas en sangre de pacientes con cáncer tiroideo son nucleolina, CYR61 (CCN1), PTMA, clusterina, enolasa 1, y biotinidasa⁽²⁶⁰⁾ e incluso se ha identificado un perfil proteico capaz de distinguir a los pacientes que captarán ¹³¹I de los que no (92,6% S, 85,7 E, y exactitud del 90,2%)⁽²⁷²⁾.

1.4.5.5. Epigenética

El ADN metilado circulante en sangre ha sido utilizado por Hu *et al.*⁽²¹⁶⁾ como marcador diagnóstico de cáncer tiroideo por varias razones: la metilación ocurre comúnmente en los cánceres, el ADN metilado es liberado por el tumor hacia el suero, el ADN es una molécula estable y, además, se puede cuantificar mediante PCR específica. Con un set de 5 genes (CALCA, CDH1, TIMP3, DAPK, RAR β 2) se ha encontrado metilación positiva en el 70% de los tumores malignos (incluidas las recidivas), mientras que en el 95-100% de los casos benignos los niveles de metilación estaban por debajo del corte (S= 68% y E= 95%). Es de destacar que un 21% de las recidivas detectadas mediante la metilación, no fueron detectadas por ningún otro medio.

1.4.5.6. miRNA circulantes

Como se ha descrito en la sección 1.3.3., los miRNA pueden ser útiles en la discriminación entre nódulos tiroideos benignos y malignos, pero también se ha descrito el potencial de los miRNA circulantes como marcadores no invasivos en otros tumores. Los miRNA se vierten a la circulación bien a través de la membrana

celular, rápidamente degradados por ARNasa, bien unidos a proteínas o en microvesículas, en cuyo caso se evita la degradación. Son estos miRNA vertidos por células enfermas los que se estudian como marcadores diagnósticos, pronósticos, de progresión tumoral o como herramientas de estadificación⁽¹⁷⁴⁾.

Yu *et al.*⁽²⁷³⁾ compararon el perfil de miRNA circulante en pacientes con CPT, nódulos benignos y controles sanos. Los niveles séricos de let-7e, miR-151-5p y miR-222 fueron significativamente más altos en CPT que en patología benigna o en controles sanos. También se analizó su relación con características clinicopatológicas de los pacientes, demostrando que los niveles de miR-151-5p y miR-222 se asociaron a afectación ganglionar, los de let-7e a tumores multifocales, y miR-151-5p y miR-222 a un mayor tamaño tumoral y un estadio más avanzado, respectivamente.

Se ha comprobado que los niveles séricos de miR-222 y miR-146b⁽²⁷⁴⁾ bajan a menos de la mitad tras la tiroidectomía total, por lo que los autores concluyen que podrían ser una alternativa a la Tg en el seguimiento de los pacientes.

1.4.5.7. Serological analysis of recombinant cDNA expression cloning (SEREX)

Se basa en la respuesta inmune frente al cáncer^(275, 276). Esta técnica permite identificar en el suero antígenos asociados a un determinado tumor y sus anticuerpos. Hasta ahora, prácticamente no ha sido usada en estudios de cáncer de tiroides⁽²⁷⁷⁾.

Basándose en esta estrategia, Izawa *et al.*⁽²⁷⁸⁾ estudian la presencia de WDR1 y su respectivo anticuerpo (AWA) en un conjunto de pacientes con patología tiroidea, incluyendo CPT, CAT, AF y nódulos adenomatosos. Aunque AWA no es específico del tiroides, en la serie estudiada encontraron que sus títulos séricos eran más altos en cáncer que en patología benigna ($p < 0,001$).

1.4.5.8. Otros

Runx2 es un gen con un papel importante en la diferenciación mesenquimal de las células osteogénicas, estudiado en CPT en virtud de su expresión en líneas celulares de CPT humano y su papel en el desarrollo de otras neoplasias. Los niveles de ARNm-Runx2, medidos mediante RT-PCR en suero, son más altos en el 75% de CPT comparado con patología nodular benigna ($p < 0,001$), es detectable en la PAAF y también se relaciona con la presencia de microcalcificaciones⁽²⁷⁹⁾.

Saussez *et al.*⁽²⁸⁰⁾ investigan si, al igual que en la expresión tisular, las diferencias en los niveles séricos de GAL3, pueden discriminar la patología benigna de la maligna. Para ello determinan de forma prospectiva concentraciones de distintas galectinas mediante ELISA. Pero, aunque las galectinas 1 y 3 están más elevadas en los pacientes con patología maligna, hay una superposición considerable entre las concentraciones en ambos grupos, por lo que su capacidad discriminativa no es muy buena (73% S, 74% E, 57% VPP y 85% VPN, usando un valor de corte de 3,2 ng/ml).

Además de GAL3, Makki *et al.*⁽²⁸¹⁾ han investigado otros marcadores consistentemente sobreexpresados en cáncer tiroideo y con kits diagnósticos de ELISA disponibles (YKL-40, CK19, TIMP-1, Ang-1) sin encontrar diferencias significativas en sus niveles séricos al comparar patología benigna o maligna. Los más prometedores fueron GAL3 ($p = 0,48$) y TIMP-1 ($p = 0,48$)

En pacientes con cáncer de tiroides asociados a síndrome de Cowden se han medido los niveles séricos proteicos de PTEN para predecir mutaciones germinales del mismo gen⁽²⁸²⁾, demostrando que niveles bajos de la proteína predicen estas mutaciones con una S del 96,3%, una E del 74,95% y un VPN del 99,7%.

1.4.6. Marcadores relacionados con el pronóstico

Los estudios moleculares no solo han encontrado numerosos marcadores con valor diagnóstico más o menos validado, sino que también han identificado a muchos de ellos que tienen valor pronóstico (real o potencial), al relacionarse con características clínico-patológicas que condicionan la progresión tumoral.

1.4.6.1. Estudios de expresión génica

En estos estudios se han encontrado genes relacionados con:

- Mortalidad:
 - Por CFT: la pérdida de heterocigosidad del gen VHL (Von Hippel Lindau)⁽²⁸³⁾, la expresión de proteína p53⁽²⁸⁴⁾.
 - Por CPT: CPSF2, LARS, AURKC, TRNT1, and BCL11A⁽²⁸⁵⁾.
- Disminución de la supervivencia libre de enfermedad: pérdida de expresión de la biotinidasa⁽²⁸⁶⁾, pérdida de la expresión de CPSF2⁽²⁸⁵⁾, sobreexpresión de ALDH1A1⁽²⁸⁷⁾.
- Estadio más avanzado y/o extensión extratiroidea de la enfermedad: ECM1, EGFR, EFNB2⁽²⁸⁸⁻²⁹⁰⁾, MCM7⁽²⁹¹⁾, expresión de HIF-1 α , MT y SLUG⁽²⁹²⁾, GLI1 y GLI2⁽²⁹³⁾, niveles séricos altos de ALCAM y AXL⁽²⁹⁴⁾, sobreexpresión de ALDH1A1⁽²⁸⁷⁾, niveles altos de TSH⁽²⁹⁵⁾, CCR7 y CXCR4⁽²⁹⁶⁾, metilación de p16⁽²⁹⁷⁾, infraexpresión de ITIH5⁽²⁹⁸⁾, infraexpresión citoplasmática de GAL3⁽²⁴⁶⁾, c-MET⁽¹⁸³⁾, hipometilación de RASSF1A.
- Invasividad del CFT: algoritmo basado en la expresión de TERT, TFF3, PPAR γ , CITED1, EGR2⁽²⁹⁹⁾ o la combinación de NID2, TM7SF2, TRIM2, y GLTSCR2⁽³⁰⁰⁾.
- Metástasis ganglionares: EFNB2⁽²⁸⁹⁾ VEGF⁽³⁰¹⁾, ERAP2 en miCPT⁽³⁰²⁾, expresión de HIF-1 α , MT y SLUG⁽²⁹²⁾, expresión de TGFB1, SNAI1 y MMP-9⁽³⁰³⁾, GLI1 y GLI2⁽²⁹³⁾, niveles séricos altos de ALCAM y AXL⁽²⁹⁴⁾, expresión de GPER1, EGFR y CXCR1⁽³⁰⁴⁾, niveles altos de TSH⁽²⁹⁵⁾, CCR7 y CXCR4⁽²⁹⁶⁾, E-CAD⁽³⁰⁵⁾, c-MET⁽¹⁸³⁾, CLDN10, HMGA2, and LAMB3⁽³⁰⁶⁾.
- Metástasis a distancia: VEGF⁽³⁰¹⁾, pérdida de expresión de p27 y sobreexpresión de ciclina D1⁽¹²⁰⁾ en CPT metastásico, inmunorreactividad a MK y NF- κ B en metástasis sincrónicas⁽³⁰⁷⁾, expresión de NCAM⁽³⁰⁸⁾.
- Recidiva tumoral: expresión de VEGF⁽³⁰⁹⁾ pérdida de la expresión de CPSF2⁽²⁸⁵⁾, reactividad restringida de AcTg⁽²⁹⁵⁾.
- Invasión vascular y/o linfática: CCR7 y CXCR4⁽²⁹⁶⁾.
- Desdiferenciación tumoral: Montero-Conde *et al.*⁽³¹⁰⁾ describen un perfil de expresión diferente entre tumores diferenciados y no diferenciados, consiguiendo un clarificador pronóstico con 23 genes y 6 secuencias breves de expresión (EST), que incluyen entre otros a BIRC5, CENPA, UBE2C and ANLN.
- Variantes agresivas: niveles séricos altos de ALCAM y/o AXL⁽²⁹⁴⁾, c-MET⁽¹⁸³⁾.

1.4.6.2. Mutaciones somáticas con valor pronóstico

- La mutación BRAF^{V600E}, de la que ya se ha hablado ha sido relacionada en bastantes estudios con datos de mal pronóstico. En un reciente metaanálisis⁽³¹¹⁾, los pacientes mutados tienen un riesgo de invasión extratiroidea, afectación ganglionar, estadio TNM avanzado, recidiva y persistencia entre 1,5 y 2 veces más alto que los no mutados. Se ha relacionado también con la progresión tumoral hacia un tumor menos diferenciado y a la pérdida de respuesta a la terapia estándar⁽³¹²⁻³¹⁴⁾.

- En un estudio muy interesante en tumores poco o nada diferenciados, y resistentes a ¹³¹I se han encontrado diferentes estados mutacionales de RAS y BRAF⁽³¹⁵⁾. Así, la prevalencia de mutaciones RAS es más alta en CPDT, salvo cuando captan ¹⁸FDG, en cuyo caso la prevalencia de BRAF^{V600E} es mayor. En CAT también es más frecuente la mutación BRAF^{V600E}, así como en las metástasis de CPT radioinducido. En este mismo estudio se observa que la concordancia entre mutación de BRAF o RAS en el tumor primario y en las metástasis es alta, mientras que no lo es en las mutaciones de PIK3CA y AKT1. Esta última se ha identificado únicamente en las metástasis. Dado que las mutaciones en RAS son también frecuentes en neoplasias benignas o poco agresivas, su valor como marcador pronóstico es más limitado pero se suele asociar con fenotipos agresivos de CPT, y con CPDT⁽³¹⁶⁾.

- PAX8-PPAR γ se ha relacionado con multifocalidad y la invasión vascular^(178, 186).

- La actividad de la telomerasa, se estudió a finales de los 90 en el cáncer tiroideo. Su aumento se detectó sobre todo en el cáncer folicular y se asoció a mayor agresividad biológica⁽¹⁶⁶⁾. Varios estudios relacionan la actividad de la telomerasa con más edad, la variante de células altas, la extensión extratiroidea, la recidiva, y las metástasis a distancia, aunque otros grupos no hallaron actividad de telomerasa en tumores malignos⁽⁹²⁾.

Recientemente se han descrito mutaciones (C228T, C250T) en el gen promotor de TERT responsables de la reactivación/expresión de TERT en varios tipos de cáncer, entre ellos en el 10% de los cánceres tiroideos⁽³¹⁷⁾. Se ha encontrado tanto en tumores diferenciados (algo más en CFT), como, con más frecuencia, en el CPDT y CAT, no habiéndose identificado en neoplasias benignas⁽³¹⁷⁻³²⁰⁾. Se asocian a características de peor pronóstico: más edad, mayor tamaño, sexo masculino, mutación BRAF^{V600E} y presencia de metástasis ganglionares o a distancia^(317, 318). En CPT o CFT se vinculó a la persistencia de la enfermedad y a mortalidad específica⁽³¹⁸⁾. Las mutaciones en TERT se han determinado en muestras de BAG, con PAAF indeterminada previa, confirmando que todos los CPT detectados con mutación positiva fueron localmente invasivos, con una prevalencia entre éstos del 17,6%⁽⁶⁵⁾.

- Mutaciones consideradas como marcadores de desdiferenciación son: p53, PIK3CA, CTNNB1 (β -catenina), AKT1^(92, 166, 174, 284, 321).

1.4.6.3. Otros

Algunos miRNA se han relacionado con datos de mal pronóstico:

- miR-199b-5p con extensión extratiroidea y metástasis a ganglionares⁽³²²⁾.
- miR-9 y miR-21 con recidiva en CPT⁽³²³⁾.
- miR-146b, miR-221 y miR-222 se han relacionado en varios estudios con extensión extratiroidea, afectación ganglionar, metástasis a distancia, recidiva y

mutación BRAFV600E, así como la infraexpresión de miR-34b y miR-130b (recidiva y metástasis a distancia)⁽²²²⁾.

La molécula de adhesión epitelial (EpCAM) se ha usado para hacer un predictor numérico utilizando anticuerpos específicos frente a los dominios intra (Ep-ICD) y extracelular (Ep-Ex) de la misma⁽³²⁴⁾. El aumento intranuclear y citoplasmático de Ep-ICD predice peor pronóstico en cáncer de tiroides, y la pérdida en membrana de Ep-Ex se asocia a menor supervivencia global⁽³²⁴⁾. El clasificador (ESLI o *Ep-ICD subcellular localization index*) mejora la identificación de CPT agresivo ya que los pacientes con ESLI>10 tienen reducida su supervivencia libre de enfermedad ($p<0,05$). También se ha relacionado específicamente con la afectación ganglionar y la presencia y/o desarrollo de metástasis a distancia en miCPT⁽³²⁵⁾.

1.5. ESTUDIOS DE PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS

1.5.1. Base biológica de los microarrays

Un gen es un fragmento de ADN, de longitud variable, que contiene la información necesaria para sintetizar una proteína. Los genes, a su vez, están agrupados en cromosomas, localizados en el núcleo celular. La composición básica del ADN son los nucleótidos: un grupo fosfato, un azúcar (desoxirribosa) y una de las 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina), que se complementan entre sí⁽³²⁶⁾.

La síntesis de proteínas se inicia con la transcripción del ADN a ARN, proceso en que la doble cadena de ADN se despliega y una de ellas es usada de molde para generar otra cadena simple y complementaria (donde en vez de timina se usa uracilo). A partir de este ARNm se sintetizan las proteínas (transducción) teniendo en cuenta que son necesarias tres bases de ADN (codón) para codificar un aminoácido concreto. Así, un gen estará activado o expresado durante el proceso de sintetizando de su proteína correspondiente⁽³²⁷⁾. Se podría definir transcriptoma como el conjunto completo de ARN transcrito desde el genoma⁽²²⁴⁾.

La técnica de análisis de expresión génica mediante microarrays se basa en la complementariedad de las bases de los ácidos nucleicos lo que permite la hibridación. Mediante este proceso, dos cadenas complementarias de ácido nucleico se unen para formar una molécula de doble cadena: ADN-ADN, ARN-ARN o ADN-ARN⁽³²⁸⁾.

1.5.2. Concepto de microarray

Un array es una colección de ADN, en la que un gran número de moléculas de ADN se dispone ordenada sobre un sustrato sólido, formando una matriz bidimensional de secuencias. Estos fragmentos de material genético inmovilizados en un soporte, son denominados sondas, mientras que el ácido nucleico que procede de la muestra a estudio se denomina diana⁽³²⁹⁾.

Con esta tecnología, se puede analizar simultáneamente el nivel de expresión de miles de genes, en una célula concreta, en un momento determinado y bajo unas condiciones específicas. Su aplicación en distintos ámbitos (identificación de perfiles genéticos, detección de mutaciones y polimorfismos, secuenciación, diagnóstico molecular) ha permitido identificar genes clave de las vías de transmisión de señales y de la carcinogénesis, reconocer nuevas dianas para medicamentos, encontrar marcadores moleculares diagnósticos de enfermedades o con valor pronóstico, e investigar las bases genéticas de una respuesta individual a factores externos (seguimiento de terapias, toxicología de fármacos)^(327, 329, 330).

1.5.3. Tipos de microarrays

Los microarrays se pueden clasificar de diferentes formas. Según los soportes usados pueden ser porosos (membranas de nylon, nitrocelulosa o micropartículas) y lisos (cristal, cuarzo o plástico) mientras que según el material genético de la sonda distinguimos tres tipos: de ADN (oligonucleótidos y ADNc), de proteínas y de tejidos. También los podemos clasificar en función de su aplicación, en cuyo caso tendremos chips de secuenciación, de hibridación comparativa o de expresión⁽³²⁹⁾.

Estos últimos son los que hemos usado en nuestro estudio y son descritos con más detalle más adelante.

- *Microarrays de ADNc*

El método de producción de las sondas es la amplificación selectiva de ADNc mediante PCR, usando fragmentos de doble cadena de ADN de entre 200 y 500 pares de bases en soportes de vidrio de 96 ó 384 pocillos^(326, 330).

- *Microarrays de oligonucleótidos*

Las sondas son cadenas simples de ADN sintético, cortas (15-25 nucleótidos) o largas (50-120 nucleótidos)⁽³²⁶⁾.

- *Microarrays de proteínas*

Las sondas son anticuerpos en soportes de cristal y las dianas son muestras de suero o tejido. El uso de éstos está limitado por las dificultades técnicas que conlleva sintetizar e inmovilizar estructuras tridimensionales como son las proteínas, detectar interacciones de proteínas plegadas, o disponer de colorantes fluorescentes que permitan una cuantificación adecuada⁽³²⁶⁾.

- *Microarrays de tejidos (TMA, Tissue MicroArray)*

En este caso, en lugar de ADN, se utilizan secciones mínimas de tejido representativas del tumor. Se analiza así la expresión de un determinado marcador en un gran número de muestras. Son una herramienta muy útil para el análisis de nuevos genes y para establecer diferencias moleculares entre los distintos grupos investigados⁽³²⁶⁾.

1.5.4. Microarrays de expresión

Se caracterizan porque las sondas son moléculas de ADN (oligonucleótidos o ADNc) ordenadas de tal forma que cada punto del microarray corresponde a un gen en concreto. Puesto que cada secuencia de ADN se corresponde con una secuencia complementaria de ARNm, y ésta, a su vez, con una proteína, la cantidad de ARNm proporciona una estimación, bastante real, tanto del nivel de expresión del gen como de la cantidad de proteína codificada⁽³²⁶⁾.

Cada microarray puede contener, en una superficie de 2 x 2 cm, más de 10.000 sondas, por lo que podemos conseguir información sobre la expresión de miles de genes⁽³²⁷⁾. Para poder distinguir un gen de otro, las sondas están construidas con la información de las secuencias de ADN o ARN disponibles en las bases de datos públicas, que además están interconectadas entre sí. Las más importantes son*:

- GenBank: *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

* http://bvs.isciii.es/bib-gen/Actividades/curso_virtual/Ftes_informacion/fteinformacion1_1.htm;
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna/>

- Unigene: en esta base de datos, cada entrada es un grupo o una colección de secuencias de ARNm o de EST que representan un único gen. También analiza la expresión por tejido, edad y estado de salud, e indica las proteínas relacionadas con dicho gen, así como información para mapear su posición en el genoma.
- La colección *Reference Sequence* (RefSeq): proporciona un conjunto ordenado, integrado, no redundante y bien definido de secuencias de ADN genómico, ARN y proteínas.
- dbEST: contiene datos de secuencias de ADNc o ESTs de diferentes organismos.
- EMBL *Nucleotide Sequence Database: European Bioinformatics Institute*⁽³³¹⁾
- *DNA Database of Japan* (DDBJ): *National Institute of Genetics*

1.5.4.1. Procedimiento para el análisis de expresión génica

El proceso^(326, 327) comienza con la obtención del ARN de las células de las muestras a estudiar y su transformación en ADNc mediante RT. Este paso es necesario dada la inestabilidad del ARN. La muestra diana se marcará con una molécula fluorescente (fluorocromo o biotina) y se hibridará con las sondas del microarray (análisis de expresión de un color). Habrá tantas sondas como genes se quieran estudiar, hasta el genoma completo. En otros casos, para evitar la variabilidad en el procedimiento, se diseñan los experimentos en competición, es decir, comparando sobre un mismo microarray dos muestras de tejidos diferentes, que hibridarán simultáneamente y de forma competitiva, p.ej. tejido tumoral y tejido sano del mismo sujeto, marcando cada uno con un fluorocromo distinto (análisis de expresión de dos colores, generalmente uno verde y uno rojo), tal y como se puede ver en la Fig. 9.

Las muestras a estudiar se cargan en el soporte del microarray, y por difusión se mueven hasta encontrar la sonda que contiene su molécula complementaria, donde se hibridan y quedan fijadas.

Transcurrido el tiempo adecuado para que la mayoría de las cadenas hibriden, el microarray se lava y se procede a su lectura para medir la cantidad de ARN que ha quedado fijada cada sonda. Sólo en los puntos del microarray donde haya ocurrido hibridación habrá fluorescencia y la intensidad de la fluorescencia detectada será proporcional al nivel de expresión del gen en estudio. Para poder realizar esta medición, se activan los colorantes mediante láser y después se mide la intensidad y el color de la luz emitida por cada punto.

La lectura o escaneado se debe hacer con dispositivos capaces de detectar los dos espectros de emisión en canales diferentes y de generar imágenes por separado de cada uno de ellos. El análisis de éstas se realiza mediante programas informáticos que cuantifican la señal de cada punto del soporte generando un archivo de imágenes, que en caso de experimentos con dos colores, resulta de la superposición de las imágenes obtenidas de cada colorante. De esta forma, los puntos rojos o verdes indican que esos genes están expresados en una condición o en otra (p.ej. tejido sano vs. tumoral o benigno vs. maligno), mientras que los puntos amarillos significan que están expresados en ambas situaciones (Fig. 9). En caso de experimentos con un color, se obtienen las imágenes por separado y el *software* del escáner combina los resultados.

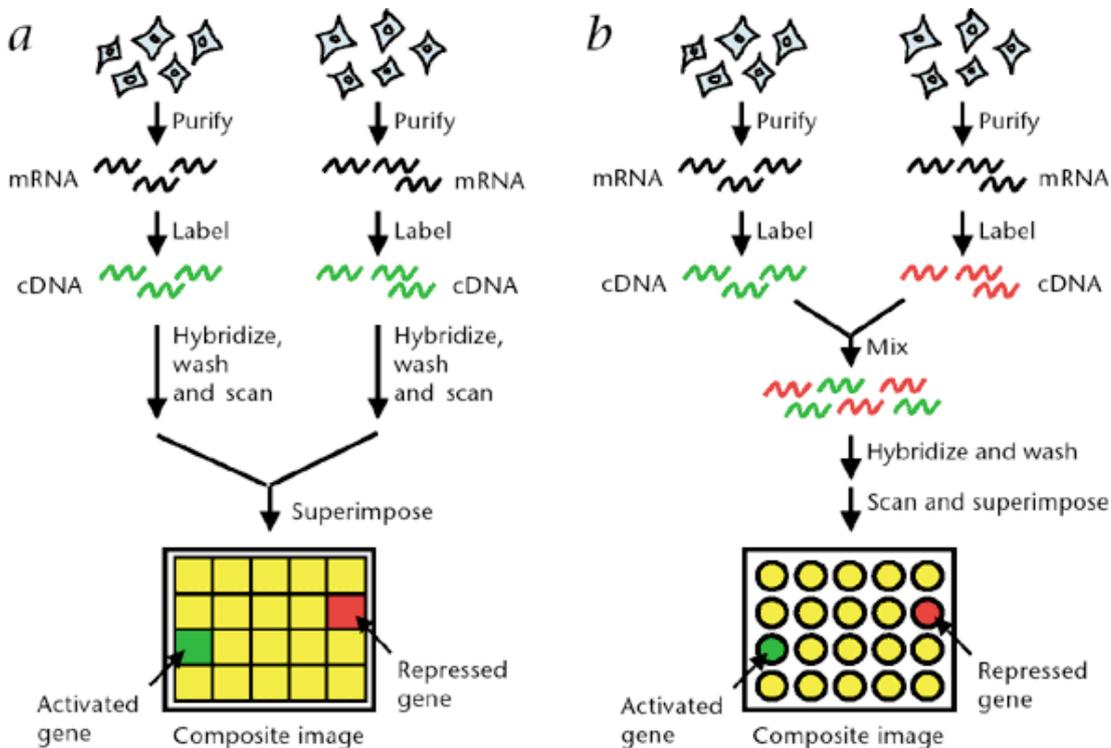
Fig. 9 Tipos de análisis de expresión con microarrays

a) Análisis de un color: se usa sólo un marcador fluorescente (líneas verdes) y dos chips, uno por muestra. Los genes expresados (verdes) y no expresados (rojos), se obtienen al superponer ambas imágenes.

b) Análisis de dos colores: se usan dos marcadores (líneas verdes y rojas) y un único chip para obtener la expresión de dos muestras diferentes. Los genes expresados (verdes) y no expresados (rojos), se obtienen al superponer ambas imágenes, generadas en dos canales diferentes de un mismo microarray.

c) Los genes igualmente expresados en las dos muestras aparecen de color amarillo.

(Reproducida con permiso: Macmillan Publishers Ltd: [Nature Medicine](#) 9, 140- 145, ©2003).

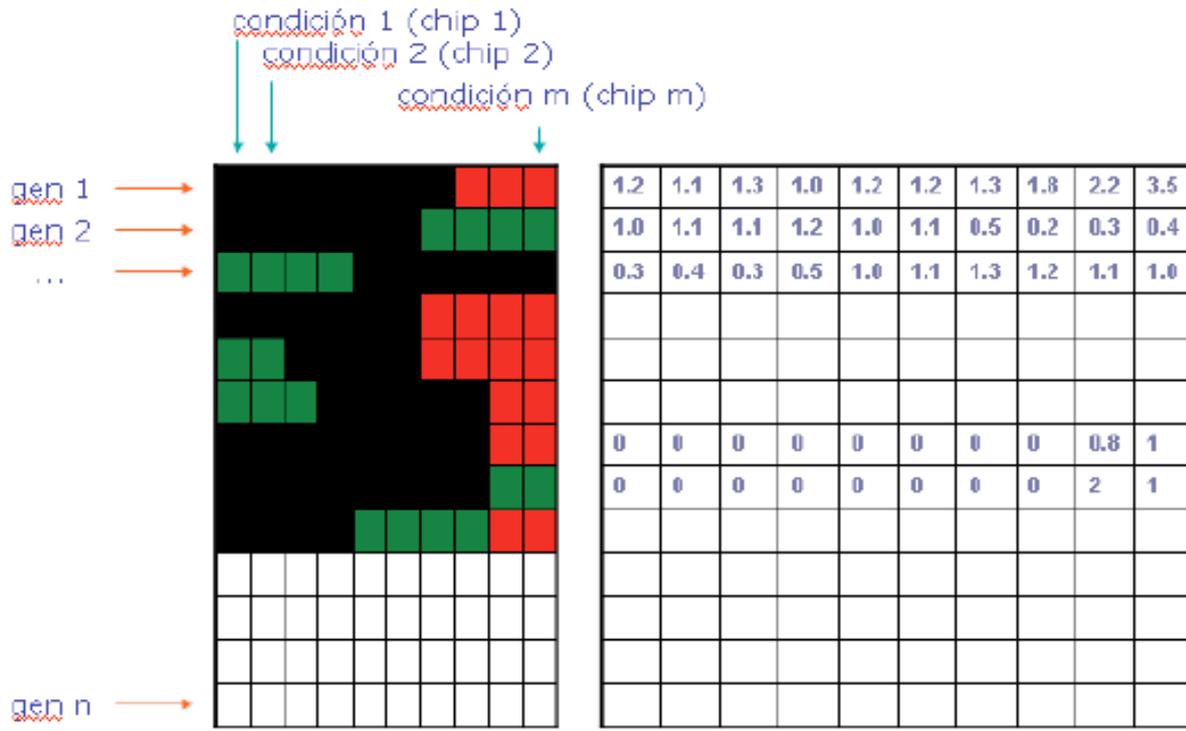


La gran cantidad de ARN necesario (20-75 μg) es uno de los inconvenientes de este diseño de estudio pero puede ser subsanado obteniendo ARN copia (ARNc) mediante transcripción *in vitro* del ARN original de la muestra. La cantidad disminuye mucho (0.2-2 μg) pero tiene la desventaja de que sólo se puede procesar una muestra por microarray⁽³²⁶⁾.

1.5.4.2. Análisis estadístico de los datos

Trata de transformar las intensidades de las señales obtenidas en datos numéricos (datos brutos) cuyo resultado final es una matriz de expresión (Fig. 10) que contiene el nivel de expresión de los genes, estando localizados éstos en las filas (un gen para cada fila) y los experimentos en las columnas (una muestra por columna)⁽³²⁶⁾.

Fig.10 Matriz de expresión genética

Fuente: Cano Gutiérrez 2010⁽³³²⁾

- *Preprocesado y normalización de los datos*

Existen numerosas plataformas o programas informáticos para el preprocesamiento, normalización y análisis estadístico de los datos brutos de una matriz de expresión⁽³³²⁾.

El primer paso es el control de calidad de los datos para detectar los valores incorrectos que deban ser excluidos del análisis. Un método para encontrar estos errores es diseñar los microarrays para que haya réplicas de una misma sonda. Al comparar las réplicas, se identifican los casos discordantes. También se pueden poner límites de tolerancia en los indicadores de calidad para los puntos de luz⁽³²⁷⁾. Otra forma de obtener réplicas radica en realizar la hibridación de un mismo ARN en más de un microarray⁽³²⁶⁾. Se admite una variación del 5-10% en las intensidades de señal entre los elementos replicados de un mismo array, y entre el 10-30% cuando son diferentes⁽³³³⁾.

El siguiente paso consiste en la normalización de los datos para eliminar la variabilidad que no está relacionada con el nivel de expresión sino con el proceso técnico de hibridación de los arrays⁽³²⁷⁾. De esta forma se reducen las diferencias entre los dos canales de una hibridación competitiva o entre distintas hibridaciones.

El nivel de expresión de un gen en un microarray de ADNc se expresa como el cociente del valor de expresión de la muestra a estudio respecto al valor de la muestra de referencia (p.ej. tejido maligno/tejido benigno). Todos los valores entre 1

e infinito (∞), indican sobreexpresión del gen en la muestra objetivo, mientras que valores entre 0 y 1, indican infraexpresión. Para igualar las amplitudes de ambos rangos, se realiza una transformación logarítmica o escalado de los datos de expresión, quedando trasladados a un rango de $-\infty$ a $+\infty$, de tal forma que los valores positivos son los genes sobreexpresados y los negativos, los infraexpresados⁽³³²⁾.

También es necesario utilizar algún método para recuperar los datos perdidos por fallo en el proceso de hibridación y la medición de la intensidad de la luz resultante. Se pueden usar técnicas basadas en medias condicionales del gen respecto al conjunto de los microarrays o respecto a los valores de los puntos vecinos^(327, 332). Por último se eliminan los datos planos, es decir, aquellos patrones que no presenten un número determinado de valores que superen, en valor absoluto, un valor umbral⁽³³²⁾.

- *Análisis de los datos*

El objetivo del análisis estadístico es darnos a conocer qué genes cambian su nivel de expresión en función de la muestra analizada (siguiendo nuestro ejemplo, muestra normal vs. maligna o muestra benigna vs. maligna). En general, en los experimentos con microarrays se emplean pocos casos pero se investigan las diferencias en miles de variables (genes), por tanto las técnicas estadísticas clásicas han de ser modificadas teniendo en cuenta que no puede asegurarse la normalidad de la distribución y que puede haber una tasa muy alta de falsos positivos dada la multiplicidad de hipótesis aprobadas. Una de las soluciones propuestas son los test de permutaciones⁽³²⁷⁾.

- Análisis de Significación de Microarrays (SAM)*

SAM (*Significance Analysis of Microarrays*)⁽³³⁴⁾ es una técnica basada en el t-test (comparación de la media entre 2 grupos diferentes) que permite identificar los genes que cambian su comportamiento de forma significativa en un conjunto de experimentos con microarrays. En ella se utilizan permutaciones de los datos y se corrigen éstos mediante el cálculo de FDR (*False Discovery Rate*) para evitar diferencias no significativas.

- Agrupamiento (clustering)*

Una vez definidos los genes con diferencias de expresión, se pueden buscar patrones para intentar clasificar las muestras. Un modo es el análisis de agrupamiento jerárquico o *clustering* de la matriz de expresión, que reúne los distintos genes basándose en la similitud de su perfil de expresión^(326, 327). El resultado final es un gráfico en forma de árbol (dendograma), que establece una relación ordenada y secuencial de los genes.

1.5.5. Validación de los resultados de los experimentos con microarrays

Los resultados de los estudios de perfil génico con microarrays deben ser validados con técnicas que permitan una cuantificación precisa del ARN de los genes identificados⁽³³⁵⁾. Se han usado diferentes métodos para este fin (Northern Blot, hibridación in situ, etc.)⁽³³⁶⁾ pero el nivel de sensibilidad, precisión y facilidad técnica de la qRT-PCR la hacen el método idóneo para este fin^(335, 336). Mediante esta técnica se logra una buena correlación entre los datos generados y los niveles de ARNm en las muestras a estudio, además de necesitar mínimas cantidades de

material en comparación con las otras técnicas (20-40 ng vs. >5 µg)^(337, 338). De hecho, es la única prueba que se puede realizar cuando los tejidos investigados son raros o únicos⁽³³⁷⁾.

- PCR

La técnica de PCR es una amplificación enzimática de ADN, utilizando una ADN polimerasa termoestable que genera copias de una secuencia específica de ADN, siendo éste un proceso de naturaleza exponencial⁽³³⁶⁾.

- Transcripción inversa (RT).

Puesto que el ARN no es útil para la amplificación por PCR (por su sensibilidad al calor y por ser un ácido nucleico monocatenario) es necesario convertirlo en ADN mediante la transcripción inversa generándose una copia en forma de ADNc. Este es más estable al calor y puede almacenarse indefinidamente⁽³³⁶⁾.

- qRT-PCR

La aplicación de técnicas de fluorescencia junto con la aparición de dispositivos que permiten la automatización de todos los procesos (amplificación, detección y cuantificación) ha permitido el desarrollo de la metodología RT-PCR cinética (también llamada cuantitativa a tiempo real) que detecta los productos amplificados en cada ciclo de la reacción e indica la cantidad de ácido nucleico presente en la muestra. Cuanto más molde (ADN) haya al inicio de la reacción, menor número de ciclos son necesarios para alcanzar el momento en que la fluorescencia sea detectada de forma significativa. Este punto, que se denomina ciclo umbral (C_t), es proporcional a la cantidad de ADN de partida y siempre ocurre durante la fase exponencial de la amplificación⁽³³⁶⁾. Este valor se obtiene para cada muestra y es convertido en un dato cuantitativo en forma de curva estándar.

Dado que puede haber errores de cuantificación dependiendo de cualquier mínima variación en la cantidad de las muestras iniciales, es necesario incluir un control interno. Para ello se amplifica, junto con la muestra a estudio, un ARN que sirve de referencia para normalizar los resultados. Estos genes de referencia (*housekeeping gene*) no deben cambiar su expresión aunque cambie el tipo de tejido de un organismo, su grado de desarrollo o las condiciones externas. Los tres más usados son los ARNm de la gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) y la β -actina, y los ARN ribosómicos (ARNr). Los datos son expresados como el número de veces en el que aumentaron o disminuyeron los niveles de ARNm con respecto al control interno⁽³³⁶⁾.

1.5.6. Reproducibilidad e intercambio de los resultados de los microarrays

Como se ha expuesto, existen diferentes tecnologías para la medición de la expresión genética por lo que se abre la cuestión de si los resultados son fiables y comparables entre sí. Para responderla, la *US Food and Drug Administration* (FDA) auspició el consorcio para el Control de Calidad de los Microarrays (*MicroArray Quality Control consortium: MAQC*)⁽³³⁹⁾ con la finalidad de evaluar las diferentes plataformas de expresión génica desarrolladas hasta entonces. Los autores concluyeron que los resultados eran consistentes tanto dentro de cada plataforma como al comparar unas con otras, y que las listas de genes generadas eran más reproducibles cuando se seguía el criterio del doble cambio de expresión que si las

diferencias habían sido obtenidas mediante el valor p en un t-test. De este estudio se derivó también la producción de una base de referencia frente a la que comparar y validar cualquier modificación en las plataformas de microarrays existentes. Actualmente las muestras de ARN humano están disponibles comercialmente y se pueden usar como instrumento de calibración y de control de calidad, así como para validar los estudios de expresión realizados (*Stratagene Universal Human Reference ARN*, compuesta por ARN de 10 líneas celulares diferentes, o *Ambion Human Brain Reference RNA*).

Por otro lado, para poder reproducir un experimento con microarrays, parece evidente que es necesario dar a conocer de forma detallada la metodología utilizada. Es más, sería conveniente que los datos brutos y procesados permitieran a otros realizar análisis y metaanálisis. Es por ésto que los miembros de la *Function Genomics Data Society*, disponible en www.FGED.org crearon los criterios MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) que definen los modelos para la descripción de los experimentos con microarrays y para el intercambio de datos⁽³²⁸⁾.

1.5.7. Aplicaciones de los microarrays de expresión

Existen multitud de campos a los cuales se puede aplicar el estudio mediante microarrays de expresión^(328, 329). En el ámbito de la investigación biomédica se encuentran:

- Análisis de expresión genética. El patrón de expresión de un gen proporciona información sobre su función cuando se analiza en tejidos o células normales. También podemos obtener datos sobre su comportamiento en diferentes condiciones experimentales, comprobando si la sobre o la infraexpresión son causantes de patología. Finalmente se usan en patógenos como los virus para determinar qué genes están implicados en el proceso de infección o en el periodo de latencia.

- Generación de nuevos fármacos. Identificación de dianas terapéuticas, conocimiento del mecanismo de acción y su implicación en rutas metabólicas, detección de efectos secundarios, y seguimiento de un tratamiento, pudiendo indicar su efecto a distintas dosis.

- Farmacogenómica. Estudia la correlación entre el perfil génico de un individuo con su respuesta a un fármaco concreto. La información obtenida se puede usar para seleccionar fármacos más eficaces y con menos efectos secundarios (fármacos a medida).

- Diagnóstico molecular. Los arrays desarrollados en este campo pueden detectar mutaciones y polimorfismos que participen en enfermedades complejas, para identificar marcadores específicos o respuestas a fármacos. Otra utilidad en este campo es definir la predisposición de una persona a padecer una enfermedad basándose en el análisis de mutaciones (arrays de caracterización genética). Otros permiten definir el genotipo de cepas infecciosas, como del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), o el de la hepatitis, a partir de muestras de un paciente (arrays de detección de enfermedades infecciosas).

1.5.8. Limitaciones de los estudios con microarrays de expresión génica

- *Limitaciones conceptuales*

Aunque la base biológica de la tecnología de los microarrays se basa en que la secuencia gen/ADN-ARNm-proteína es una relación uno a uno por la complementariedad de bases, la realidad es mucho más compleja. En la cadena de ADN hay unas regiones denominadas intrones que, al contrario que los exones, no codifican información. El proceso de partición de la cadena de ADN no se inicia siempre en el mismo exón, por lo que un gen puede codificar más de una secuencia de ARNm y por tanto, más de una proteína. Así pues, es complicado diseñar arrays cuando las muestras tienen secuencias con cierto grado de homología o cuando los genes tienen múltiples variantes en su partición⁽³²⁸⁾.

Aunque se supone que la señal medida en una posición del microarray es proporcional a la concentración de la muestra en la solución que hibrida con la sonda, esta proporción no es lineal, salvo en un rango muy limitado de concentraciones, de tal modo que cuando éstas son altas el array se saturará y cuando son bajas, no habrá reacción⁽³²⁸⁾.

Por último, si la muestra incluye ADN o ARN diana para los que no hay sonda, éstos no serán detectados y por lo tanto se perderá información⁽³²⁸⁾.

- *Limitaciones técnicas*

Otras fuentes de variación en los resultados tienen que ver con las limitaciones del instrumental utilizado: cantidad de material biológico en cada pocillo, cantidad de reactivo fluorescente, medición de la luz por el escáner, etc. Como ya se ha mencionado, el preprocesamiento y la normalización de los microarrays trata de subsanar este tipo de errores.

Independientemente de sus limitaciones, esta tecnología permite la medición de los niveles de expresión de miles de genes en decenas de muestras y, como consecuencia se obtiene mucha información acerca de los procesos celulares. Sin embargo, los resultados deben ser validados con información procedente de otras fuentes de datos.

1.5.9. Perfil de expresión génica mediante microarrays y cáncer de tiroides.

La primera investigación de expresión génica en cáncer de tiroides mediante microarrays fue la de Huang *et al.*⁽³⁴⁰⁾ en 2001. Desde entonces múltiples estudios se han realizado, intentando buscar un marcador o combinación de marcadores, que ayuden a distinguir los tumores malignos de los benignos, tanto tejido como en muestras de PAAF. En la Tabla 13 se exponen los resultados de los estudios de perfil de expresión génica en cáncer tiroideo revisados para esta Tesis Doctoral, indicando la referencia bibliográfica, metodología, los datos de S, E, VPP,VPN y exactitud (Ext), en el caso de que estén disponibles, o bien, las conclusiones principales del estudio. El nombre completo de cada gen* está disponible en el Anexo IV.

* La notación genética se ha obtenido de GeneCards® (www.genecards.org); acceso entre junio y octubre de 2015.

En general, la investigación con microarrays se ha centrado en la diferenciación entre tumores benignos y malignos, pero también en analizar los distintos tipos histológicos tanto de cánceres diferenciados como de indiferenciados. De hecho se han encontrado diferencias de expresión entre:

- CPT clásicos y la variante de células altas^(183, 341, 342),
- CPT y miCPT^(343, 344)
- Tumores foliculares: AF, CFT, y CPT-VF⁽³⁴⁵⁻³⁵³⁾.
- CFT mínimamente invasivo (CFTmi) y altamente invasivo (CFTai)^(300, 342, 354).

Algunos autores se han centrado en un diagnóstico citológico poco frecuente como es el tumor tiroideo de potencial maligno incierto (TPMI)⁽³⁵⁵⁻³⁵⁷⁾.

En otros casos se ha comparado CPT con CAT lo que ha contribuido a apoyar la teoría secuencial de la carcinogénesis. Así Hebrant *et al.*⁽³⁵⁸⁾ han encontrado nueve genes capaces de discriminar ambos tumores (infraexpresados en CAT y sobreexpresados en CPT: NELL2, SPINT2, MARVELD2, DUOXA1, RPH3AL, TBX3, PCYOX1, c5orf41, PKP4). Pero además se han encontrado puntos de coincidencia ya que a mayoría de los genes expresados en todos los anaplásicos también lo están en algunos papilares, y el 43% de los expresados en todos los CPT también lo están de forma similar en todos los CAT. Pita *et al.*⁽²⁹⁸⁾ han hallado diferencias de expresión entre CPDT y cánceres diferenciados (CPT y CFT), sobre todo genes infraexpresados (92/107). El que el perfil del CPDT tenga bastante en común con el del CPT-VF les lleva a concluir que éste podría ser un precursor del primero.

1.5.9.1. Variabilidad en los estudios de expresión

En todos estos trabajos se han identificado múltiples genes con diferencias en cuanto a su perfil de expresión en tejido sano vs. enfermedad benigna vs. enfermedad maligna, de los que sólo una pequeña fracción tiene probabilidades de ser finalmente útil en el diagnóstico o como marcador pronóstico⁽³⁵⁹⁾. Se ha cifrado hasta en un 30% el porcentaje de genes incorrectamente identificados por el análisis de microarrays⁽²⁹⁰⁾. Las fuentes de variabilidad en la expresión génica en los distintos estudios podría estar en:

- La presencia de más de un tipo celular en los tumores (heterogeneidad tumoral)^(183, 300, 330). En este sentido podrían influir los genes relativos a la inmunidad debido a la infiltración del tumor por linfocitos, fenómeno bien documentado en el CPT, y los genes de las inmunoglobulinas⁽³⁶⁰⁾.
- Diferencias técnicas por artefactos debidos a la preparación de las muestras⁽³⁶¹⁾ o durante el procesado de las mismas⁽³⁶¹⁾.
- Factores clínicos o biológicos⁽³⁶¹⁾, como p.ej. los niveles de TSH del paciente⁽³³⁰⁾.
- La selección de las muestras a analizar y la forma de comparar los datos de expresión (intraindividuales, interindividuales), junto con la nomenclatura usada para definir los tejidos usados^(300, 330)
- Diferencias poblacionales^(100, 183)
- Diferencias en el abordaje estadístico y bioinformático para analizar los datos⁽³³⁰⁾.
- Diferencias entre plataformas de arrays^(300, 349, 354).

1.5.9.2. Clasificadores

Debido a esta variabilidad, se considera que los perfiles de expresión génica son más útiles para el diagnóstico molecular cuando se utilizan combinaciones de genes⁽³⁶²⁾. En esta línea se han descrito distintos clasificadores que, si bien no suelen tener en común muchos genes, sí coinciden en su capacidad para hacer un diagnóstico correcto. Éstos, a diferencia de los basados en mutaciones somáticas, suelen tener cifras más altas de sensibilidad que de especificidad (*ruling out test*)^(289, 290, 346, 355, 360, 363, 364). Algunos autores han validado sus resultados aplicando los clasificadores a otras bases de datos disponibles públicamente^(346, 349, 362, 365), y aunque el grado de correlación es bueno, no se suelen obtener los resultados de la muestra base⁽³⁴⁹⁾.

Dos meta-análisis^(359, 366) realizados han dado validez externa a los resultados. En el publicado por Griffith *et al.*⁽³⁶⁶⁾, los autores determinaron un conjunto de 12 genes sobre o infraexpresados en el tejido tumoral tiroideo, con respecto a controles sanos o benignos, con capacidad discriminativa. Seleccionaron los genes a partir de 21 publicaciones, en función del tamaño muestral, la magnitud de la diferencias de expresión y el número de publicaciones en las que se había documentado ésta.

El objetivo del segundo metaanálisis⁽³⁵⁹⁾ fue comprobar la validez de la metodología: por un lado evaluar si los estudios realizados en diferentes centros con distintas generaciones de microarrays de oligonucleótidos de alta densidad (GeneChip[®], Affymetrix Inc. EEUU) eran comparables entre sí, y por otro, qué influencia tenían las muestras escogidas. Para ello primero combinaron tres bases de datos disponibles públicamente que incluían resultados de muestras de tejido (nódulos fríos y CPT), tanto pareadas (comparación intraindividual entre el tejido patológico y sano) como no pareadas (el tejido patológico y el sano vienen de diferentes individuos). Posteriormente las compararon y las reanalizaron.

Comprobaron como los datos de GeneChip[®] de diferentes generaciones no son directamente comparables. Igualmente encontraron que para estudios donde se trata de estudiar patogenia o etiología, es importante definir el tipo de tejido a analizar y usar muestras pareadas. El motivo es que los perfiles obtenidos en este tipo de muestras tienen más similitudes que cuando no son pareadas, a pesar de ser analizadas con la misma plataforma de arrays y bajo las mismas condiciones de laboratorio. Finalmente concluyen que los estudios con microarrays son altamente reproducibles, pero sólo cuando se seleccionan genes obtenidos en un mismo estudio.

1.5.9.3. Expresión génica y biología molecular.

Intentando ahondar en el conocimiento sobre la patogenia del cáncer tiroideo, se ha tratado de relacionar el estado mutacional del paciente con el perfil de expresión génica^(204, 298, 352), encontrando una correspondencia muy fuerte no sólo entre la expresión génica y la morfología tumoral, sino también con la presencia del reordenamiento RET/PTC y la presencia de mutaciones en RAS o BRAF.

Desde el punto de vista ontológico* los genes con diferencias de expresión en el cáncer diferenciado de tiroides tienen que ver con:

- La infraexpresión de genes:
 - Síntesis hormonal (TPO, deiodinasas I y II o el transportador de yodo), reflejando la hipofuncionalidad de la mayoría de los tumores tiroideos^(340, 362, 367).
 - Supresión del crecimiento celular o la regulación de la transcripción⁽³⁶⁸⁾
- La sobreexpresión de genes:
 - Regulación del ciclo y el crecimiento celular^(298, 340, 361, 365, 367-369)
 - Señales de transducción^(298, 347, 361, 366, 368)
 - Regulación de la transcripción^(298, 366, 368, 369)
 - Apoptosis^(361, 368, 369)
 - Proteólisis^(298, 366-368, 370)
 - Moléculas de adhesión^(298, 340, 347, 361, 365-370)
 - Respuesta inmune, inmunoglobulinas^(347, 361, 366-368)
 - Citoesqueleto y matriz celular^(347, 361)

Tabla 13 Perfil de expresión génica en cáncer de tiroides

Autor (Ref.)	Muestra	Arrays	Validación	Genes	Resultados
Takano 2000 ⁽³⁷¹⁾	Muestras quirúrgicas 1 TN 4 tumores	SAGE	qRT-PCR	600 sondas en cada muestra	CTSB: presente con más frecuencia en CPT y CFT que en TN y AF. Diferencias de expresión entre CDT y CAT: SPARC, TBCA, GPX, GAPDHS, Tg.
Cerutti 2004 ⁽³⁴⁸⁾	Bibliotecas SAGE: TN AF CFT	SAGE	qRT-PCR (17 genes): 10 AF 13 CFT 8 TN ^a IHQ: muestras independientes (27 CFT, 32 AF)	73 genes qRT-PCR: DDIT3, ARG2, ITM1, C1orf24, ACO1, TARSH	<u>Marcadores de CFT</u> (Ext 0,83): DDIT3, ARG2, ITM1, C1orf24 IHQ: 82,5% de CFT + a DDIT3, ARG2
Huang 2001 ⁽³⁴⁰⁾	8 CPT 7 TN ^a	Affymetrix HG-U95A (Datos disponibles en http://thinker.med.ohio-state.edu)	qRT-PCR: 2 CPT previos y 6 muestras independientes 9 genes IHQ: 42 CPT, 6 CFT, 1 CAT, 9 TN	24 genes S-E y 27 I-E qRT-PCR: CPT S-E: FN1, CITED1, CHI3L1, ODZ1, ADORA1 y SCEL I-E: GAS1, TFF3, FOSB, y ITPR1 IHQ: CITED1, SFTPb	Cambios moleculares consistentes y específicos en CPT. IHQ: <u>CITED1</u> : 39/42 CPT, 0/6 CFT, 0/1 CAT, 0/9 TN. <u>SFTPb</u> : 33/42 CPT, 0/6 CFT, 01 CAT, 0/9 TN

* Gene Ontology Consortium (GO) accesible en <http://www.geneontology.org>

Wasenius 2003 ⁽³⁶⁹⁾	Muestras quirúrgicas: 18 CPT 3 TN	Atlas Human Cancer 1.2 cDNA array	qRT-PCR: misma muestra (MET, FN, TIMP-1, y GADD153) IHQ (MAT): (FN, TIMP-1, MMP-11) Misma muestra (16 CPT) + 107 CPT independientes de banco tisular	19 genes: <u>S-E:</u> c-MET, MMP-11, MIC-1, CGD, FN, HIF1, FCER1G, LDH-A, HLA-DPB1, AHR, TIMP-1, y GARS <u>I-E:</u> GADD153, PKD1, CYR61, DPC4, HBA1, AKAP250, DLG3, PTPRS, y HP1-α	MET y MMP-11 sólo en tejido tumoral. CPT muestra S-E de: FN: 100%; qRT-PCR 100%; IHQ 81% <u>TIMP-1:</u> 89%; 94% qRT-PCR; IHQ 68% <u>MET</u> 56%; qRT-PCR: 94% <u>MMP-11:</u> 56%; IHQ 87% CPT: muestra I-E de: GADD153: 78%; qRT-PCR: 89%
Barden 2003 ⁽³⁵⁰⁾	Muestras quirúrgicas 12 AF 7 CFT Grupo de validación: 5 muestras independientes + 2 CFTmi	Affymetrix GeneChip Hu95 array	qRT-PCR: 19 de las 24 muestras Western Blot: EMMPRIN en 8 muestras	105 genes: 59 S-E en CFT 49 S-E en AF qRT-PCR: 19 muestras ADM, ENPP2, BSG=EMMPRIN, MET, TGFβR2	Diferencias de expresión entre CFT y AF confirmadas por qRT-PCR. Expresión IHQ de EMMPRIN en CFT > AF
Aldred 2004 ⁽³⁷²⁾	28 Muestras quirúrgicas 6 CPT 9 CFT 13 TN ^a (con CPT y algunos CFT)	Affymetrix U95A_v2 GeneChips	qRT-PCR Las mismas muestras -1 CPT + 10 CFT adicionales	qRT-PCR: CAV1 CAV2 CLDN10 IG- FBP	5 genes distinguen CPT vs. CFT CPT: <u>S-E</u> CITED1, CLDN10, IG-FBP6. <u>No cambios</u> de expresión en CAV1, CAV2 CFT: <u>no</u> expresión de CLDN10; <u>I-E</u> de IG-FBP6, y/ o CAV1 y CAV2.
Finley 2004 ⁽³⁷³⁾	Muestras quirúrgicas 45: 21 PTB 7 CPT 8 CPT-VF 9 CFT Grupo de validación: 17	Affymetrix U95 GeneChip	-	627 genes con diferencias de expresión. Malignos: S-E 61 I-E 72	<u>Benigno vs. Maligno</u> S 90,9% ; E 96,2% <u>Benigno vs. Maligno</u> (incluyendo 3 CMT): S 91,7%; E 96,2% <u>Alto riesgo vs. Bajo riesgo:</u> S 85,7% E 80,9% <u>Agresivo vs. no agresivo:</u> S 91,6%; E 82,6%
Finley 2004 ⁽³⁷⁴⁾	Muestras quirúrgicas 21 PTB 14 carcinomas (CPT, CPT-VF). Grupo de validación: 7	Affymetrix GeneChip Hu95 array	qRT-PCR Inmunoblot	qRT-PCR: ADM TROP-2, MET, NRP-2, TFF. Inmunoblot: NRP2	<u>Benigno vs. Maligno:</u> S 93%; E 100% <u>CPT-VF vs. PTB:</u> S 91% E 100% <u>CPT vs. PTB</u> S 100%, E 100%
Chevillard 2004 ⁽³⁴⁷⁾	Banco tisular 6 TN (4 ^a con muestras tumorales) 4 AF 3 CFT 3 CPT-VF 2 CPT	Soares human infant brain 1NIB library (Genethon)	qRT-PCR Las mismas muestras	<u>Maligno vs. Benigno:</u> 186 genes <u>AF vs. CFT:</u> 43 genes <u>AF vs. CPT:</u> 23 genes <u>CPT vs. CFT:</u> 52 genes CPT vs. CPT-VF: 14 genes	El análisis de expresión génica se correlaciona con la clasificación de los tumores tiroideos

Mazzanti 2004 ⁽³⁷⁵⁾	Muestras quirúrgicas 63 (PTB, AF, CPT, CPT-VF) Grupo de validación: 10	Hs-UniGem2	-	47 genes. C21orf4, KIT, LSM7, SYNGR2, Hs.24183, Hs.296031, KIAA1128, IMPACT, FAM13A1 C11orf8, CDH1	Dos modelos predictivos con 6 y 10 genes de los 11 anteriores. El modelo de 6 genes (en negrita) fue el mejor.
Lubitz 2005	27 muestras quirúrgicas: 13 AF 7 CFTmi 7 CFTai	Affymetrix U95 Av 2 GeneChip	-	AF vs. CFTai: 401 genes CFTmi vs. CFTai: 365 genes AF vs. CFTmi: 223 genes	La mayoría de CFTmi son genéticamente similares a los AF pero clínicamente tienen potencial maligno
Jarab 2005 ⁽³⁶¹⁾	Muestras quirúrgicas: 50 Grupo A: CPT 16 TN/ TBD 16 ^a Grupo validación: CPT 7 TN/PTB 11 ^a	Affymetrix GeneChip HG-U133A array (datos disponible en www.genomika.pl/thyroidcancer)	qRT-PCR (en 37 muestras)	102 genes. De ellos 20 son más significativos: DPP4, GJB3, ST14, SERPINA1, LRP4, MET, EVA1, SPUVE, LGALS3, HBB, MKRN2, MRC2, IGSF1, KIAA0830, RXRG, P4HA2, CDH3, IL13RA1, y MTMR4.	RRF-20 set (Grupo de validación) Ext 94.4% (95% CI: 72,7-99,9 S 85,7%, E 100%.
Giordano ⁽³⁵²⁾	Banco tisular 51 CPT 4 TN	Affymetrix GeneChip U133A array. Estudio de mutaciones: RET/PTC1 y -3, HRAS, NRAS, KRAS, BRAF	IHC (MAT): 98 CPT (92 muestras independientes) : 72 casos primarios y 34 metastásicos)	IHQ: TPO I-E en CPT BRAF + 53% de CPT Los tumores con menos expresión de TPO fueron los BRAF+	El estado mutacional se correlaciona con el perfil de expresión y con la morfología tumoral. Las mutaciones por tanto, se consideran responsables del perfil génico.
Kebebew 2005 ⁽²⁹⁰⁾	95 muestras quirúrgicas: 28 PTB, 28 AF, 25 CFT, 26 CPT, 19 CPT-VF, 5 CAT 12 PAAF ^a <i>ex vivo</i> Grupo de validación: 36	HS-010 GEarray Superarray kit (genes de matriz extracelular y moléculas de adhesión)	qRT-PCR	ADAMTS8, ECM1, PLAUI, SELP, TMPRSS4	<u>Modelo predictivo (ECM1, TMPRSS4):</u> ABC: 0,985; S 91,7%, E 89,8, VPP 85,7%, VPN 82,8% . Mejora resultados de citología <u>Grupo validación:</u> S 90%, E 92,6%, VPP 81,8%, VPN 96,1%.
Kebebew 2005 ⁽²⁸⁹⁾	5 Muestras quirúrgicas de cada grupo histológico: 4 TN 28 AF 23 CFT 25 CPT 19 CPT-VF PAAF <i>ex vivo</i> de las mismas muestras	HS-009 GEArray Q series Human Angiogenesis Array	qRT-PCR En 123 muestras.	22 genes. qRT-PCR: S-E en malignos: ERBB2, EGFR, ENG, EDG1, EFNB2, ANGPT2, ADAMTS1, FGFR1, AMOT, ITGA5, TGFB1, TGFB1, TIMP1	EGFR, EFNB2: tumores más agresivos ANGPT2, TIMP1: marcadores independientes de malignidad: ABC: 0,873; S 90%, E 85%, VPP 75%, VPN 94%.

Weber 2005 ⁽³⁴⁵⁾	Muestras quirúrgicas A: 12 CFT, 12 PTB B: grupo validación: 12 CFT, 17 PTB, 2 TN C: muestras en parafina 14 CFT, 7 CCH, 26 PTB	Affymetrix U133A GeneChips	qRT-PCR: grupo B B-actina CCND2 PLAB PCSK2 ARHI CITED1 IHQ: grupo C CCND2 PCSK2	qRT-PCR: CCND2 PLAB PCSK2 IHQ CCND2 PCSK2	Clasificador 3 genes: <u>CFT vs. AF:</u> S 100% E 94,7%, Ext 96,7% <u>CPT-VF:</u> Ext 85,7% (correctamente identificados como malignos) Clasificador IHQ: S 89,5%; E 80,8%; Ext 86,7%
Lubitz 2006 ⁽³⁷⁶⁾	Muestras quirúrgicas: 50 (10 PTB, 16 AF, 11 CPT, 13 CPT-VF) 22 PAAF ex vivo	Affymetrix HG-U133A GeneChip	-	25 genes: I-E: TPO, TFF3, FCGBP, MATN2, RAP1GA1 S-E: HMGA2, TIPARP, QPCT, PSD3, DUSP4, ABCC3, DPP4, TIMP1, KRT19, GALIG, PROS1, SERPINA1, FN1, CITED1=MSG1, LRP4, TACSTD2=TROP2=GA733-1, SH2D1A.	Mejora los resultados de la citología.
Zhao ⁽³⁴²⁾	46 Muestras quirúrgicas 16 CPT (5 CPT-VF) 13 CFT (-mi 10; -ai: 3) 17 TN ^a	Filtros de ADNc de alta densidad (RZPD library 956, Human Unigene Set 2, German Human Genome Project)	qRT-PCR (Tg, PAX8, FN1 y CNN3) en 12 muestras aleatorizadas de la anterior.	123 genes diferencian CPT de CFT.	El perfil del CPT difiere poco del CPT- VF. Sin embargo entre CFTmi y CFTai hay diferencias significativas (80 genes).
Fujarewicz 2007 ⁽³⁶²⁾	Banco tisular (Huang 2001, Eszlinger 2004, Jarzab 2005) 57 CPT 61 PTB 62 TN (pareadas y no pareadas)	Affymetrix HG-U133A Affymetrix 90 HG-U95A (Huang), HG-U95Av2 (Eszlinger [#]) y Affymetrix 90 HG-U133A (Jarzab)	-	FN1, MET, DPP4, SERPINA1, KRT19, LGALS3, CITED1, DUSP6, SFTPB, TIMP1, MUC1, ADM, TROP2, NRP2, KIT, CDH1, LSM7, SYNGR2, FAM13A1, IMPACT	Clasificador 20-genes: CPT: Ext 98,5% (IC 95%: 0,959-1) Benigno vs. maligno: Ext 98,6% Errores de clasificación: 2,8%
Delys 2007 ⁽³⁶⁷⁾	- Banco tisular: 12 ^a - Muestras quirúrgicas: 14 ^a Total: 26 CPT 26 TN ^a	Agilent Human 1 cDNA microarray Combinado con datos de: Huang 2001 ⁽³⁴⁰⁾ : 8 CPT + TN ^a y Jarzab 2005 ⁽³⁶¹⁾ : 16 CPT + TN ^a	qRT-PCR (11 CPT y 20 TN).	451 genes S-E y 233 I-E qRT-PCR: <u>11 S-R:</u> ANXA1, CDH3, CLDN1, DUSP5, GPX1, HMGA2, NELL2, NRCAM, SLIT1, THBS2, TNC <u>4 I-R:</u> BCL2, EGR1, EGR2, FLRT2.	44% del transcriptoma está afectado en CPT. Excelente correlación entre los tres conjuntos de datos (disponibles públicamente)
Durand 2008 ⁽³⁷⁷⁾	Banco tisular 6 AF 8 CFT 14 CPT (5 CPT-V) 28 TN ^a	Transcriptome Analysis Platform of Genopole Rhône-Alpes,	qRT-PCR en PAAF: 25 muestras <i>ex vivo</i>	qRT-PTC: cambios en expresión de 6 genes: - ALDO A, GOT1,	<u>Modelo predictivo:</u> CPT (9/57 genes): S 86%, E 100% CPT+CFT (12/21 genes): S 91%, E 100%

		(Grenoble, France). Macroarray oligonucleótidos de baja densidad en membrana de nylon		GAPD: aumentados en CFT. - CDKN1A: aumentado en CPT y CFT. Menos en AF - SLC26A4 y TFF3: expresión reducida en CFT y CPT	CFT (9/26 genes): S 100%, E 100% Global 19 genes comunes en los 3 grupos previos: fortaleza en la predicción de la mediana= 0,92
Nikolova 2008 ⁽³⁶⁸⁾	Muestras quirúrgicas 18 CPT 18 TN ^a Línea celular FTC-133 de cáncer tiroideo humano	Affymetrix Human genome U133 Plus 2.0 GeneChip arrays	Las mismas muestras qRT-PCR : CHI3L1, FAM20A, KLHDC8A, LRP4, NMU, TM7SF4, RGS4 más otros 13 genes Northern Blot RGS4	243 genes S-E y 138 I-E qRT-PCR (14 casos de CPT): Northern blot : RGS4	RGS4: S-E en cáncer tiroideo pero no en otros tejidos. Su bloqueo inhibe el crecimiento en las células cancerosas tiroideas.
Murphy 2008 (Murphy, 2008 #13924)	Muestras quirúrgicas CPT 9 TN 11	Affimetric Human U133 GeneChip Set	IHQ de 88 muestras de banco tisular: MAT (CDH3, KRT19, BAX, galectin-3) TN ^a 19 CPT 20 CPT-VF 9 CFT 14 TH 11 AF 15	20 genes CDH3, LRP4, CHI3L1, SCEL, PLAB, SYTL5, NFE2L3, CAPN3, NGEF, NMU, DUSP4, CLG, GOLT1A, SOX4, TNRC6C, RUNX1, XTP1, PLEC1, KRT19, BAX LGALS3	MAT CDH3: 0% TN; 55% CPT; 14% CFT BAX: 0% TN; 75% CPT; 36% CFT CK19: CFT 43% TN (89%) vs.: - CPT (100%) p< 0,0001 - AF (27%) p= 0,0012 - CPT-VF (22%) p= 0,0007 <u>Galectina-3</u> (LGALS3) CFT 21% CPT (100%) vs.: - TN (42%) p < 0,0001 - CPT-VF (55%) p= 0,0066)
Zhao 2008 ⁽³⁵¹⁾	Muestras quirúrgicas 24 (12 AF, 12 CFT)	Arrays de ADNc obtenidos del German Human Genome Project	-	131 genes, 23 de ellos distinguen AF de CFT (BIKE, RAPTOR, PRKCD, PPP6C, PSEN2, CDX2, SON, LSM4, ZDHHC2, DNAJA2, HIST1H4B, PHLDA1, GBA3, PSMB6, URKL1, HARSL, PSMF1, ARHN, FTHFD, MLL, SDBCAG84, DBNL, ACCN1)	Todos los CFT tuvieron un perfil diferente a los AF
Prasad 2008 ⁽³⁷⁸⁾	Muestras quirúrgicas 70 benignos (20 PTB, 13 TH, 20 AF, 17 ACH) 55 malignos (19 CPT, 16 CPT-VF, 14 CFT, 6 CCH)	34K human oligonucleotide array (NCI)	qRT-PCR 76 previos + 31 nuevos Western blot tumores y TN ^a : HMGA2 MAT 87 casos nuevos (68 tumores y 19	75 genes (33 S-E, 42 I-E en malignos) qRT-PCR malignos : S-E: 9 (HMGA2, LRRK2, PLAG1, DPP4, CDH3, CEACAM6,	Capacidad de diferenciar malignos de benignos.

			TN): HMGA2	PRSS3, SPOCK1 , y PDE5A) I-E: 3 (RAG2, AGTR1 , y TPO5) Western-Blot e IHQ: HMGA2	
Hinsch 2009 ⁽³⁵⁴⁾	Muestras quirúrgicas 4 AF 8 CFT: 4 –mi y 4 -ai	Aplied Biosystems Human Genome Survey Microarrays V.2.0 (Base GSE15045 disponible en Gene Expresión Omnibus)	qRT-PCR: mismas muestras IHQ: QPRT en 149 muestras prospectivas (75 AF, 58 PBT, 9 ACH, 7 CFTmi) Western Blot: 3 AF, 3 CFA (mismas muestras)	Diferencia entre AF, CFTmi y CFTai: 25 genes. Los más significativos: DPT y QPRT	qRT-PCR: 20 veces más QPRT en CFT que En AF IHQ: Ext 72%; S 65%; E 73%, VPP 73%, VPN 71% CFTmi: S 60% CFTai: S 75% Western Blot: QPRT sólo aparece en CFT y no en AF.
Arora 2009 ⁽³⁵⁵⁾	50 muestras quirúrgicas 11 CPT 13 CPT-VF 26 PTB	Affymetrix GeneChip U95A o GeneChip U133A	40 muestras independientes: 15 TPMI 11 PTB 5 CPT 9 CPT-VF	<u>malignos vs.</u> <u>benignos:</u> 31 genes S-E y 30 genes I-E. <u>Benignos vs.</u> <u>TPMI:</u> 27 genes <u>Malignos vs.</u> <u>TPMI:</u> 14 genes	<u>Benigno vs. Maligno:</u> S: 93%; E: 82%
Kim 2010 ⁽³⁷⁹⁾	Muestras quirúrgicas CPT 5 TN ^a 5	Illumina HumanHT-12 v3 Expression BeadChips microarray.	35 pacientes (1 CPT-VF, 34 CPT): qRT-PCR IHC	112 genes: 96 S- E y 16 I-E qRT-PCR: <u>S-E:</u> TM7SF4, SLC34A2, KCNJ2, COMP, KLK7 <u>I-E:</u> TFCP2L1, LYVE- 1, FOXA2, SLC4A4 IHC: FOXA2, COMP, LYVE-1	La actividad de FOXA2 está reducida en CPT (acumulación en citoplasma en IHQ) Posible relación con mutación de BRAF (4/5 pacientes con CPT tenían este gen mutado)
Borup 2010 ⁽³⁴⁹⁾	Muestras quirúrgicas A: 69 (2 TN, 22 AF, 12 miAF, 18 CFT [10 –ai, 7 – mi], 4 CAT, 2 CPT, 9 PTB) + Banco de tejidos (14 CPT, 9 TN) Grupos de validación externos y públicos: B ⁺ (12 AF y 12 CFT) y C ⁺ (4 AF, 8 CFT)	Affymetrix HG-U133 plus2 GeneChip array	IHQ (Ki67, TOP2A, NR4A1, NR4A3	76 genes	Grupo A: AF vs. CFT: Ext 95%; S 94,4%; E 95,4% AF vs. miAF vs. CFT: Ext 85% AF + miAF vs. CFT: Ext 90 %; S 88,9%; E 96,9%. Grupo B: AF vs. CFT: Ext 92%; S 83% Grupo C: AF vs. CFT: Ext 83%; S 88%
Chudova 2010 ⁽³⁶⁰⁾	Muestras quirúrgicas: 178 de banco de tejidos: PTB, AF, CF, CPT, CPT-VF, CCH Muestras de PAAF: 137	Affymetrix Human Exon 1.0 ST arrays	Validación: PAAF A (48): benignas, malignas e indeterminadas PAAF B (24): indeterminadas	Genes no especificados. Sólo como representativos se mencionan: FN1, TPO, LGALS3, CALCA, TIMP, ANGPT2,	Veracyte, Inc. Clasificador basado en tejido: - Validación A: S 92,3% E 58,1% - Validación B: S 85,7% E 40% Clasificador basado en

	muestras de diagnóstico conocido (96 malignas y 41 benignas)			TERT	PAAF: - Validación A: S 92,3% E 83,9 - Validación B: S 100% E 73,3%
Kundel 2010 ⁽³⁸⁰⁾	Muestras quirúrgicas 13: 6 PTB 7 malignos (CPT, CPT-VF) 13 PAAF ^a	Affymetrix HG-U133A GeneChips	-	61 genes	Benigno vs. CPT PAAF: S 100%, E 100% Ext 100% Tejido: S 85,7%, E 100, Ext 92,3%
Ory 2011 ⁽³⁸¹⁾	Banco tisular Grupo A: 7 rFA, 7 sAF, 7 rCPT, 7 sCPT. Grupo de validación (exposición a radiación desconocida): 16 AF, 13 CPT	25K 50-52mer Oligo-microarrays humanos de una plataforma genómica nacional (Resogen Program, RNG/MCR, Evry)	Grupo de validación con los mismos microarrays	322 genes: 137 S-E y 185 I-E También se analizaron RET/PTC 1 y 3 (qRT-PCR); BRAF, NRAS, KRAS y HRAS (secuenciación ADNc) en el grupo de validación	Perfil genético específico que permite diferenciar la etiología del tumor (radiado o no), independientemente del subtipo histológico
Williams 2011 ⁽³⁰⁰⁾	Banco tisular 7 CFT-agresivo 8 CFT-no agresivo Muestras quirúrgicas 4 AF 11 TN (8 ^a)	Affymetrix HG-U133A	qRT-PCR: CKS2, PBP	<u>TN vs. AF y CE:</u> 421 genes: 152 S-E y 269 I-E <u>TN vs. AF:</u> 203 genes, 89 S-E y 114 I-E <u>TN y AF vs. CFT:</u> 302 genes, 75 S-E y 227 I-E <u>AF vs. CFT:</u> 94 genes: 70 I-E, 24 S-E <u>Agresivo vs. no:</u> 4 genes	Los CFT agresivos se asocian a la I-E de NID2, TM7SF2, TRIM2 y la S-E de GLTSCR2. <u>RT-PCR:</u> PBP S-E en AF y CKS2 S-E en CFT
Hébrant 2012 ⁽³⁵⁸⁾	Banco tisular 11 CAT 48 CPT	Affymetrix HU 133 Plus 2.0 arrays	qRT-PCR 5 CAT 5 CPT (muestras independientes)	NELL2, SPINT2, MARVELD2, DUOXA1, RPH3AL, TBX3, PCYOX1, c5orf41, PKP4	43% de los genes I-E en CPT también I-E en CAT. <u>Perfil de agresividad:</u> los 9 genes I-E en CAT y S-E en CPT
Dom 2012 ⁽³⁶⁵⁾	Banco tisular 95 muestras. 45 tumores tiroideos y sus NT ^a : 22 radiados y 23 no radiados 5 tumores no radiados sin TN disponible	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays.	qRT-PCR En una base de datos externa y pública (Jarzab 2005(Jarzab, 2005 #20118))	403 genes S-E en rTN qRT-PCR: SERPINE1, DUSP1, TRIB1, S100A10, ANXA1, GNAL, RDH12	793 <i>probes gene set</i> : Ext 69% Diferencia entre TN radiado vs. no radiado. Identifica a los cánceres radioinducidos
Chung 2012 ⁽³⁶⁴⁾	19 CPT 7 TN ^a	Illumina Human-8 Expression Bead Chip microarray	qRT-PCR (la misma muestra)	CDH3, NGEF, PROS1, TGFA, MET	Set de 90 sondas: Ext: 100%
Alexander 2012 ⁽⁹⁴⁾	Estudio de validación en muestras de PAAF multicéntrico (49	Afirma Gene Expression Classifier (Veracyte,	-	167 genes: 142 diferencian entre benigno y sospechoso.	Afirma GE Clasifier: Sospechosos: - S 92% (IC 95%, 84-97) Bethesda 2

centros): 4812
PAAFs:
Finalmente útiles
312 muestras
(265
indeterminadas
(Bethesda 3,4,5)

Inc),
disponible en
Gene
Expression
Omnibus
(GSE34289)

Otros 25 genes
se usan para
filtrar
neoplasias raras

- E 52% (IC 95%, 44-59)
Bethesda 3:
- S 90% (IC 95%, 74-98)
- E 53% (IC 95%, 43-63)
- VPN 95%
Bethesda 4
- S 90% (IC 95%, 74-98)
- E 53% (IC 95%, 43-63)
- VPN 94%
Bethesda 5
- S 94% (IC 95%, 80-99)
- E 52% (IC 95%, 30-74)
- VPN 85%

Pfeifer 2013 ⁽³⁴⁶⁾	Muestras quirúrgicas A: 13 CFT, 13 FA Grupo de validación: - B: 14 CFT, 12 AF - C: muestras en parafina (31 CFT, 40 AF) - D ^s , E [*] , F ⁺ : 3 bases de datos de microarrays públicas (76: 38 AF, 38 CFT)	Affymetrics HG-U133 Plus 2.0 microarray	qRT-PCR: muestras grupo C	qRT-PCR: CA4, ELMO1, EMCN, ITIH5, KCNAB1, LRP1B, PLEKHG4B, SLCO2A1	Clasificador 5 genes: Ext B: 73% Ext C: 72% (IC 95%, 60-82); S 71%, E 72% Ext E: 92% Ext F: 83%
Abend 2013 ⁽³⁸²⁾	Banco tisular 126 muestras de CPT y TN ^a de 63 pacientes radiados en la infancia (3 categorías en función de la dosis) <u>Grupo base:</u> 32 TN y 32 CPT (muestras aleatorizadas) <u>Grupo validación:</u> 28 TN, 30 CPT	Agilent oligo microarray (formato 4 x 44K) combinado con protocolo de hibridación de un color	qRT-PCR Muestras del Grupo de validación: 95 genes.	832 genes 95 seleccionados para qRT-PCR. TN: 8 genes ABCC3, C1orf9, C6orf62, FGFR1OP2, HEY2, NDOR1, STAT3, y UCP3 CPT: 6 genes ANKRD46, CD47, HNRNPH1, NDOR1, SCEL, y SERPINA1	Los genes especificados están relacionados con la dosis de radiación recibida. Los cambios provocados por la radiación en tejido normal podrían ser pasos iniciales en la carcinogénesis de este origen.
Zheng 2015 ⁽³⁸³⁾	Gene Expression Omnibus (GEO): GSE29315 (71 tumores, 40 benignos y 31 benignos) GSE 33630, GSE27155, GSE3678	Gene Expression Omnibus (GEO)	qRT-PCR: Muestras quirúrgicas 70: <u>39 benignos:</u> 20 AF, 11 TH, 8 PTB <u>31 malignos:</u> 20 CPT, 1 CFT, 1 CAT IHQ: 29 de 70	DPP4, SCG5 y CA12	qRT-PCR^b: S 93,5%; E 94,9%; Ext 94,3% IHQ Ext: DPP4: 86,2% SCG5: 82,8% CA12: 72,4%
Barros- Filho 2015 ⁽³⁰⁶⁾	Muestras quirúrgicas 61 CPT (57 + 4) 13 TN (4 ^a) Grupo qRT-PCR: 23 TN, 8 PTB, 86 PTC Grupo validación (qRT-PCR): 10 TN,	Plataforma de microarrays SurePrint G3 8 x 60K (Agilent Technologies) combinada con el perfil de 138 CPT y TN ^a de 2 bases	qRT-PCR: <u>grupo qRT-PCR y grupo de validación.</u> Aplicación del predictor CLDN10, HMGA2, y LAMB3 en las 2	589 genes 28 genes en <u>grupo RT-PCR</u> <u>Grupo de validación:</u> CLDN10, GABRB2, HMGA2, LAMB3.	Predictor CLDN10, HMGA2, y LAMB3 (puntuación algorítmica): Se asocia a peor pronóstico (metástasis ganglionares, extensión extratiroidea, invasión

140 PTB, 120 CPT, 12 cánceres de origen folicular no papilar	de datos públicas: GEO y The Cancer genome Atlas	bases externas	vascular y mayor tamaño tumoral) <u>PTB vs. tumor</u> - grupo qRT-PCR: Ext 100% - grupo validación: Ext 95%; S 94%; E 96% - bases externas: Ext 92%; S 91%; E 93%
---	---	----------------	---

^a: muestras pareadas: tejido normal del lóbulo contralateral; el prefijo r significa radioinducido y el prefijo s se refiere a esporádico.

*: Datos de Weber 2005⁽³⁴⁵⁾ <http://www.ebi.ac.uk/miamexpress/> (número de acceso E-MEXP-97); +: Datos de Hinsch 2009⁽³⁵⁴⁾ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE15045>; \$: Datos de Borup 2010⁽³⁴⁹⁾ Array Express (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/> (número de acceso E-MEXP-2442)); # Datos de Eszlinger disponibles en http://www.uni-leipzig.de/innere/_forschung/schwerpunkte/etiology.html.

Abreviaturas de genes en Anexo IV; ACH adenoma de células de Hürthle; AF: adenoma folicular; miAF: micro AF; CAT: cáncer anaplásico; CFT: cáncer folicular de tiroides; CFTmi: CFT mínimamente invasivo; CFTai: CFT altamente invasivo; CDT: cáncer diferenciado de tiroides; CPT: cáncer papilar de tiroides; CPT-FV: cáncer papilar de tiroides variante folicular; miCPT: micro CPT; IHQ: inmunohistoquímica; MAT: microarray de tejido; PTB: patología tiroidea benigna; TH: tiroiditis de Hashimoto; TN: tejido normal; TPMI: tumores de potencial maligno incierto;

S-E: sobreexpresado; I-E: infraexpresado; qRT-PCR: PCR cuantitativa o a tiempo real; ABC: área bajo la curva; Ext: exactitud; E: especificidad; S: sensibilidad; FN: falso negativo; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

1.5.9.4. Validación

Como ya se ha mencionado previamente y como se puede ver en la Tabla 13, la técnica de elección para validar los estudios expresión génica con microarrays es la qRT-PCR. Las técnicas basadas en PCR son rápidas, fiables, y muy sensibles, proporcionan un dato cuantitativo y son más baratas que los estudios con microarrays, por lo que tienen utilidad clínica^(384, 385). Todo ello ha facilitado la realización de estudios de expresión génica con un número más limitado y más específico de genes:

- Rosen *et al.*⁽³⁸⁴⁾ validan su clasificador de 6 genes⁽³⁷⁵⁾ en un conjunto nuevo de muestras de tejido con una S del 75%, E 100% VPN 85,5% y VPP 100%.

- Taniguchi *et al.*⁽³⁵³⁾ construyen su clasificador de 60 genes, validados en una muestra que incluía 12 AF y 6 CFT obteniendo una S del 66,7%, una E del 91,6%, con VPP del 80%, VPN del 84,6% y Ext 83,3%.

- Foukakis *et al.*⁽²⁹⁹⁾, parten de 26 genes y construyen dos modelos predictivos. El primero, con 5 genes (TERT, TFF3, PPAR γ , CITED1, y EGR2), consigue diferenciar a los tumores foliculares en alto (CFTai y CFTmi con metástasis a distancia) y bajo riesgo (AF, TPMI, CFTmi) con una Ext del 96%. El segundo modelo diferencia entre tumores foliculares benignos y malignos con sólo 2 genes (TERT y TFF3) con una E del 94%.

- Krause *et al.*⁽³⁸⁶⁾ investigan CCND2, PLAB, PCSK2, HGD1, TFF3, B4GALT, LGALS3, ETS1, ADM3, y TG como posibles marcadores. La mejor predicción, se basó en un número mínimo de 6 genes (PLAB, HGD1, TFF3, LGALS3, ADM3, y TG) con una Ext del 94%.

1.5.9.5. Estudios de expresión génica en PAAF

Entre las ventajas de las técnicas con PCR está la necesidad de menos cantidad de ARN, así que se ha investigado su utilidad en muestras obtenidas por PAAF, tanto con un gran número de genes, como los que contienen los GeneChips[®]^(376, 380), como analizando un número más limitado de ellos^(290, 377, 387, 388) tratando de validar datos obtenidos mediante el uso de microarrays, y/o proponiendo

clasificadores que mejoren los resultados de la PAAF, sobre todo en casos de citología dudosa (*AUS/FLUS*, *NF/SNF* o sospechoso de malignidad). En algunos casos las muestras se han obtenido de la lesión investigada inmediatamente después de su extirpación quirúrgica (*ex vivo*)^(290, 376, 377, 380).

En la Tabla 14, se describen algunos estudios realizados con muestras de PAAF, basados en PCR, con datos de S, E, y Ext de la prueba, en caso de estar disponibles, o bien indicando las conclusiones fundamentales del estudio.

Recientemente, Chudova *et al.*⁽³⁶⁰⁾ han conseguido amplificar el ARN obtenido de muestras de PAAFs *in vivo*, lo suficiente como para usar un biochip con más de 247.187 sondas. El clasificador así obtenido (*Afirma Gene Expression Classifier* (AGEC); Veracyte, Inc), cuyos resultados se pueden ver en la Tabla 13, está formado por 167 genes (142 que discriminan nódulos benignos de sospechosos, y otros 25 que están relacionados con tumores menos frecuentes) y ha sido validado de forma prospectiva y multicéntrica⁽⁹⁴⁾ utilizando muestras de PAAF con citología indeterminada. En este estudio se ha confirmado la alta S global en este tipo de muestras (92%, IC 84-97) aunque a costa de una baja especificidad (52%, IC 44-59). El VPN para Bethesda 3, 4 y 5 fue de 95, 94 y 85%, respectivamente. El estudio teórico de coste-efectividad realizado, estima que podría evitar tres cuartos de las cirugías en pacientes con citología indeterminada, reduciendo costes y mejorando la calidad de vida⁽⁹⁸⁾.

Sin embargo McIver *et al.*⁽³⁸⁹⁾ no obtuvieron los mismos resultados aplicando el AGECE a su muestra de 72 pacientes (*NF* o *AUS*) ya que sólo el 17% de los nódulos sospechosos fue realmente maligno aportando una S del 83% y VPN del 75%. Dado que la mayoría de los pacientes con nódulos catalogados como benignos no se han intervenido, los autores no pueden dar el verdadero VPN de la prueba. Por otro lado, el coste es alto por el número de test a realizar para evitar una cirugía (4:1) y por los costes del seguimiento de los pacientes con citología indeterminada no operados, al no haber podido validar el VPN.

Otros autores ha utilizado el AGECE y el análisis del conjunto de pacientes a los que se ha realizado este test (864), incluyendo como verdaderos negativos los pacientes catalogados como benignos y no operados, arroja unos resultados bastante consistentes, con un VPN global del 97,7% (IC 95,6-98,9) y con una prevalencia de malignidad del 21,3%⁽³⁹⁰⁾.

1.5.9.6. Estudios de microarrays en sangre periférica

Otro punto interesante es el análisis de expresión génica mediante microarrays (o técnicas de PCR) en células mononucleares de sangre periférica, antes y después de la tiroidectomía. La sangre periférica es idónea para estudios que requieran muchas tomas o seguimiento a largo plazo. Podría proporcionar información sobre posibles mediadores protooncogénicos activados en pacientes con lesiones malignas que puedan servir de marcadores. Las células mononucleares son las más activas transcripcionalmente en la sangre, pueden servir como un monitor sensible del estado fisiológico del organismo y reflejar respuestas diferenciadas de variantes de una enfermedad que clínicamente parecen homogéneas.

En la bibliografía revisada hay dos referencias con respecto a este tema^(387, 391). Hamada *et al.* realiza estudio mediante qRT-PCR en células mononucleares de sangre periférica de pacientes intervenidos por patología tiroidea (PTB y CPT), encontrando patrones que distinguen CPT de otros tejidos, incluyendo la sangre,

pero no exploran la posibilidad del utilizar los genes estudiados como marcadores séricos⁽³⁸⁷⁾. Rostamzadeh *et al.* sólo investigan en patología benigna⁽³⁹¹⁾.

Tabla 14 Estudios de expresión génica en PAAF

Autor (Ref.)	Muestra	Genes	PAAF	Clasificador	Resultados
Hamada 2005 ⁽³⁸⁷⁾	18 CPT 18 NT ^a 19 AF 2 PTB 10 muestras células sanguíneas 38 PAAF <i>in vivo</i>	qRT-PCR en tejido: S-E: CITED1, CHI3L1, FN1, RIL y SFTPB I-E: ITPR1, TFF3 y TPO	qRT-PCR en 9 PAAF con diagnóstico final y 29 con sólo diagnóstico citológico	La combinación de S-E de SFTPB e I-E de TFF3 discrimina CPT de PTB/TN	9 PAAF: S 75%, E 100%, Ext 88,9% 29 PAAF: 24,1 % con perfil de CPT sin evidencia citológica. El resto fue coincidente con el diagnóstico citológico.
Kebebew 2006 ⁽²⁸⁸⁾	Muestras de tejido: 95 PTB: 19 AF 19 FT 19 CPT-VF 19 CPT 19.	qRT-PCR en tejido ECM1, TMPRSS4 EGFR, EFNB2, ANGPT2, TIMP1	qRT-PCR en PAAFs <i>ex vivo</i> : 31 muestras independientes como grupo de validación	Modelo de 6 genes [*] : ECM1, TMPRSS4 EGFR, EFNB2, ANGPT2, TIMP1	ECM1, TMPRSS4, ANGPT2, TIMP1: S-E en malignos. <u>Tejido:</u> ABC: 0,993; S 100%, E 94,6%, VPP 96,5%, VPN 100%. <u>PAAF:</u> S 91%, E 95%, VPP 92,9%, VPN 92,3%. ECM1, EGFR, EFNB2: - buena correlación con MACIS, AGES, EORTC - En PAAF: Ext 90,9%
Shibru 2008 ⁽¹⁰⁰⁾	Banco tisular: 138 benignos 123 malignos	qRT-PCR en tejido: PCSK2, PLAB, CCND2	qRT-PCR en 144 PAAFs prospectivas	Modelo de 3 genes [*] : PCSK2, PLAB, CCND2	<u>Tejido Maligno vs. Benigno:</u> PCSK2 y CCND2 ABC de PCSK2: 0,67 y de CCND2: 0,62 <u>PAAF Maligno vs. Benigno:</u> PCSK2, CCND2 discriminan ABC de PCSK2 0,59 y de CCND2 =,61
Tomei 2012 ⁽³⁸⁸⁾	Banco tisular: PAAFs preoperatorias 93: 49 malignos, 38 benignos. 6 controles de diagnóstico desconocido	qRT-PCR: KIT, SYNGR2, C21orf4, Hs.296031, DDI2, CDH1, LSM7, TC1, NATH BRAF	qRP-PCR: en 6 muestras independientes de PAAF	KIT, CDH1, LSM7, C21orf4, DDI2, y BRAF	Los 6 genes: ABC 0,88, S 91% y E 63% Sólo TC1 se expresa más en benignos que en malignos. BRAF: negativa en todos los benignos
Karger 2012 ⁽³⁹²⁾	111 muestras: 40 AF, 53 PTB, 7 CFT, 11 CPT PAAF <i>in vivo</i> : 66 PAAF <i>ex vivo</i> : 45 + 45 TN ^a	qRT-PCR: ADM3, HGD1, LGALS3, PLAB, TFF3, TG y ACTB	qRT-PCR en las 156 muestras de PAAF	Varios clasificadores basados en parejas de genes	Malignos: I-E de TFF3 y HGD1 y S-E de ADM3 y LGALS3. <u>Maligno vs Benigno:</u> LGALS3/TG: S 82% LGALS3/HGD1: E 87%, Ext 78%. <u>NF/SNF:</u> ADM3/TFF3: predice benignidad (E 89%) ADM3/ACTB predice malignidad (S 89%)

^a: muestras pareadas: TN del lóbulo contralateral.

*: Clasificador de Weber 2005⁽³⁴⁵⁾; &: Clasificadores de Kebebew^(289, 290)

S-E: sobreexpresado; I-E: infraexpresado; ABC: área bajo la curva; Ext: exactitud; E: especificidad; S: sensibilidad. AF: adenoma folicular; CFT: cáncer folicular de tiroides; CPT: cáncer papilar de tiroides; CPT-FV: cáncer papilar de tiroides variante folicular; PTB: patología tiroidea benigna; TN: tejido normal qRT-PCR: PCR cuantitativa o a tiempo real; Abreviaturas de genes en Anexo IV.

1.6. APLICACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

La aplicación de test moleculares en el diagnóstico del nódulo tiroideo añade costes y complejidad al relativamente simple modelo actual. Por tanto, en cualquier estudio de viabilidad, es necesario considerar un balance entre los costes de los estudios frente al posible ahorro en cirugías innecesarias y otros tratamientos evitados restando los efectos adversos por infratratamientos derivados de los falsos negativos⁽³⁸⁵⁾. Es más, también se debe tener en cuenta que los costes serán diferentes en función del número de pacientes de cada categoría diagnóstica y su probabilidad de malignidad en cada ámbito clínico^(227, 385). Es importante puntualizar que el VPP y el VPN de cualquier prueba diagnóstica depende no sólo de la S y la E, sino también de la prevalencia de la enfermedad en la población investigada (probabilidad pretest). Dada la variabilidad interobservador de la citología, hay que ser muy cuidadoso en conocer los datos de prevalencia locales antes de asumir que se va a obtener el mismo VPP y VPN que en los estudios de validación publicados^(264, 393).

En cuanto a los test genéticos, podemos afirmar que no están indicados en^(235, 385, 389):

- pacientes con diagnóstico clínico, radiológico o citológico de cáncer tiroideo
- Enfermos que tengan una citología benigna
- Nódulos hiperfuncionantes
- Cuando la intervención quirúrgica vaya a ser una tiroidectomía total (por indicación clínica o por preferencia del paciente)

Para que un test molecular negativo nos descarte un cáncer con la suficiente seguridad, la probabilidad de malignidad pretest debe ser lo suficientemente baja⁽²²⁷⁾. Por otro lado, realizar un estudio mutacional (*ruling in test*) en una población con baja prevalencia de cáncer no es coste efectivo, ya que las mutaciones sólo están presentes en alrededor del 50% de los pacientes.

Sería en estos casos donde tendrían cabida los test que nos identificaran con fiabilidad a los pacientes con lesiones benignas (*ruling out test*)^(94, 360, 390), ya que al tener un alto VPN, cuando su resultado sea sospechoso de malignidad, seleccionarán una población con más incidencia de cáncer⁽²³⁵⁾.

En cualquier caso habría que valorar con cuidado si el uso de ambos tipos de test (estimado en 5.700 US\$) junto con una tiroidectomía total, es menos costoso que la tiroidectomía total en dos pasos⁽²³⁵⁾. Actualmente se realiza una tiroidectomía diagnóstica basada en la citología a un 39,2% de los casos de AUS/FLUS y casi al 70% de NF/SNF teniendo un riesgo de malignidad del 15,9% y 26% respectivamente⁽³⁹⁴⁾. No obstante, ni todas la citologías indeterminadas condicionan una cirugía estrictamente diagnóstica ni ambas categorías (Bethesda 3 y 4) tienen la misma línea de trabajo^(235, 389).

Una forma de aumentar el VPN de los paneles de mutaciones somáticas es añadiendo otros marcadores, como los miRNA⁽²²³⁾. La unión de ambos paneles

permite detectar la presencia de mutaciones oncogénicas (BRAF, RAS, PAX8-PPAR γ y RET-PTC 1 y 3) junto con los niveles de expresión de 10 miRNA (*Multiplatform Mutation and miRNA test* (MPT) actualmente comercializados como *ThyGenX Thyroid Oncogene Panel*^{*} y *ThyraMIR Thyroid miRNA Classifier*; Interpace Diagnostic; PDI, Inc). Su utilidad se ha analizado en un estudio multicéntrico, incluyendo 109 nódulos con AUS/FLUS o NF/SNF, con un VPP del 74% y un VPV del 94%. Con una prevalencia del 32% de cáncer, la tasa de verdaderos negativos fue del 58%, las cirugías diagnósticas pasaron de 74 a 11. Los autores realizaron además un estudio teórico, en función de diferentes prevalencias o probabilidades pretest de patología maligna, consiguiendo un VPP>50% para prevalencias >15% y un VPN del 93-98% para cualquier prevalencia >15% y <35%. Además, independientemente de ésta, el uso del MPT reduce en 85% el número de cirugías diagnósticas.

Paskas *et al.* proponen un algoritmo secuencial basado en la determinación de BRAF, 2 miRNA (miR-221 y miR-222) y la expresión IHQ de galectina-3, en muestras de PAAF⁽³⁹⁵⁾. Este algoritmo de decisión ha demostrado una S del 73,5%, una E del 89,9% y una Ext del 75,7%, con VPP del 80,6% y VPN del 85,5%.

También se ha combinado el estudio con microarrays, PCR y miRNA⁽³⁵⁷⁾ encontrando 13 genes y 62 miRNA (todos los genes y 10 miRNA confirmados por qRT-PCR) capaces de discriminar entre AF, variantes oncocíticas de tumores foliculares, y CPT, además de comprobar como el perfil de los TPMI se solapa con el de los anteriores, catalogándolos como benignos en el 70% de los casos tras el estudio molecular. Si bien aún no se ha validado, se abre una vía para reclasificar a los TPMI.

La cantidad de marcadores ha crecido muchísimo y es difícil saber qué es útil y qué no. Rodrigues *et al.*⁽²⁴⁵⁾, tratan de poner un poco de orden en esta cantidad de información revisando publicaciones que incluyen marcadores moleculares en PAAF hasta junio de 2011. Casi el 70% de los estudios usaron sólo un marcador y poco más del 30% incluyeron paneles de marcadores. Los genes más frecuentemente estudiados han sido GAL3, BRAF, RET y HBME-1. En esta revisión se pone de manifiesto que las diferencias metodológicas provocan discrepancias importantes haciendo difícil la comparación entre investigaciones. Entre estas diferencias están las que afectan a la dilución de las muestras, la presencia de más de 4 criterios diferentes para evaluar la tinción inmunohistoquímica, o la ausencia de más de un observador independiente para evaluar las muestras citológicas. Los autores encuentran que 26 marcadores se han investigado menos de dos veces y que otros 17, no han sido objeto de ninguna publicación en cinco años o más. Concluyen que, a pesar de que parece evidente que es imposible encontrar un único marcador que reduzca el número de PAAFs indeterminadas, los dos más útiles son BRAF por su especificidad (siete FP en 26 estudios que valoraron 2.800 lesiones) y GAL3 por su regularidad en los resultados de las investigaciones que la incluyen (80% o más de media en S, E, VPP, VPN y Ext).

* Previamente comercializado con miRInform® Thyroid, Asuragen, Inc. Existe otra plataforma comercial (Quest Diagnostics Thyroid Cancer Mutation Panel (Reflex Testing), que incluye BRAF, RAS, RET/PTC y PAX8-PPAR γ presentada durante 2012 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), pero sobre la que no he encontrado más publicaciones.

1.6.1. Marcadores emergentes

Entre los nuevos genes que podría tener utilidad como marcador diagnóstico o pronóstico⁽³²¹⁾ se encuentran:

- Nuevos genes de fusión:
 - BRAF/AKAP9: se encuentra en cáncer esporádico, sobre todo en pacientes con antecedentes de exposición a radiación (11%).
 - ETV6–NTRK3: se ha encontrado tanto en CPT esporádico (2%) como radio inducido (14.5%)
 - STRN/ALK: presente en el 9% de CPDT y el 4% de CAT pero también en algún CDT (1.2%)
- Recientemente se ha investigado la detección en BAG de mutaciones el promotor de la telomerasa de la transcriptasa inversa (TERT)⁽⁶⁵⁾. La mutación C228T del promotor de TERT no se encuentra en tumores benignos, afectando al 10% de los CPT y asociándose a mayor agresividad.

1.7. SUMARIO

A lo largo de esta introducción hemos visto que el cáncer tiroideo es un tumor poco frecuente y con buen pronóstico, que está aumentando su incidencia en los últimos años. Las técnicas diagnósticas preoperatorias se basan en la ecografía y en la citología y ambas clasifican correctamente a la mayoría de los pacientes. Sin embargo, cuando el resultado citológico es de neoplasia folicular (citología indeterminada), podemos encontrarnos finalmente bien patología benigna, en la mayor parte de los casos (AF, ACH) bien patología maligna (CFT, CPT-VF, CCH). Dado que ni la citología ni los datos clínicos o radiológicos, proporcionan datos más precisos, muchos de estos pacientes acaban siendo sometidos a cirugías con intención diagnóstica.

Para mejorar el rendimiento de las pruebas preoperatorias se ha investigado mucho en biología molecular, y se puede afirmar que estos estudios han identificado una serie de moléculas con potencial para diferenciar ambos tipos de lesiones, proporcionar un pronóstico o servir como dianas para el tratamiento, y que además, han contribuido al conocimiento de las vías implicadas en la carcinogénesis.

Los estudios de expresión génica presentan una gran variabilidad en sus resultados, que depende no sólo de la técnica, sino del tipo de muestras incluidas en los estudios, e incluso de variaciones geográficas o raciales. Puesto que hasta el momento actual no hay un marcador único con la suficiente capacidad discriminativa entre nódulos benignos y malignos en caso de citología no concluyente, se ha recurrido a utilizar combinaciones de genes, con cierto éxito, pero a un coste demasiado elevado para su generalización.

Así pues, la investigación continúa, buscando marcadores o combinaciones de ellos, que puedan mejorar el diagnóstico citológico evitando cirugías diagnósticas innecesarias a un coste asequible. Es en este contexto, tratando de encontrar marcadores de utilidad en nuestro medio, donde se plantearon los objetivos de este trabajo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Es posible discriminar preoperatoriamente la benignidad o malignidad de un nódulo tiroideo (con citología previa indeterminada o sospechosa de malignidad) mediante el estudio del perfil de expresión génica que muestran las células del tejido tiroideo patológico y/o de sangre periférica. Además, este estudio de expresión génica proporciona datos sobre el pronóstico y la evolución de los cánceres diferenciados de tiroides.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo principal

Catalogar preoperatoriamente como benigno o maligno el nódulo tiroideo de malignidad dudosa mediante el estudio del perfil de expresión génica de los pacientes en muestras de tejido tiroideo y/o células de sangre periférica.

2.2.2. Objetivos intermedios

1) Detección mediante técnica con microarrays de un perfil de expresión génica diferencial en muestras de tejido tiroideo patológico y de sangre periférica de un grupo de pacientes con lesiones tiroideas benignas y malignas.

2) Valoración de la capacidad discriminativa de benignidad y malignidad de este set de genes diferencialmente expresados mediante qRT-PCR, en un segundo grupo de enfermos intervenidos por enfermedad nodular tiroidea con citología indeterminada y/o sospechosa clínica y/o radiológica de malignidad.

3) Detección de relaciones de los genes diferencialmente expresados con factores pronósticos clinicopatológicos conocidos del carcinoma de tiroides.

4) Comprobar la validez de la ^{18}F FDG-PET/TAC en el diagnóstico preoperatorio del nódulo tiroideo y análisis de la posible relación de las diferencias de expresión génica con la captación de ^{18}F -FDG.

5) Valoración de la relación del conjunto de genes con la agresividad biológica del cáncer de tiroides.

6) Construcción de un clasificador a partir de los genes cuyo perfil de expresión muestre mayor capacidad discriminante de benignidad o malignidad.

7) Validación de sensibilidad, especificidad y valor predictivo de este clasificador aplicado al grupo de pacientes con citología indeterminada.

PACIENTES Y MÉTODOS

3. PACIENTES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo y controlado de base hospitalaria, de validez de métodos diagnósticos y de factores pronósticos, aprobado por el Comité de Investigación Clínica de Hospital Universitario Virgen de las Nieves, perteneciente al Complejo Hospitalario Universitario de Granada. Estudio financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (referencia PI-0057/2007).

3.2. ÁMBITO

Todas las intervenciones quirúrgicas y, por tanto, la toma de muestras se han realizado en el Servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, por dos miembros de la sección de Cirugía Endocrina del mismo. Para la extracción de las muestras sanguíneas se contó con la colaboración de un enfermero del área de quirófanos de nuestro centro.

Todos los experimentos con microarrays, y las determinaciones de qRT-PCR se realizaron en el laboratorio de la Unidad de Investigación y Cirugía Experimental perteneciente al hospital, contando con dos investigadores con experiencia en este análisis y el equipo necesario detallado a continuación:

- Cabina de seguridad biológica Nuair para la obtención óptima de RNA de las muestras.
- Incubadora-agitadora Thermomixer® (Eppendorf, Alemania).
- Centrífuga Sigma® 4-15C específica para arrays. Microcentrifugas MiniSpin® plus, centrifugas con refrigeración, agitador para hibridación de arrays INNOVA™-4080 (New Brunswick Scientific Co., Inc, USA), autovortex Mixer SA2 (Stuart® Scientific) y bloque térmico.
- Bioanalizador Experion® (Bio-Rad, Richmond (VI), EEUU) para determinar la calidad del ARN.
- GenePix 4000B Array Scanner™ (Axon Instruments) para la lectura de los microarrays.
- El *software* del sistema CodeLink® (Applied Microarrays).
- Stratagene™ Mx3005P qPCR Instrument (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA) para la determinación de qRT-PCR.
- Equipo TissueLyser (Qiagen) disruptor de tejidos.
- Termociclador Eppendorf con gradiente de temperatura.
- Lector de ELISA Sunrise™.
- Baño termostático Selecta.
- Sistema de imagen Kodak Digital Science™ Image Station 440CF.
- Nanodrop™ ND-1000 Spectrophotometer.
- Cubetas de electroforesis y blotting, y micropipetas autoclavables.

El Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Informática de la Universidad de Granada ha colaborado realizando el análisis de los datos proporcionados por los microarrays.

Las imágenes de ^{18}F FDG-PET/TAC se han obtenido en el servicio de Medicina Nuclear de nuestro centro. La determinación de la mutación BRAF se realizó en el laboratorio de Biología Molecular, adscrita a dicho servicio.

3.3. TAMAÑO MUESTRAL

El cálculo del tamaño muestral se realizó utilizando la calculadora de tamaño muestral GRANMO (disponible en: <http://www.imim.es/ofertadeserveis/software-public/granmo/>). Aceptando un riesgo alfa de 0.05 y una potencia del 80% en un contraste bilateral, se precisan 16 sujetos en el grupo maligno y 16 en el grupo benigno para detectar como estadísticamente significativa la diferencia entre dos proporciones, que para el grupo 1 se espera sea de 0.25 y el grupo 2 de 0.75. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%.

3.4. SUJETOS DE ESTUDIO

3.4.1. Criterios de elegibilidad

Pacientes con enfermedad nodular tiroidea programados para tiroidectomía, mayores de 18 años de edad, que tras ser informados de forma oral y escrita (Anexo III.I) acepten participar en el estudio y firmen el correspondiente Documento de Consentimiento (Anexo III.II). Los pacientes debían tener sospecha clínica o radiológica de patología maligna, y/o citología indeterminada (incluyendo sospechosa de malignidad) o maligna.

3.4.2. Criterios de Exclusión

Negativa a participar en el estudio.

Neoplasia maligna previa o concomitante, incluyendo metástasis tiroidea de otros tumores.

Diagnóstico de bocio tóxico (nodular o difuso).

TSH preoperatoria por encima del rango normal (hipertiroidismo subclínico).

3.4.3. Muestra

Entre el uno de enero de 2008 y el 30 de enero de 2011 se consideraron elegibles para el estudio un total 56 pacientes que acudieron a consulta externa de Cirugía General de nuestro centro hospitalario por la patología tiroidea referida en los criterios de elegibilidad. Los enfermos fueron programados para tiroidectomía y dieron su conformidad para participar en el estudio. La fecha de la intervención quirúrgica dependió del orden de inclusión en el Registro de Demanda Quirúrgica, teniendo en consideración para la programación, que los pacientes con cáncer diagnosticado tuvieron preferencia sobre los pacientes con lesiones sospechosas o indeterminadas. Esta fecha fue, por tanto, la que determinó el orden en que se obtuvieron y analizaron las muestras.

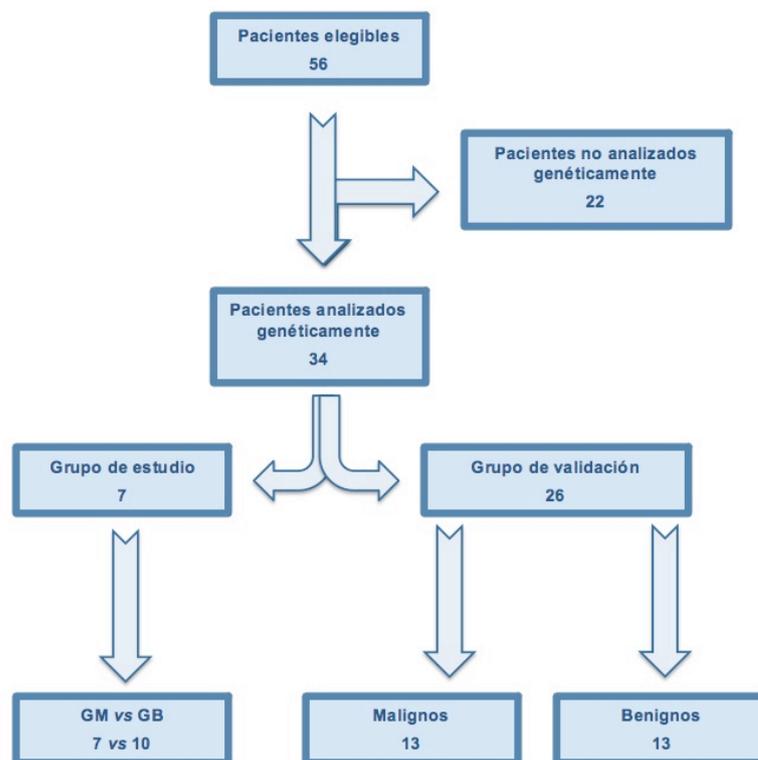
Para obtener el máximo de expresión diferencial entre patología benigna y maligna en el experimento con microarrays se decidió dividir a los pacientes en dos subgrupos: un grupo de estudio para análisis del perfil génico con microarrays, y un grupo de validación para determinación de qRT-PCR con el objetivo de validar los resultados en un conjunto independiente de pacientes.

El total de pacientes elegibles se compuso por 28 afectos por lesiones benignas y 28 con diagnóstico final de cáncer tiroideo. El grupo de estudio quedó compuesto por 7 pacientes con diagnóstico final de cáncer de tiroides que se compararon con 10 pacientes con patología benigna, incluidos durante los primeros 12 meses del periodo de reclutamiento. Sobre ellos se realizó el análisis mediante microarrays mientras que la determinación de qRT-PCR se utilizó para validar los resultados así obtenidos en un grupo independiente de 13 pacientes con patología maligna y en 13 con patología benigna: nueve de los 10 utilizados para el experimento con microarrays y cuatro pacientes adicionales (Fig. 11).

La asignación al grupo de estudio no fue aleatoria, ni cegada, sino que se decidió realizar el análisis con microarrays con los casos incluidos durante los primeros 12 meses del estudio.

Como ya se ha mencionado, las muestras se procesaron por orden de llegada a la Unidad de Investigación y Cirugía Experimental, es decir por el orden en que fueron intervenidos. Los 22 últimos pacientes en ser intervenidos (14 del grupo benigno y 8 del grupo maligno) no fueron analizados por falta de financiación.

Fig. 11 Diagrama de flujo de los pacientes incluidos en el estudio



El seguimiento de los pacientes se ha realizado según el protocolo habitual del servicio de Cirugía General y del Servicio de Endocrinología de nuestro centro. Los pacientes con patología benigna fueron revisados a las 4-6 semanas de la intervención y, tras obtener un correcto control hormonal pasaron a seguimiento por Atención Primaria. En cuanto a los pacientes con patología maligna se revisaron a los 1, 3, 6 y 12 meses tras la intervención, realizándose tratamiento ablativo al tercer

mes de la cirugía, si estaba indicado. El resto del seguimiento dependió del si el paciente tenía o no criterios de curación clínica (ausencia de alteraciones en la exploración física), bioquímica (negatividad de tiroglobulina), y radiológica (ausencia de lesiones estructurales). Estos pacientes, en cualquier caso, han sido evaluados al menos anualmente. La información de la evolución está disponible electrónicamente en la Historia Única de Salud de Andalucía y se ha revisado por última vez el 15 de septiembre de este año.

3.5. MATERIAL BIOLÓGICO

El estudio se realizó en muestras de sangre periférica, y de tejido tiroideo patológico obtenido en el momento de la extirpación quirúrgica del tiroides de los pacientes que cumplían con los criterios de elegibilidad.

3.5.1. Toma de muestras y conservación de sangre periférica.

Antes de la inducción anestésica, se realizó una extracción de 15 ml de sangre mediante venopunción con sistema de acceso venoso Vacutainer™ (Becton, Dickinson and Company, NJ, EEUU) en vena periférica del miembro superior. La muestra se distribuyó en 3 tubos *Pax Gene Blood RNA*® (Becton-Dickinson/Qiagen, San Diego, California, USA) con agentes lisadores celulares y agentes estabilizadores del ARN.

De cada muestra de sangre obtenida se conservó una alícuota para un posterior análisis mediante qRT-PCR.

3.5.2. Toma de muestras y conservación del tejido tiroideo.

Las muestras de tejido tiroideo se obtuvieron inmediatamente después de la extirpación de la pieza, siempre por el mismo equipo de dos cirujanos pertenecientes a la sección de Cirugía Endocrina del servicio de Cirugía General del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Se tomó un fragmento del tejido nodular dominante o sospechoso de malignidad de al menos 0,4 gramos, y fue conservado para su envío posterior al laboratorio de la Unidad de Investigación en la solución *TRI Reagent*® (Ambion, Applied Biosystems, USA), 1 ml por cada 50-100 mg. Esta solución monofásica combina fenol e isotiocianato de guanidina para inhibir rápidamente la acción de ARNasas que puedan degradar el ARN.

3.5.3. Análisis del perfil de expresión génica mediante microarrays en tejido y sangre periférica.

Los microarrays empleados en este estudio son los bioarrays de la plataforma tecnológica *CodeLink™ Expression Bioarray* (Applied Microarrays, Tempe, AZ, USA), más concretamente el *CodeLink™ UniSet Human Whole Genome Bioarray* que contiene unas 57.000 réplicas que representan unos 45.000 genes humanos bien caracterizados en las bases de datos públicas (UniGene, RefSeq, dbEST), y que permite analizar todo el genoma en un único array. Además, contiene 384 oligos

* Información disponible en: https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1314735988470/litdoc11001167p07_09_20110830233403.pdf

correspondientes a controles negativos y 360 oligos de controles positivos obtenidos de secuencias bacterianas para la monitorización de su funcionamiento. La reproducibilidad aportada por el fabricante es buena, con un coeficiente de variación menor del 15% cuando se analiza una muestra en diferentes bioarrays.

Los bioarrays de *CodeLink*[™] (Fig. 12) están compuestos por una superficie cristalina recubierta por una matriz tridimensional de un gel acuoso. El cristal es sometido a un fotoacoplamiento de un prepolímero hidrofílico de acrilamida que proporciona una superficie de unión, gracias a la presencia en su interior de un éster activado. Este polímero está covalentemente unido a sí mismo y a la superficie de cristal, y proporciona el sitio de unión para los C6-aminooligonucleótidos que son depositados sobre el polímero por robots dispensadores piezoeléctricos^(396, 397). Esta matriz proporciona un ambiente acuoso que permite a las sondas de oligonucleótidos estar separadas del soporte cristalino y así maximizar la interacción con la diana marcada procedente de la muestra^(396, 397). El tipo de ácido nucleico inmovilizado sobre el soporte es un oligómero de 30 bases presintetizado y fabricado mediante el método de deposición. El sistema incluye una cámara flexible de hibridación para procesar hasta 12 bioarrays.

En el trabajo que constituye la presente Tesis Doctoral se realizaron dos bioarrays por cada muestra (tanto de sangre como de tejido) de cada participante en el estudio.

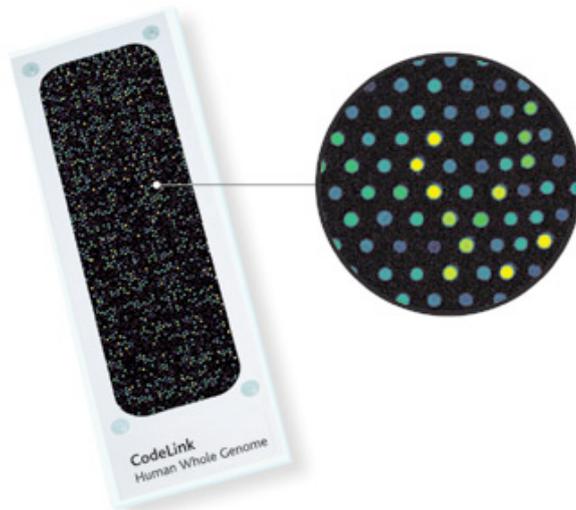


Fig. 12 CodeLink[™] Human Whole Genome bioarray

3.5.3.1. *Aislamiento, precipitación, cuantificación y control de la calidad del ARN*

• *Aislamiento y purificación de ARN*

El material de laboratorio empleado para el manejo de ARN se trató con dietil-pirocarbonato (DEPC) al 1% y, posteriormente, se autoclavó para evitar cualquier posible contaminación con ribonucleasas (RNAsas).

Tejido

El procedimiento seguido es el proporcionado por el fabricante de *TRI Reagent*[®] (Ambion, Applied Biosystems, USA) y se resume a continuación.

El primer paso es la preparación de etanol al 75% que será usado posteriormente como reactivo. Para ello se mezclan 250 µl de agua libre de ribonucleasas, y 750 µl de etanol al 100% por cada ml de solución *Tri Reagent*[®] que vaya a ser usada.

Seguidamente se realiza el homogeneizando o disrupción mecánica del tejido contenido en *TRI Reagent*[®] mediante un agitador de vórtice (o *vortex*). La mezcla obtenida se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos, lo que permite disociar completamente los complejos nucleoproteicos. Tras este tiempo se añaden 100 µl de 1-bromo-3-cloropropano por cada ml de la solución *Tri Reagent*[®] usada en la homogeneización, mezclándose vigorosamente durante 15 segundos. El resultante se incuba a temperatura ambiente durante 5-15 minutos, y se centrifuga a 12.000 xg (fuerza centrífuga) durante 15 minutos a 4°C.

La fase acuosa, que contiene el ARN, se transfiere a un tubo nuevo al que se le añaden 0,5 ml de isopropanol por ml de solución *Tri Reagent*[®] usada durante la homogeneización. Esta mezcla se agita moderadamente durante 5-10 segundos, se incuba a temperatura ambiente durante 5-10 minutos y se centrifuga a 12.000 xg durante 8 minutos a 4-25°C. El sobrenadante se desecha quedando el RNA precipitado en el fondo y a los lados del tubo en forma de gel. A continuación se adiciona 1 ml del etanol al 75% preparado previamente por cada ml de la solución *Tri Reagent*[®] para lavar los precipitados de ARN y se centrifuga a 7.500 xg durante 5 minutos a 4-25°C. En caso de que el precipitado de ARN no forme una bola compacta, se puede repetir la centrifugación.

El etanol residual se desecha y se procede al secado al aire del precipitado de ARN durante 3-5 minutos. Finalmente se disuelve el ARN en un agua libre de nucleasas (o en cualquier *buffer*), tras lo cual está preparado para su análisis o para su conservación a más largo plazo (a -70°C o menos).

Antes del análisis se comprobará la cantidad, la pureza y la calidad del ARN obtenido. Estos pasos son descritos más adelante.

Sangre periférica

El proceso de purificación del ARN de sangre periférica (Fig. 13) se efectuó siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante del equipo *PAXgene Blood RNA*[®] *Kit* (PreAnalytix, Qiagen/Becton-Dickinson, Holanda). Dicho kit contiene los tampones BR1 (de resuspensión), BR2 (de enlace), BR3 (de lavado), BR4 (de lavado), y BR5 (de elución) necesarios para realizar la purificación. Otros componentes proporcionados son los tubos de procesado (2 ml), de microcentrifuga (1,5 ml), y las columnas de centrifuga de ARN *PAXgene*[®].

El primer paso es el centrifugando los tubos *PAXgene Blood*[®] a 5.000 xg durante 15 minutos para conseguir el precipitado de los ácidos nucleicos. Éstos se resuspenden en 4 ml de agua destilada libre de RNAsas, volviéndose a centrifugar otros 10 minutos igual velocidad. Se descarta el sobrenadante y al sedimento se le añaden 350 µl de tampón BR1, mezclándolo vigorosamente hasta que la solución quede homogénea.

El volumen obtenido es transferido a un tubo de microcentrifuga, añadiéndose 300 µl del tampón BR2 y 40 µl de Proteinasa K, para su incubación a 55°C durante

10 minutos en una incubadora-agitadora (Thermomixer, Eppendorf, Alemania) a 1.200 xg. De esta forma se produce la digestión de las proteínas.

El material lisado se pipetea en la columna *PAXgene*® de disrupción por centrifugación, suministrada en el kit y ésta en un tubo de procesado para su centrifuga durante 10 minutos a máxima velocidad (sin superar 20.000 xg). Todo el sobrenadante obtenido se transfiere cuidadosamente a un nuevo tubo de microcentrifuga, se le añaden 350 µl de etanol (96-100% de pureza) y se mezcla en el agitador *vortex*.

El siguiente paso es pipetear 700 µl en la columna *PAXgene*® de centrifugación de ARN (también suministrada en el Kit), colocada en un tubo de procesado, y centrifugar durante 1 minuto a 8.000-20.000 xg. Tras este paso, se introduce la columna de centrifugación en un nuevo tubo de procesado. El resto de la muestra se pipetea también en la columna *PAXgene*® de centrifugación de ARN y se repite el procedimiento anterior.

A continuación se pipetean 350 µl del tampón de lavado BR3 en la columna de centrifugación de ARN. Se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 - 20.000 xg y se introduce dicha columna en un tubo de procesado nuevo.

Después se pipetean 80 µl de la mezcla de incubación de DNAsa, (70 µl del tampón de digestión de ADN del *PAXgene*® *Blood RNA Kit* + 10 µl de la solución madre de DNAsa) directamente en la membrana de la columna *PAXgene*® de centrifugación de ARN y se deja actuar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Transcurrido el tiempo indicado, se pipetean 350 µl de tampón de lavado BR3 en la columna de centrifugación de ARN y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000-20.000 xg. Se introduce la columna de centrifugación en un tubo de procesado nuevo, desechándose el previo.

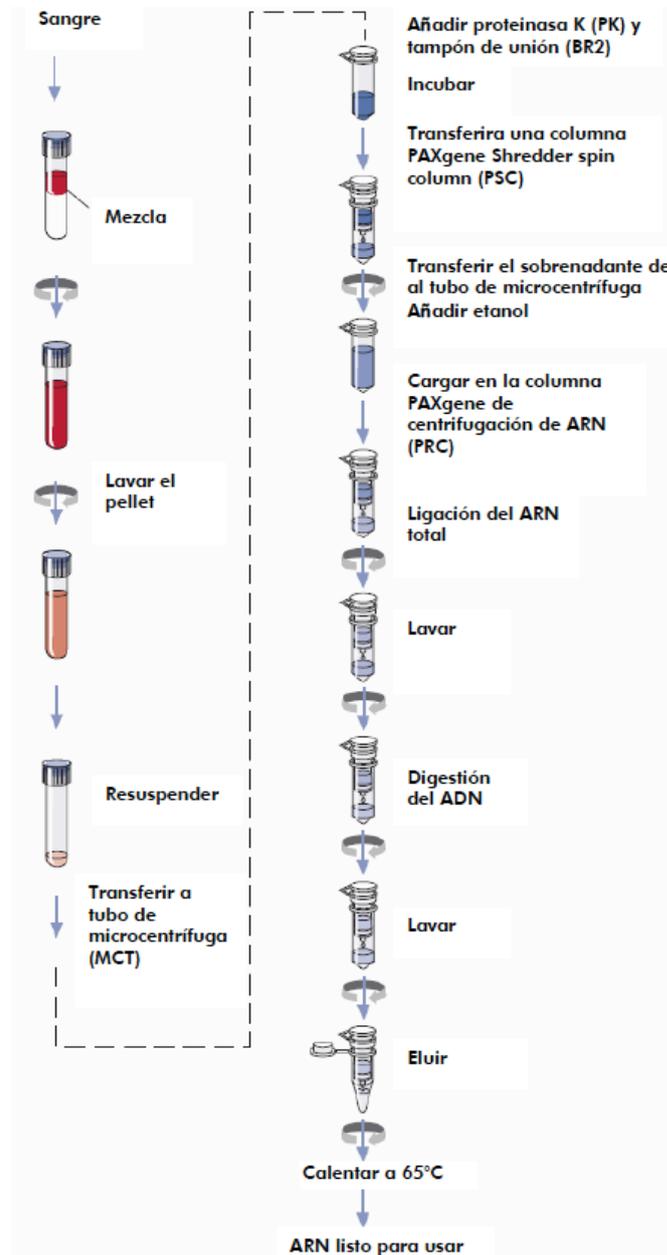
Finalmente se pipetean 500 µl de tampón de lavado BR4 en la columna *PAXgene*® de centrifugación de ARN y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000-20.000 xg. Se introduce la columna de centrifugación en un nuevo tubo de procesado, desechando el previo. Este paso se vuelve a repetir una vez más, pero se centrifuga durante 3 minutos a 8.000-20.000 xg y tras desechar el tubo antiguo, se vuelve a centrifugar 1 minuto a la misma velocidad.

Se prescinde de este tubo de procesado con los restos, y la columna de centrifugado se dispone en un tubo de microcentrifuga. Se pipetean 40 µl del tampón BR5 en la membrana de dicha columna, y se realiza una nueva centrifuga a 8.000-20.000 xg durante un minuto para eluir el RNA. Este paso se repite, utilizando el mismo tampón y el mismo tubo de microcentrifuga.

El eluido de ARN se incuba a 65°C durante 5 minutos, tras lo cual, el ARN esta preparado para su uso o se almacena a -80°C para posteriores aplicaciones.

Una vez obtenido el ARN se procede al precipitado del mismo. Para ello hay que ajustar el volumen de ARN eluido en BR5 (320 µl) hasta un volumen final de 360 µl en agua destilada libre de RNAsas. A estos 360 µl se le añaden 40 µl de acetato sódico (2 M y pH 4,0) hasta un volumen final de 400 µl. Se añaden a esta mezcla 400 µl de isopropanol y se incuba durante durante 12h a -20°C. Pasado este tiempo, la muestra se centrifuga 10 minutos a 4°C y 12.000 rpm y se descarta el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 1 ml de etanol al 70% y, tras otra centrifugación como la anterior, se vuelve a descartar el sobrenadante. El sedimento final se deja secar durante 15-30 minutos y se resuspende en 12 µl de agua libre de RNAsas.

Fig. 13 Método utilizado para la extracción de RNA total según PAXgene® Blood RNA Kit (PreAnalytix, Qiagen/Becton-Dickinson)
(Fuente: PAXgene® Blood RNA Kit Handbook).



• Cuantificación y comprobación de la pureza del ARN

La cuantificación del ARN total se determinó utilizando un equipo NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop™ Technologies, Inc, Wilmington (DE), EEUU), el cual, con tan solo 1µl de muestra de interés, permite conocer la cantidad de ARN presente en ella. Este equipo, además permite intuir la pureza del ARN respecto a posibles contaminaciones proteicas determinando el cociente entre 260 y 280nm (A_{260}/A_{280}), que debe hallarse entre valores de 1,8-2,1.

• Determinación de la calidad del ARN

La calidad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis capilar en un bioanalizador Experion® (Bio-Rad, Richmond (VI), EEUU). Este método emplea el ARN ribosómico (ARNr) para inferir la calidad del ARNm, ya que el ribosómico constituye más del 80% y el mensajero solo entre el 1 y el 3% del ARN total, lo que hace imposible su detección directa.

El bioanalizador Experion® es un sistema de electroforesis automatizado basado en la tecnología de microfluidos. Evalúa la integridad y concentración del ARN, generando de forma automática un informe con:

- el indicador de calidad del ARN,
- una valoración cuantitativa de la integridad,
- un electroferograma, y
- los cocientes de ARNr y sus concentraciones.

Cada chip de microfluidos (Fig. 14) contiene una serie de pocillos de plástico unidos sobre una placa de vidrio. Esta placa, a su vez, está grabada con una red de microcanales que conectan con la base de cada uno de los pocillos. Cuando estos canales se ceban con el gel y se le añaden las muestras de ARN, la estación de electroforesis conduce cada muestra por un microcanal aplicando un voltaje preciso.

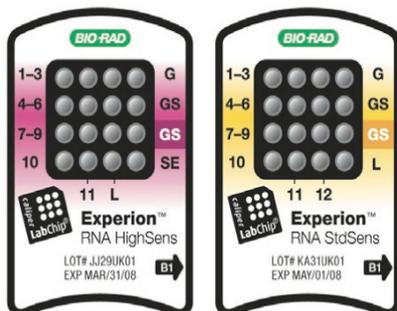
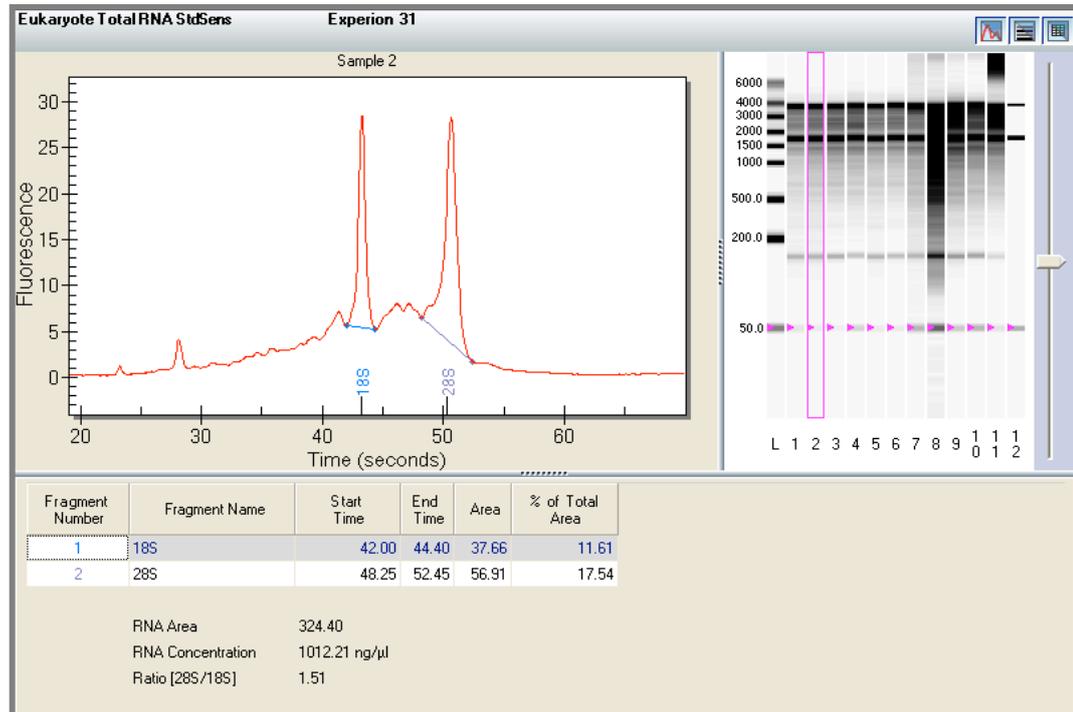


Fig. 14 Chip de microfluidos Experion RNA StdSens y RNA HighSens. Permiten analizar 1-12 muestras en unos 30 minutos. Cada uno de ellos analiza el ARN en diferentes concentraciones (nanogramos o picogramos).

El *software* del *Experion*® primero genera el electroferograma de los marcadores de ARN (*ladder*) en el que se identifican nueve picos a diferentes tamaños. Después, se genera el electroferograma de la muestra de ARN donde se observan dos picos de pequeño tamaño, que corresponden a un marcador interno y al ARNr 5S, y dos picos mayores, que corresponden al ARN 18S y 28S respectivamente (Fig. 15).

Fig. 15 Resultado obtenido del análisis de una muestra de ARN total con el bioanalizador Experion® (Bio-Rad)



3.5.3.2. Descripción del proceso de preparación e hibridación de los microarrays

• Reactivos y muestras

En las Tablas 15a, 15b, 15c, y 15d figuran los componentes necesarios para los distintos procesos, suministrados por el fabricante en el *MessageAmpII-Biotin EnhancedTM Kit* (Applied Biosystems, USA):

- Síntesis de la primera hebra de ADNc
- Síntesis de la segunda hebra de ADN
- Síntesis de ARNc

Para la fragmentación e hibridación del ARNc se aplicaron las instrucciones del manual de *CodeLink® Gene Expression System* (Applied Microarrays)*.

• Síntesis del ARNc

En primer lugar, el ARN total obtenido de sangre y tejido (0,2-2 μg) se somete a RT en presencia de T7-Oligo(dT) para la síntesis del ADN complementario (ADNc) (Tabla 15a). Para ello se utilizan los reactivos para la síntesis de la primera hebra de

* CodeLink Expression Bioarray System disponible en <http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/UCM132970.pdf>

ADNc (Tabla 15b) que se incuban durante 2 horas a 42°C. Seguidamente se prepara la mezcla de reactivos para la síntesis de la segunda hebra de ADNc (Tabla 15c) que junto con los 20 µl de la reacción anterior, se incuban durante 2 horas a 16°C.

Tabla 15a Componentes necesarios para la preparación de la solución de RNA y controles bacterianos

Reactivos	Contenido (µl/muestra)
RNA total	~2 µg → 1µg/µl
T7 Oligonucleótidos dT	1 µl
Set Control de ARNm bacteriano	2 µl
Agua libre de ribonucleasas	7 µl
Volumen final	12 µl

Tabla 15b Componentes necesarios para la preparación de la síntesis de la primera hebra de ADNc

Reactivos	Contenido (en µl)
Solución de RNA y controles bacterianos	12 µl
Tampón de Síntesis de la 1ª hebra (10X)	2 µl
Mezcla de dNTPs	4 µl
Inhibidor de Ribonucleasas	1 µl
Enzima transcriptasa inversa	1 µl
Volumen final	20 µl

Tabla 15c Componentes necesarios para la síntesis de la segunda hebra de ADNc

Reactivos	Contenido (en µl)
Solución de la síntesis de la primera hebra	20 µl
Agua libre de Ribonucleasas	63 µl
Tampón de Síntesis de la 2ª hebra (10X)	10 µl
Mezcla de dNTPs	4 µl
ADN polimerasa	2 µl
ARNasa H	1 µl
Volumen final	100 µl

Una vez sintetizado el ADNc, éste es purificado mediante columnas de silica-gel incluidas en el *MessageAmp II Biotin Enhanced™ PCR Purification Kit* (Ambion, Applied Biosystems, CA, USA), y concentrado mediante precipitación. A continuación, se realiza la síntesis del ARNc mediante transcripción *in vitro* y el marcaje con ¹¹UTP biotina, dejando incuban la reacción durante 14 horas a 37°C (Tabla 15d). El ARNc así obtenido es igualmente purificado (*MessageAmp II Biotin*

Enhanced™ PCR Purification Kit; Ambion, Applied Biosystems, CA, USA) y se comprueba su concentración, pureza y calidad. La A_{260} debe ser de 0,15 para continuar con el proceso.

Tabla 15d Componentes necesarios para la síntesis y marcado del ARNc

Reactivos	Contenido (en μ l)
ADNc purificado y concentrado	9,5 μ l
Tampón de reacción de T7 (10X)	4 μ l
Solución de ATP T7	4 μ l
Solución de GTP T7	4 μ l
Solución de CTP T7	4 μ l
Solución de UTP T7	3 μ l
Solución de biotina 11-UTP	7,5 μ l
Mezcla de Enzima T7*	4 μ l
Volumen final	40 μl

*: Contiene una polimerasa de ARN T7

• *Fragmentación e hibridación del ARNc*

Para cada array se mezclan 10 μ g ARNc con agua libre de ribonucleasas (hasta un volumen de 20 μ l) y con 5 μ l del tampón de fragmentación. La solución se incuba a 94°C durante 20 minutos obteniéndose ARNc fragmentado (Tabla 15e).

Tabla 15e Componentes necesarios para la hibridación del ARNc

Reactivos	Contenido (en μ l)
ARNc fragmentado (10 μ g)	25 μ l
Componente A del tampón de hibridación	78 μ l
Componente B del tampón de hibridación	130 μ l
Agua libre de ribonucleasas	27 μ l
Volumen final	260 μl

Para cada cámara del bioarray (*CodeLink™ UniSet Human Whole Genome Bioarray*, Tempe, Az, USA) que se vaya a procesar se pipetea 250 μ l de la solución de hibridación (Tabla 15e), tras lo que se procede al sellado de los puertos de las mismas. La reacción de hibridación se realiza a 37°C durante 18-24 h, en el agitador INNOVA-4080 (New Brunswick Scientific Co., Inc, USA) a 300 revoluciones por minuto (rpm).

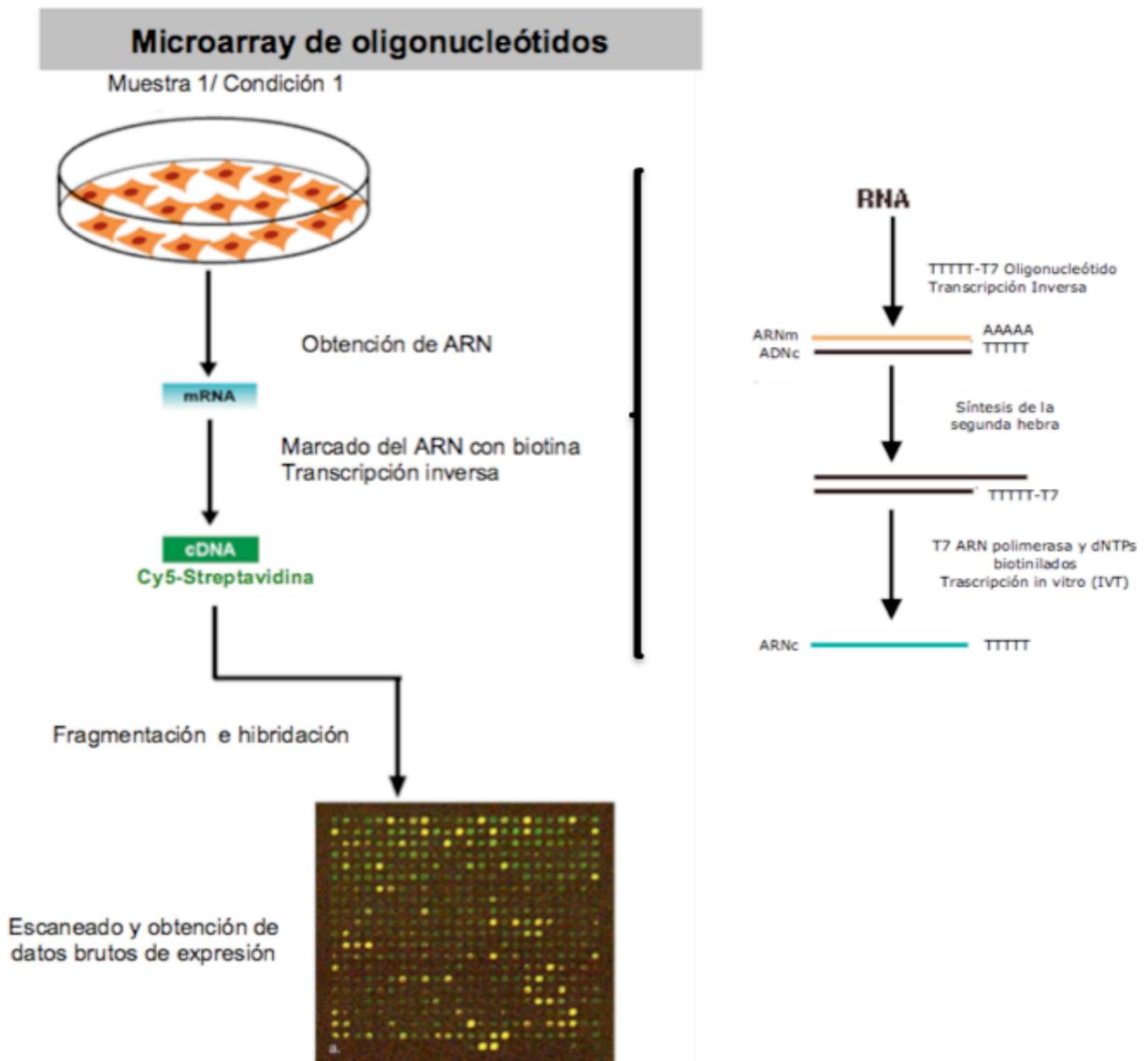
El procesado tras la hibridación incluye un primer lavado con tampón TNT 0,75X (0,1 M Tris-HCl a pH 7,6; 0,15 M de NaCl y 0,05% de Tween® 20), la tinción

con un conjugado de estreptavidina (proteína fijadora de biotina) y un fluorocromo de cianina (Cy5), y sucesivos lavados para eliminar uniones inespecíficas. Tras el último aclarado los arrays son secados mediante centrifugación después de lo cual ya están preparados para su escaneado y análisis.

Las imágenes de los bioarrays se han procesado con un equipo GenePix 4000B Array Scanner™ (Axon Instruments) instalado en el laboratorio de la Unidad Investigación y Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

El esquema de todo el procedimiento se puede ver en la Fig. 16.

Fig. 16 Esquema de la metodología para obtener microarrays
(Modificada de Vermeeren y Michiels 2011 (Doi: 10.5772/19432.)



3.5.3.3 Análisis de los datos de expresión de los microarrays

- Normalización

Antes de poder utilizar los datos experimentales o brutos es necesario normalizarlos para minimizar los efectos que son debidos a las variaciones en la tecnología y no en la biología. En particular se pretende ajustar las diferencias existentes entre los fluorocromos, en el marcaje, intensidad, etc.

La normalización de los datos se ha realizado con el software *CodeLink™ Expression Analysis*. Este programa ha sido implementado en el lenguaje de programación R⁽³⁹⁸⁾ y el método incluye la normalización de la mediana y la corrección del ruido de fondo o *background* con aplicación del método LOESS (regresión polinómica combinada).

- Análisis estadístico: Análisis de Significación de Microarrays

Una vez obtenidos los datos normalizados de cada caso del grupo de estudio se utilizó el método SAM⁽³³⁴⁾ para identificar los genes que variaron su comportamiento de forma significativa. Éste se basa en el t-test, y en él se utilizan permutaciones de los datos que se corrigen mediante el cálculo del FDR para evitar diferencias no significativas. Se parte de una matriz numérica de expresión X_{pn} con p filas y n columnas, en la que se dispone un gen por cada fila y, el resultado de un experimento de microarrays por cada columna, de tal forma que la posición (i, j) de la matriz contendrá el nivel de expresión del gen i bajo la muestra experimental j .

SAM toma como entrada la matriz de expresión y el valor de un parámetro *delta* (Δ) fijado por el usuario, para discriminar entre genes que cambian su expresión de forma significativa y no significativa. El parámetro Δ se fija de forma empírica, en función del número de genes significativos que se deseen extraer y del grado de significación estadística que se exige.

Existen distintos tipos de experimentos para los que se puede aplicar esta técnica. En esta Tesis doctoral se ha usado el de dos muestras independientes (*two class unpaired*): dos conjuntos de experimentos con microarrays (C_1 y C_2) que representan situaciones diferentes, en nuestro caso, C_1 es el conjunto de pacientes con patología benigna y C_2 , el conjunto de pacientes con patología maligna.

Esta metodología (Fig. 17) nos permite detectar un conjunto de genes *significativos positivos* (los que han aumentando su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1) y *significativos negativos* (los que han disminuido su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1).

Descripción del método SAM

Se definen los niveles de expresión x_{ij} con $i= 1, 2, \dots, p$ genes y $j= 1, 2, \dots, n$ experimentos diferenciados en dos clases: C_1 y C_2 . SAM realiza los siguientes cálculos:

a. Para cada gen i calcula el estadístico d_i que mide la diferencia de expresión relativa para el gen i entre los dos grupos de estudio C_1 y C_2 :

$$d_i = \frac{r_i}{s_i + s_0}$$

b. Ordena los genes en base a su estadístico, generando la lista $d_{(1)} < d_{(2)} < d_{(3)} < \dots < d_{(p)}$, donde $d_{(1)}$ es el valor mínimo y así sucesivamente.

c. Realiza B permutaciones de los experimentos.

d. Para cada permutación b , calcula los estadísticos d_i^b y los ordena obteniendo la lista $d_{(1)}^b < d_{(2)}^b < d_{(3)}^b < \dots < d_{(p)}^b$.

e. A partir de los estadísticos calculados para cada una de las B permutaciones, se estiman los valores de los estadísticos originales (los calculados con la clasificación correcta de las columnas). Esta estimación se lleva a cabo haciendo la media de los valores de la primera posición de las listas obtenidas en el punto 4 ($\bar{d}_{(1)}$), de la segunda posición ($\bar{d}_{(2)}$), etc. Es decir, se calcula:

$$\bar{d}_{(i)} = \left(\frac{1}{B} \right) \times \sum_{b=1}^B d_{(i)}^b, \text{ para } i = 1, 2, \dots, p$$

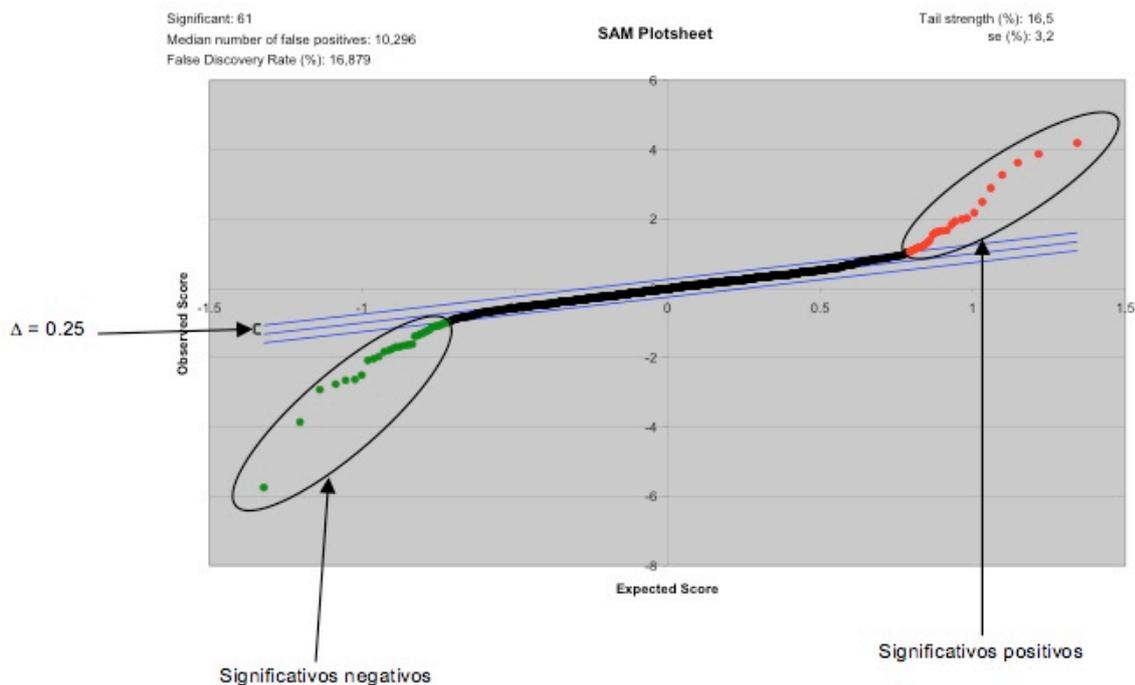
f. Genera una representación gráfica los valores de los $\bar{d}_{(i)}$ frente a los $d_{(i)}$ (Fig. 17).

g. Una vez fijado el valor de Δ , se recorre la gráfica partiendo desde el (0,0) hacia la derecha hasta encontrar un $i1$ tal que $\bar{d}_{(i1)} - d_{(i1)} > \Delta$.

- A todos los genes que quedan más allá del $i1$ se les llama **significativos positivos**. Estos serán los genes que han aumentando su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1 .
- A su vez, se recorre también la gráfica hacia la izquierda partiendo del (0,0) hasta encontrar un $i2$ tal que $\bar{d}_{(i2)} - d_{(i2)} > \Delta$. Todos los genes que quedan más a la izquierda de $i2$ son **significativos negativos**. Estos serán los genes que han disminuido su expresión significativamente en las muestras de la clase C_2 respecto a las de la clase C_1 .

h. Finalmente, calcula el estadístico q para cada gen, equivalente al p , pero corregido para test con múltiples hipótesis.

Fig. 17 Gráfico genérico de SAM



3.5.3.4 Validación de los resultados de los microarrays: qRT-PCR.

En el designado grupo de validación se ha realizado la comprobación de aquellos genes cuya expresión diferencial (malignos frente a benignos) ha mostrado resultados significativos mediante qRT-PCR. Se han utilizado sondas comerciales (*primers* o cebadores) diseñadas con el software Solaris (Dharmacon, Chicago, IL USA) (Tabla 16), comprobando que ningún *primer* presentaba homología con otros genes conocidos mediante la herramienta BLAST [*Sequence Similarity Search Tool* (NCBI)]. El análisis se realizó en un equipo Mx3005P (Stratagene™, Agilent Technologies, Santa Clara, (CA), USA).

La secuencia de los *primers* o cebadores utilizados en esta Tesis Doctoral se exponen en la Tabla 16:

Tabla 16. *Primers* utilizados para la determinación de qRT-PCR

Tejido	Sangre
Sonda GDF11 Solaris Human qPCR Gene Expression 2 Assay GDF11 Ref 77AX-012086-00-010 Forward: CGTATCCGCTCACTGAAGATTG Reverse: AGCTGTGTAGCACTTGCTTG Probe: ATTGGCAGAGCATCGACTTC	Sonda FLJ21986 (C7orf58) Solaris Human qPCR Gene Expression C7orf58 Ref 777AX-018816-00-020 Forward primer: AACCTGTGGGTTACAGCCTA Reverse primer: TAAGGCAAGGCACAATC Probe: GACATGAAAGGCCAGTGG
Sonda SCGB2A1 Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay SCGB2A1 Ref 77AX-019606-00-020 Forward: AAGCTGCTGATGGTCCTCAT Reverse: TCCAGGAGTTTGAGCCCA Probe: GCTATGCAGATTCTGGC	Sonda NLRC3 (NOD3) Solaris Human qPCR Gene Expression NLRC3 Ref 77AX-008796-00-010 Forward primer: CATCGTCAGTGGCCTAC Reverse primer: TCGAAGATGGCCCTCT Probe: ATTACTATGGCGCATCCAGG
Sonda FGF12 Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay FGF12 Ref 77AX-013145-00-020 Forward: CCATCCAAGGAGTGAAGGCTA Reverse: CTGGAGTGA AACATCTGAACTG Probe: GGTGAAGGCTATCTCTAC	Sonda PCGEM1 Homo sapiens PCGEM1 gene, non-coding mRNA Ref 19 × #18BA-DN001-004 + #18PU-GOLD 0-004 Forward Primer: CTGTGTCTGCAACTTCCTC Reverse Primer: AGTTCCACTTTGGCTGATATC Probe: cacCaaGccTgcTcact
Sonda ATP2C1 Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay ATP2C1 Ref 77AX-006119-00-020 Forward: GTAAACCTCCTCGCAACTG Reverse: GGTGTAATCACATTGTCTC Probe: CTCTGGCGTGAGCTACG	Sonda SUCLG2 Solaris Human qPCR Gene Expression SUCLG2 Ref 77AX-008918-00-010 Forward primer: CGTGCCGAGTTTCCTGT Reverse primer: GCCATCTTCTGGAGGTTAATTGAAC Probe: CGGGTCCCAGGCAGTTC
Sonda ASRGL1 Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay ASRGL1 Ref 77AX-004909-00-020 Forward: TCCGCAGTCCAGTGTATAGCAA Reverse: AGCAATGAGGTGTCTTTTCCA Probe: TGCTCGGCTTGTCATGG	Sonda CTAGE3 CTAGE 3, im21b07.y1 Human insulinoma Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 6035653 5, mRNA sequence Ref 21 × #18BA-DN001-004 + #18PU-GOLD0-004 Forward: AAATACTTCACGGCAAATTAC Reverse: AACATGAAATGATTTTTCTTTATTG Probe: tgcGgtActTtcCagc
Sonda HMG2 Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay HMG2 Ref 77AX-012710-00-020 Forward: CCCCTGCAAAGAAGGGA Reverse: ACTTGGCATCTCCAGCAC Probe: CAGGCACAGAAAGCTGAAGG	
Sonda ZNF568 Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay ZNF568	

Ref 77AX-027357-00-020 Forward: GAGCGTTTGAGCCACAT Reverse: GGCAGACTCTTGAGAACAC Probe: GATGGAAAGGAAAGCTTGG Sonda ERH	
Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay ERH Ref 77AX-012670-00-020 Forward: CGGCGTTGTAGTTAAGCTC Reverse: CTGTACCAGCAAATGGTGTG Probe: TTGGCGCGATGTCTCAC Sonda MGC45438	
Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay C16orf89 Ref 77AX-018764-00-020 Forward: AGGCTGCCATCCAGAGAT Reverse: AGCTGGAActCTCTTAGG Probe: TGAGTGATCCCAAGTACC Sonda PHF20	
Solaris Human qPCR Gene Expression 1 Assay PHF20 Ref 77AX-015234-00-020 Forward: ATGACCGCTATGACTTCGAG Reverse: GGCActCTTCActGAATC Probe: AGGAAAATGACTTCATG	

El primer paso es la obtención del ADNc mediante la reacción de retrotranscripción a partir del ARN conservado. Para ello se ha empleado el protocolo de *AffinityScript[®] QPCR cDNA Synthesis Kit* (Agilent Technologies, CA, EEUU). El proceso, descrito por el fabricante, se resume a continuación:

1. Se prepara la síntesis de la primera hebra de ADNc en un tubo de microcentrifugado y se añaden los siguientes componentes en este orden:

- RNAsa libre en 20 µl de H₂O.
- 10 µl de la primera hebra master-mix.
- 3 µl de oligo(dT)primer.
- 1 µl de *AffinityScript RT/RNasa Block enzyme mixture*.
- 1 µg de ARN (0,3 pg-3 µg).

2. Incubación a 25° C durante 5 minutos.

3. Incubación a 42° C durante 15 minutos para permitir la síntesis del ADNc.

4. Incubación a 95° C durante 5 minutos para terminar la reacción de síntesis del ADNc.

5. Para finalizar la síntesis de la primera cadena de ADNc se enfría en hielo para usar inmediatamente la qRT-PCR.

6. Se comprueba la calidad del ADNc y se determina su concentración utilizando el NanoDrop[™] ND-1000 Spectrophotometer.

Una vez obtenido el ADNc se prepara, para cada muestra, la mezcla indicada en la Tabla 17.

Las condiciones de la qRT-PCR fueron: 15 minutos y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, con una elongación terminal a 60°C durante 1 minuto.

Tabla 17 Preparación mezcla de reacción del protocolo de qRT-PCR.

Master Mix (Solaris qPCR)	12,5 μ l
Solaris primer	1,25 μ l
ADNc	1 μ g
H2O libre de RNAsas	Cantidad suficiente (Variable)
Volumen final	25 μ l

Las medidas de control usadas en este trabajo han sido:

- Elección del gen gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), como gen constitutivamente expresado (*housekeeping gene*) para el control interno.
- Medición de cada ADNc por duplicado para comprobar la reproducibilidad dentro del experimento.
- Medición de dos diluciones del mismo ADNc, cada una por triplicado. Esto pondría de manifiesto errores por la composición del material, ya que una muestra más concentrada amplifica más tarde que una más diluida
- Medición de ADNc procedentes de síntesis diferentes para descartar artefactos debidos a la reacción de retrotranscripción.

Tras completarse el proceso de qRT-PCR, se obtiene una medida de fluorescencia, que se traduce en una medida de cantidad.

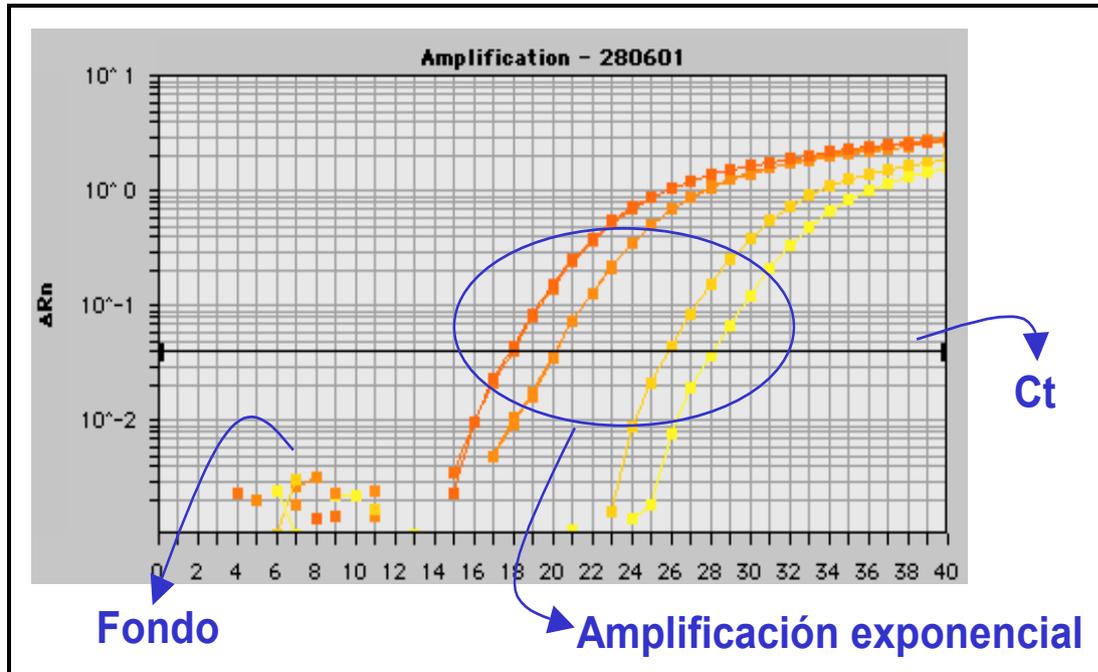
Para ello se parte de una curva estándar, realizada con cantidades conocidas de ADNc molde, que se mantiene igual en los distintos experimentos, y por tanto, también se utiliza para evaluar la reproducibilidad entre los mismos. Esta curva se compone de 5 puntos obtenidos de 5 diluciones seriadas (1, 1/10, 1/50, 1/100 y 1/500) de ADNc procedente de un ARN humano universal (*Universal Human Reference RNA* (Stratagene™, Agilent Technologies, Santa Clara, (CA), USA) que está compuesto de ARN de 10 líneas celulares. La curva estándar elegida debe tener varios puntos entre los que se deben amplificar todas las muestras ya que este es el único rango en el que se puede asegurar que la amplificación es lineal. Al final del experimento, el programa suministrado con el equipo Mx3005P (*MxPro QPCR software*, Agilent Tech, Ca, USA) genera los resultados en forma de gráfico (Fig. 18), en el que se representa el incremento de fluorescencia en función del ciclo de amplificación. Sobre este gráfico, se fija el Ct de manera que éste corte todas las líneas de amplificación de todas las muestras en la parte exponencial de la curva, por encima de la señal del fondo. Así se establece el punto en el cual el programa procesará cada amplificación para calcular la cantidad de molde.

Por último, con todos los datos, el mismo programa genera un fichero de informe (*experimental report*) en el que se registra cada muestra, se indica qué tipo de muestra es, qué valores de expresión fijados para la curva estándar tiene y cual es el valor de expresión calculado para cada muestra problema. Este fichero fue procesado posteriormente en una hoja de cálculo Excel (Microsoft Office™) para realizar las normalizaciones. El valor real de expresión de cada muestra se obtuvo del cociente de la expresión del gen problema entre la expresión del control endógeno.

Para este trabajo se ha considerado que los valores positivos de qRT-PCR indican la expresión del gen mientras que los negativos indican la ausencia de expresión del mismo.

Fig. 18 Gráfico de los resultados de la RT-PCR cuantitativa.

En la línea horizontal están representados los ciclos de amplificación y en la vertical la intensidad de la señal.



3.6. VARIABLES ANALIZADAS

3.6.1. Variables dependientes

3.6.1.1. Diagnóstico histopatológico de la pieza quirúrgica.

Se consideran dos grupos de patologías:

- Patología benigna (GB). En este grupo se incluirán pacientes con diagnóstico de bocio multinodular, bocio coloide, adenoma folicular, hiperplasia adenomatosa o nódulo tiroideo único benigno.

- Patología maligna (GM). En este grupo se incluirán pacientes con diagnóstico de CDT (folicular, papilar clásico o su variante folicular, medular, oncocítico) o anaplásico de tiroides.

La adscripción de la lesión a uno u otro grupo de patologías vendrá dada por el informe anatomopatológico final del espécimen de tiroidectomía sobre nuestras fijadas en parafina.

3.6.1.2. Pronóstico.

Los pacientes se han clasificado en función de las escalas con valor pronóstico más usadas y con mejor capacidad predictiva: TNM, MACIS y AMES (Anexo II).

3.6.2. Variables independientes.

3.6.2.1. Variables clínicas, analíticas y de técnicas de imagen.

1. Sexo. (Masculino/Femenino).
2. Edad del paciente en años.
3. Antecedentes familiares de neoplasia maligna tiroidea (Sí/No).
4. Antecedentes de irradiación cervical (Sí/No).
5. Sintomatología sospechosa de neoplasia tiroidea (Sí/No). Se consideran síntomas de patología maligna (sección 1.1.2): antecedentes familiares de cáncer tiroideo, o antecedentes de irradiación cervical, crecimiento rápido de la masa cervical, disfonía, disfagia, o disnea, todas ellas de aparición brusca.
6. Exploración física compatible con neoplasia tiroidea (Sí/No). Según la sección 1.1.2., se ha considerado la exploración clínica como sospechosa de malignidad cuando el paciente presente una masa cervical dura, fijada a tejidos peritiroideos, o se aprecien adenopatías palpables de las mismas características.
7. Resultados analíticos: TSH ($\mu\text{UI/ml}$).
8. Resultados de la ecografía tiroidea: Sospechosa o no de malignidad condicionado por la presencia de dos ó más criterios de malignidad radiológica (Tabla 2)⁽⁴⁴⁾: hipoecogenicidad, márgenes irregulares, microcalcificaciones, aspecto heterogéneo, vascularización intranodular, diámetro del nódulo más alto que ancho, presencia de adenopatías sospechosas de malignidad.
9. Resultados de ^{18}F FDG-PET preoperatorio y, en su caso, durante el seguimiento. (Captación focal, difusa o no captación. SUVmax o valor máximo de la captación estándar).
10. Tipo de cirugía (Tiroidectomía total, hemitiroidectomía, asociación o no de vaciamiento ganglionar).
11. Tg estimulada postoperatoria:
 - Negativa: Valores inferiores a 1 ng/ml.
 - Positiva: Valores por encima de 1 ng/ml.
12. Número de dosis de radioyodo (^{131}I) administradas al paciente, así como la dosis acumulada del radiofármaco.
13. Presencia o no de recidiva local (resto tiroideo), regional (ganglios linfáticos cervicales o mediastínicos) y a distancia (metástasis hematógenas). Tiempo hasta la recidiva.
14. Seguimiento en meses. Estado al final del seguimiento
 - Supervivencia libre de enfermedad.
 - Supervivencia con recidiva o metástasis.
 - Perdido en el seguimiento.
 - Exitus* por la enfermedad o por otra causa.

3.6.2.2. Variables histopatológicas

1. Diagnóstico de la citología preoperatoria obtenida por PAAF de la lesión tiroidea no sistematizado⁽³⁹⁹⁻⁴⁰¹⁾. El sistema Bethesda⁽⁵⁶⁾ (Tabla 4) comenzó a implantarse en nuestro centro en enero de 2009.
 - Benigno: bocio coloide, hiperplasia nodular o adenomatosa, tiroiditis linfocítica, quiste, adenoma, ausencia de células malignas.

- Sospechoso malignidad: sospechoso de carcinoma
- Maligno: carcinoma.
- Indeterminado: proliferación folicular, neoplasia folicular, citología oncocítica o de células de Hürthle.
- No valorable: ausencia de celularidad, muestra inadecuada, artefactos que impiden el diagnóstico.

Para este trabajo se han considerado los pacientes sospechosos de malignidad en el grupo indeterminado.

2. Tamaño de la lesión (T) en mm. En caso de patología benigna con más de un nódulo se considera el tamaño del nódulo dominante.

3. Presencia de Mutación BRAF^{T1799A} en estudio citológico (Si/No).

En caso de tumores malignos se registrarán las siguientes variables:

4. Tipo histológico: CPT y sus variantes, CFT, CCH, CPDT, CAT.

5. Presencia de multifocalidad (Si/No): Presencia de más de un foco neoplásico.

6. Presencia de invasión vascular. (Sí/No). Los vasos afectados deben estar dentro o inmediatamente por fuera de la cápsula, deben ser mayores que un capilar, con una pared muscular y endotelio bien definidos. Las células tumorales deben estar adosadas a la pared vascular y proyectarse en el interior de la luz, quedando cubiertas por una capa simple de células endoteliales⁽⁸⁰⁾.

7. Presencia de extensión extratiroidea. (Sí/No). Se considera así cuando el tumor va más allá de la cápsula tiroidea⁽¹⁵³⁾.

8. Presencia de metástasis ganglionares (N) al diagnóstico. (Sí/No).

9. Presencia de metástasis a distancia (M) al diagnóstico. (Sí/No).

10. Estadificación TNM⁽¹⁵³⁾ según criterios de su séptima edición (I, II, III, IV).

11. Clasificación MACIS⁽¹³⁷⁾ y AMES⁽¹⁴⁶⁾. Catalogación del paciente en bajo, medio y alto riesgo de mortalidad.

3.6.2.3. Variables genéticas

1. Nivel de expresión en tejido tiroideo (determinado por qRT-PCR) de los genes que en el estudio de microarrays se han mostrado sobreexpresados en tejido tiroideo maligno con respecto al benigno.

2. Nivel de expresión en sangre periférica (determinado por qRT-PCR) de los genes que en el estudio de microarrays se han mostrado sobreexpresados en los pacientes con lesiones malignas con respecto a los portadores de lesiones benignas.

3.6.2. ¹⁸F-DG-PET/TAC

Se realizó ¹⁸F-DG-PET/TAC a los pacientes que dieron su consentimiento, al menos entre tres y seis semanas después de la realización de la PAAF, siguiendo el protocolo habitual del servicio de Medicina Nuclear de nuestro centro.

Según éste, tras un periodo de ayunas de al menos seis horas, y la confirmación de una glucemia inferior a 120 mg/dl, se administran dosis de 210–370 megabequerelios (MBq) de ¹⁸F-FDG intravenoso, en función del peso del sujeto, y en condiciones de hidratación sostenida. Todos los pacientes se premedican con 5–

10 mg de diazepam vía oral y se mantienen en reposo durante 45–60 minutos después de la inyección del contraste. Posteriormente se obtienen las imágenes en un equipo *Biograph 16 PET/CT* (Siemens, Knoxville, Tennessee, USA). Las imágenes originales son topográficamente reconstruidas mediante algoritmos iterativos: reconstrucción iterativa; OSEM (2 iteraciones, 8 subconjuntos) pero con las correcciones de dispersión y atenuación determinadas a partir de las imágenes del TAC. La reconstrucción de las imágenes del TAC se realiza simultáneamente (en paralelo) a la adquisición del estudio PET. El estudio genera imágenes en los planos axial, coronal y sagital de las imágenes fusionadas de ^{18}F FDG-PET y TAC.

El análisis se realizó por dos médicos nucleares con experiencia en la técnica y en patología tiroidea, que no conocían el tamaño y la localización de los nódulos. Ambos consensuaron la presencia o no de captación y si ésta era focal o difusa. Las captaciones difusas han sido consideradas como negativas, ya que suelen asociarse a tiroiditis crónicas. El valor máximo de captación estándar (SUVmax) se calculó para las lesiones focales. En las lesiones sin captación focal, se calculó este en las áreas de mayor interés de la glándula tiroidea.

3.6.3. Determinación de la mutación BRAF^{V600E}

La detección de la mutación BRAF^{V600E} se realizó en muestras obtenidas mediante PAAF o bien del tejido tiroideo patológico representativo de la lesión tras la extirpación quirúrgica. Para ello se realizó una técnica de PCR convencional seguida del análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima TspRI. En los casos positivos además se realizó una secuenciación bidireccional. En las 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.

Puesto que esta determinación formó parte de un proyecto de investigación previo⁽¹⁹⁸⁾, sólo disponemos del estado mutacional de los tumores primarios de los pacientes incluidos en nuestro estudio durante los años 2008 y 2009.

3.7. ANÁLISIS DE DATOS

El análisis estadístico se ha realizado con el paquete IBM® SPSS® Statistics 22.0 para Windows.

3.7.1. Análisis descriptivo de todas las variables analizadas

Variables cualitativas: frecuencias absolutas y relativas (porcentajes).

Variables cuantitativas: medias y desviación estándar para variables con distribución normal, y medianas y rango intercuartílico en caso contrario.

3.7.2. Análisis comparativo de las variables epidemiológicas y clínicas en los distintos subgrupos

Para evaluar si existían diferencias clínicas relevantes entre los componentes de los subgrupos de estudio y validación se han analizado y comparado entre los mismos diferentes variables epidemiológicas, clínicas, analíticas, de pruebas de imagen, anatomopatológicas y vinculadas al pronóstico. Se han utilizado tests paramétricos (t de Student) o no paramétricos (U-Mann Whitney), según las

variables siguieran o no una distribución normal. Para confirmar dicha distribución normal se ha usado el test Kolmogorov-Smirnov.

3.7.3. Análisis bivalente para estudiar las posibles relaciones entre las variables dependientes, diagnóstico y pronóstico, y las independientes 2 a 2

Para determinar si existían diferencias entre los niveles de expresión de cada uno de los genes, entre pacientes con patología benigna y maligna, se han usado tests paramétricos (t de Student) o no paramétricos (U-Mann Whitney), según sean o no de distribución normal dichos niveles de expresión. Para confirmar dicha distribución normal se usó el test Kolmogorov-Smirnov.

Para estudiar el resto de relaciones, se han aplicado los test correspondientes dependiendo de la variable independiente: t de Student o U-Mann Whitney para cuantitativas y para variables dicotómicas, el test de la chi cuadrado con corrección de Yates o test exacto de Fisher.

3.7.4. ¹⁸FDG-PET/TAC

Se ha analizado la utilidad de esta prueba diagnóstica en el estudio preoperatorio de los nódulos tiroideos en pacientes con citología indeterminada. Para ellos se ha calculado su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, así como el área bajo la curva ROC, construida con la sensibilidad y el inverso de la especificidad.

3.7.5. Construcción del clasificador

Mediante regresión logística se ha construido un clasificador que considera la expresión de los genes con máxima capacidad discriminativa.

Para evaluar el funcionamiento de esta fórmula como herramienta diagnóstica preoperatoria en el grupo de validación, se ha calculado su sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, así como el área bajo la curva ROC construida con la sensibilidad y el inverso de la especificidad.

3.7.6. Análisis de la influencia de las diferentes variables sobre el pronóstico

Se han incluido en el modelo de regresión logística multivariante las variables independientes que en el análisis bivalente estuvieron estadísticamente relacionadas con el pronóstico, variables de confusión y variables de importancia biológica. El método de selección de variables ha sido por pasos sucesivos hacia atrás (*backward stepwise*). En cada paso se ha considerado como criterio de salida $p > 0,10$ y como criterio de entrada $p < 0,05$.

También se ha realizado un análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier considerando supervivencia global y libre de enfermedad, calculando probabilidades, medias y medianas de supervivencia. Para comparar la supervivencia entre los grupos de expresión/no expresión de los distintos genes estudiados, se ha utilizado el test de Log-Rank.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. COMPOSICIÓN DE LA SERIE DE PACIENTES

Durante el período 2008-2011, se han intervenido en nuestro centro un total de 600 pacientes por enfermedad tiroidea, de los cuales 99 lo fueron por cáncer tiroideo (70 CPT). De estos, un total de 56 que no cumplían los criterios de exclusión fueron considerados elegibles en nuestro estudio.

Como se expuso en la sección 3.3.3, de la muestra completa sólo fueron analizados 34 debido a problemas de financiación (Fig. 11). De ellos, 14 presentaron lesiones finalmente benignas y 20 cáncer tiroideo. Siete de éstos compusieron el grupo de estudio, y el resto el grupo de validación.

4.1.1. Características clínicas

Los datos preoperatorios de los pacientes incluidos en el estudio se presentan en la Tabla 18. De las variables cuantitativas, la edad, el tamaño del nódulo y el SUVmax, seguían una distribución normal según el test de Kolmogorov-Smirnov por lo que se han expresado como media \pm desviación típica. Ni los valores de TSH preoperatorios ni el tiempo de seguimiento han seguido esa distribución por lo que se han descrito mediante su mediana y rango intercuartílico.

Más de tres cuartas partes de la serie estuvo formada por mujeres, con una edad media de 45 años. En la mayoría de los casos no había antecedentes personales de patología tiroidea o de irradiación cervical, ni antecedentes familiares de cáncer tiroideo. La mayoría tampoco presentaban síntomas sospechosos de cáncer tiroideo, pero hasta el 38% de los casos han tenido al menos un dato sospechoso en la exploración clínica, bien por la firmeza o la adherencia a tejidos circundantes del nódulo tiroideo, bien por la presencia de adenopatías sugerentes de malignidad.

De los cinco casos incluidos con citología benigna, dos fueron considerados potencialmente malignos, y por tanto elegibles, al tener positiva la mutación BRAF^{T1799A}. Un tercer caso tenía una ecografía con más de dos datos sugerentes de malignidad y el resto tenían una exploración que alertaba sobre la posibilidad de que hubiera una lesión cancerosa. Se realizó ¹⁸FDG-PET/TAC preoperatorio en 26 casos (76,5%), de los cuales más de la mitad mostraron captación focal en el área tiroidea.

La mutación BRAF^{T1799A} se determinó en el 41,2% de la serie (13 pacientes) y en diez de éstos se detectó la misma. Todos ellos, pertenecientes al grupo de validación, fueron diagnosticados de cáncer tiroideo. De los tres pacientes no mutados, dos se encuadraban en el GB y el tercero en el GM. Teniendo en cuenta el número de pacientes en los que se determinó, la prevalencia de la mutación fue del 76,9% entre las lesiones malignas y del 0% entre las benignas. El diagnóstico final de todos los pacientes con lesiones malignas fue CPT.

Tabla 18 Características preoperatorias de la serie total.

Sexo	
Femenino	27 (79,4%)
Masculino	7 (20,6%)
Edad (años)	45 ± 18
Antecedentes	
Patología tiroidea	2 (5,9%)
Irradiación cervical	0 (0%)
Sospecha de cáncer	
Síntomas	5 (14,7%)
Exploración física	13 (38,2%)
Datos ecográficos	13 (38,2%)
TSH (μUI/ml)	2,11 (1,20 - 2,74)*
¹⁸FDG-PET/TAC	
No hecho	8 (23,5%)
No captación	4 (11,8%)
Captación focal	21 (61,8%)
Captación difusa	1 (2,9%)
SUVmax	10,83 ± 8,8
Citología	
No valorable	2 (5,9%)
Benigna	5 (14,7%)
Indeterminada	15 (44,1%) proliferación folicular + 3 (8,8%) sospechosas
Maligna	5 (14,7%)
Presencia de Mutación BRAF^{T1799A}	10/13 (76,9%)
Tamaño del nódulo (mm)	31,17 ± 15,7
Diagnóstico final del nódulo	
Benigno	14 (41,2%)
Maligno	20 (58,8%)

* Mediana y rango intercuartílico. El resto de variables cuantitativas se expresan como media ± desviación típica.

En la Tabla 19 se presenta el análisis bivariante comparativo de ambos grupos (GB vs. GM). Se apreciaron diferencias significativas en el sexo, la exploración física y ecografía sugerentes de malignidad, el nivel de TSH, la captación focal en el ¹⁸FDG-PET/TAC, y la presencia de la mutación BRAF.

La intervención realizada mayoritariamente fue la tiroidectomía total que se realizó en 10 pacientes del GB (57,1%) y en el 100% de los cánceres (p= 0,162). En el GM se asoció vaciamiento cervical en 14 casos (70%): 7 (35%) sólo vaciamientos centrales y otros 7 (35%) asociando además vaciamiento lateral. La mediana de seguimiento fue de 74 meses con un rango intercuartílico de 55-82 en los pacientes con lesiones benignas, y algo inferior (69 meses [57-79]) en los pacientes del GM, sin diferencia significativa entre ambos grupos (p= 0,514).

Tabla 19 Características preoperatorias de los grupos benigno y maligno

	GRUPO BENIGNO	GRUPO MALIGNO	p
N	14 (41,2%)	20 (58,8%)	
Sexo			
Femenino	14 (100%)	13 (65%)	0,026
Masculino	0 (0%)	7 (35%)	
Edad (años)	44 ± 15	45,8 ± 19	0,783 [§]
Antecedentes			
Patología tiroidea	2 (14,3%)	0 (0%)	0,162
Irradiación cervical	0 (0%)	0 (0%)	1,000
Sospecha de cáncer			
Síntomas	0 (0%)	5 (25%)	0,063
Exploración	1 (7,1%)	12 (60%)	0,001
Ecografía	2 (14,3%)	11 (55%)	0,005
TSH (μUI/ml)	1,68 (0,7 - 2,2)	2,39 (1,8 - 4,7)	0,027*
¹⁸FDG-PET/TAC			
No hecho	5 (35,7%)	3 (15%)	Captación
No captación	3 (21,4%)	1 (5%)	vs.
Captación focal	5 (35,7%)	16 (80%)	no captación:
Captación difusa	1 (7,1%)	0 (0%)	0,0034
SUVmax	12,8 ± 11,8	9,5 ± 6,4	0,422 [§]
Citología			
No valorable	1 (7,1%)	1 (5%)	
Benigna	2 (17,6%)	3 (20%)	
Indeterminada	11 (78,6%)	7 (30%)	
Maligna	0 (0%)	5 (25%)	
Mutación BRAF^{T1799A}			
No hecho	12 (85,7%)	9 (45%)	
<i>Wild-type</i>	2 (14,3%)	1 (5%)	0,0038
Mutado	0	10 (50%)	
Tamaño del nódulo (mm)	31,4 ± 13	31,1 ± 17	0,959 [§]

* U de Mann-Whitney; [§]: T de Student para muestras independientes; Resto de variables: Test exacto de Fisher.

4.1.2. Composición de la serie de pacientes con patología maligna

El diagnóstico definitivo fue CPT en todos los pacientes, siendo la variante dominante la clásica (17 casos) pero también hubo dos pacientes con variante folicular, y un tercero en el que había algunas áreas de indiferenciación, pero sin entidad suficiente para catalogarlo como pobremente diferenciado.

Tabla 20 Características de los pacientes con lesiones malignas

	GRUPO DE ESTUDIO	GRUPO DE VALIDACIÓN	p
N	7 (35%)	13 (65%)	
Sexo			
Femenino	5 (71,4%)	8 (61,5%)	1,000
Masculino	2 (28,6%)	5 (38,5%)	
Edad (años)	37 (29-72)	49 (34-55)	0,699*
TSH (μUI/ml)	4,5 (2,1-7,2)	2,37 (1,6-2,4)	0,085*
Diagnóstico definitivo			
CPT clásico	7 (100%)	10 (76,9%)	
CPT-VF	0 (0%)	2 (15,4%)	
CPT indiferenciado	0 (0%)	1 (7,7%)	
Tipo de cirugía			
TT	2 (28,6%)	4 (30,8%)	1,000
TT + vaciamiento ganglionar	5 (71,5%)	9 (69,2%)	
Tamaño tumoral (mm)	30 (20-65)	25 (16,25-38,75)	0,340
Multifocalidad	2 (28,6%)	2 (15,4%)	0,587
Invasión vascular	3 (42,9%)	1 (7,7%)	0,101
Extensión extratiroidea	3 (42,9%)	1 (7,7%)	0,101
Metástasis ganglionares	6 (85,8%)	7 (53,9%)	1,000
Metástasis a distancia	0 (0%)	2 (15,4%)	0,521
TNM			
E I	3 (50%)	6 (46,2%)	
E II	1 (10%)	1 (10%)	EI-EII
E III	0 (0%)	2 (15,4%)	vs.
E IVa	3 (30%)	2 (15,4%)	EIII-EIV:
E IVb	0 (0%)	0 (0%)	1,000
E IVc	0 (0%)	2 (15,4%)	
MACIS			
Bajo riesgo	2 (28,6%)	8 (61,5%)	Bajo vs.
Riesgo medio	4 (57,1%)	5 (38,5%)	Medio/alto:
Alto riesgo	1 (14,3%)	3 (23,1%)	0,160
Tg estimulada postoperatoria (ng/ml)	3,1 (1,8-129,6)	2,06 (0,99-7,65)	0,279*
AcTg posoperatorios (UI/ml)	7,8 (6,54-205,35)	17,4 (8,56-127,67)	0,506*
Dosis acumulada de ¹³¹I (mCi)	250 (100-325)	120 (100-125)	0,246*
Recidiva	5 (71,4%)	2 (15,4%)	0,002
Tiempo hasta la recidiva (meses)	24 (13,5-59)	8,5 (0-)	0,190*
Seguimiento (meses)	79 (73,5-83,5)	65 (47-74,5)	0,014*
Estado actual			
Perdido	2 (28,6%)	0 (0%)	
Vivo libre de enfermedad	0 (0%)	10 (76,9%)	
Vivo con recidiva	5 (71,5%)	0 (0%)	
Exitus	0 (0%)	3 (23,1%)	

Las variables numéricas se han expresado como mediana y rango intercuartílico

*: test U de Mann-Whitney; las variables cuantitativas se han comparado con el test exacto de Fisher.

En la Tabla 20 se describen las características de los tumores malignos, dividiéndolos según su pertenencia al grupo de estudio o al grupo de validación.

Dado que el tamaño de la muestra por subgrupo es pequeño, las variables cuantitativas no seguían una distribución normal y se han aplicado test no paramétricos.

Como se aprecia en dicha tabla, la única diferencia significativa entre ambos grupos fue la recidiva tumoral que fue mayor en el grupo de estudio, que por otra parte tiene un seguimiento significativamente más prolongado. Sólo un paciente tuvo más de dos focos tumorales y sólo dos pacientes debutaron con metástasis a distancia. La afectación ganglionar fue similar en ambos grupos. En cuanto al rastreo postablación, únicamente se detectaron restos tiroideos en todos los pacientes menos en un caso en que se apreciaron metástasis a distancia.

Cinco pacientes están diagnosticados de recidiva. De éstas, una es bioquímica y cuatro estructurales: dos cervicales y otras dos a distancia. De los dos pacientes con metástasis a distancia al diagnóstico, uno falleció a los 29 meses, diagnosticado de un segundo tumor primario (cáncer esofágico). El otro era un enfermo de edad muy avanzada y con múltiples comorbilidades. Corresponde al único caso de la serie de CPT con áreas indiferenciadas y falleció a los 8 meses de la intervención quirúrgica, sin haber recibido tratamiento ablativo. El tercer paciente fallecido fue diagnosticado posteriormente de un osteosarcoma y falleció a los 52 meses del tratamiento quirúrgico, sin evidencia de recidiva del tumor tiroideo.

4.2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA

4.2.1. Genes expresados diferencialmente en el grupo maligno con respecto al benigno.

El estudio estadístico mediante SAM de los resultados de los experimentos con microarrays en el grupo de estudio mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en la expresión de un conjunto de genes en el GM con respecto al GB. En el Anexo V se pueden consultar los datos brutos y normalizados obtenidos.

Tabla 21 Genes obtenidos de muestras de sangre periférica para su análisis por qRT-PCR

Nombre	Fold	Descripción	CodeLink ID
BU618895.1	2,48219439877	UI-H-FH1-bfl-i-08-0-UIs1 NCI_CGAP_FH1 cDNA Clon: UI-H-FH1-bfl-i-08-0-UI 3'	BU618895.1
FLJ21986	1,79453143063	CPED1 (cadherin-like and PC-esterase domain containing 1)	AY358220.1
AW301414.1	1,66135099953	NCI_CGAP_Lu26 cDNA clone IMAGE:2775583 3' similar to contains Alu repetitive element; mRNA sequence	AW301414.1
AA890028.1	1,56891051951	aj90h07.s1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA cDNA clone IMAGE:1403773 3', mRNA sequence	AA890028.1
NOD3	1,47531327327	NLR Family, CARD Domain Containing 3 (NLRC3)	AA631949.1
PCGEM1	1,37209808681	Prostate-Specific Transcript (Non-Protein Coding)	AF223389.1
SUCLG2	1,238230556	GTP-Specific Succinyl-CoA Synthetase Subunit Beta	BX103728.1
CTAGE3	1,20161953937	Cutaneous T-Cell Lymphoma-Associated Antigen 3	BU069608.1
BX099693.1	0,956071684326	Soares_testis_NHT cDNA clone IMAGp998B244459	BX099693.1

Fold: número de veces en que el gen está más expresado con respecto a su comparativo (tejido con patología benigna). CodeLink ID: identificación del gen en la plataforma de microarrays usada para esta Tesis Doctoral: CodeLink™ UniSet Human Whole Genome Bioarray

En sangre periférica (Tabla 21; Fig. 19) se encontraron nueve genes sobreexpresados y 44 infraexpresados, mientras que en tejido se encontraron 11 genes sobreexpresados, sin cambios en el resto (Tabla 22; Fig. 20).

Fig. 19 Gráfico de análisis de significación de microarrays (SAM) de las muestras de sangre periférica

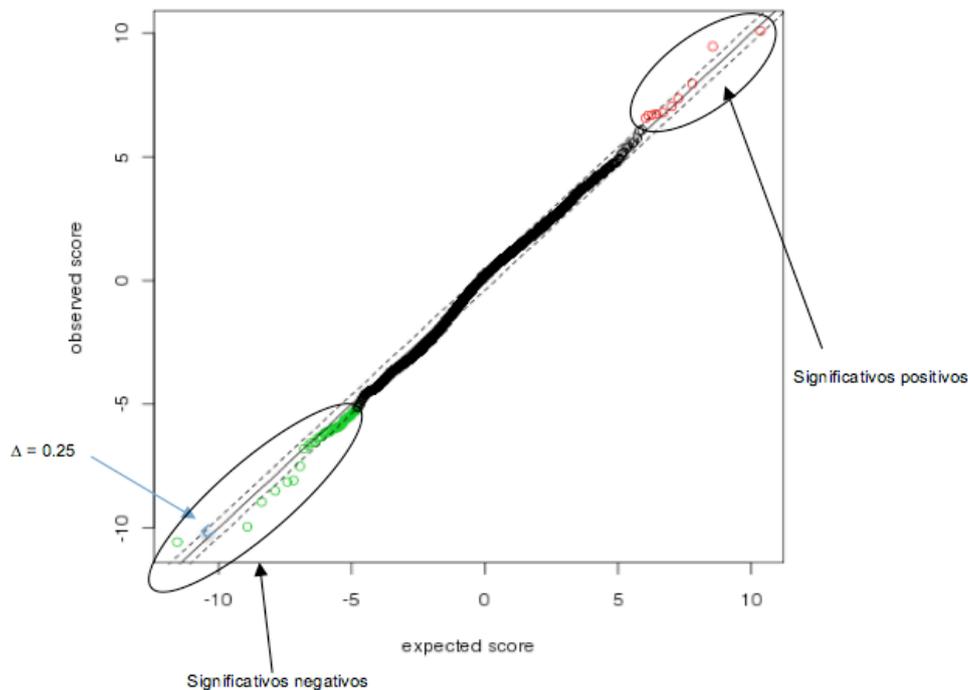


Tabla 22 Genes obtenidos de muestras de tejido tiroideo maligno para su análisis por qRT-PCR

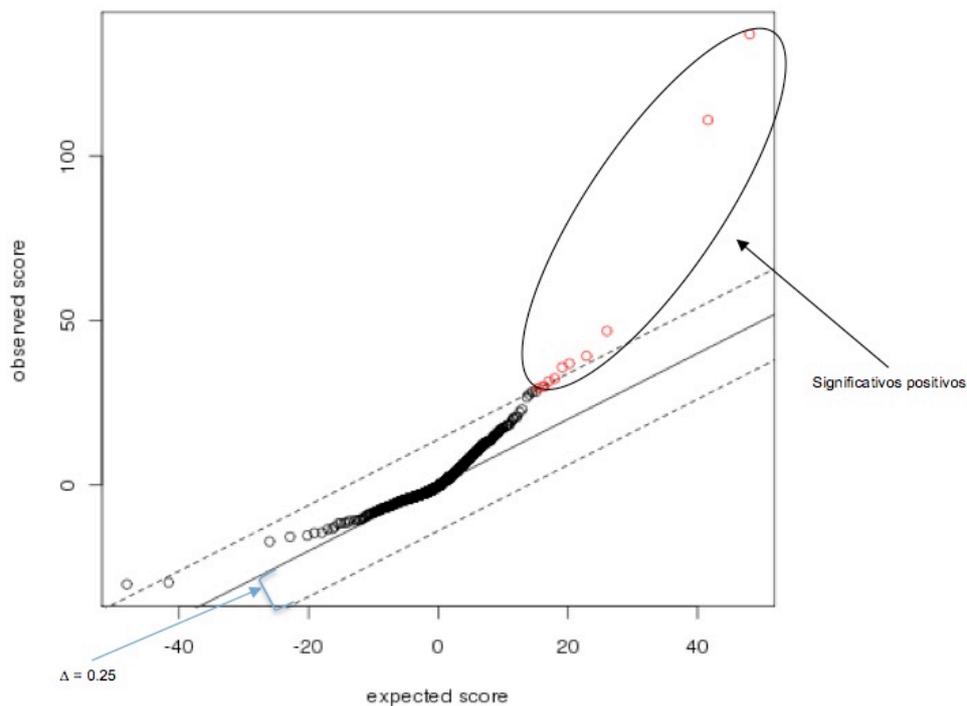
Nombre	Fold	Descripción	CodeLink ID
GDF11	5,3718066153	Growth Differentiation Factor 11	BU185158.1
SCGB2A1	5,3694113031	Secretoglobin, family 2A, member 1	NM_002407.1
FGF12	3,6341212367	Fibroblast growth factor 12	NM_004113.3
ATP2C1	3,3702788064	Calcium-Transporting ATPase Type 2C Member 1	BM674602.1
ASRGL1	2,5001201036	Asparaginase-Like Protein 1	BQ343733.1
HMGN2	2,4801001789	High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 2. También: Non-histone chromosomal protein HMG-17	AW248979.1
BG610669.1	2,0438722316	602611856F1 NIH_MGC_60 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4737636 5', mRNA sequence Similar to ribosomal protein L13a; 60S ribosomal protein L13a; 23 kDa highly basic protein	BG610669.1
ZNF568	1,6173091054	Zinc finger protein 568	BU188515.1
ERH	1,4878678391	Enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)	NM_004450.1
MGC45438	1,2940468450	Homo sapiens chromosome 16 open reading frame 89 (C16orf89)	NM_152459.2
PHF20	1,0216306593	PHD finger protein 20 (C20orf 104)	NM_016436.3

Fold: número de veces en que el gen está más expresado con respecto a su comparativo (tejido con patología benigna).

CodeLink ID: identificación del gen en la plataforma de microarrays usada para esta Tesis Doctoral:

CodeLink™ UniSet Human Whole Genome Bioarray.

Fig. 20 Gráfico de análisis de significación de microarrays (SAM) de las muestras de tejido (GM vs. GB)



4.2.2. Validación con qRT-PCR. Capacidad predictiva de benignidad o malignidad que ha mostrado el perfil de expresión génica

4.2.2.1. Resultados en tejido

Inicialmente se comprobaron 10 de los 11 genes obtenidos en tejido en el grupo de validación formado por los pacientes malignos (Tabla 23). El gen BG610669.1 no está descrito más que como secuencia de genes (Tabla 16) y, al no disponer de sonda comercial disponible, no se investigó más.

De todos ellos, los que más se expresaron en tejido maligno frente al benigno fueron HMG2 y ZNF568. HMG2 estaba expresado en el 76,9% de los pacientes del GM y en el 7,7% de los del GB, siendo esta diferencia significativa ($p=0,001$). Sin embargo, ZNF568 se expresó por igual en ambos grupos, en una proporción del 84,6%.

Este nivel de significación se mantuvo considerando al gen tanto como una variable cuantitativa como cualitativa (expresado vs. no expresado), considerando los datos positivos como indicativo de expresión, tal y como se describió en Pacientes y Métodos.

Tabla 23. Valores de qRT-PCR de muestras de tejido

Tejido	GDF11	SCGB2A1	FGF12	ATP2C1	ASRGL1	HMG2	ZNF568	ERH	MGC45438	PHF20
maligno 1	2.05	0.404	-0,833	-1,12	0.645	-1,94	0.655	0.304	-0,547	1.19
maligno 2	-0,678	-1,56	-4,08	-0,36	-2,44	0.393	0.0511	-0,354	-2,060	-0,15
maligno 3	0.795	-3,56	-3,14	-0,477	-0,347	0.267	0.493	0.136	-1,130	0.917
maligno 4	-0,988	-2,53	-1,21	-0,713	-0,837	0.358	-1,39	-0,107	-1,460	-0,398
maligno 5	-0,726	-0,706	-1,72	-0,607	-0,932	0,054	-0,377	-0,125	-0,917	0.0153
maligno 6	-0,627	0.247	-2,55	-0,252	-1,86	0.39	0.0821	-0,143	-1,280	-1,16
maligno 7	-1,35	-0,807	-5,29	-0,685	-0,951	-0,226	0.138	-0,258	-1,600	-1,32
maligno 8	0.0379	-3,68	-1,56	1.16	-1,29	0.523	1.48	0.505	-2,900	0.506
maligno 9	-1,24	-2,39	-2,82	0.178	-0,751	0.0665	0.478	0.114	-1,670	-0,302
maligno 10	-0,447	-0,531	-2,47	0.0489	-0,62	0.0618	0.514	0.301	-1,600	1.53
maligno 11	-0,78	0.169	-1,53	-0,154	-0,298	-1,54	0.134	0.0346	-1,440	0.745
maligno 12	-1,25	-0,566	-1,89	-0,238	0.156	0.844	0.421	-0,37	-1,540	0.804
maligno 13	-0,498	-2,03	-2,17	0.124	-3,09	0.0807	1.31	-0,158	-1,590	0.218
Porcentaje	23,1	23,1	0	30,8	15,4	76,9	84,6	46,5	0	61,5
Benigno 1						-0.855	1.51			
Benigno 2						-1.24	0,0107			
Benigno 3						-0.583	3.12			
Benigno 4						-2.83	-1.28			
Benigno 4						0,0627	1.23			
Benigno 6						-4.06	-0.841			
Benigno 7						-0.541	0.787			
Benigno 8						-0.569	1.01			
Benigno 8						-0.351	1.80			
Benigno 10						-2.33	1.31			
Benigno 11						-1.28	0.960			
Benigno 12						-0.951	1.06			
Benigno 13						-1.01	0.207			
Porcentaje						7,7	84,6			
P (M vs. B)						0,001	1			

Porcentaje: proporción de pacientes con expresión de cada gen en la serie

En tono más claro se marcan los pacientes usados previamente para el análisis SAM. En negrita se señalan los genes expresados.

4.2.2.2. Resultados en sangre periférica

De los genes sobreexpresados obtenidos en sangre periférica sólo se validaron cinco con qRT-PCR, por ausencia de sondas disponibles para el resto (Tabla 16). De estos cinco, sólo NLRC3 (NOD3) y C7orf58 (FLJ21986) mostraron cierta capacidad discriminativa. Los resultados de la validación se exponen en la Tabla 24.

Cuando se comparó la expresión de ambos genes entre el GB y el GM, encontramos que NLRC3 se encontraba significativamente más expresado en los pacientes con patología benigna: 92,3% vs. 38,5% ($p=0,011$) mientras que no había ninguna diferencia en la expresión de C7orf58 (76,9% en ambos grupos). El nivel de significación se mantuvo independientemente de que se utilizaran los valores numéricos obtenidos por qRT-PCR, o se categorizaran en expresado o no expresado, tal y como ocurrió con HMG2.

Tabla 24. Valores de qRT-PCR de muestras de sangre periférica

Sangre	NLRC3	Ct	FLJ21986	Ct
maligno 1	0,352	29,42	0,279	31.74
maligno 2	0,117	28,89	1,00	31.46
maligno 3	0,264	30,36	0,327	30.73
maligno 4	0,346	28,12	-0,559	31.41
maligno 5	-1,13	29,57	0,543	32.29
maligno 6	-0,388	28,66	0,654	31.19
maligno 7	0,224	30,13	-0,674	31.08
maligno 8	-0,413	30,62	1,03	32.41
maligno 9	-0,598	30,04	0,0692	30.71
maligno 10	-0,734	29,32	-0,46	31.67
maligno 11	-1,92	30,26	0,00574	32.20
maligno 12	-1,75	31,76	0,522	31.74
maligno 13	-1,07	30,35	1,23	31.21
Porcentaje	38,5		76,9	
Benigno 1	-0.619		-0,236	
Benigno 2	3,20		2,11	
Benigno 3	1,41		0,986	
Benigno 4	1,30		0,364	
Benigno 5	0,567		0,241	
Benigno 6	1,91		0,939	
Benigno 7	0,272		-0,443	
Benigno 8	1,13		-0,281	
Benigno 9	10,6		1,12	
Benigno 10	0,764		0,347	
Benigno 11	5,52		0,640	
Benigno 12	0,990		0,202	
Benigno 13	4,02		0,0969	
Porcentaje	92,3		76,9	
P (B vs. M)	0,011		0,724	

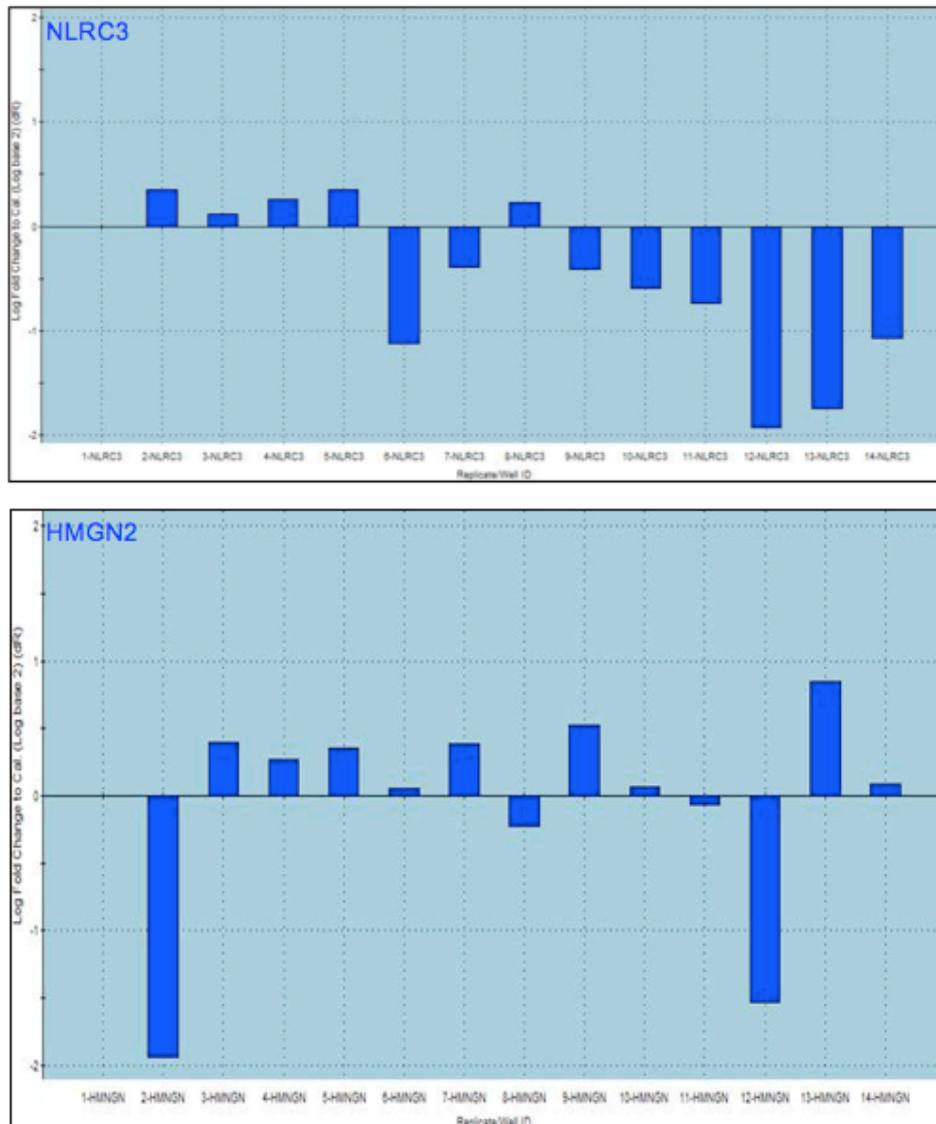
Ct: ciclo umbral; Ct calibrador NLRC3: 29,44; Ct calibrador FLJ21986: 31,74

Porcentaje: proporción de pacientes con expresión de cada gen en la serie

En tono más claro se marcan los pacientes usados previamente para el análisis SAM. En negrita se señalan los genes expresados.

La Fig. 21 muestra dos ejemplos de las gráficas proporcionadas por la qRT-PCR en los pacientes del GM, tanto para NLRC3 como para HMGN2. La línea horizontal marca el 0, por debajo del cual consideramos al gen como no expresado y por encima, como expresado.

Fig. 21 Resultados de la expresión de NLRC3 y HMGN2 mediante qRT-PCR en pacientes con patología maligna



4.3. RELACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA CON LAS VARIABLES DEL ESTUDIO

4.3.1. Análisis bivariante

En las Tablas 25 y 26 se exponen las características relacionadas con el tumor de los pacientes con lesiones malignas del grupo de validación en función de la expresión de HMGN2 y NLRC3, respectivamente. Las variables cuantitativas se consideran no paramétricas debido al tamaño de la muestra, por tanto se expresan como mediana y rango intercuartílico. Se ha utilizado el test U de Mann-Whitney para las comparaciones.

Tabla 25 Expresión de HMGN2 en tejido tiroideo y características de los pacientes con patología maligna del grupo de validación

	HMGN2		p
	No expresado	Expresado	
N	3 (23,1%)	10 (76,9%)	-
Sexo			
Masculino	2 (66,7%)	3 (30%)	0,510
Femenino	1 (33,3%)	7 (70%)	
Edad (años)	37 (35-)	49,5 (30-53)	0,932
TSH (μUI/ml)	1,61 (1,2 -)	2,4 (2 -3,6)	0,221
Mutación BRAF^{T1799A}	1 (20%)	4 (80%)	0,464
¹⁸F-DG-PET/TAC (captación focal)	0 (0%)	10 (100%)	0,167
Diagnóstico definitivo			
CPT clásico	3 (100%)	7 (70%)	-
CPT-VF	0 (0%)	2 (20%)	
CPT indiferenciado	0 (0%)	1 (20%)	
Tipo de cirugía			
TT	1 (33,3%)	3 (30%)	1,000
TT + vaciamiento ganglionar	2 (66,7%)	7 (70%)	
Tamaño tumoral (mm)	27,5 (20-)	25 (14,5 - 40)	0,914
Multifocalidad	0 (0%)	2 (20%)	1,000
Invasión vascular	0 (0%)	1 (10%)	1,000
Extensión extratiroidea	0 (0%)	1 (10%)	1,000
Metástasis ganglionares*	1 (100%)	6 (85,7%)	1,000
Metástasis a distancia	1 (33,3%)	1 (10%)	0,423
TNM			
E I	2 (80%)	4 (36,4%)	EI-EII vs.
E II	0 (0%)	1 (9,1%)	
E III	0 (0%)	2 (18,2%)	
E IVa	0 (0%)	2 (18,2%)	EII-EIV: 1,000
E IVb	0 (0%)	0 (0%)	
E IVc	1 (6,7%)	1 (9,1%)	
MACIS			
Bajo riesgo	2 (66,7%)	7 (70%)	Bajo vs. Medio/ alto: 1,000
Riesgo medio	0 (0%)	1 (10%)	
Alto riesgo	1 (33,3%)	2 (20%)	
Tg estimulada postoperatoria (ng/ml)	2,2 (0,99 -)	1,9 (0,9 - 6,3)	0,578
AcTg posoperatorios (UI/ml)	67,5 (14,1 -)	13,3 (6,6 - 204,9)	0,517
Dosis acumulada de ¹³¹I (mCi)	120 (100 -)	115 (100 - 122,5)	0,602
Recidiva	0 (0%)	2 (20%)	1,000
Tiempo hasta la recidiva (meses)	67 (29 -)	60,5 (35,7 - 73,7)	0,866
Seguimiento (meses)	67 (29 -)	63,5 (49,5 - 73,7)	1,000
Estado actual			
Perdidos	0 (0%)	0 (0%)	-
Vivo libre de enfermedad	2 (66,7%)	8 (80%)	
Vivo con recidiva	0 (0%)	0 (0%)	
Exitus	1 (33,3%)	2 (20%)	

* Metástasis ganglionares: se desconoce el estado ganglionar en dos casos de los tres que no expresan el gen y en tres casos de los 10 que sí lo hacen.

En la Tabla 25 se puede observar que en el grupo “no expresado” sólo hay tres casos, por lo que no se puede proporcionar el tercer cuartil. Las variables cualitativas se han comparado con el test exacto de Fisher.

En este análisis no se aprecian diferencias significativas en relación a la expresión de HMGN2 en el tejido afecto y las características del tumor maligno.

Tabla 26 Expresión de NLRC3 en sangre periférica y características de los pacientes con patología maligna del grupo de validación

	NLRC3		p
	No expresado	Expresado	
N	8 (61,5%)	5 (38,5%)	-
Sexo			
Masculino	3 (37,5%)	2 (40%)	1,000
Femenino	5 (62,5%)	3 (60%)	
Edad (años)	49,5 (34 - 72)	37 (25,5 - 51)	0,378
TSH (μUI/ml)	2,38 (1,96 - 2,43)	1,6 (1,2 -)	0,540
Mutación BRAF^{T1799A}	1 (20%)	4 (80%)	0,333
¹⁸FDG-PET /TAC (captación focal)	8 (100%)	3 (75%)	0,333
Diagnóstico definitivo			
CPT clásico	6 (75%)	4 (80%)	-
CPT-VF	1 (12,5%)	1 (20%)	
CPT indiferenciado	1 (12,5%)	0 (0%)	
Tipo de cirugía			
TT	1 (12,5%)	3 (60%)	0,217
TT + vaciamiento ganglionar	7(87,5%)	2 (40%)	
Tamaño tumoral (mm)	22,5 (13,5 - 33,7)	32,5 (21,2 - 51,2)	0,200
Multifocalidad	1 (12,5%)	1 (20%)	1,000
Invasión vascular	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
Extensión extratiroidea	1 (12,5%)	0 (0%)	1,000
Metástasis ganglionares*	3 (50%)	1 (100%)	1,000
Metástasis a distancia	2 (25%)	0 (0%)	0,487
TNM			
E I	3 837,5%)	3 (60%)	EI-EII vs. EIII-EIV: 0,266
E II	0 (0%)	1 (20%)	
E III	1 (12,5%)	1 (20%)	
E IVa	2 (25%)	0 (0%)	
E IVb	0 (0%)	0 (0%)	
E IVc	2 (25%)	0 (0%)	
MACIS			
Bajo riesgo	4 (50%)	5 (100%)	Bajo vs. Medio/ alto: 0,105
Riesgo medio	1 (12,5%)	0 (0%)	
Alto riesgo	3 (37,5%)	0 (0%)	
Tg estimulada postoperatoria (ng/ml)	4,1 (1,9 - 14,4)	0,99 (0,5 - 1,6)	0,012
AcTg posoperatorios (UI/ml)	13,3 (6 - 67,5)	100 (10,6 -205)	0,290
Dosis acumulada de ¹³¹I (mCi)	120 (102,5 - 167,5)	100 (100 - 120)	0,259
Recidiva	2 (25%)	0 (0%)	0,487
Tiempo hasta la recidiva (meses)	50,5 (20 - 66,5)	77 (59,5 - 80,5)	0,040
Seguimiento (meses)	60,5 (32,2 - 67,2)	77 (59,5 - 80,5)	0,057
Estado actual			
Perdidos	0 (0%)	0 (0%)	-
Vivo libre de enfermedad	6 (75%)	4 (80%)	
Vivo con recidiva	0 (0%)	0 (0%)	
Exitus	2 (25%)	1 (20%)	

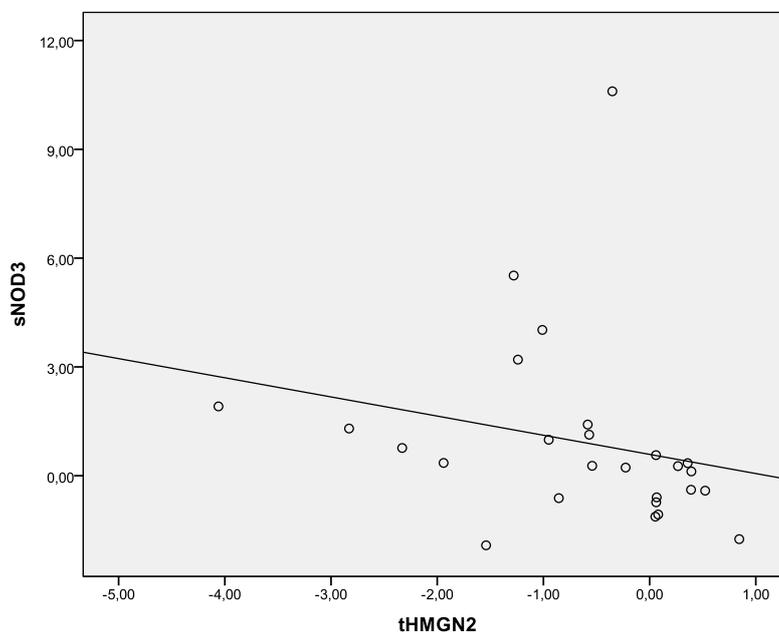
* Metástasis ganglionares: se desconoce el estado ganglionar en un caso de los ocho que no expresan el gen y en cuatro casos de los cinco que sí lo hacen.

Sin embargo, la expresión de NLRC3 sí se relaciona significativamente con menor nivel de Tg estimulada postoperatoria y con mayor tiempo hasta el desarrollo de una recidiva (Tabla 26).

La presencia de la mutación BRAF^{T1799A} no se ha podido relacionar con la expresión ninguno de los 2 genes.

Se realizó un análisis de correlación para comprobar si la expresión de ambos genes se asociaba de alguna forma entre sí. De los 11 pacientes que expresaban HMGN2, siete (63.6%) no expresaban NLRC3, relación estadísticamente significativa ($p=0,014$). Considerando las variables como numéricas, se comprobó que esta relación era inversa (Fig. 22) con un coeficiente de correlación de Pearson de -0.545 ($p=0,004$).

Fig. 22 Correlación entre HMGN2 y NLRC3



4.3.2. Análisis multivariante

Las variables predictoras de malignidad en el análisis bivalente fueron el sexo masculino, la presencia de síntomas clínicos y exploración física sugerentes de lesión neoplásica, la ecografía sospechosa, los niveles altos de TSH, la captación focal en el ¹⁸FDG-PET/TAC, la presencia de la mutación BRAF (Tabla 19), la expresión de HMGN2 en tejido tiroideo (Tabla 23) y la no expresión de NLRC3 en sangre periférica (Tabla 24).

Sóloamente la expresión de HMGN2 y la no expresión de NLRC3 han sido confirmados en el análisis multivariante. Como se puede ver en la Tabla 27, la expresión de HMGN2 en tejido tiroideo patológico aumenta el riesgo de que éste sea un cáncer en 24 veces, mientras que la expresión de NLRC3 prácticamente anula dicho riesgo. Si lo interpretamos desde el punto de vista opuesto, la no expresión en

sangre periférica de NLRC3, aumentaría hasta en 19 veces el riesgo de malignidad en el análisis bivariante (OR 19,2; 95% IC: 1,9-196-5; p= 0,013) y hasta 9 veces en el multivariante (OR 9; 95% IC: 0,6-142,9; p= 0,114).

Tabla 27 Análisis multivariante mediante regresión logística

VARIABLES PREDICTORAS	Coefficiente β	E.T	p	OR	IC 95%
CRUDAS					
HMG2 expresado	3,7	1,2	0,003	40,000	3,6 - 447
NLRC3 expresado	-2,9	1,2	0,013	0,052	0,0 - 0,6
AJUSTADAS					
HMG2 expresado	3,2	1.3	0,014	24,359	1,94 - 312,34
NLRC3 expresado	-2,2	1.4	0,114	0,110	0,0 - 1,7

E.T. error típico de β ; OR: *Odds ratio*

4.3.3. Utilidad de la expresión génica para diagnosticar malignidad

Los valores expuestos en la Tabla 28 nos muestran la capacidad predictiva de lesión maligna de la expresión en tejido de HMG2, con una exactitud global de casi el 85%, destacando una especificidad del 92% y un VPP del 90%.

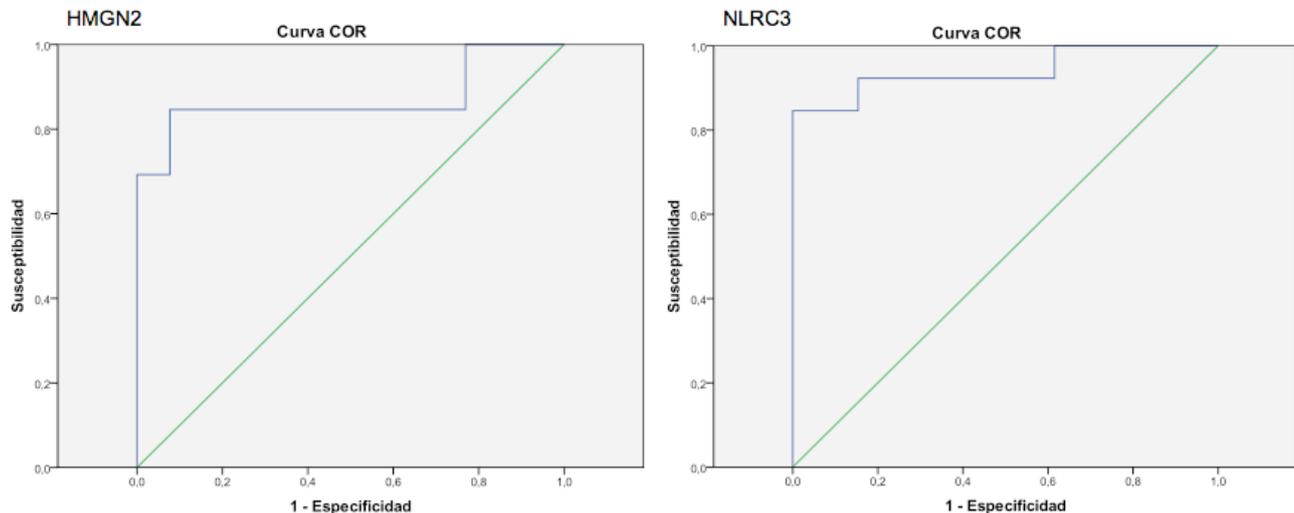
NLRC3, como ya hemos expuesto, predice benignidad, y lo hace con una S del 92,31%.

Tabla 28 Capacidad predictiva de HMG2 y NLRC3

HMG2			
		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud	84,62%	64,27%	94,95%
Sensibilidad	76,92%	45,98%	93,84%
Especificidad	92,31%	62,09%	99,60%
Valor predictivo positivo	90,91%	57,12%	99,52%
Valor predictivo negativo	80,00%	51,37%	94,69%
NLRC3			
		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud	76,92%	55,92%	90,25%
Sensibilidad	92,31%	62,09%	99,60%
Especificidad	61,54%	32,28%	84,87%
Valor predictivo positivo	70,59%	44,05%	88,62%
Valor predictivo negativo	88,89%	50,67%	99,42%

El área bajo la curva calculada para la expresión de HMG2 es de 0,870 y para la de NLRC3 es de 0,941(Fig. 23).

Fig. 23 Curvas ROC para HMG2 y NLRC3



4.3.4. ¹⁸FDG-PET/TAC

Aunque hemos visto que la captación focal en esta prueba se relacionó con la malignidad de la lesión (Tabla 19), en esta serie sólo se ha diagnosticado correctamente el 58,3% de los 12 pacientes con citología indeterminada a los que se les realizó (Tabla 29). Aunque la S es del 100% pues los cuatro pacientes malignos tenían captación focal, es muy poco específica, ya que el 55,6% de las ocho lesiones benignas también la tenían ($p=0,491$).

La expresión génica no se ha relacionado con la captación focal de FDG. De los 11 pacientes que expresaban HMG2, 10 (90%) tenían captación focal en la ¹⁸FDG-PET/TAC frente a los 6 de los 10 que (60%) que no lo expresaban ($p=0,149$). Por otro lado, aunque el 100% de los que no expresaban NLRC3 tenían captación focal (8 de 8 casos), también la tenían 8 de los 13 que sí lo expresaban (61,5%; $p=0,111$).

Tampoco hay significación estratificando por tipo de lesión, es decir relacionando captación focal y expresión génica para diferenciar malignidad y benignidad. De los cinco pacientes con patología benigna que tenían captación focal ninguno expresaba HMG2, mientras que los 10 tumores malignos que sí lo expresaban en tejido también tenían captación focal. Estas diferencias, en cualquier caso, no fueron significativas ($p=0,444$ y $p=0,167$, respectivamente).

Tabla 29 Capacidad diagnóstica de la ¹⁸FDG-PET/TAC en pacientes con citología indeterminada

		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud global	58,33%	28,60%	83,50%
Sensibilidad	100,00%	39,58%	97,65%
Especificidad	37,50%	10,24%	74,11%
Valor predictivo positivo	44,44%	15,34%	77,35%
Valor predictivo negativo	100,00%	31,00%	96,82%

En el caso de los enfermos que expresaron NLRC3 en sangre periférica, los afectados de lesiones benignas tuvieron un porcentaje similar entre los que captaron (56,6%) y los que no (44,4%). Dado que todos los pacientes benignos expresaron NLRC3 no se pudo hacer comparativa según las diferencias de expresión en este grupo. En cuanto a los afectados por cáncer tiroideo, sólo tres de los 11 que tenían captación focal de FDG expresaban NLRC3 frente al 100% (8 casos) de los que no lo expresaron ($p=0,333$).

Dado que a ningún paciente con ¹⁸FDG-PET/TAC negativo se les determinó la mutación BRAF^{T1799A} no ha sido posible relacionar ambas variables.

4.3.5. Modelo predictivo.

El modelo predictivo obtenido con la regresión logística es:

$$p = \frac{e^{\alpha_0 + \alpha_1 X}}{1 + e^{\alpha_0 + \alpha_1 X}} \quad p = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha_0 + \alpha_1 X)}}$$

$p = 1/1 + e^{-(0,385 + 3,193 \cdot \text{HMG2} - 2,207 \cdot \text{NOD3})}$, donde p es la probabilidad de padecer un tumor maligno. Dado que se han considerado las variables como categóricas, los cuatro posibles valores que podría tomar p son:

- Ambos genes negativos: la probabilidad pronosticada de tumor maligno es de 0,595.
- Ambos genes positivos: la probabilidad es del 0,797
- La combinación HMG2 negativo y NLRC3 positivo: la probabilidad de malignidad es de 0,139, así que podríamos concluir que predice benignidad (Tabla 30).
- Finalmente, la presencia de HMG2 positivo y NLRC3 negativo: es la mejor combinación para predecir malignidad, con una probabilidad de 0,972 (Tabla 30).

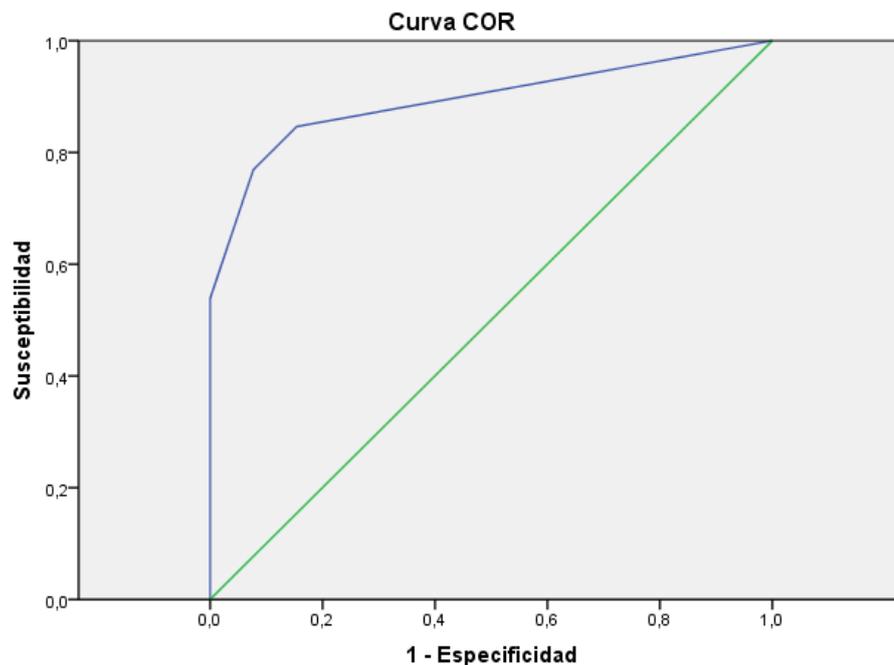
La combinación predictora de malignidad tiene una E del 100% pero a costa de una S baja (53,85%). Por su parte, la combinación predictora de benignidad tiene una exactitud del 84%.

Tabla 30 Capacidad diagnóstica del modelo predictivo en la totalidad de la serie

HMG2 expresado + NLRC3 no expresado			
		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud	76,92%	55,92%	90,25%
Sensibilidad	53,85%	26,12%	79,60%
Especificidad	100,00%	71,65%	99,29%
Valor predictivo positivo	100,00%	56,09%	98,68%
Valor predictivo negativo	68,42%	43,50%	86,44%
HMG2 no expresado + NLRC3 expresado			
		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud	84,62%	64,27%	94,95%
Sensibilidad	84,62%	53,66%	97,29%
Especificidad	84,62%	53,66%	97,29%
Valor predictivo positivo	84,62%	53,66%	97,29%
Valor predictivo negativo	84,62%	53,66%	97,29%

La curva ROC cuando aplicamos el modelo multivariante con ambos genes a la serie total es la expuesta en la Fig. 24 y muestra un área bajo la curva de 0,893.

Fig. 24 Curva ROC del modelo predictivo de dos genes



En el subgrupo de los 15 pacientes con citología indeterminada de la serie (Tabla 31), comprobamos que la expresión de HMGN2 es significativamente más alta en los pacientes con lesiones finalmente malignas que en los del GB. Es más, de los tres pacientes con nódulos finalmente malignos, todos lo tenían expresado (S 100%), frente a sólo uno de los benignos (E 90%).

En cuanto a NLRC3, y para este mismo subgrupo, encontramos que de los 11 pacientes que lo expresaron, sólo uno tenía una lesión cancerosa, siendo la diferencia entre la frecuencia de expresión en lesiones benignas y malignas estadísticamente significativa. Dado que está presente sólo en los pacientes del GB, se podría considerar como un gen protector. De esta forma, su expresión tendría capacidad de predecir la benignidad de la lesión con una S del 100% y una E algo más baja pues uno de los malignos también lo expresaba.

Tabla 31. Capacidad discriminativa de HMGN2 y NLRC3 en pacientes con citología indeterminada.

	HMGN2		NLRC3			
Expresión en el GB	1 de 10 (10%)		10 de 10 (100%)			
Expresión en el GM	3 de 4 (75%)		1 de 3 (33%)			
p	0,014		0,038			
		95% I.C.			95% I.C.	
		Límite superior	Límite inferior		Límite superior	Límite inferior
Exactitud global	92,3%	62,09%	99,60%	92,3%	62,09%	99,60%
Sensibilidad	100,0%	31,00%	96,82%	100,0%	65,55%	99,08%
Especificidad	90,0%	54,11%	99,48%	66,7%	12,53%	98,23%
Valor predictivo positivo	75,0%	21,94%	98,68%	90,9%	57,12%	99,52%
Valor predictivo negativo	100,0%	62,88%	98,97%	100,0%	19,79%	95,11%
Área bajo la curva	0,975	0	1	0,975	0	1

La aplicación del modelo predictivo obtenido por regresión logística a este subgrupo de pacientes, proporciona una elevada E y VPP para predecir malignidad e igualmente para predecir benignidad, como se observa en la Tabla 32, siendo la S del predictor de benignidad algo más elevada que la del otro modelo (90% vs. 75%).

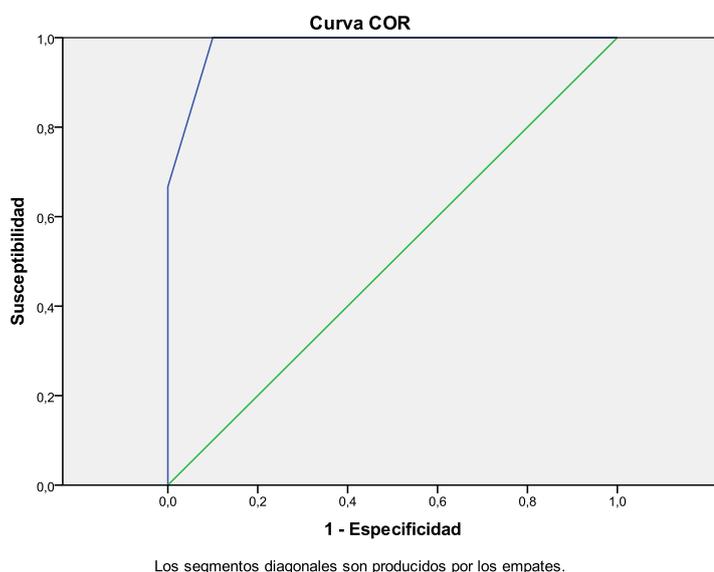
Tabla 32 Capacidad diagnóstica del modelo predictivo en los pacientes con citología indeterminada

HMGN2 expresado + NLRC3 no expresado			
		95 % I.C.	
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud	92,86%	64,17%	99,63%
Sensibilidad	75,00%	21,94%	98,68%
Especificidad	100,00%	65,55%	99,08%
Valor predictivo positivo	100,00%	31,00%	96,82%
Valor predictivo negativo	90,91%	57,12%	99,52%

HMGN2 no expresado + NLRC3 expresado			
95 % I.C.			
		Límite inferior	Límite superior
Exactitud	92,86%	64,17%	99,63%
Sensibilidad	90,00%	54,11%	99,48%
Especificidad	100,00%	39,58%	97,65%
Valor predictivo positivo	100,00%	62,88%	98,97%
Valor predictivo negativo	80,00%	29,88%	98,95%

Nuevamente el área bajo la curva ROC del modelo multivariante aplicado a los pacientes con citología indeterminada es muy elevada (0,983) y se muestra en la Fig. 25.

Fig. 25 Curva ROC del modelo predictivo de dos genes en pacientes con citología indeterminada

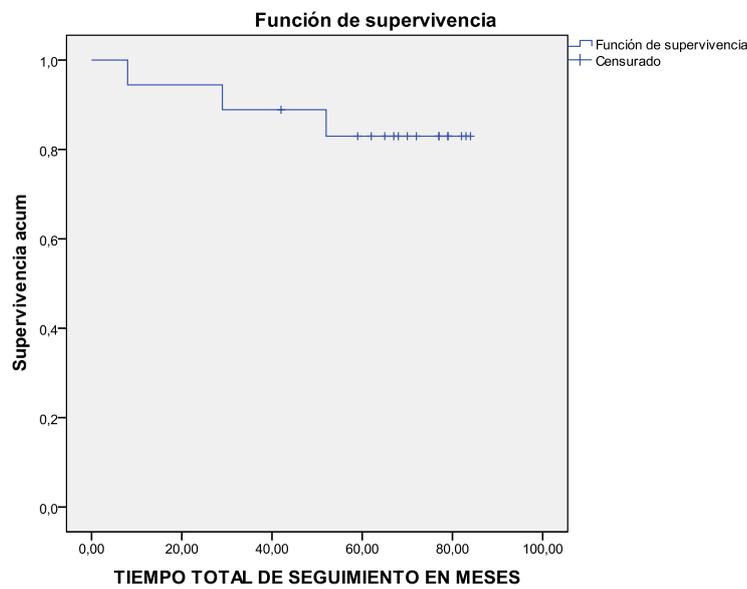


4.3.6. Análisis de la influencia de las diferentes variables sobre el pronóstico.

En las Tablas 25 y 26, se ha expuesto el análisis bivalente de los genes con expresión diferencial en relación con las características del tumor que tienen valor pronóstico. Como se puede apreciar, no se han detectado diferencias significativas con ninguna variable excepto la expresión de NLRC3 que se relaciona con una Tg estimulada postoperatoria más baja en el seguimiento y un periodo más largo hasta el tiempo de recidiva.

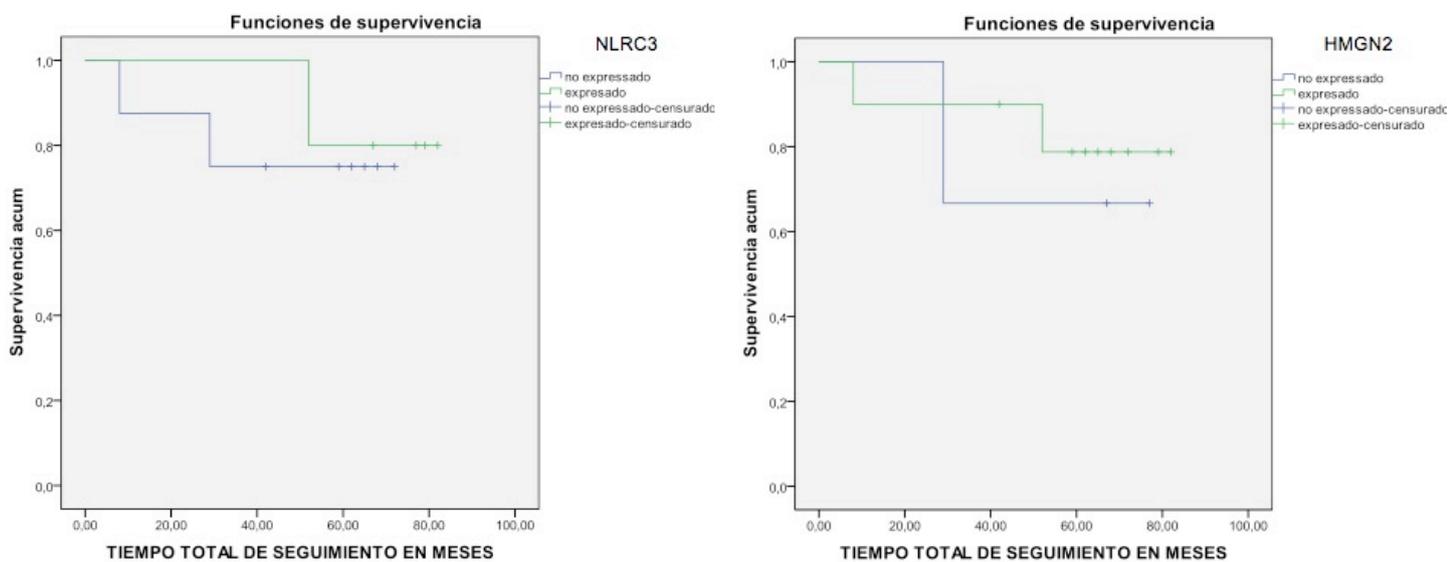
La mediana de seguimiento fue de 74 meses con un rango intercuartílico de 55-82 en los pacientes con lesiones benignas, y algo inferior, 69 meses (57-79) en los pacientes con patología maligna. La supervivencia global de la serie es del 83%, con una media del tiempo de supervivencia de $74,83 \pm 5,2$ meses (Fig. 26).

Fig. 26 Supervivencia global de los pacientes con patología maligna



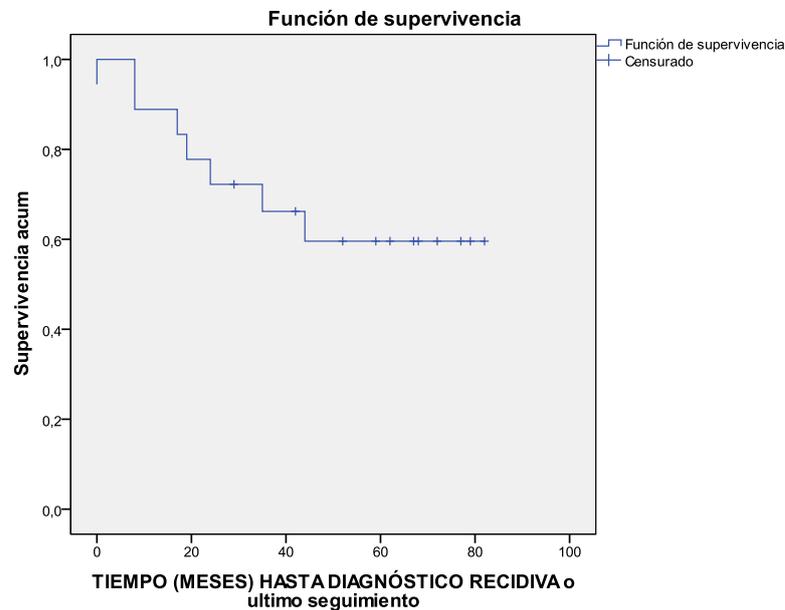
La expresión o no de HMGN2 en tejido tiroideo patológico (Fig. 26) no ha influido en la supervivencia global de la serie (78,8% vs. 66,7%; test de log-rank, $p=0,660$) y tampoco la expresión o no de NLRC3 en sangre periférica (Fig. 27): 80% vs. 75% (test log-rank, $p=0,724$).

Fig. 27 Supervivencia global en función de la expresión de HMGN2 y de NLRC3



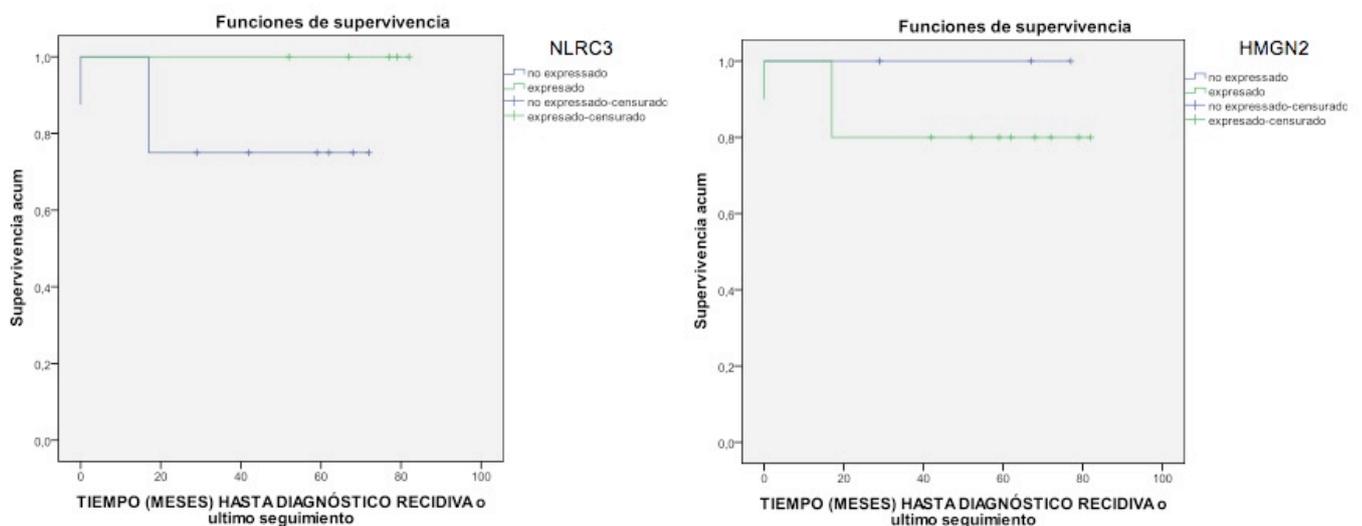
La supervivencia libre de enfermedad ha sido, para toda la serie, del 61,1%, con una media de $57,7 \pm 7$ meses (Fig. 28).

Fig. 28 Supervivencia libre de enfermedad para toda la serie



Tampoco hemos podido relacionar las diferencias de expresión de HMGN2 (80% vs. 100%; test log-rank, $p= 0,426$) y de NLRC3 (100% vs. 75%; test de log-rank, $p= 0,247$) con la supervivencia libre de enfermedad (Fig. 29), teniendo en cuenta que para este cálculo se han excluido los siete pacientes malignos del grupo de estudio, al no tener disponibles los datos de PCR.

Fig. 29 Supervivencia libre de enfermedad función de la expresión de HMGN2 y de NLRC3



DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El clasificador obtenido con este estudio nos muestra la probabilidad de tener una lesión maligna (CPT) en función de la expresión o no de dos genes, uno tisular (HMG2) y otro en sangre periférica (NLRC3). La expresión del primero junto con la ausencia del segundo genera una probabilidad de malignidad del 0,98 mientras que si la combinación es la contraria, esta probabilidad se reduce al 0,14. La aplicación de este predictor al subgrupo de pacientes con lesiones con citología indeterminada en la PAAF, muestra una alta capacidad predictiva, y permite identificar correctamente la malignidad o benignidad de la mayoría de las lesiones, con un área bajo la curva de 0,983. El estudio ha revelado, además, que la expresión de ambos genes está inversamente relacionada entre sí.

5.1. SUJETOS DE ESTUDIO

El cáncer de tiroides es el más frecuente del sistema endocrino⁽¹⁰³⁾ y el que más rápidamente ha aumentado su incidencia en ambos sexos⁽¹⁰⁴⁾. Este hecho se atribuye al mayor número de tumores de pequeño tamaño diagnosticados, fundamentalmente CPT de menos de 2 cm⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾. La supervivencia global es excelente llegando al 97% a los 10 años⁽¹⁰⁹⁾. El CPT es el tipo histológico más frecuente, suponiendo aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de tiroides⁽¹³⁶⁾. Dentro de este grupo, la variante con más dificultad diagnóstica en el estudio preoperatorio es la folicular (CPT-VF) ya que simula un CFT encapsulado⁽¹²⁰⁾.

El diagnóstico de esta patología, se fundamenta básicamente en la ecografía y la citología. Existen algunas características ecográficas relacionadas con la malignidad (Tabla 1)⁽⁴³⁾ pero ninguna por sí sola tiene suficiente valor predictivo. Sin embargo, cuando se suman dos ó más, aumenta mucho la capacidad diagnóstica^(40, 44) por lo que, en nuestro estudio, se ha utilizado este criterio para clasificar preoperatoriamente a los pacientes. La sospecha ecográfica se confirmó en el 55% de los casos (Tabla 19).

El segundo pilar del diagnóstico del cáncer de tiroides es la citología por su elevada capacidad para detectar cáncer, con especificidad y valor predictivo positivo (VPP) que rondan el 100%⁽⁴⁷⁻⁵⁴⁾. Al inicio de este estudio todavía los informes citológicos eran poco sistematizados, descriptivos, no comparables, usaban la nomenclatura histológica y rara vez indicaban manejo o riesgo de malignidad. Salvo en el caso de carcinoma papilar, carcinoma medular, enfermedad metastásica y linfoma, la confusión de la terminología daba lugar a dar diferentes diagnósticos para las mismas entidades⁽³⁹⁹⁻⁴⁰¹⁾. El TBSRTC se concibió para poner fin a esta situación⁽⁵⁶⁾ y, en nuestro centro comenzó a utilizarse en enero de 2009. En cualquier caso, existe un porcentaje de pacientes que no pueden ser diagnosticados por citología y que plantean el diagnóstico diferencial con CFT o un CPT-VF. Son las antiguas proliferaciones foliculares o las nuevas neoplasias foliculares (Bethesda 4), que no deberían superar el 15% de las citologías, con un riesgo de malignidad asociado no superior al 30%⁽⁵⁶⁾.

En el período en el que se inició el reclutamiento de los casos incluidos en esta Tesis Doctoral, nuestras tasas de citología indeterminada eran algo superiores a esta cifra⁽⁵⁴⁾ como se ha comentado en Pacientes y Métodos. Con estos datos, durante la fase de diseño del estudio, se decidió modificar los criterios de inclusión para incrementar el número de pacientes participantes con enfermedad maligna en

un período de tiempo aceptable. La mitad de los incluidos presentaban una citología indeterminada (Tabla 18) de los que el 20,6% se diagnosticaron finalmente de cáncer tiroideo.

Por último se decidió añadir a la muestra a los pacientes con mutación BRAF^{T1799A}, independientemente del informe citológico, en base a los resultados preliminares del estudio que sobre su utilidad en la citología tiroidea se estaba realizando en nuestro centro⁽⁴⁰²⁾. En este trabajo, cuyos resultados finales se han publicado recientemente⁽⁹⁶⁾, la especificidad de la mutación fue del 100%, sin ningún falso positivo.

Para establecer los grupos comparativos (GM vs. GB) era necesario conocer el tipo de lesión que afectaba a cada paciente (benigna o maligna). Así pues, tras tener disponible el informe final del servicio de Anatomía Patológica de nuestro centro, los pacientes elegibles fueron asignados al grupo de estudio o de validación. Este proceso no fue aleatorio puesto que en el diseño del estudio figuraba el análisis de todos los casos. Cuando esto no fue posible, se decidió seguir un criterio temporal, por el cual, los pacientes con muestras disponibles en la Unidad de Investigación en los primeros 12 meses fueron adscritos al grupo de estudio, mientras que el resto lo fue al grupo que se utilizaría para validar los resultados obtenidos.

El análisis de expresión génica que permiten los biochips CodeLink™ es de un color. Así que se obtuvieron por duplicado los datos brutos y normalizados de los pacientes del grupo de estudio. El siguiente paso fue obtener los datos de expresión diferencial entre el GM y el GB, tanto en tejido como en sangre periférica. Para ello, los bioinformáticos se sirvieron del método SAM. Aunque los estudios de microarrays se suelen diseñar con dos colores para tratar de evitar la variabilidad derivada del procedimiento^(326, 327), la alta calidad de los bioarrays comercializados ha mejorado mucho la consistencia de los resultados⁽⁴⁰³⁾. Los ensayos de un color permiten la comparación a través de los microarrays y entre grupos de muestras y se consideran equivalentes a los ensayos de dos colores, proporcionando niveles similares de información biológica⁽⁴⁰³⁾.

La financiación limitada y lo costoso de los análisis mediante microarrays nos impidió llegar al tamaño muestral previsto, así que en el grupo de validación se dio prioridad al análisis de nuevos pacientes con lesiones malignas, mientras que para el GB volvimos a usar parte de la muestra del grupo de estudio. De esta forma, además de validar la técnica, pensamos que obtendríamos la máxima información genética de esta patología, y un perfil génico con más posibilidades de predecir malignidad. Otros autores han publicado diseños similares utilizando parte de la muestra de estudio para validación de resultados, bien con qRT-PCR bien con otros medios como la inmunohistoquímica o el Western Blot^(340, 342, 347, 350, 354, 364, 368, 369, 372, 378, 381).

Desde el punto de vista clínico, los grupos benigno y maligno han mostrado lógicas disimilitudes en la presencia de síntomas, exploración física y características ecográficas sugerentes de malignidad (Tabla 19). Además se diferenciaron en otras variables asociadas a cáncer tiroideo como son el nivel de TSH, más alto en los pacientes del GM^(118, 126, 127), la presencia de mutación BRAF^{T1799A}^(130, 131, 195, 198, 199) y la captación focal en el ¹⁸FDG-PET^(76, 77).

Esta diferencia significativa en la captación focal de ¹⁸FDG entre ambos grupos de pacientes abrió una nueva vía de investigación, que intentó determinar si dicha captación diferencial tendría validez en el diagnóstico preoperatorio de los

pacientes con citología indeterminada. Con los participantes en este estudio no conseguimos demostrar su utilidad (Tabla 29) en la etapa previa a la implantación del sistema Bethesda, que sistematizó los informes citológicos.

Se decidió continuar con esta línea de investigación mediante la realización de un estudio prospectivo de validez de pruebas diagnósticas sobre pacientes con nódulos tiroideos y una citología compatible con Bethesda 4, prolongando el reclutamiento de pacientes hasta abril de 2012. Los datos de este trabajo fueron publicados en 2013⁽⁷⁹⁾, aportándose como artículo asociado a esta Tesis Doctoral. La muestra se componía de 46 pacientes de los que el 28,3% tuvieron una lesión finalmente maligna. Se confirmó que la presencia de captación focal se relacionaba con más riesgo de cáncer, con una S, E, VPP y VPN del 92,3; 48,5; 41,4; y 94,1%, respectivamente.

Puesto que la asignación al grupo de estudio y de validación no ha sido aleatoria, se han comparado las características clinicopatológicas y con valor pronóstico de los tumores malignos que componen dichos grupos (Tabla 20). La única diferencia significativa fue que los pacientes del grupo de estudio recidivaron más, sin que, con el estudio estadístico realizado, podamos aventurar una causa. No obstante, al analizar las proporciones obtenidas en cada grupo, parece haber mayor tamaño tumoral, más frecuencia de invasión vascular, extensión extratiroidea y afectación ganglionar, así como más dosis acumulada de ¹³¹I en el grupo de estudio. Teniendo en cuenta el orden en que los pacientes fueron intervenidos, y que este hecho condicionó el orden en que se obtuvieron y se procesaron las muestras, podría haber habido una concentración de pacientes con peor pronóstico al inicio del estudio.

Finalmente he de destacar, que aunque nuestro objetivo inicial era diferenciar lesiones malignas de benignas, dado que todos los pacientes con tumores malignos fueron diagnosticados de CPT, desconocemos si los resultados serán extrapolables a otros tipos histológicos.

5.2. PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROARRAYS.

Puesto que, ni los datos clínicos ni los radiológicos dan más rendimiento diagnóstico que la PAAF en los pacientes con resultado citológico de neoplasia folicular, se han realizado múltiples estudios tratando de encontrar un marcador más sensible que ésta para discriminar las lesiones benignas de las malignas, evitar cirugías diagnósticas innecesarias, e incluso, dar información con valor pronóstico para individualizar el tratamiento. De hecho, los estudios moleculares comienzan a aparecer en las guías clínicas como método auxiliar en caso de citología indeterminada, aunque su uso rutinario aún no esté formalmente recomendado^(1, 2, 29, 30, 55, 63, 161). Actualmente, sin embargo, no hay disponible ningún marcador que por sí sólo tenga esta capacidad⁽²⁴⁵⁾.

Esta dificultad diagnóstica, la ausencia de un marcador, y la variabilidad en metodología y resultados de los estudios publicados (Tabla 13) estimularon el diseño de esta investigación y mantienen su validez.

Las técnicas para los estudios cromosómicos o de genoma han evolucionado a partir de la tecnología de los microarrays. Ésta consiste en la extracción del ARN de muestras de tejido o de sangre, para proceder a su purificación, amplificación, marcaje e hibridación, tras lo cual se puede realizar el análisis de la expresión génica obteniéndose un mapa de genes con diferentes grados de expresión⁽²²⁴⁾. En concreto, los estudios con microarrays analizan simultáneamente el nivel de

expresión de miles de genes, en una célula concreta (o conjunto celular), en un momento determinado y bajo unas condiciones específicas^(327, 329, 330).

En esta Tesis Doctoral se decidió realizar el análisis del genoma completo, comparando a los pacientes del GM frente a los del GB. Se encontraron 11 genes sobreexpresados en tejido, mientras que en sangre periférica fueron 9 sobreexpresados y 44 infraexpresados. Los genes encontrados no se han descrito previamente en otros estudios de similares características.

Como ya se ha expuesto la variabilidad de los estudios de expresión es alta y tiene diversas causas, desde las diferentes plataformas de microarrays usadas^(300, 349, 354), hasta la metodología estadística para procesar los datos⁽³³⁰⁾ pasando por las diferencias en la selección y comparación de las muestras⁽³³⁰⁾ o artefactos metodológicos⁽³⁶¹⁾.

Sólo en un trabajo de los revisados⁽³⁵⁴⁾ (Tabla 13) se ha utilizado una plataforma de la misma casa comercial que la nuestra (Applied Biosystems) aunque difiere en el número de sondas*. En dicho trabajo se estudiaron muestras de CFT y de AF (4 muestras de cada clase). Por último, el estudio estadístico se basó en la desviación estándar y el agrupamiento jerárquico no supervisado. Los autores encontraron 25 genes capaces de distinguir entre AF, CFT micro y altamente invasivo. De éstos los más significativos fueron DPT y QPRT, éste último 20 veces más presente en CFT que en AF.

La mayoría del resto de autores utilizaron biochips de Affymetrix®^(300, 340, 346, 349, 350, 355, 358, 360, 362, 363, 365, 368, 372-374, 376, 380, 404-407). Se ha comprobado que cuando se comparan plataformas, aunque los resultados sea consistentes de unas con otras⁽³³⁹⁾, éstos no son directamente comparables entre sí, ni se pueden reproducir salvo que se seleccionen los genes de un mismo estudio⁽³⁵⁹⁾.

Sólo algunos trabajos analizan únicamente CPT frente a patología benigna^(355, 361, 362, 374-376, 380, 381) pero ni el diseño ni el análisis estadístico coinciden con el usado por nuestro grupo. Algunos autores también han utilizado SAM para el análisis de sus datos^(306, 365, 372, 377) pero en estos casos ni las muestras ni el diseño del estudio coinciden con el expuesto aquí.

En todos los artículos resumidos en la Tabla 13 se describe un perfil génico, con mayor o menor número de genes, que diferencian distintas patologías. En el presente trabajo se ha confirmado en un grupo de validación analizado mediante qR-TPCR que la expresión de dos genes tienen capacidad discriminante entre lesiones tiroideas malignas y benignas. Tanto en el análisis bivalente (Tablas 21, 22) como en el multivalente (Tabla 27), la expresión tisular de HMGN2 ha resultado ser un marcador de malignidad, mientras que la de NLRC3 en sangre periférica lo ha sido de benignidad. Es de destacar la significativa relación inversa entre ambos genes, como se puede ver en la Fig. 22, lo que podría tener importancia desde el punto de vista biológico.

* Plataforma de Hinchs et al. 2009: Applied Biosystems Human Genome Survey Microarrays V.2.0. Información disponible en:
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_041901.pdf

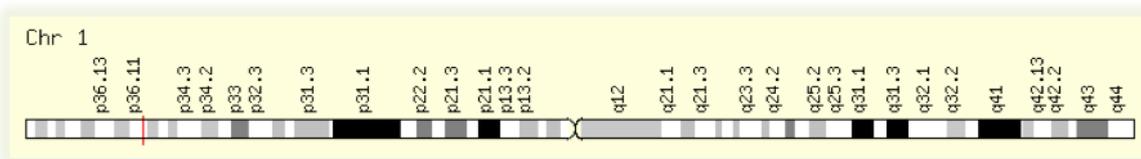
Hasta el momento, teniendo en cuenta la amplia revisión bibliográfica realizada, podemos afirmar que es la primera vez que la sobreexpresión ambos genes se describe en patología tiroidea.

5.2.1. HMGN2

El gen HMGN2 o *High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 2⁺* (también *Nonhistone Chromosomal Protein HMG-17*, *High Mobility Group Protein N2*, o *HMG17*) se encuentra localizado en el cromosoma 1 (1p36.1; Fig. 30) y codifica una proteína de unión del ADN nucleosómico ligada a la cromatina activa. También parece tener una amplia actividad antimicrobiana. La expresión del ARNm HMGN2 ha sido descrita en tejido tiroideo normal.

Fig. 30 Gen HMGN2 en el brazo corto cromosoma 1

(Fuente: <http://www.genecards.org/Search/Keyword?queryString=hmg2>; acceso en octubre de 2015)



El grupo asociado a cromatina de alta motilidad (*chromatin-associated high mobility group*: HMG) es una superfamilia de proteínas que incluye a otras tres: HMG-AT-hook (HMGA), HMG-box (HMGB), y HMG unida al nucleosoma* (HMGN)⁽⁴⁰⁸⁾. Esta última familia, a su vez, está compuesta por cinco proteínas arquitecturales de la cromatina⁽⁴⁰⁹⁾, y de ellas, HMGN1, 2 y 4 son expresadas amplia e inespecíficamente en los tejidos humanos. Las proteínas HMGN descompactan la cromatina condensada⁽⁴¹⁰⁾, aumentan la actividad transcripcional del molde de cromatina⁽⁴¹⁰⁾, intervienen en la reparación del ADN, sobre todo HMGN2⁽⁴¹¹⁾, en la remodelación de la cromatina⁽⁴¹²⁾ y en el grado de modificación de las histonas⁽⁴¹³⁾.

La secuencia del ADNc de HMGN2 fue descrita en 1986⁽⁴¹⁴⁾ y el gen se localizó en el cromosoma 1 en 1990⁽⁴¹⁵⁾. La primera descripción como componente estructural que facilitaba la función de la cromatina fue publicada por Bustin y Reeves en 1996⁽⁴¹⁶⁾. Actualmente se considera que la disposición estructural del complejo HMGN2-nucleosoma se puede comparar a una grapa que se ancla por un lado al octámero de histona y por otro al ADN nucleosomal. De esta forma

+ La Información básica de ambos genes se ha obtenido de GENECards®, (<http://www.genecards.org>) y NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=>), incluidas las ilustraciones en las que no se indique lo contrario.

* El nucleosoma es una estructura nuclear en la que dos vueltas de ADN (unas 146 pares de bases) se enrollan alrededor de un cilindro u octámero de histonas (dos dímeros de histona H2A-H2B junto a un tetrámero de histonas H3-H4). Es la unidad básica de la cromatina, es decir del genoma compactado para que tenga cabida en el núcleo. Fuente: portal de Medicina molecular de FIBAO en <http://medmol.es/glosario/23/>; acceso en octubre de 2015.

HMG2 puede interferir con la histona de enlace H1 y promover la descompactación de la cromatina mediante su separación de dicho complejo, fosforilándose durante la fase de mitosis⁽⁴¹³⁾. Esta unión a la cromatina es dinámica y dependiente de la fase del ciclo celular. Así, durante la interfase las HMNGs se unen específicamente al nucleosoma mientras que esa unión es débil y no específica durante la mitosis⁽⁴¹⁷⁾. Las modificaciones postranscripcionales afectan a sus efectos biológicos, ya que influyen en la interacción de la proteína con el ADN. Estas modificaciones se realizan mediante acetilación, metilación, fosforilación y SUMOización⁽⁴¹⁸⁾. Este último mecanismo se produce en situaciones de estimulación inflamatoria y disminuye la afinidad de HMG2 por el nucleosoma y, por tanto, favorece la descompactación de la cromatina. Recientemente se ha descubierto que la proteína es expresada y secretada por los monocitos, convirtiéndose en un efector relacionado con la función inmunitaria de las células *natural killer* y los linfocitos T citotóxicos^(419, 420).

HMG2 se ha implicado en la regulación de la transcripción^(410, 421). Uno de los mecanismos por el que parece realizar esta función es a través de la vía Wnt- β -catenina, cuyas mutaciones se relacionan con cánceres tiroideos^(124, 170, 171), fundamentalmente poco diferenciados. En resumen, la activación de esta vía permite la translocación de la β -catenina al interior del núcleo celular donde forma un complejo con HMG2 y PITX2 (factor de transcripción) convirtiéndose en un complejo transcripcional activo. Cuando la vía es inactivada, la β -catenina se degrada y HMG2 inactiva a PITX2⁽⁴²²⁾.

También se ha vinculado con la diferenciación celular^(412, 423, 424), y se ha investigado su relación con el cáncer:

- Se ha encontrado su sobreexpresión en células de sangre periférica de pacientes con leucemia mielocítica crónica con respecto al tejido normal⁽⁴²⁵⁾, en líneas celulares de leucemia promielocítica⁽⁴²³⁾, y en tejido tumoral de pacientes con cáncer de mama y cáncer intestinal⁽⁴²⁵⁾. Los autores relacionan el nivel de expresión de la proteína con la tasa de proliferación celular.

- La ausencia de HMNG2, en cultivos de la línea celular DT40, hace a dichas células más sensibles a la radiación ultravioleta debido a una alteración en la capacidad de reparar el daño en el ADN, lo que provoca un aumento de la apoptosis⁽⁴¹¹⁾

- Se ha relacionado con el neuroblastoma, donde las deleciones en el brazo corto del cromosoma 1 (1.p36) son una de las alteraciones genéticas más frecuentes⁽⁴²⁶⁾.

- En cáncer de mama serviría de factor regulador en eventos biológicos que contribuirían al fenotipo tumoral mediante interacción con el receptor de prolactina (PRLr) translocado al núcleo⁽⁴²⁷⁾. Esto daría lugar a la activación de la expresión de genes mediados por Stat5a. Entre los genes diana de esta vía estaría CCND1, cuya sobreexpresión ha sido descrita en relación con el CPT⁽¹²⁴⁾ (Tablas 11 y 13).

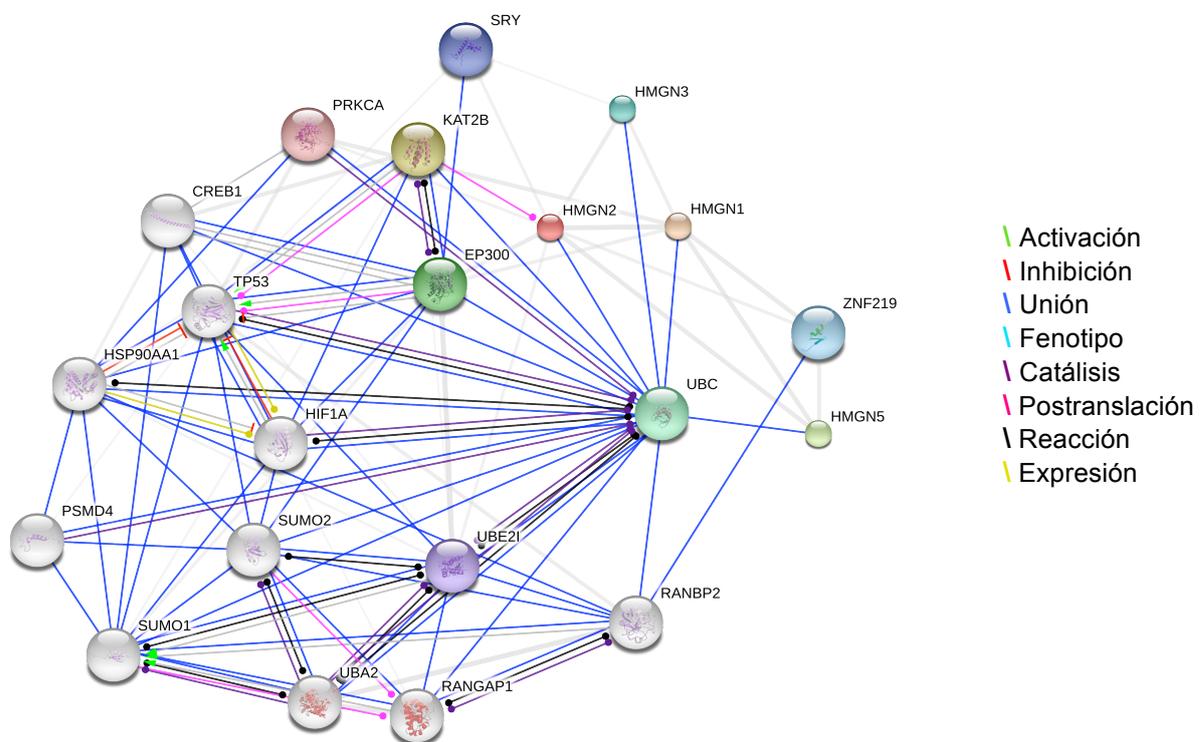
- Se ha encontrado expresado en un modelo animal de glucagonoma aunque se desconoce si esta hiperexpresión tendría que ver con fenotipos vinculados a la producción hormonal⁽⁴²⁸⁾

- HMG2 es directamente inhibido por miR-23a, y éste, a su vez, es estimulado por TGF- β . La sobreexpresión de miR-23a se ha documentado en varios tipos de cáncer: gástrico, mamario, pancreático, y en glioblastoma⁽⁴²⁹⁾.

- Hay otras evidencias de un posible efecto antitumoral. En líneas celulares de osteosarcoma, su sobreexpresión tiene un efecto protector pues disminuye la proliferación y la migración celular, aumenta la apoptosis y la sensibilidad a la quimioterapia, disminuyendo la expresión de CCND1⁽⁴³⁰⁾. Estos resultados coinciden con investigaciones en otros tumores como el carcinoma oral de células escamosas⁽⁴¹⁹⁾, donde además asocian la sobreexpresión de HMGN2 con la regulación al alza de p53 y a la baja de BCL-2. En cultivos de células tumorales se ha comprobado que las células T CD8 (activadas con antígeno tumoral) que expresan HMGN2 pueden matar a las células tumorales⁽⁴²⁰⁾.

Fig. 31 Interacciones con otros genes.

[Fuente: STRING 10 (en: <http://string-db.org>); acceso en octubre de 2015]



Las posibles relaciones funcionales de HMGN2 (Anexo VI) se exponen en la Fig. 31. Probablemente, la más interesante es la que tiene con KAT2B, que funciona como una acetiltransferasa de histonas (HAT) para promover la activación de la transcripción. Como se puede ver en la figura, a través de ésta conecta con p53⁽⁴³¹⁾, y también con HIF1A (o HIF-1 α). Como ya se expuso la sección 1.4, HIF1A tiene que ver con la angiogénesis y las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT, y se ha encontrado en tumores tiroideos, sobre todo indiferenciados^(170, 171). Por otro lado, el gen supresor p53 induce la inactivación de HMGN2, además de la de otros reguladores celulares, en el cumplimiento de su misión como inhibidor del ciclo celular⁽⁴³¹⁾.

Otra vinculación descrita es con NF- κ B en un estudio con la línea celular A549^(408, 418). Esta vía de señalización interviene, entre otras, en la regulación de la respuesta inflamatoria ligada a la génesis tumoral y también se ha relacionado con el

cáncer tiroideo^(170, 171). No se ha encontrado ningún estudio que relacione este gen o su proteína a patología tiroidea.

En resumen podemos decir que HMG2 está vinculado funcionalmente a la transcripción del ADN, la diferenciación celular y a mecanismos relacionados con la inmunidad, incluida la inmunidad tumoral. Sin embargo no hemos encontrado explicación a su sobreexpresión en los tumores malignos de nuestra serie, ni a su significado biológico. También se desconoce si la sobreexpresión conlleva algún tipo de alteración en su estructura molecular que condicione un fenotipo maligno.

5.2.2. NLRC3

NLRC3 (NOD3; CLR16.2) pertenece a una familia de genes que actúan en la repuesta inmunitaria innata, generalmente estimulando la respuesta inflamatoria, aunque algunos miembros lo harían con efecto inhibitor⁽⁴³²⁾. Se caracterizan por tener un dominio N-terminal fundamental para la transcripción, un dominio intermedio de unión a nucleótidos (NBD) y una región C-terminal rica en leucina (LRR), conociéndose de forma genérica como NLR (*NB-LLR-related gene family*)⁽⁴³²⁾.

Este grupo de genes se describió a inicios de los años 2.000 por distintos grupos lo que ha dado lugar a una nomenclatura confusa que finalmente se consensuó en 2008⁽⁴³³⁾. En este grupo se incluyeron genes con los siguientes nombres:

- CATERPILLER (CLR)⁽⁴³⁴⁾ por sus siglas en inglés: **CARD**, *Transcription Enhancer, R (purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats*.
- NOD⁽⁴³⁵⁾: *Nucleotide-oligomerization domain*
- NOD-LRR: *Nucleotide-oligomerization domain-Leucine rich repeat*.
- NACHT-LLR⁽⁴³⁶⁾: nomenclatura dada por las iniciales de 4 proteínas que definían su función: *neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP)*, *MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) class II transcription activator (CIITA)*, *incompatibility locus protein from Podospora anserina (HET-E)*, and *telomerase-associated protein (TP1)*.
- NOD-like receptor.

Cada subfamilia se distingue por su dominio N-terminal^(433, 437):

- NLRA: Dominio de transactivación acídica cuyo miembro principal es CIITA.
- NLRP: Dominio pirina (PYD), previamente denominados PAN, PYPAF y NALP.
- NLRC: Dominio caspasa (*caspase recruitment domain* o CARD), o también CARD o NOD. En esta subfamilia se incluye NLRX1, único que contiene una secuencia N-terminal dirigida a las mitocondrias.
- NLRB: Dominio BIR (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat*) o NAIP ó BIRC.

De este grupo de genes y se han descrito al menos 23 miembros^(438, 439) y se les ha asociado a distintos trastornos inmunológicos^(433, 440):

- CIITA: inmunodeficiencia.
- NLRP3: síndromes autoantiinflamatorios
- NOD2: enfermedad de Crohn, síndrome de Blau (asma, artritis psoriásica).

- NLRP1: síndromes autoinmunes asociados al vitíligo.

Los NLR forman parte de la familia de receptores de reconocimiento de patrones (*pattern recognition receptors* o PRR), esenciales en el sistema inmunitario innato. Éstos, tras reconocer patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos o PAMP), daño o estrés celular (patrones moleculares asociados al peligro o DAMP) inician las cascadas de señalización inflamatoria. También son PPRs los receptores tipo Toll, los lecitina tipo C y los tipo RIG-I^(439, 441).

Para realizar su función en la cascada inflamatoria los NLR forman parte de dos tipos de complejos proteicos:

- Inflamasomas: inicialmente descritos por Martinon *et al.* en 2002⁽⁴⁴²⁾ y constituidos por una caspasa (-1 ó -5), una proteína NLR (o AIM2, *absent in melanoma 2*) y la proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase activation and recruitment domain*)⁽⁴⁴¹⁾. La interacción NLR-ASC activa a la caspasa-1 y como consecuencia se segregan citoquinas inflamatorias biológicamente activas (IL-1 β e IL-18, IL-33)^(438, 441). La activación de caspasa-1 puede estimular la piroptosis o muerte celular mediada por la inflamación⁽⁴⁴¹⁾. Cada NLR reconoce a un grupo específico de PAMPs y DAMPs⁽⁴³⁹⁾

- Nodosomas^(443, 444), formados por un NLR (NOD1 o NOD2) al que se une RIP2 (*receptor-interacting protein 2*). La consecuencia es la activación de NF- κ B y de la vía MAPK, induciendo respuestas proinflamatorias y antimicrobianas⁽⁴³⁸⁾. También induce la activación de la IL-1 β , el TNF α y la IL-6⁽⁴⁴⁵⁾.

Los PPR además influyen en la regulación de la proliferación, la supervivencia y la muerte celular, la angiogénesis, la remodelación y reparación tisular⁽⁴³⁹⁾.

La exposición a sustancias o patógenos potencialmente carcinogénicos dará lugar a una respuesta inmune similar a la descrita, mediada por los PPR y activando los inflamasomas. No obstante, si esta actividad inflamatoria se mantiene, se crearía un ambiente proclive a la iniciación y progresión tumoral⁽⁴³⁹⁾. El papel de la inflamación crónica en todas las fases de la carcinogénesis está bien establecido y su presencia puede condicionar peor pronóstico clínico⁽⁴⁴¹⁾. La activación de los inflamasomas NLR se ha vinculado con diversos tipos de cáncer (colon, mama, piel, hepatocelular relacionado con virus) mientras que tres miembros de la familia NLR (NLRC3, NLRP12 y NLRX1)⁽⁴³⁹⁾ regularían negativamente la inflamación independientemente de esta vía.

Entre las fuentes promotoras de la inflamación asociados a cáncer están las infecciones virales y bacterianas, los agentes ambientales, la obesidad, los propios tumores, las terapias proinflamatorias, o algunas citoquinas (IL-1 β and IL-6)⁽⁴⁴¹⁾.

El descubrimiento de NLRC3 (CLR16.2) y su localización en cromosoma 16 fue publicado en 2005⁽⁴⁴⁶⁾. Actualmente* se sabe que se ubica en el brazo corto del mismo (Fig. 32) y que existen múltiples variantes de transcripción. Se expresa sobre todo en el citoplasma de los linfocitos T, pero también se ha encontrado sobreexpresión de su ARNm en sangre completa (células mononucleares de sangre

*GeneCards®: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NLRC3>

periférica), y en tejido esplénico. Se considera un regulador citosólico de la inmunidad innata.

Fig. 32 Cromosoma 16 con el gen NLRC3 en su brazo corto

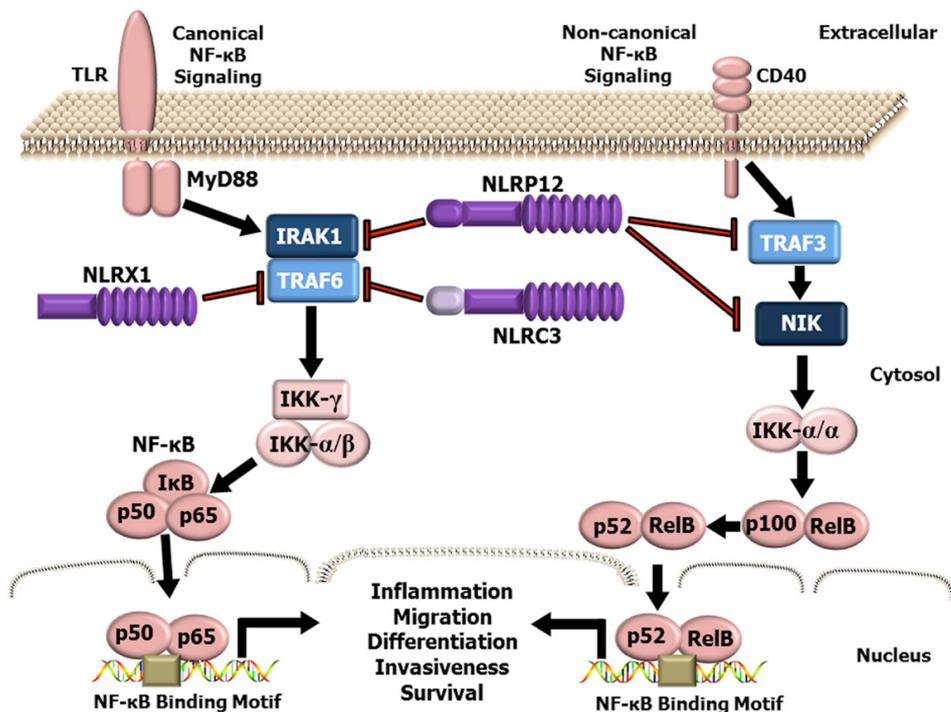
(Fuente: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NLRC3>; acceso en octubre de 2015)



Ya sus descubridores⁽⁴⁴⁶⁾ perfilaron el papel que jugaba en la modulación de la inmunidad. NLRC3 atenúa el efecto de la activación de los linfocitos T a través de la vía de señalización TCR (*T-cell receptor*) disminuyendo la transcripción de genes estimulados por esta vía como CD25 (IL-2R α) e IL-2, y reduciendo la actividad de NF- κ B, de NFAT (factor nuclear de células T activadas), y de AP-1 (jun). También demostraron que NLRC3 reducía su expresión en las células T unas horas después de la activación de las mismas, postulando que este hecho permitiría el siguiente ciclo de activación.

Ésta inhibición de la vía NF- κ B, evitando una respuesta inflamatoria descontrolada, ha sido confirmada posteriormente⁽⁴⁴⁷⁾, por una vía alternativa, en la que NLRC3 actúa, inhibiendo al PPR tipo Toll, a través de la interacción con TRAF6 (*TNF Receptor-Associated Factor 6, E3 Ubiquitin Protein Ligase*), un efector de esta vía de señalización (Fig. 33).

Fig. 33 Atenuación de la vía NF- κ B por NLRC3 y NLRX1 interactuando con TRAF6
(Reproducida con permiso del autor: Allen, IC⁽⁴³⁸⁾: [Front Immunol 2014; 5:169](https://doi.org/10.3389/fimm.2014.00169))



Hasta ahora se consideraba que NLRC3 regularía negativamente la inflamación independientemente del inflamasoma⁽⁴³⁹⁾. Sin embargo este año ha publicado cómo NLRC3 interactúa con los componentes del mismo (ASC, caspasa-1 y caspasa-5) inhibiendo la activación de IL-1 β . Además, su sobreexpresión provoca una supresión de la actividad transcripcional y de señalización dependientes de NF- κ B⁽⁴³⁸⁾.

Finalmente se ha relacionado a NLRC3 con la vía de los genes estimulantes de interferón⁽⁴⁴⁸⁾, inhibiendo la respuesta inmunitaria al impedir la síntesis de interferón I y evitar el movimiento adecuado de STING a la región perinuclear de la célula⁽⁴⁴⁹⁾.

Se ha especulado con que la atenuación de NF- κ B tenga el mismo efecto inhibitorio en la génesis tumoral que en la inmunidad⁽⁴³⁹⁾. En este contexto se ha asociado recientemente la ausencia o la baja expresión de NLRC3 con el cáncer colorrectal⁽⁴⁵⁰⁾, e incluso los investigadores vinculan el grado de reducción de expresión del mismo con la progresión tumoral. Estos datos podrían estar en consonancia con los de nuestro estudio, en el que la sobreexpresión del gen se relaciona con benignidad.

5.2.3. Relación entre ambos genes

Ambos genes están relacionados de forma inversa como se ha comprobado en el estudio de correlación (Fig. 22). Tras revisar la bibliografía en la que HMGN2 tiene un papel mal definido en la patogenia del cáncer, y NLRC3, tiene un claro efecto inhibitorio de la respuesta inflamatoria y probablemente de la carcinogénesis, parece haber cierta lógica en nuestros resultados. HMGN2 se ha encontrado en el tejido tumoral, mientras que NLRC3, expresado sobre todo en células T, se ha encontrado en sangre periférica, postulándose un efecto protector del mismo al ser su expresión prácticamente inexistente en tumores malignos.

5.3. PERFIL GÉNICO Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS Y CON VALOR PRONÓSTICO DE LAS LESIONES MALIGNAS.

Recientemente se han revisado los factores de riesgo de mortalidad tradicionalmente considerados en CPT y CFT⁽¹⁴⁴⁾. El papel del sexo es controvertido si bien la edad superior a 45 años sigue empeorando el pronóstico de estos pacientes. La afectación ganglionar aumenta el riesgo de recidiva pero está por demostrar su efecto en la mortalidad. Finalmente, la influencia de otros factores como la TSH o los marcadores moleculares, (BRAF, RAS, RET/PTC, PAX8-PPAR γ) en el pronóstico de la enfermedad está siendo objeto de investigación.

Probablemente relacionado con el número de casos de nuestra población estudiada, no hemos encontrado diferencias en cuanto a las características clínicas, histológicas y el pronóstico entre los que expresaban HMGN2 y los que no lo hacían. Las proporciones en ambos grupos pueden sugerir más metástasis ganglionares, estadios más avanzados y más recidivas en los que expresan dicho gen, pero dados los resultados estadísticos no podemos obtener conclusiones.

En cuanto a NLRC3 sí se ha relacionado su no expresión con un tiempo de recidiva más corto ($p= 0,040$) y con niveles más altos de Tg estimulada postoperatoria ($p= 0,012$), lo que se encuentra en consonancia con el efecto protector de su expresión. La ausencia de la misma con se asociaría malignidad y, quizá, con peor pronóstico.

Se han calculado las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad para los pacientes con patología maligna. Nuevamente, dado el escaso tamaño muestral y los pocos eventos producidos durante el seguimiento de los pacientes del grupo de validación, no se ha podido relacionar la expresión génica con ninguna de las dos variables.

5.4. CLASIFICADOR

En general los estudios de expresión han tendido a proporcionar clasificadores en los que la combinación de genes tiene más utilidad diagnóstica que la utilización de un único gen⁽³⁶²⁾. Dada la variabilidad en los resultados de estos estudios, el número de clasificadores no es desdeñable, y aunque no tienen en común muchos genes, suelen tener una alta capacidad para diagnosticar correctamente a los pacientes.

En este trabajo se ha asociado la expresión de HMGN2 en el tejido del nódulo tiroideo sospechoso a un riesgo veinte veces mayor de que dicha lesión se trate de un cáncer papilar de tiroides (Tabla 27). Al mismo tiempo, la ausencia de NLRC3 en sangre periférica se asocia a una probabilidad de que lo sea nueve veces mayor. En ambos casos los intervalos de confianza son muy amplios, y además, NLRC3 no ha alcanzado la significación estadística por 3 milésimas. No obstante, dada la relevancia biológica del gen, como protector y/o predictor de benignidad, la consistencia con el resto de resultados, y que atribuimos la falta de significación estadística al tamaño muestral, se decidió mantenerlo en el modelo predictivo

La construcción del clasificador y su aplicación a la serie total de pacientes, nos proporciona la probabilidad de tener o no cáncer en función de la combinación de expresión o no expresión de ambos genes. Así, la probabilidad es muy alta (0,97) cuando se expresa HMGN2 y no se expresa NLRC3, mientras que es muy baja en la situación opuesta (0,14). El predictor de malignidad tiene una sensibilidad baja, lo que es un hándicap en el diagnóstico preoperatorio, pero por el contrario tiene una E del 100%. La combinación que predice benignidad, tiene igual S que E (84,6%). Este resultado mejora bastante cuando aplicamos el clasificador a los pacientes con citología indeterminada, aumentando la S al 75%, manteniendo una E del 100% en el primer caso y aumentando la S al 90% con la misma E en el segundo.

En la Tabla 33 se ha comparado el nuestro con otros clasificadores de los que tienen disponibles, al menos las cifras de S y E. Casi todos aportan una exactitud global mayor del 90%, similar a nuestro resultado en el subgrupo de pacientes con citología indeterminada (92,86%). Aunque en general los estudios basados en microarrays se consideran más sensibles que específicos^(289, 290, 346, 355, 360, 363, 364), en el caso de nuestro clasificador, y en otros, prima la especificidad alcanzando el 100%^(361, 374, 377, 380).

Lubitz *et al.*⁽³⁷⁶⁾ sólo consiguen reclasificar correctamente a tres de 8 casos de citología indeterminada mientras que otro grupo⁽⁴⁵¹⁾, usando GABRB2 (*Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor, Beta 2*) como marcador, diagnostican correctamente al 74% de las citologías indeterminadas⁽³⁰⁶⁾. Los mejores resultados, sin embargo, los tienen los creadores del AGECE. En el estudio preliminar⁽³⁶⁰⁾ demuestran una S del 85,7% y una E del 40%, utilizando los genes con capacidad discriminativa obtenidos de muestras quirúrgicas. Este resultado mejora mucho cuando utilizan un set de genes obtenidos en muestras de PAAF: S 100% y E 73,3%. Posteriormente Alexander *et al.* validan el clasificador con 167 genes de forma prospectiva, y para citologías Bethesda 4, la S es del 90%, la E del 52%, con un VPN del 85%.

Tabla 33 Capacidad diagnóstica de diferentes clasificadores basados en técnica de microarrays

Autor y ref	Clasificador	S	E	VPP	VPN	Ext (IC 95%)	ABC (IC 95%)
5 genes							
Finley 2004 ⁽³⁷⁴⁾	GM vs. GB	93	100	-	-	-	-
	CPT vs. GB	100	100	-	-	-	-
	PTC-VF vs. GB	91	100	-	-	-	-
Jarzab 2005 ⁽³⁶¹⁾	RFR-20 set	85,7	100	-	-	94,4	-
	CPT vs. GB					(72,7-99,9)	
Kebebew 2005 (290)	ECM1, TMPRSS4	91,7	89,8	85,7	82,8	-	0,985
	GM vs. GB						
Kebebew 2005 ⁽²⁸⁹⁾	ANGPT2, TIMP1	90	85	75	94	-	0,873
	GM vs. GB						
Weber 2005 ⁽³⁴⁵⁾	3 genes	100	94,7	-	-	96,7	-
	CFT vs. AF					(83,3-99,9)	
Durand 2008 ⁽³⁷⁷⁾	12 genes	91	100	-	-	-	-
	CPT+CFT vs. GB						
Arora 2009 ⁽³⁵⁵⁾	61 genes	93	82	-	-	-	-
	PTC vs. GB						
Borup 2010 ⁽³⁴⁹⁾	76 genes	94,4	95,5	-	-	95	0,96
	CFT vs. AF						
Chudova 2010 ⁽³⁶⁰⁾	Múltiples genes (AGEC)	92,3	58,1	-	-	-	0,9
	PAAF GM vs. GB						
Kundel 2010 ⁽³⁸⁰⁾	61 genes	85,7	100	-	-	92,3	-
	GM (CPT) vs. GB						
Pfeifer 2013 ⁽³⁴⁶⁾	5 genes	71	72	67	76	72	-
	AF vs. CFT					(60-82)	
Zheng 2015 ⁽³⁸³⁾	3 genes	93,5	94,9	-	-	94,3	-
	GB vs. GM					(88,9-99,7)	
Barros- Filho 2015 ⁽³⁰⁶⁾	3 genes	94	96	-	-	95	-
	GB vs. GM						
	GABRB2	85	97	-	-	91	-
Este estudio	2 genes	53,8	1000	100	68,4	76,9	0,89
	GM vs. GB					(55,9-90,2)	
Este estudio	2 genes	75	100	100	90,9	92,9	0,98
	C. Indeterminada					(64,2-99,6)	

Valores expresados en % excepto ABC

Los genes implicados se pueden ver en la tabla 13. Abreviaturas en Anexo IV.

Ext: exactitud; ABC: área bajo la curva; IC: intervalo de confianza; AGECE: Afirma Gene Expression Clasifier; GB: patología benigna; GM: cáncer de tiroides; CPT: cáncer papilar; CPT-VF: variante folicular de CPT; CFT: cáncer folicular; AF: adenoma folicular

Como ya se ha mencionado, el análisis de expresión génica de las muestras obtenidas por PAAF se facilita con las técnicas basadas en la PCR, al precisar menos cantidad de ARN^(337, 338). En nuestro trabajo, sin embargo, no se han analizado las muestras citológicas por lo que la comparación con el AGECE no es totalmente equiparable.

5.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Diversos factores son causantes de la variabilidad entre los experimentos con microarrays y algunos de estos afectarán a la validez del estudio. Así, hay que considerar fuentes potenciales de inexactitud en los resultados a:

1. La imposibilidad de llegar al número de muestra previsto dados los problemas de financiación.

2. Sesgo de selección de los pacientes: el conocimiento del diagnóstico final (variable dependiente) ha determinado la asignación a un grupo u otro de estudio. Por otra parte tampoco se aleatorizaron los casos dentro del GM para que formaran parte del grupo de estudio o el de validación, por lo que ambos subgrupos podrían no ser totalmente comparables. En cualquier caso, este sesgo nos aseguró un número mínimo de pacientes con patología maligna de la que extraer un perfil génico representativo de esta condición.

3. Otro posible sesgo podría ser la utilización de la mayoría de los pacientes del GB para el experimento con microarrays y para la validación posterior, aunque esta haya sido una práctica habitual en los estudios con microarrays para confirmar los resultados obtenidos. La adición de cuatro pacientes independientes en el GB y de 13 en el GM se ha hecho para mitigar de alguna forma este sesgo, aunque es posible que el número sea insuficiente.

4. Puesto que el diagnóstico citológico es nuestro principal criterio de elegibilidad, la heterogeneidad en el grupo de citología indeterminada (no sistematizada al inicio del periodo de reclutamiento) podría suponer una fuente de variabilidad que dificultara la reproducción de los resultados con otro grupo de pacientes.

5. Aunque nuestro objetivo es diferenciar lesiones malignas de las benignas, al tener en nuestra serie sólo un tipo histológico (CPT) este predictor podría no ser útil con otros tipos de cáncer tiroideo.

6. Durante el manejo y procesamiento de tejidos y muestras sanguíneas, podrían producirse cambios con potencial capacidad de influir en la expresión génica.

Los estudios de expresión génica son supuestamente reproducibles, sin embargo, la validez externa se ve condicionada por diversos factores:

1. Factores técnicos. Las diferencias de instrumental y equipamiento y otros condicionamientos durante la realización del experimento: la cantidad de material biológico en cada pocillo, la cantidad de reactivo fluorescente, la dilución de la solución que va a hibridarse, la medición de la luz por el escáner, etc. Se sabe p.ej. que la señal medida en una posición concreta del array mantiene una relación no lineal con la concentración de ARN en la dilución que se va a hibridar.

El preprocesamiento y la normalización de los microarrays trata de subsanar este tipo de errores técnicos.

2. La propia base metodológica de los arrays. Con esta técnica pueden analizarse miles de genes presentes en una muestra tisular en un momento concreto y bajo unas condiciones determinadas, lo que implica dificultad en obtener muestras *in vivo* exactamente en las mismas condiciones. Además hay que contar con la propia heterogeneidad de las células presentes en un tumor. En el otro brazo de la balanza se encuentra la homología entre las secuencias de genes, que podría condicionar que una sonda hibride con más de un gen, perdiendo especificidad y

dado un resultado inexacto. Y lo que es más, un gen puede codificar más de una secuencia de ARNm, y por tanto, más de una proteína.

3. Las características de los datos de expresión (gran número de genes con pequeño tamaño de la muestra) complica el proceso de clasificación. Puesto que la precisión de la clasificación se degrada conforme el número de clases se incrementa, se decidió agrupar en este estudio toda la patología en dos variables dicotómicas: lesión maligna vs. benigna.

5.6. VÍAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Dado el pequeño tamaño muestral, es evidente que no podemos extrapolar esos resultados sin primero validarlos en nuestro ámbito, con un número mayor de pacientes, incluidos en un estudio prospectivo utilizando la metodología de qRT-PCR. La mayor utilidad práctica de este trabajo sería poder aplicar este clasificador en muestras citológicas obtenidas por PAAF del nódulo tiroideo sospechoso. Si los resultados fueran concordantes con los obtenidos en esta Tesis Doctoral, podríamos mejorar el diagnóstico preoperatorio del cáncer de tiroides. Este es un factor de importancia crítica en la definición de la extensión de la cirugía inicial del cáncer de tiroides, y por ende en su pronóstico a largo plazo. Finalmente, sería preciso un estudio multicéntrico para confirmar si el modelo es exportable a otras poblaciones.

La aparición de un marcador en sangre periférica abre a la investigación un campo poco explorado en este tipo de patología, y la posibilidad de hacer un diagnóstico preoperatorio poco invasivo en un número no desdeñable de pacientes, evitando PAAFs y cirugías diagnósticas.

Finalmente, si se confirmaran los resultados, se podría avanzar en el conocimiento de la biología molecular del cáncer tiroideo. El mayor conocimiento en las vías de señalización relacionadas con la carcinogénesis favorece, a su vez, la investigación en futuras dianas terapéuticas.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1) Mediante el estudio de expresión génica mediante microarrays de muestras de tejido tiroideo y/o sangre periférica es posible catalogar preoperatoriamente como benigno o maligno un nódulo tiroideo con citología indeterminada.

2) El estudio de expresión de perfil génico mediante microarrays permite identificar genes con diferencias de expresión en tejido tiroideo y en sangre periférica de los pacientes con cáncer tiroideo frente a los que tienen una lesión benigna.

3) La expresión de los genes HMGN2 y NLRC3, mediante qRT-PCR, han demostrado su capacidad para discriminar y malignidad de benignidad en un grupo de validación posterior con enfermos intervenidos por enfermedad nodular tiroidea.

4) En nuestra población de estudio, la expresión de HMGN2 no se ha relacionado con ningún factor pronóstico asociados a cáncer tiroideo. Sin embargo, los pacientes que expresaban NLRC3 tuvieron niveles más bajos de Tg postoperatoria y un tiempo hasta la recidiva más largo.

5) Se ha comprobado que la captación focal en la ^{18}F FDG-PET/TAC está relacionada el cáncer de tiroides pero no hemos podido demostrar la utilidad del mismo en el diagnóstico preoperatorio de pacientes con citología indeterminada.

6) La expresión de ninguno de los genes se ha podido relacionar con las características del tumor vinculadas con la agresividad biológica del cáncer de tiroides.

7) Mediante regresión logística se ha construido un clasificador que proporciona una alta probabilidad de lesión maligna cuando HMGN2 está expresado en tejido y NLRC3 no lo está en sangre periférica. La situación contraria predice benignidad.

8) La aplicación de este clasificador al subgrupo de pacientes con citología indeterminada es útil pues clasifica correctamente a los pacientes con patología maligna con una sensibilidad del 75%, una especificidad del 100%, y valores predictivo positivos del 100% y negativo del 91%.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper, DS, Doherty, GM, Haugen, BR, Kloos, RT, Lee, SL, Mandel, SJ, *et al.* Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2009;19(11):1167-214.
2. Wemeau, JL, Sadoul, JL, d'Herbomez, M, Monpeyssen, H, Tramalloni, J, Leteurtre, E, *et al.* Guidelines of the French society of endocrinology for the management of thyroid nodules. *Annales d'endocrinologie.* 2011;72(4):251-81.
3. Frates, MC, Benson, CB, Charboneau, JW, Cibas, ES, Clark, OH, Coleman, BG, *et al.* Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology.* 2005;237(3):794-800.
4. Pacini, F, Burroni, L, Ciuli, C, di Cairano, G, Guarino, E. Management for thyroid nodules: a clinicopathological, evidence-based approach. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31:1443-9.
5. Gharib, H, Papini, E, Valcavi, R, Baskin, HJ, Crescenzi, A, Dottorini, ME, *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists.* 2006;12(1):63-102.
6. Dean, DS, Gharib, H. Epidemiology of thyroid nodules. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2008;22(6):901-11.
7. 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. *Annals of internal medicine.* 1968;69(3):537-40.
8. Brander, A, Viikinkoski, P, Nickels, J, Kivisaari, L. Thyroid gland: US screening in a random adult population. *Radiology.* 1991;181(3):683-7.
9. Tan, GH, Gharib, H, Reading, CC. Solitary thyroid nodule. Comparison between palpation and ultrasonography. *Archives of internal medicine.* 1995;155(22):2418-23.
10. Guth, S, Theune, U, Aberle, J, Galach, A, Bamberger, CM. Very high prevalence of thyroid nodules detected by high frequency (13 MHz) ultrasound examination. *European journal of clinical investigation.* 2009;39(8):699-706.
11. Miller, MC. The patient with a thyroid nodule. *The Medical clinics of North America.* 2010;94(5):1003-15.
12. Ezzat, S, Sarti, DA, Cain, DR, Braunstein, GD. Thyroid incidentalomas. Prevalence by palpation and ultrasonography. *Archives of internal medicine.* 1994;154(16):1838-40.
13. Mortensen, JD, Woolner, LB, Bennett, WA. Gross and microscopic findings in clinically normal thyroid glands. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1955;15(10):1270-80.
14. Carle, A, Krejbjerg, A, Laurberg, P. Epidemiology of nodular goitre. Influence of iodine intake. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2014;28(4):465-79.
15. Alexander, EK, Hurwitz, S, Heering, JP, Benson, CB, Frates, MC, Doubilet, PM, *et al.* Natural history of benign solid and cystic thyroid nodules. *Annals of internal medicine.* 2003;138(4):315-8.

16. Quadbeck, B, Pruellage, J, Roggenbuck, U, Hirche, H, Janssen, OE, Mann, K, *et al.* Long-term follow-up of thyroid nodule growth. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association.* 2002;110(7):348-54.
17. Mazzaferri, EL. Management of a solitary thyroid nodule. *The New England journal of medicine.* 1993;328(8):553-9.
18. Durante, C, Costante, G, Lucisano, G, Bruno, R, Meringolo, D, Paciaroni, A, *et al.* The natural history of benign thyroid nodules. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2015;313(9):926-35.
19. Papini, E, Guglielmi, R, Bianchini, A, Crescenzi, A, Taccogna, S, Nardi, F, *et al.* Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2002;87(5):1941-6.
20. Pasqualetti, G, Caraccio, N, Basolo, F, Miccoli, P, Monzani, F. Prevalence of thyroid cancer in multinodular goiter versus single nodule: iodine intake and cancer phenotypes. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2014;24(3):604-5.
21. Brito, JP, Yarur, AJ, Prokop, LJ, McIver, B, Murad, MH, Montori, VM. Prevalence of thyroid cancer in multinodular goiter versus single nodule: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2013;23(4):449-55.
22. Luo, J, McManus, C, Chen, H, Sippel, RS. Are there predictors of malignancy in patients with multinodular goiter? *The Journal of surgical research.* 2012;174(2):207-10.
23. Noureldine, SI, Tufano, RP. Association of Hashimoto's thyroiditis and thyroid cancer. *Current opinion in oncology.* 2015;27(1):21-5.
24. Paschke, R, Hegedüs, L, Alexander, E, Valcavi, R, Papini, E, Gharib, H. Thyroid nodule guidelines: agreement, disagreement and need for future research. *Nature reviews Endocrinology.* 2011;7(6):354-61.
25. Hegedüs, L. Clinical practice. The thyroid nodule. *The New England journal of medicine.* 2004;351(17):1764-71.
26. Land, CE, Zhumadilov, Z, Gusev, BI, Hartshorne, MH, Wiest, PW, Woodward, PW, *et al.* Ultrasound-detected thyroid nodule prevalence and radiation dose from fallout. *Radiation research.* 2008;169(4):373-83.
27. Gharib, H, Papini, E, Paschke, R, Duick, DS, Valcavi, R, Hegedüs, L, *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists, Associazione Medici Endocrinologi, and European Thyroid Association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: Executive Summary of recommendations. *Journal of endocrinological investigation.* 2010;33(5):287-91.
28. Pacini, F, Schlumberger, M, Dralle, H, Elisei, R, Smit, JW, Wiersinga, W. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2006;154(6):787-803.
29. Tuttle, RM, Ball, DW, Byrd, D, Dilawari, RA, Doherty, GM, Dhu, QY, *et al.* Thyroid cancer 2012 [cited 2012 julio]. Version 2.2012:[Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp].
30. Perros, P, Boelaert, K, Colley, S, Evans, C, Evans, RM, Gerrard Ba, G, *et al.* Guidelines for the management of thyroid cancer. *Clinical endocrinology.* 2014;81 Suppl 1:1-122.

31. Elisei, R, Bottici, V, Luchetti, F, Di Coscio, G, Romei, C, Grasso, L, *et al.* Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2004;89(1):163-8.
32. Musholt, TJ, Clerici, T, Dralle, H, Frilling, A, Goretzki, PE, Hermann, MM, *et al.* German Association of Endocrine Surgeons practice guidelines for the surgical treatment of benign thyroid disease. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie.* 2011;396(5):639-49.
33. Acharya, UR, Vinitha Sree, S, Krishnan, MM, Molinari, F, Garberoglio, R, Suri, JS. Non-invasive automated 3D thyroid lesion classification in ultrasound: a class of ThyroScan systems. *Ultrasonics.* 2012;52(4):508-20.
34. Scheible, W, Leopold, GR, Woo, VL, Gosink, BB. High-resolution real-time ultrasonography of thyroid nodules. *Radiology.* 1979;133(2):413-7.
35. Blum, M, Goldman, AB, Herskovic, A, Hernberg, J. Clinical applications of thyroid echography. *The New England journal of medicine.* 1972;287(23):1164-9.
36. Christensen, SB, Ericsson, UB, Janzon, L, Tibblin, S, Trelle, E. The prevalence of thyroid disorders in a middle-aged female population, with special reference to the solitary thyroid nodule. *Acta chirurgica Scandinavica.* 1984;150(1):13-9.
37. Walker, J, Findlay, D, Amar, SS, Small, PG, Wastie, ML, Pegg, CA. A prospective study of thyroid ultrasound scan in the clinically solitary thyroid nodule. *The British journal of radiology.* 1985;58(691):617-9.
38. Marqusee, E, Benson, CB, Frates, MC, Doubilet, PM, Larsen, PR, Cibas, ES, *et al.* Usefulness of ultrasonography in the management of nodular thyroid disease. *Annals of internal medicine.* 2000;133(9):696-700.
39. Siström, C. Thyroid nodule aspiration guided by ultrasound. *American family physician.* 1995;51(5):1066, 8.
40. Rago, T, Vitti, P. Diagnostic role of ultrasound and elastosonography in nodular goiter. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2014;28(4):519-29.
41. Cantisani, V, Lodise, P, Grazhdani, H, Mancuso, E, Maggini, E, Di Rocco, G, *et al.* Ultrasound elastography in the evaluation of thyroid pathology. *Current status. European journal of radiology.* 2014;83(3):420-8.
42. Zhang, B, Ma, X, Wu, N, Liu, L, Liu, X, Zhang, J, *et al.* Shear wave elastography for differentiation of benign and malignant thyroid nodules: a meta-analysis. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine.* 2013;32(12):2163-9.
43. Fish, SA, Langer, JE, Mandel, SJ. Sonographic imaging of thyroid nodules and cervical lymph nodes. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2008;37(2):401-17, ix.
44. Lew, JI, Rodgers, SE, Solorzano, CC. Developments in the use of ultrasound for thyroid cancer. *Current opinion in oncology.* 2010;22(1):11-6.
45. Cakir, B, Aydin, C, Korukluoglu, B, Ozdemir, D, Sisman, IC, Tuzun, D, *et al.* Diagnostic value of elastosonographically determined strain index in the differential diagnosis of benign and malignant thyroid nodules. *Endocrine.* 2011;39(1):89-98.
46. Hoang, JK, Lee, WK, Lee, M, Johnson, D, Farrell, S. US Features of thyroid malignancy: pearls and pitfalls. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc.* 2007;27(3):847-60; discussion 61-5.

47. Walfish, PG, Hazani, E, Strawbridge, HT, Miskin, M, Rosen, IB. A prospective study of combined ultrasonography and needle aspiration biopsy in the assessment of the hypofunctioning thyroid nodule. *Surgery*. 1977;82(4):474-82.
48. Gharib, H, Goellner, JR, Johnson, DA. Fine-needle aspiration cytology of the thyroid. A 12-year experience with 11,000 biopsies. *Clinics in laboratory medicine*. 1993;13(3):699-709.
49. Campillo-Soto, A, Flores-Pastor, B, Candel-Arenas, M, Soria-Aledo, V, Gimenez-Bascunana, A, Miquel Perello, J, *et al.* [Utility of frozen section in the surgical treatment of thyroid nodules]. *Cirugia española*. 2006;79(3):176-9.
50. Yang, J, Schnadig, V, Logrono, R, Wasserman, PG. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: a study of 4703 patients with histologic and clinical correlations. *Cancer*. 2007;111(5):306-15.
51. Wang, CC, Friedman, L, Kennedy, GC, Wang, H, Kebebew, E, Steward, DL, *et al.* A large multicenter correlation study of thyroid nodule cytopathology and histopathology. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2011;21(3):243-51.
52. Brooks, AD, Shaha, AR, DuMornay, W, Huvos, AG, Zakowski, M, Brennan, MF, *et al.* Role of fine-needle aspiration biopsy and frozen section analysis in the surgical management of thyroid tumors. *Annals of surgical oncology*. 2001;8(2):92-100.
53. Seningen, JL, Nassar, A, Henry, MR. Correlation of thyroid nodule fine-needle aspiration cytology with corresponding histology at Mayo Clinic, 2001-2007: An institutional experience of 1,945 cases. *Diagnostic cytopathology*. 2012;40 Suppl 1:E27-32.
54. Muñoz Pérez, N, Serradilla Martín, M, Olmos Juárez, E, Moreno Cortés, C, Martín, J, García García, C, *et al.* Utilidad de la punción aspiración con aguja fina preoperatoria y la biopsia intraoperatoria en la patología tiroidea. X Congreso de la ASAC. Torremolinos (Málaga): Cirugía Andaluza; 2007. p. 109.
55. Baloch, ZW, Cibas, ES, Clark, DP, Layfield, LJ, Ljung, BM, Pitman, MB, *et al.* The National Cancer Institute Thyroid fine needle aspiration state of the science conference: a summation. *CytoJournal*. 2008;5:6.
56. Cibas, ES, Ali, SZ. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009;19(11):1159-65.
57. Cross, P, Chandra, A, Giles, T, Johnson, S, Kocjan, G, Poller, D, *et al.* Guidance on the reporting of thyroid cytology specimens. London: The Royal College of Pathologists; 2009. Available from: <http://www.rcpath.org/Resources/RCPPath/MigratedResources/Documents/G/g089guidanceonthereportingofthyroidcytologyfinal.pdf>
58. Camargo, R, Corigliano, S, Friguglietti, C, Gauna, A, Harach, R, Munizaga, F, *et al.* Latin American thyroid society recommendations for the management of thyroid nodules. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2009;53(9):1167-75.
59. Cibas, ES, Alexander, EK, Benson, CB, de Agustin, PP, Doherty, GM, Faquin, WC, *et al.* Indications for thyroid FNA and pre-FNA requirements: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagnostic cytopathology*. 2008;36(6):390-9.
60. Brito, JP, Singh-Ospina, N, Gionfriddo, MR, Maraka, S, Espinosa De Ycaza, A, Rodriguez-Gutierrez, R, *et al.* Restricting ultrasound thyroid fine needle

- aspiration biopsy by nodule size: which tumors are we missing? A population-based study. *Endocrine*. 2015.
61. Langer, JE, Baloch, ZW, McGrath, C, Loevner, LA, Mandel, SJ. Thyroid nodule fine-needle aspiration. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*. 2012;33(2):158-65.
 62. Campbell, MJ, Seib, CD, Candell, L, Gosnell, JE, Duh, QY, Clark, OH, *et al*. The underestimated risk of cancer in patients with multinodular goiters after a benign fine needle aspiration. *World J Surg*. 2015;39(3):695-700.
 63. Haugen, BRM, Alexander, EK, Bible, KC, Doherty, G, Mandel, SJ, Nikiforov, YE, *et al*. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015.
 64. Sreaton, NJ, Berman, LH, Grant, JW. US-guided core-needle biopsy of the thyroid gland. *Radiology*. 2003;226(3):827-32.
 65. Crescenzi, A, Trimboli, P, Modica, DC, Taffon, C, Guidobaldi, L, Taccogna, S, *et al*. Preoperative assessment of TERT promoter mutation on thyroid core needle biopsies supports diagnosis of malignancy and addresses surgical strategy. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2015.
 66. Hahn, SY, Shin, JH, Han, BK, Ko, EY, Ko, ES. Ultrasonography-guided core needle biopsy for the thyroid nodule: does the procedure hold any benefit for the diagnosis when fine-needle aspiration cytology analysis shows inconclusive results? *The British journal of radiology*. 2013;86(1025):20130007.
 67. Lee, KH, Kim, HS, Han, BK, Ko, EY, Ki, CS, Shin, JH. Incidence and predictive factors of inadequate fine-needle aspirates for BRAF(V600E) mutation analysis in thyroid nodules. *AJR American journal of roentgenology*. 2014;202(2):391-6.
 68. Yeon, JS, Baek, JH, Lim, HK, Ha, EJ, Kim, JK, Song, DE, *et al*. Thyroid nodules with initially nondiagnostic cytologic results: the role of core-needle biopsy. *Radiology*. 2013;268(1):274-80.
 69. Liu, Q, Castelli, M, Gattuso, P, Prinz, RA. Simultaneous fine-needle aspiration and core-needle biopsy of thyroid nodules. *The American surgeon*. 1995;61(7):628-32; discussion 32-3.
 70. Quinn, SF, Nelson, HA, Demlow, TA. Thyroid biopsies: fine-needle aspiration biopsy versus spring-activated core biopsy needle in 102 patients. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*. 1994;5(4):619-23.
 71. Raparia, K, Min, SK, Mody, DR, Anton, R, Amrikachi, M. Clinical outcomes for "suspicious" category in thyroid fine-needle aspiration biopsy: Patient's sex and nodule size are possible predictors of malignancy. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2009;133(5):787-90.
 72. Jin, J, McHenry, CR. Thyroid incidentaloma. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2012;26(1):83-96.
 73. Lu, Y, Moreira, AL, Hatzoglou, V, Stambuk, HE, Gonen, M, Mazaheri, Y, *et al*. Using diffusion-weighted MRI to predict aggressive histological features in papillary thyroid carcinoma: a novel tool for pre-operative risk stratification in thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25(6):672-80.
 74. Deandreis, D, Al Ghuzlan, A, Auperin, A, Vielh, P, Caillou, B, Chami, L, *et al*. Is (18)F-fluorodeoxyglucose-PET/CT useful for the presurgical characterization of thyroid nodules with indeterminate fine needle aspiration cytology? *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2012;22(2):165-72.

75. Kim, JM, Ryu, JS, Kim, TY, Kim, WB, Kwon, GY, Gong, G, *et al.* 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography does not predict malignancy in thyroid nodules cytologically diagnosed as follicular neoplasm. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2007;92(5):1630-4.
76. Vriens, D, de Wilt, JH, van der Wilt, GJ, Netea-Maier, RT, Oyen, WJ, de Geus-Oei, LF. The role of [(18) F]-2-fluoro-2-deoxy-d-glucose-positron emission tomography in thyroid nodules with indeterminate fine-needle aspiration biopsy: Systematic review and meta-analysis of the literature. *Cancer.* 2011;117(20):4582-94.
77. Wang, N, Zhai, H, Lu, Y. Is fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography useful for the thyroid nodules with indeterminate fine needle aspiration biopsy? A meta-analysis of the literature. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale.* 2013;42:38.
78. Wang, LY, Roman, BR, Migliacci, JC, Palmer, FL, Tuttle, RM, Shaha, AR, *et al.* Cost-effectiveness analysis of papillary thyroid cancer surveillance. *Cancer.* 2015.
79. Muñoz Pérez, N, Villar del Moral, JM, Muros Fuentes, MA, Lopez de la Torre, M, Arcelus Martínez, JI, Becerra Massare, P, *et al.* Could 18F-FDG-PET/CT avoid unnecessary thyroidectomies in patients with cytological diagnosis of follicular neoplasm? *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie.* 2013;398(5):709-16.
80. Faquin, WC. The thyroid gland: recurring problems in histologic and cytologic evaluation. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2008;132(4):622-32.
81. Alonso, N, Lucas, A, Salinas, I, Castella, E, Sanmarti, A. Frozen section in a cytological diagnosis of thyroid follicular neoplasm. *The Laryngoscope.* 2003;113(3):563-6.
82. Baloch, ZW, Fleisher, S, LiVolsi, VA, Gupta, PK. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagnostic cytopathology.* 2002;26(1):41-4.
83. Williams, MD, Suliburk, JW, Staerckel, GA, Busaidy, NL, Clayman, GL, Evans, DB, *et al.* Clinical significance of distinguishing between follicular lesion and follicular neoplasm in thyroid fine-needle aspiration biopsy. *Annals of surgical oncology.* 2009;16(11):3146-53.
84. Iskandar, ME, Bonomo, G, Avadhani, V, Persky, M, Lucido, D, Wang, B, *et al.* Evidence for overestimation of the prevalence of malignancy in indeterminate thyroid nodules classified as Bethesda category III. *Surgery.* 2015;157(3):510-7.
85. Mihai, R, Parker, AJ, Roskell, D, Sadler, GP. One in four patients with follicular thyroid cytology (THY3) has a thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2009;19(1):33-7.
86. Gheri, RG, Romoli, E, Vezzosi, V, Raggianti, B, Bianchi, S, Pedercini, S, *et al.* Follicular nodules (THY3) of the thyroid: we recommend surgery. *Journal of endocrinological investigation.* 2011;34(7):e183-7.
87. Dutta, S, Thaha, MA, Smith, DM. Do sonographic and cytological features predict malignancy in cytologically indeterminate thyroid nodules? *Annals of the Royal College of Surgeons of England.* 2011;93(5):361-4.
88. Sippel, RS, Elaraj, DM, Khanafshar, E, Zarnegar, R, Kebebew, E, Duh, QY, *et al.* Tumor size predicts malignant potential in Hurthle cell neoplasms of the thyroid. *World J Surg.* 2008;32(5):702-7.

89. Castro, MR, Espiritu, RP, Bahn, RS, Henry, MR, Gharib, H, Caraballo, PJ, *et al.* Predictors of malignancy in patients with cytologically suspicious thyroid nodules. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2011;21(11):1191-8.
90. Sillery, JC, Reading, CC, Charboneau, JW, Henrichsen, TL, Hay, ID, Mandrekar, JN. Thyroid follicular carcinoma: sonographic features of 50 cases. *AJR American journal of roentgenology.* 2010;194(1):44-54.
91. Seo, HS, Lee, DH, Park, SH, Min, HS, Na, DG. Thyroid follicular neoplasms: can sonography distinguish between adenomas and carcinomas? *Journal of clinical ultrasound : JCU.* 2009;37(9):493-500.
92. Kato, MA, Fahey, TJ, 3rd. Molecular markers in thyroid cancer diagnostics. *The Surgical clinics of North America.* 2009;89(5):1139-55.
93. Eszlinger, M, Hegedus, L, Paschke, R. Ruling in or ruling out thyroid malignancy by molecular diagnostics of thyroid nodules. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism.* 2014;28(4):545-57.
94. Alexander, EK, Kennedy, GC, Baloch, ZW, Cibas, ES, Chudova, D, Diggans, J, *et al.* Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *The New England journal of medicine.* 2012;367(8):705-15.
95. Agretti, P, Ferrarini, E, Rago, T, Candelieri, A, De Marco, G, Dimida, A, *et al.* MicroRNA expression profile helps to distinguish benign nodules from papillary thyroid carcinomas starting from cells of fine needle aspiration. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2012.
96. Cañadas-Garre, M, Becerra-Massare, P, Lopez de la Torre-Casares, M, Villardel Moral, J, Cespedes-Mas, S, Vilchez-Joya, R, *et al.* Reduction of false-negative papillary thyroid carcinomas by the routine analysis of BRAF(T1799A) mutation on fine-needle aspiration biopsy specimens: a prospective study of 814 thyroid FNAB patients. *Annals of surgery.* 2012;255(5):986-92.
97. Kitano, M, Rahbari, R, Patterson, EE, Steinberg, SM, Prasad, NB, Wang, Y, *et al.* Evaluation of candidate diagnostic microRNAs in thyroid fine-needle aspiration biopsy samples. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2012;22(3):285-91.
98. Li, H, Robinson, KA, Anton, B, Saldanha, IJ, Ladenson, PW. Cost-effectiveness of a novel molecular test for cytologically indeterminate thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2011;96(11):E1719-26.
99. Nikiforov, YE. Molecular diagnostics of thyroid tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine.* 2011;135(5):569-77.
100. Shibru, D, Hwang, J, Khanafshar, E, Duh, QY, Clark, OH, Kebebew, E. Does the 3-gene diagnostic assay accurately distinguish benign from malignant thyroid neoplasms? *Cancer.* 2008;113(5):930-5.
101. Vriens, MR, Weng, J, Suh, I, Huynh, N, Guerrero, MA, Shen, WT, *et al.* MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer. *Cancer.* 2012;118(13):3426-32.
102. Yip, L, Farris, C, Kabaker, AS, Hodak, SP, Nikiforova, MN, McCoy, KL, *et al.* Cost impact of molecular testing for indeterminate thyroid nodule fine-needle aspiration biopsies. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(6):1905-12.
103. Ferlay, J, Soerjomataram, I, Dikshit, R, Eser, S, Mathers, C, Rebelo, M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2015;136(5):E359-86.

104. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2015. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
105. Davies, L, Welch, HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. JAMA : the journal of the American Medical Association. 2006;295(18):2164-7.
106. Davies, L, Morris, LG, Haymart, M, Chen, AY, Goldenberg, D, Morris, J, *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: The Increasing Incidence of Thyroid Cancer. Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists. 2015;21(6):686-96.
107. Enewold, L, Zhu, K, Ron, E, Marrogi, AJ, Stojadinovic, A, Peoples, GE, *et al.* Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2009;18(3):784-91.
108. La Vecchia, C, Malvezzi, M, Bosetti, C, Garavello, W, Bertuccio, P, Levi, F, *et al.* Thyroid cancer mortality and incidence: a global overview. International journal of cancer Journal international du cancer. 2015;136(9):2187-95.
109. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Factsheets: Thyroid Cancer Bethesda, MD, EEUU2015 [cited 2015 31/08/2015]. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>.
110. Ferlay, J, Soerjomataram, I, Ervik, M, Dikshit, R, Eser, S, Mathers, C, *et al.* GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013 [01/07/2015]. incidencia/ mortalidad]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
111. group, ECRw. EUROCARE-5 Survival Analysis 2000-2007. Spain. 2015 [cited 2015 01/07/2015]. Available from: <http://www.eurocare.it/Portals/0/CDEU4/Forms/SA9599.aspx>.
112. Lope Carvajal, V, Pollán Santamaría, M. Cáncer diferenciado de tiroides. Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición. 2005;52 (Supl 1):2-10.
113. López-Abente, G, Ramis, R, Pollán, M, Aragonés, N, Pérez-Gómez, B, Gómez-Barroso, D, *et al.* Atlas municipal de mortalidad por cáncer en España, 1989-1998. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2006.
114. Cabanes, A, Pérez-Gómez, B, Aragonés Sanz, N, Pollán, M, López-Abente, G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Madrid: Instituto Carlos III; 2009.
115. Soley, MH, Lindsay, S, Dailey, ME. The clinical significance of a solitary nodule in the thyroid gland. Western journal of surgery, obstetrics, and gynecology. 1948;56(2):96-104.
116. Meza, R, Chang, JT. Multistage carcinogenesis and the incidence of thyroid cancer in the US by sex, race, stage and histology. BMC public health. 2015;15(1):789.
117. Alexander, EK. The Evaluation and Management of Thyroid Nodules. In: Randolph, GW, editor. Surgery of the thyroid and parathyroid glands. Second ed. Philadelphia: Elsevier. Saunders; 2013. p. 275-89.
118. Boelaert, K, Horacek, J, Holder, RL, Watkinson, JC, Sheppard, MC, Franklyn, JA. Serum thyrotropin concentration as a novel predictor of malignancy in

- thyroid nodules investigated by fine-needle aspiration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(11):4295-301.
119. Schonfeld, SJ, Lee, C, Berrington de Gonzalez, A. Medical exposure to radiation and thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011;23(4):244-50.
120. Tumours of the thyroid and parathyroid In: DeLellis, R, Lloid, R, Heitz, P, Eng, C, editors. *Pathology and Genetics Tumours of Endocrine Organs (IARC/WHO classification on tumours)*. World Health Organization Classification of Tumours. 8. Third ed. Lyon: IARC Press; 2004. p. 320.
121. Ron, E. Cancer risks from medical radiation. *Health physics*. 2003;85(1):47-59.
122. Imaizumi, M, Ohishi, W, Nakashima, E, Sera, N, Neriishi, K, Yamada, M, *et al*. Association of radiation dose with prevalence of thyroid nodules among atomic bomb survivors exposed in childhood (2007-2011). *JAMA Intern Med*. 2015;175(2):228-36.
123. Tronko, M, Mabuchi, K, Bogdanova, T, Hatch, M, Likhtarev, I, Bouville, A, *et al*. Thyroid cancer in Ukraine after the Chernobyl accident (in the framework of the Ukraine-US Thyroid Project). *Journal of radiological protection : official journal of the Society for Radiological Protection*. 2012;32(1):N65-9.
124. Kondo, T, Ezzat, S, Asa, SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(4):292-306.
125. Hurley, JR. Thyroid physiology and thyroid function testing. In: Randolph, GW, editor. *Surgery of the thyroid and parathyroid glands*. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 23-41.
126. Haymart, MR, Repplinger, DJ, Levenson, GE, Elson, DF, Sippel, RS, Jaume, JC, *et al*. Higher serum thyroid stimulating hormone level in thyroid nodule patients is associated with greater risks of differentiated thyroid cancer and advanced tumor stage. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(3):809-14.
127. McLeod, DS, Watters, KF, Carpenter, AD, Ladenson, PW, Cooper, DS, Ding, EL. Thyrotropin and thyroid cancer diagnosis: a systematic review and dose-response meta-analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(8):2682-92.
128. Rinaldi, S, Plummer, M, Biessy, C, Tsilidis, KK, Ostergaard, JN, Overvad, K, *et al*. Thyroid-stimulating hormone, thyroglobulin, and thyroid hormones and risk of differentiated thyroid carcinoma: the EPIC study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(6):dju097.
129. Gudmundsson, J, Sulem, P, Gudbjartsson, DF, Jonasson, JG, Masson, G, He, H, *et al*. Discovery of common variants associated with low TSH levels and thyroid cancer risk. *Nature genetics*. 2012;44(3):319-22.
130. Romei, C, Fugazzola, L, Puxeddu, E, Frasca, F, Viola, D, Muzza, M, *et al*. Modifications in the papillary thyroid cancer gene profile over the last 15 years. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(9):E1758-65.
131. Jung, CK, Little, MP, Lubin, JH, Brenner, AV, Wells, SA, Jr., Sigurdson, AJ, *et al*. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(2):E276-85.
132. Zamora-Ros, R, Rinaldi, S, Tsilidis, KK, Weiderpass, E, Boutron-Ruault, MC, Rostgaard-Hansen, AL, *et al*. Energy and macronutrient intake and risk of differentiated thyroid carcinoma in the European Prospective Investigation into

- Cancer and Nutrition study. International journal of cancer Journal international du cancer. 2015.
133. Cotran, RS, Kumar, V, Robbins, SL. Glándula tiroides. In: Cotran, RS, Kumar, V, Robbins, SL, editors. Patología estructural y funcional. II. 4.^a ed. Madrid: McGraw-Hill - Interamericana; 1990. p. 1275-305.
 134. 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.
 135. Volante, M, Collini, P, Nikiforov, YE, Sakamoto, A, Kakudo, K, Kato, R, *et al*. Poorly differentiated thyroid carcinoma: the Turin proposal for the use of uniform diagnostic criteria and an algorithmic diagnostic approach. *The American journal of surgical pathology*. 2007;31(8):1256-64.
 136. Hundahl, SA. Perspective: National Cancer Institute summary report about estimated exposures and thyroid doses received from iodine 131 in fallout after Nevada atmospheric nuclear bomb tests. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1998;48(5):285-98.
 137. 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 7-8.
 138. 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.
 139. Sherman, SI, Brierley, JD, Sperling, M, Ain, KB, Bigos, ST, Cooper, DS, *et al*. Prospective Multicenter Study of Thyroid Carcinoma Treatment Initial Analysis of Staging and Outcome. *Cancer*. 1998;83:1012-21.
 140. Kim, SJ, Myong, JP, Suh, H, Lee, KE, Youn, YK. Optimal Cutoff Age for Predicting Mortality Associated with Differentiated Thyroid Cancer. *PloS one*. 2015;10(6):e0130848.
 141. Krook, KA, Fedewa, SA, Chen, AY. Prognostic indicators in well-differentiated thyroid carcinoma when controlling for stage and treatment. *The Laryngoscope*. 2015;125(4):1021-7.
 142. Nilubol, N, Kebebew, E. Should small papillary thyroid cancer be observed? A population-based study. *Cancer*. 2015;121(7):1017-24.
 143. Tran Cao, HS, Johnston, LE, Chang, DC, Bouvet, M. A critical analysis of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for differentiated thyroid carcinoma in young patients on the basis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry. *Surgery*. 2012.
 144. Papaleontiou, M, Haymart, MR. New insights in risk stratification of differentiated thyroid cancer. *Current opinion in oncology*. 2014;26(1):1-7.
 145. Byar, DP, Green, SB, Dor, P, Williams, ED, Colon, J, van Gilse, HA, *et al*. 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.
 146. Cady, B, Rossi, R. An expanded view of risk-group definition in differentiated thyroid carcinoma. *Surgery*. 1988;104(6):947-53.
 147. DeGroot, LJ, Kaplan, EL, McCormick, M, Straus, FH. Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1990;71(2):414-24.
 148. 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.
149. Akslen, LA. Prognostic importance of histologic grading in papillary thyroid carcinoma. *Cancer*. 1993;72(9):2680-5.
150. Mazzaferri, EL, Jhiang, SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *The American journal of medicine*. 1994;97(5):418-28.
151. Shaha, AR, Loree, TR, Shah, JP. Intermediate-risk group for differentiated carcinoma of thyroid. *Surgery*. 1994;116(6):1036-40; discussion 40-1.
152. Noguchi, S, Murakami, N, Kawamoto, H. Classification of papillary cancer of the thyroid based on prognosis. *World J Surg*. 1994;18(4):552-7; discussion 8.
153. Thyroid. In: Edge, SB, Byrd, DR, Compton, CC, Fritz, AG, Greene, FL, Trotti, A, editors. *AJCC Cancer Staging Manual*. New York, NY: Springer; 2010. p. 87-96.
154. Lee, J, Rhee, Y, Lee, S, Ahn, CW, Cha, BS, Kim, KR, *et al*. Frequent, aggressive behaviors of thyroid microcarcinomas in korean patients. *Endocrine journal*. 2006;53(5):627-32.
155. Noguchi, S, Yamashita, H, Uchino, S, Watanabe, S. Papillary microcarcinoma. *World J Surg*. 2008;32(5):747-53.
156. Miccoli, P, Minuto, MN, Ugolini, C, Panicucci, E, Berti, P, Massi, M, *et al*. Intrathyroidal differentiated thyroid carcinoma: tumor size-based surgical concepts. *World J Surg*. 2007;31(5):888-94.
157. Zeiger, MA. Evolution in the surgical management of well-differentiated thyroid cancer or not: to dissect or not dissect the central lymph node compartment. *Journal of surgical oncology*. 2010;101(2):101-2.
158. Gomez Saez, JM. [Taking of position in relationship to the protocol of the current treatment of thyroid nodules and differentiated thyroid cancer]. *Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutricion*. 2010;57(8):370-5.
159. Pacini, F, Castagna, MG, Brilli, L, Pentheroudakis, G. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21 Suppl 5:v214-9.
160. Larrad Jiménez, A. Carcinoma diferenciado de tiroides. In: Sitges-Serra, A, Sancho Insenser, J, editors. *Cirugía Endocrina. Guías clínicas de la Asociación Española de Cirujanos*. 2ª ed. Madrid: Arán; 2009. p. 27-44.
161. Dralle, H, Musholt, TJ, Schabram, J, Steinmuller, T, Frilling, A, Simon, D, *et al*. German Association of Endocrine Surgeons practice guideline for the surgical management of malignant thyroid tumors. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. 2013;398(3):347-75.
162. Shammas, AD, B.; Mountz, J. M.; Mc Cook, B. M.; Branstetter, B.; Bencherif, B. *et al*. 18F-FDG PET/CT in patients with suspected recurrent or metastatic well-differentiated thyroid cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2007;48:221-6.
163. Smeds, S, Heldin, NE. Growth factor, thyroid hyperplasia, and neoplasia. In: Clark, OH, Dhu, QY, Kebebew, E, editors. *Textbook of Endocrine Surgery*. 2ª ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 256-64.
164. Salabe, GB. Pathogenesis of thyroid nodules: histological classification? *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2001;55(1):39-53.

165. Kebebew, E. Thyroid oncogenesis. In: Clark, OH, Dhu, QY, Kebebew, E, editors. Textbook of Endocrine Surgery. 2^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 288-94.
166. Álvarez F, MJ, Matías X y el Grupo de Estudio de Marcadores Tumorales de Neoplasias Tiroideas del Hospital de Sant Pau. Carcinoma tiroideo del epitelio folicular: marcadores tumorales y oncogenes. Med Clin. 2003;264-9.
167. Tezelman, ST, Siperstein, AE. Signal transduction in thyroid neoplasms. In: Clark, OH, Dhu, QY, Kebebew, E, editors. Textbook of Endocrine Surgery. 2^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 265-79.
168. Goretzki, PE, Gorelev, V, Simon, D, Roehrer, HD. Oncogenes in thyroid tumors. In: Clark, OH, Dhu, QY, Kebebew, E, editors. Textbook of Endocrine Surgery. 2^a ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p. 280-7.
169. Singer, PA. Hiperthyroidism: toxic nodular goiter and Grave's disease. In: Randolph, GW, editor. Surgery of the thyroid and parathyroid glands. Philadelphia: Saunders; 2003. p. 109-22.
170. Omur, O, Baran, Y. An update on molecular biology of thyroid cancers. Critical reviews in oncology/hematology. 2014;90(3):233-52.
171. Xing, M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. Nature reviews Cancer. 2013;13(3):184-99.
172. Zafon, C, Obiols, G. [The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in papillary thyroid cancer. From the molecular bases to clinical practice]. Endocrinología y nutrición : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinología y Nutrición. 2009;56(4):176-86.
173. Nikiforova, MN, Nikiforov, YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2009;19(12):1351-61.
174. Yip, L. Molecular markers for thyroid cancer diagnosis, prognosis, and targeted therapy. Journal of surgical oncology. 2015;111(1):43-50.
175. Valderrabano, P, Zota, VE, McIver, B, Coppola, D, Leon, ME. Molecular Assays in Cytopathology for Thyroid Cancer. Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center. 2015;22(2):152-7.
176. Sobrinho-Simoes, M, Maximo, V, Rocha, AS, Trovisco, V, Castro, P, Preto, A, *et al.* Intragenic mutations in thyroid cancer. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2008;37(2):333-62, viii.
177. Radkay, LA, Chiosea, SI, Seethala, RR, Hodak, SP, LeBeau, SO, Yip, L, *et al.* Thyroid nodules with KRAS mutations are different from nodules with NRAS and HRAS mutations with regard to cytopathologic and histopathologic outcome characteristics. Cancer cytopathology. 2014;122(12):873-82.
178. Nikiforova, MN, Lynch, RA, Biddinger, PW, Alexander, EK, Dorn, GW, 2nd, Tallini, G, *et al.* RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2003;88(5):2318-26.
179. Gupta, N, Dasyam, AK, Carty, SE, Nikiforova, MN, Otori, NP, Armstrong, M, *et al.* RAS mutations in thyroid FNA specimens are highly predictive of predominantly low-risk follicular-pattern cancers. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2013;98(5):E914-22.
180. Vriens, MR, Schreinemakers, JM, Suh, I, Guerrero, MA, Clark, OH. Diagnostic markers and prognostic factors in thyroid cancer. Future Oncol. 2009;5(8):1283-93.

181. Espinosa, AVP, L.; Ringel, M. D. Targeting BRAF in thyroid cancer. . British journal of cancer. 2007;96:16-20.
182. Zhou, Y, Zhao, C, Gery, S, Braunstein, GD, Okamoto, R, Alvarez, R, *et al.* Off-target effects of c-MET inhibitors on thyroid cancer cells. Molecular cancer therapeutics. 2014;13(1):134-43.
183. Siraj, AK, Bavi, P, Abubaker, J, Jehan, Z, Sultana, M, Al-Dayel, F, *et al.* Genome-wide expression analysis of Middle Eastern papillary thyroid cancer reveals c-MET as a novel target for cancer therapy. The Journal of pathology. 2007;213(2):190-9.
184. Greco, A, Miranda, C, Pierotti, MA. Rearrangements of NTRK1 gene in papillary thyroid carcinoma. Molecular and cellular endocrinology. 2010;321(1):44-9.
185. Zhu, X, Zhu, YJ, Kim, DW, Meltzer, P, Cheng, SY. Activation of integrin-ERBB2 signaling in undifferentiated thyroid cancer. American journal of cancer research. 2014;4(6):776-88.
186. Lacroix, L, Lazar, V, Michiels, S, Ripoche, H, Dessen, P, Talbot, M, *et al.* Follicular thyroid tumors with the PAX8-PPARgamma1 rearrangement display characteristic genetic alterations. The American journal of pathology. 2005;167(1):223-31.
187. Boos, LA, Dettmer, M, Schmitt, A, Rudolph, T, Steinert, H, Moch, H, *et al.* Diagnostic and prognostic implications of the PAX8-PPARgamma translocation in thyroid carcinomas-a TMA-based study of 226 cases. Histopathology. 2013;63(2):234-41.
188. Armstrong, MJ, Yang, H, Yip, L, Ohori, NP, McCoy, KL, Stang, MT, *et al.* PAX8/PPARgamma rearrangement in thyroid nodules predicts follicular-pattern carcinomas, in particular the encapsulated follicular variant of papillary carcinoma. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2014;24(9):1369-74.
189. Klemke, M, Drieschner, N, Belge, G, Burchardt, K, Junker, K, Bullerdiek, J. Detection of PAX8-PPARG fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR. Genes, chromosomes & cancer. 2012;51(4):402-8.
190. Klemke, M, Drieschner, N, Laabs, A, Rippe, V, Belge, G, Bullerdiek, J, *et al.* On the prevalence of the PAX8-PPARG fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid. Cancer genetics. 2011;204(6):334-9.
191. Hibi, Y, Nagaya, T, Kambe, F, Imai, T, Funahashi, H, Nakao, A, *et al.* Is thyroid follicular cancer in Japanese caused by a specific t(2; 3)(q13; p25) translocation generating Pax8-PPAR gamma fusion mRNA? Endocrine journal. 2004;51(3):361-6.
192. Mochizuki, K, Kondo, T, Oishi, N, Tahara, I, Inoue, T, Kasai, K, *et al.* Low frequency of PAX8-PPARgamma rearrangement in follicular thyroid carcinomas in Japanese patients. Pathology international. 2015;65(5):250-3.
193. Jeong, SH, Hong, HS, Kwak, JJ, Lee, EH. Analysis of RAS mutation and PAX8/PPARgamma rearrangements in follicular-derived thyroid neoplasms in a Korean population: frequency and ultrasound findings. Journal of endocrinological investigation. 2015;38(8):849-57.
194. Cañadas Garre, M, Muñoz Pérez, N, Villar del Moral, J, Ferrón Orihuela, JA, Llamas Elvira, JM. Biomarkers in diagnosis of papillary thyroid carcinoma. 2014. In: Cancer Biomarkers Minimal and Noninvasive Early Diagnosis and

- Prognosis [Internet]. Boca Ratón, FL, USA: CRC Press; [679-750]. Available from: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/b16389-33>.
195. Xing, M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev.* 2007;28(7):742-62.
 196. 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 research.* 2003;63(7):1454-7.
 197. Cohen, Y, Xing, M, Mambo, E, Guo, Z, Wu, G, Trink, B, *et al.* BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003;95(8):625-7.
 198. Cañadas Garre, M. Diagnóstico preoperatorio de carcinoma papilar de tiroides mediante la determinación de la mutación BRAFT1799A en citologías de tiroides obtenidas mediante punción y aspiración con aguja fina (PAAF). Granada: Granada; 2010.
 199. Elisei, R, Ugolini, C, Viola, D, Lupi, C, Biagini, A, Giannini, R, *et al.* BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008;93(10):3943-9.
 200. Miccoli, P, Basolo, F. BRAF mutation status in papillary thyroid carcinoma: significance for surgical strategy. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie.* 2014;399(2):225-8.
 201. Schulten, HJ, Salama, S, Al-Mansouri, Z, Alotibi, R, Al-Ghamdi, K, Al-Hamour, OA, *et al.* BRAF mutations in thyroid tumors from an ethnically diverse group. *Hereditary cancer in clinical practice.* 2012;10(1):10.
 202. Romei, C, Ciampi, R, Faviana, P, Agate, L, Molinaro, E, Bottici, V, *et al.* BRAFV600E mutation, but not RET/PTC rearrangements, is correlated with a lower expression of both thyroperoxidase and sodium iodide symporter genes in papillary thyroid cancer. *Endocrine-related cancer.* 2008;15(2):511-20.
 203. Durante, C, Puxeddu, E, Ferretti, E, Morisi, R, Moretti, S, Bruno, R, *et al.* BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2007;92(7):2840-3.
 204. Schulten, HJ, Alotibi, R, Al-Ahmadi, A, Ata, M, Karim, S, Huwait, E, *et al.* Effect of BRAF mutational status on expression profiles in conventional papillary thyroid carcinomas. *BMC genomics.* 2015;16 Suppl 1:S6.
 205. Grabellus, F, Worm, K, Schmid, KW, Sheu, SY. The BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma is associated with glucose transporter 1 overexpression. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2012;22(4):377-82.
 206. Pita, JM, Figueiredo, IF, Moura, MM, Leite, V, Cavaco, BM. Cell cycle deregulation and TP53 and RAS mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2014;99(3):E497-507.
 207. Marcello, MA, Morari, EC, Cunha, LL, De Nadai Silva, AC, Carraro, DM, Carvalho, AL, *et al.* P53 and expression of immunological markers may identify early stage thyroid tumors. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:846584.
 208. Wreesmann, VB, Ghossein, RA, Patel, SG, Harris, CP, Schnaser, EA, Shaha, AR, *et al.* Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *The American journal of pathology.* 2002;161(5):1549-56.

209. Nikiforova, MN, Wald, AI, Roy, S, Durso, MB, Nikiforov, YE. Targeted next-generation sequencing panel (ThyroSeq) for detection of mutations in thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(11):E1852-60.
210. Krause, K, Prawitt, S, Eszlinger, M, Ihling, C, Sinz, A, Schierle, K, *et al*. Dissecting molecular events in thyroid neoplasia provides evidence for distinct evolution of follicular thyroid adenoma and carcinoma. *The American journal of pathology*. 2011;179(6):3066-74.
211. Thomas, D, Friedman, S, Lin, RY. Thyroid stem cells: lessons from normal development and thyroid cancer. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(1):51-8.
212. Gao, YJ, Li, B, Wu, XY, Cui, J, Han, JK. Thyroid tumor-initiating cells: increasing evidence and opportunities for anticancer therapy (review). *Oncology reports*. 2014;31(3):1035-42.
213. Kondo, T, Asa, SL, Ezzat, S. Epigenetic dysregulation in thyroid neoplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2008;37(2):389-400, ix.
214. Faam, B, Ghaffari, MA, Ghadiri, A, Azizi, F. Epigenetic modifications in human thyroid cancer. *Biomed Rep*. 2015;3(1):3-8.
215. Suh, I, Kebebew, E. The biology of thyroid oncogenesis. In: Sturgeon, C, editor. *Endocrine Neoplasia. Cancer treatment and research*. 1^a ed ed. New York: Springer; 2010.
216. Hu, S, Ewertz, M, Tufano, RP, Brait, M, Carvalho, AL, Liu, D, *et al*. Detection of serum deoxyribonucleic acid methylation markers: a novel diagnostic tool for thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(1):98-104.
217. Kondo, T, Nakazawa, T, Ma, D, Niu, D, Mochizuki, K, Kawasaki, T, *et al*. Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2009;89(7):791-9.
218. Rodriguez-Rodero, S, Fernandez, AF, Fernandez-Morera, JL, Castro-Santos, P, Bayon, GF, Ferrero, C, *et al*. DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(7):2811-21.
219. Nikiforova, MN, Chiosea, SI, Nikiforov, YE. MicroRNA expression profiles in thyroid tumors. *Endocrine pathology*. 2009;20(2):85-91.
220. Braun, J, Huttelmaier, S. Pathogenic mechanisms of deregulated microRNA expression in thyroid carcinomas of follicular origin. *Thyroid research*. 2011;4 Suppl 1:S1.
221. Braun, J, Hoang-Vu, C, Dralle, H, Huttelmaier, S. Downregulation of microRNAs directs the EMT and invasive potential of anaplastic thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2010;29(29):4237-44.
222. Lee, JC, Gundara, JS, Glover, A, Serpell, J, Sidhu, SB. MicroRNA expression profiles in the management of papillary thyroid cancer. *The oncologist*. 2014;19(11):1141-7.
223. Labourier, E, Shifrin, A, Busseniers, AE, Lupo, MA, Manganelli, ML, Andruss, B, *et al*. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(7):2743-50.

224. Carpi, A, Mechanick, JI, Saussez, S, Nicolini, A. Thyroid tumor marker genomics and proteomics: diagnostic and clinical implications. *Journal of cellular physiology*. 2010;224(3):612-9.
225. Deja, S, Dawiskiba, T, Balcerzak, W, Orczyk-Pawilowicz, M, Glod, M, Pawelka, D, *et al*. Follicular adenomas exhibit a unique metabolic profile. (1)H NMR studies of thyroid lesions. *PLoS one*. 2013;8(12):e84637.
226. Wojakowska, A, Chekan, M, Widlak, P, Pietrowska, M. Application of metabolomics in thyroid cancer research. *International journal of endocrinology*. 2015;2015:258763.
227. Beaudenon-Huibregtse, S, Alexander, EK, Guttler, RB, Hershman, JM, Babu, V, Blevins, TC, *et al*. Centralized molecular testing for oncogenic gene mutations complements the local cytopathologic diagnosis of thyroid nodules. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24(10):1479-87.
228. Ferraz, C, Eszlinger, M, Paschke, R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(7):2016-26.
229. Nikiforov, YE, Steward, DL, Robinson-Smith, TM, Haugen, BR, Klopper, JP, Zhu, Z, *et al*. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(6):2092-8.
230. Moses, W, Weng, J, Sansano, I, Peng, M, Khanafshar, E, Ljung, BM, *et al*. Molecular testing for somatic mutations improves the accuracy of thyroid fine-needle aspiration biopsy. *World J Surg*. 2010;34(11):2589-94.
231. Ohori, NP, Nikiforova, MN, Schoedel, KE, LeBeau, SO, Hodak, SP, Seethala, RR, *et al*. Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of "follicular lesion of undetermined significance/atypia of undetermined significance". *Cancer cytopathology*. 2010;118(1):17-23.
232. Cantara, S, Capezzone, M, Marchisotta, S, Capuano, S, Busonero, G, Toti, P, *et al*. Impact of proto-oncogene mutation detection in cytological specimens from thyroid nodules improves the diagnostic accuracy of cytology. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(3):1365-9.
233. Nikiforov, YE, Ohori, NP, Hodak, SP, Carty, SE, LeBeau, SO, Ferris, RL, *et al*. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(11):3390-7.
234. Eszlinger, M, Krogdahl, A, Munz, S, Rehfeld, C, Precht Jensen, EM, Ferraz, C, *et al*. Impact of molecular screening for point mutations and rearrangements in routine air-dried fine-needle aspiration samples of thyroid nodules. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24(2):305-13.
235. Parangi, S, Suh, H. The role of genetic markers in the evaluation and management of thyroid nodules. *The Surgical clinics of North America*. 2014;94(3):515-28.
236. Nikiforov, YE, Carty, SE, Chiosea, SI, Coyne, C, Duvvuri, U, Ferris, RL, *et al*. Highly accurate diagnosis of cancer in thyroid nodules with follicular neoplasm/suspicious for a follicular neoplasm cytology by ThyroSeq v2 next-generation sequencing assay. *Cancer*. 2014;120(23):3627-34.
237. Sykorova, V, Dvorakova, S, Vcelak, J, Vaclavikova, E, Halkova, T, Kodetova, D, *et al*. Search for new genetic biomarkers in poorly differentiated and

- anaplastic thyroid carcinomas using next generation sequencing. *Anticancer research*. 2015;35(4):2029-36.
238. Le Mercier, M, D'Haene, N, De Neve, N, Blanchard, O, Degand, C, Rorive, S, *et al*. Next-generation sequencing improves the diagnosis of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology. *Histopathology*. 2015;66(2):215-24.
239. Faggiano, A, Caillou, B, Lacroix, L, Talbot, M, Filetti, S, Bidart, JM, *et al*. Functional characterization of human thyroid tissue with immunohistochemistry. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2007;17(3):203-11.
240. Wiseman, SM, Melck, A, Masoudi, H, Ghaidi, F, Goldstein, L, Gown, A, *et al*. Molecular phenotyping of thyroid tumors identifies a marker panel for differentiated thyroid cancer diagnosis. *Annals of surgical oncology*. 2008;15(10):2811-26.
241. de Matos, PS, Ferreira, AP, de Oliveira Facuri, F, Assumpcao, LV, Metze, K, Ward, LS. Usefulness of HBME-1, cytokeratin 19 and galectin-3 immunostaining in the diagnosis of thyroid malignancy. *Histopathology*. 2005;47(4):391-401.
242. Park, YJ, Kwak, SH, Kim, DC, Kim, H, Choe, G, Park do, J, *et al*. Diagnostic value of galectin-3, HBME-1, cytokeratin 19, high molecular weight cytokeratin, cyclin D1 and p27(kip1) in the differential diagnosis of thyroid nodules. *Journal of Korean medical science*. 2007;22(4):621-8.
243. Prasad, ML, Pellegata, NS, Huang, Y, Nagaraja, HN, de la Chapelle, A, Kloos, RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(1):48-57.
244. Zafon, C, Obiols, G, Castellvi, J, Ramon y Cajal, S, Baena, JA, Mesa, J. Expression of p21cip1, p27kip1, and p16INK4a cyclin-dependent kinase inhibitors in papillary thyroid carcinoma: correlation with clinicopathological factors. *Endocrine pathology*. 2008;19(3):184-9.
245. Rodrigues, HG, de Pontes, AA, Adan, LF. Use of molecular markers in samples obtained from preoperative aspiration of thyroid. *Endocrine journal*. 2012;59(5):417-24.
246. Weinberger, PM, Adam, BL, Gourin, CG, Moretz, WH, 3rd, Bollag, RJ, Wang, BY, *et al*. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2007;133(5):503-10.
247. Liu, H, Lin, F. Application of immunohistochemistry in thyroid pathology. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2015;139(1):67-82.
248. de Matos, LL, Del Giglio, AB, Matsubayashi, CO, de Lima Farah, M, Del Giglio, A, da Silva Pinhal, MA. Expression of CK-19, galectin-3 and HBME-1 in the differentiation of thyroid lesions: systematic review and diagnostic meta-analysis. *Diagnostic pathology*. 2012;7:97.
249. Wilkins, MR, Pasquali, C, Appel, RD, Ou, K, Golaz, O, Sanchez, JC, *et al*. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. 1996;14(1):61-5.
250. de Hoog, CL, Mann, M. Proteomics. *Annual review of genomics and human genetics*. 2004;5:267-93.

251. Krause, K, Jessnitzer, B, Fuhrer, D. Proteomics in thyroid tumor research. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(8):2717-24.
252. Srisomsap, C, Subhasitanont, P, Otto, A, Mueller, EC, Punyarit, P, Wittmann-Liebold, B, *et al.* Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*. 2002;2(6):706-12.
253. Torres-Cabala, C, Panizo-Santos, A, Krutzsch, HC, Barazi, H, Namba, M, Sakaguchi, M, *et al.* Differential expression of S100C in thyroid lesions. *International journal of surgical pathology*. 2004;12(2):107-15.
254. Brown, LM, Helmke, SM, Hunsucker, SW, Netea-Maier, RT, Chiang, SA, Heinz, DE, *et al.* Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Molecular carcinogenesis*. 2006;45(8):613-26.
255. Torres-Cabala, C, Bibbo, M, Panizo-Santos, A, Barazi, H, Krutzsch, H, Roberts, DD, *et al.* Proteomic identification of new biomarkers and application in thyroid cytology. *Acta cytologica*. 2006;50(5):518-28.
256. Braunschweig, T, Kaserer, K, Chung, JY, Bilke, S, Krizman, D, Knezevic, V, *et al.* Proteomic expression profiling of thyroid neoplasms. *Proteomics Clinical applications*. 2007;1(3):264-71.
257. Giusti, L, Iacconi, P, Ciregia, F, Giannaccini, G, Donatini, GL, Basolo, F, *et al.* Fine-needle aspiration of thyroid nodules: proteomic analysis to identify cancer biomarkers. *Journal of proteome research*. 2008;7(9):4079-88.
258. Netea-Maier, RT, Hunsucker, SW, Hoevenaars, BM, Helmke, SM, Slootweg, PJ, Hermus, AR, *et al.* Discovery and validation of protein abundance differences between follicular thyroid neoplasms. *Cancer research*. 2008;68(5):1572-80.
259. Sofiadis, A, Dinets, A, Orre, LM, Branca, RM, Juhlin, CC, Foukakis, T, *et al.* Proteomic study of thyroid tumors reveals frequent up-regulation of the Ca²⁺ - binding protein S100A6 in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2010;20(10):1067-76.
260. Kashat, L, So, AK, Masui, O, Wang, XS, Cao, J, Meng, X, *et al.* Secretome-based identification and characterization of potential biomarkers in thyroid cancer. *Journal of proteome research*. 2010;9(11):5757-69.
261. Sofiadis, A, Becker, S, Hellman, U, Hultin-Rosenberg, L, Dinets, A, Hulchiy, M, *et al.* Proteomic profiling of follicular and papillary thyroid tumors. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2012;166(4):657-67.
262. Damante, G, Scalonì, A, Tell, G. Thyroid tumors: novel insights from proteomic studies. *Expert review of proteomics*. 2009;6(4):363-76.
263. Milas, M, Shin, J, Gupta, M, Novosel, T, Nasr, C, Brainard, J, *et al.* Circulating thyrotropin receptor mRNA as a novel marker of thyroid cancer: clinical applications learned from 1,758 samples. *Annals of surgery*. 2010;252(4):643-51.
264. Mon, SY, Hodak, SP. Molecular diagnostics for thyroid nodules: the current state of affairs. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2014;43(2):345-65.
265. Ditkoff, BA, Marvin, MR, Yemul, S, Shi, YJ, Chabot, J, Feind, C, *et al.* Detection of circulating thyroid cells in peripheral blood. *Surgery*. 1996;120(6):959-64; discussion 64-5.

266. Ringel, MD. Molecular detection of thyroid cancer: differentiating "signal" and "noise" in clinical assays. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(1):29-32.
267. Kaufmann, S, Schmutzler, C, Schomburg, L, Korber, C, Luster, M, Rendl, J, *et al*. Real time RT-PCR analysis of thyroglobulin mRNA in peripheral blood in patients with congenital athyreosis and with differentiated thyroid carcinoma after stimulation with recombinant human thyrotropin. *Endocrine regulations*. 2004;38(2):41-9.
268. Villanueva, J, Martorella, AJ, Lawlor, K, Philip, J, Fleisher, M, Robbins, RJ, *et al*. Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2006;5(10):1840-52.
269. Moretz, WH, 3rd, Gourin, CG, Terris, DJ, Xia, ZS, Liu, Z, Weinberger, PM, *et al*. Detection of papillary thyroid carcinoma with serum protein profile analysis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2008;134(2):198-202.
270. Linkov, F, Ferris, RL, Yurkovetsky, Z, Marrangoni, A, Velikokhatnaya, L, Gooding, W, *et al*. Multiplex analysis of cytokines as biomarkers that differentiate benign and malignant thyroid diseases. *Proteomics Clinical applications*. 2008;2(12):1575-85.
271. Wang, JX, Yu, JK, Wang, L, Liu, QL, Zhang, J, Zheng, S. Application of serum protein fingerprint in diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Proteomics*. 2006;6(19):5344-9.
272. Xu, YH, Wang, WJ, Song, HJ, Qiu, ZL, Luo, QY. Serum differential proteomics analysis between papillary thyroid cancer patients with 131I-avid and those with non-131I-avid lung metastases. *Hellenic journal of nuclear medicine*. 2011;14(3):228-33.
273. Yu, S, Liu, Y, Wang, J, Guo, Z, Zhang, Q, Yu, F, *et al*. Circulating microRNA profiles as potential biomarkers for diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(6):2084-92.
274. Lee, JC, Zhao, JT, Clifton-Bligh, RJ, Gill, A, Gundara, JS, Ip, JC, *et al*. MicroRNA-222 and microRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer*. 2013;119(24):4358-65.
275. Desmetz, C, Cortijo, C, Mange, A, Solassol, J. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. *Journal of proteomics*. 2009;72(6):982-8.
276. Sahin, U, Tureci, O. Antigen identification using SEREX. *Methods Mol Biol*. 2013;1061:59-77.
277. Vitale, M. SEREX: a promising approach for identification of thyroid cancer serological biomarkers. *Clinical endocrinology*. 2013;79(1):12-3.
278. Izawa, S, Okamura, T, Matsuzawa, K, Ohkura, T, Ohkura, H, Ishiguro, K, *et al*. Autoantibody against WD repeat domain 1 is a novel serological biomarker for screening of thyroid neoplasia. *Clinical endocrinology*. 2013;79(1):35-42.
279. Dalle Carbonare, L, Frigo, A, Francia, G, Davi, MV, Donatelli, L, Stranieri, C, *et al*. Runx2 mRNA expression in the tissue, serum, and circulating non-hematopoietic cells of patients with thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97(7):E1249-56.
280. Saussez, S, Glinoe, D, Chantrain, G, Pattou, F, Carnaille, B, Andre, S, *et al*. Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2008;18(7):705-12.

281. Makki, FM, Taylor, SM, Shahnava, A, Leslie, A, Gallant, J, Douglas, S, *et al.* Serum biomarkers of papillary thyroid cancer. *Journal of otolaryngology - head & neck surgery = Le Journal d'oto-rhino-laryngologie et de chirurgie cervico-faciale.* 2013;42:16-25.
282. Ngeow, J, He, X, Mester, JL, Lei, J, Romigh, T, Orloff, MS, *et al.* Utility of PTEN protein dosage in predicting for underlying germline PTEN mutations among patients presenting with thyroid cancer and Cowden-like phenotypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2012;97(12):E2320-7.
283. Hunt, JLY, J. H.; Tometsko, M.; Filkenstein, S. D.; Swalsky, P.; Carty, S. E. Loss of heterozygosity of the VHL gene identifies malignancy and predicts death in follicular thyroid tumors. *Surgery.* 2003;2003:1043-8.
284. Godballe, CA, P.; Järgensen, K. E.; Bastholt, L.; Clausen, P. P.; Hansen, T. P. *et al.* Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinomas: p53 expression is a significant indicator of prognosis. *The Laryngoscope.* 1998;108:243-9.
285. Nilubol, N, Boufraquech, M, Zhang, L, Kebebew, E. Loss of CPSF2 expression is associated with increased thyroid cancer cellular invasion and cancer stem cell population, and more aggressive disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2014;99(7):E1173-82.
286. So, AK, Kaur, J, Kak, I, Assi, J, MacMillan, C, Ralhan, R, *et al.* Biotinidase is a novel marker for papillary thyroid cancer aggressiveness. *PloS one.* 2012;7(7):e40956.
287. Xing, Y, Luo, DY, Long, MY, Zeng, SL, Li, HH. High ALDH1A1 expression correlates with poor survival in papillary thyroid carcinoma. *World journal of surgical oncology.* 2014;12:29-34.
288. Kebebew, E, Peng, M, Reiff, E, McMillan, A. Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms. *Cancer.* 2006;106(12):2592-7.
289. 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;138(6):1102-9; discussion 9-10.
290. Kebebew, EP, M.; Reiff, E.; Duh, Q. Y.; Clark, O. H.; Mc Millan, A. ECM1 and Tmprss4 are diagnostic markers of malignant thyroid neoplasms and improve the accuracy of fine needle aspiration biopsy. *Annals of surgery.* 2005;242(3):353-61; discussion 61-3.
291. Kebebew, EP, M.; Reiff, E.; Duh, Q. Y.; Clark, O. H.; McMillan, A. Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasm. *World J Surg* 2006;30:767-74.
292. Wang, N, Dong, CR, Jiang, R, Tang, C, Yang, L, Jiang, QF, *et al.* Overexpression of HIF-1alpha, metallothionein and SLUG is associated with high TNM stage and lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology.* 2014;7(1):322-30.
293. Lee, J, Jeong, S, Lee, CR, Ku, CR, Kang, SW, Jeong, JJ, *et al.* GLI1 transcription factor affects tumor aggressiveness in patients with papillary thyroid cancers. *Medicine.* 2015;94(25):e998.
294. Chaker, S, Kashat, L, Voisin, S, Kaur, J, Kak, I, MacMillan, C, *et al.* Secretome proteins as candidate biomarkers for aggressive thyroid carcinomas. *Proteomics.* 2013;13(5):771-87.
295. McLeod, DS, Cooper, DS, Ladenson, PW, Ain, KB, Brierley, JD, Fein, HG, *et al.* Prognosis of differentiated thyroid cancer in relation to serum thyrotropin and

- thyroglobulin antibody status at time of diagnosis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24(1):35-42.
296. Wagner, PL, Moo, TA, Arora, N, Liu, YF, Zarnegar, R, Scognamiglio, T, *et al.* The chemokine receptors CXCR4 and CCR7 are associated with tumor size and pathologic indicators of tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Annals of surgical oncology*. 2008;15(10):2833-41.
297. Wang, P, Pei, R, Lu, Z, Rao, X, Liu, B. Methylation of p16 CpG islands correlated with metastasis and aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*. 2013;76(3):135-9.
298. Pita, JM, Banito, A, Cavaco, BM, Leite, V. Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *British journal of cancer*. 2009;101(10):1782-91.
299. Foukakis, T, Gusnanto, A, Au, AY, Hoog, A, Lui, WO, Larsson, C, *et al.* A PCR-based expression signature of malignancy in follicular thyroid tumors. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(2):381-91.
300. Williams, MD, Zhang, L, Elliott, DD, Perrier, ND, Lozano, G, Clayman, GL, *et al.* Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Human pathology*. 2011;42(9):1213-20.
301. Lennard, CM, Patel, A, Wilson, J, Reinhardt, B, Tuman, C, Fenton, C, *et al.* Intensity of vascular endothelial growth factor expression is associated with increased risk of recurrence and decreased disease-free survival in papillary thyroid cancer. *Surgery*. 2001;129(5):552-8.
302. Kim, WY, Lee, JB, Kim, HY, Woo, SU, Son, GS, Bae, JW. Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2 is highly expressed in papillary thyroid microcarcinoma with cervical lymph node metastasis. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2015;11(2):443-6.
303. Wang, N, Jiang, R, Yang, JY, Tang, C, Yang, L, Xu, M, *et al.* Expression of TGF-beta1, SNAI1 and MMP-9 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *J Mol Histol*. 2014;45(4):391-9.
304. Tang, C, Yang, L, Wang, N, Li, L, Xu, M, Chen, GG, *et al.* High expression of GPER1, EGFR and CXCR1 is associated with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(6):3213-23.
305. Wiseman, SM, Griffith, OL, Gown, A, Walker, B, Jones, SJ. Immunophenotyping of thyroid tumors identifies molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic carcinoma. *American journal of surgery*. 2011;201(5):580-6.
306. Barros-Filho, MC, Marchi, FA, Pinto, CA, Rogatto, SR, Kowalski, LP. High diagnostic accuracy based on CLDN10, HMGA2, and LAMB3 transcripts in papillary thyroid carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100(6):E890-9.
307. Zhang, Y, Meng, Z, Zhang, M, Tan, J, Tian, W, He, X, *et al.* Immunohistochemical evaluation of midkine and nuclear factor-kappa B as diagnostic biomarkers for papillary thyroid cancer and synchronous metastasis. *Life sciences*. 2014;118(1):39-45.
308. Yang, AH, Chen, JY, Lee, CH, Chen, JY. Expression of NCAM and OCIAD1 in well-differentiated thyroid carcinoma: correlation with the risk of distant metastasis. *Journal of clinical pathology*. 2012;65(3):206-12.

309. Kilicarslan, ABO, M.; Arici, C.; Pestereli, H. E.; Cakir, M.; Karpuzoglu, G. Clinical importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) for papillary thyroid carcinomas. *APMIS*. 2003;111:439–4.
310. Montero-Conde, C, Martin-Campos, JM, Lerma, E, Gimenez, G, Martinez-Guitarte, JL, Combalia, N, *et al*. Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information. *Oncogene*. 2008;27(11):1554-61.
311. Kim, TH, Park, YJ, Lim, JA, Ahn, HY, Lee, EK, Lee, YJ, *et al*. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012;118(7):1764-73.
312. Riesco-Eizaguirre, G, Gutierrez-Martinez, P, Garcia-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. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(1):257-69.
313. Riesco-Eizaguirre, G, Rodriguez, I, De la Vieja, A, Costamagna, E, Carrasco, N, Nistal, M, *et al*. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer research*. 2009;69(21):8317-25.
314. Soares, P, Celestino, R, Melo, M, Fonseca, E, Sobrinho-Simoes, M. Prognostic biomarkers in thyroid cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2014;464(3):333-46.
315. Ricarte-Filho, JC, Ryder, M, Chitale, DA, Rivera, M, Heguy, A, Ladanyi, M, *et al*. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer research*. 2009;69(11):4885-93.
316. Albarel, F, Conte-Devolx, B, Oliver, C. From nodule to differentiated thyroid carcinoma: Contributions of molecular analysis in 2012. *Annales d'endocrinologie*. 2012.
317. Vinagre, J, Almeida, A, Populo, H, Batista, R, Lyra, J, Pinto, V, *et al*. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun*. 2013;4:2185.
318. Melo, M, da Rocha, AG, Vinagre, J, Batista, R, Peixoto, J, Tavares, C, *et al*. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(5):E754-65.
319. Liu, X, Bishop, J, Shan, Y, Pai, S, Liu, D, Murugan, AK, *et al*. Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(4):603-10.
320. Landa, I, Ganly, I, Chan, TA, Mitsutake, N, Matsuse, M, Ibrahimasic, T, *et al*. Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(9):E1562-6.
321. Hsiao, SJ, Nikiforov, YE. Molecular approaches to thyroid cancer diagnosis. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(5):T301-13.
322. Peng, Y, Li, C, Luo, DC, Ding, JW, Zhang, W, Pan, G. Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules*. 2014;19(8):11586-99.

323. Sondermann, A, Andreghetto, FM, Moulatlet, AC, da Silva Victor, E, de Castro, MG, Nunes, FD, *et al.* MiR-9 and miR-21 as prognostic biomarkers for recurrence in papillary thyroid cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2015;32(6):521-30.
324. He, HC, Kashat, L, Kak, I, Kunavisarut, T, Gundelach, R, Kim, D, *et al.* An Ep-ICD based index is a marker of aggressiveness and poor prognosis in thyroid carcinoma. *PloS one*. 2012;7(9):e42893.
325. Kunavisarut, T, Kak, I, Macmillan, C, Ralhan, R, Walfish, PG. Immunohistochemical analysis based Ep-ICD subcellular localization index (ESLI) is a novel marker for metastatic papillary thyroid microcarcinoma. *BMC cancer*. 2012;12:523.
326. Barrero, PR. Aplicaciones de la técnica de microarrays en ciencias biomédicas: presente y futuro. *Química Viva*. 2005;4(3):91-100.
327. Moreno, V, Sole, X. [Use of DNA chips (microarrays) in medicine: technical foundations and basic procedures for statistical analysis of results]. *Medicina clinica*. 2004;**122 Suppl 1**:73-9.
328. Bumgarner, R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013;Chapter 22:Unit 22 1.
329. López, M, Mallorquín, P, Vega, M. Microarrays y Biochips de ADN. Informe de Vigilancia Tecnológica: Fundación Española para le Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica. Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid.; 2002.
330. Eszlinger, MK, K.; Kukulska, A.; Jarzab, B.; Paschke. R. Perspectives and limitations of microarray-based gene expression profiling of thyroid tumors. *Endocr Rev* 2007;28:322-38.
331. Di Dalmazi, G, Kisker, C, Calebiro, D, Mannelli, M, Canu, L, Arnaldi, G, *et al.* Novel somatic mutations in the catalytic subunit of the protein kinase A as a cause of adrenal Cushing's syndrome: a European multicentric study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(10):E2093-100.
332. Cano Gutiérrez, C. Extracción de conocimiento de microarrays y literatura biomédica para el estudio de la regulación genética. Granada: Universidad de Granada; 2010.
333. Stears, RL, Martinsky, T, Schena, M. Trends in microarray analysis. *Nature medicine*. 2003;9(1):140-5.
334. Tusher, VG, Tibshirani, R, Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5116-21.
335. Provenzano, M, Mocellin, S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Advances in experimental medicine and biology*. 2007;593:66-73.
336. Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000;25(2):169-93.
337. Dallas, PB, Gottardo, NG, Firth, MJ, Beesley, AH, Hoffmann, K, Terry, PA, *et al.* Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate? *BMC genomics*. 2005;6:59.
338. Rajeevan, MS, Vernon, SD, Taysavang, N, Unger, ER. Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2001;3(1):26-31.

339. Arikawa, E, Sun, Y, Wang, J, Zhou, Q, Ning, B, Dial, SL, *et al.* Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC genomics*. 2008;9:328.
340. Huang, Y, Prasad, M, Lemon, WJ, Hampel, H, Wright, FA, Kornacker, K, *et al.* Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(26):15044-9.
341. Wreesmann, VB, Siczka, EM, Socci, ND, Hezel, M, Belbin, TJ, Childs, G, *et al.* Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. *Cancer research*. 2004;64(11):3780-9.
342. Zhao J, LC, Brunner, G, Gensjäger E, Heitz P U, Odermatt B. Molecular characterization of well-differentiated human thyroid carcinomas by cDNA arrays. *International journal of oncology*. 2006;29:1041-51.
343. Kim, HY, Park, WY, Lee, KE, Park, WS, Chung, YS, Cho, SJ, *et al.* Comparative analysis of gene expression profiles of papillary thyroid microcarcinoma and papillary thyroid carcinoma. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2010;6(4):452-7.
344. Soares, P, Celestino, R, Gaspar da Rocha, A, Sobrinho-Simoes, M. Papillary thyroid microcarcinoma: how to diagnose and manage this epidemic? *International journal of surgical pathology*. 2014;22(2):113-9.
345. Weber, F, Shen, L, Aldred, MA, Morrison, CD, Frilling, A, Saji, M, *et al.* Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(5):2512-21.
346. Pfeifer, A, Wojtas, B, Oczko-Wojciechowska, M, Kukulska, A, Czarniecka, A, Eszlinger, M, *et al.* Molecular differential diagnosis of follicular thyroid carcinoma and adenoma based on gene expression profiling by using formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC medical genomics*. 2013;6:38.
347. Chevillard, S, Ugolin, N, Vielh, P, Ory, K, Levalois, C, Elliott, D, *et al.* Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10(19):6586-97.
348. Cerutti, JM, Delcelo, R, Amadei, MJ, Nakabashi, C, Maciel, RM, Peterson, B, *et al.* A preoperative diagnostic test that distinguishes benign from malignant thyroid carcinoma based on gene expression. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(8):1234-42.
349. Borup, R, Rossing, M, Henao, R, Yamamoto, Y, Krogh, A, Godballe, C, *et al.* Molecular signatures of thyroid follicular neoplasia. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(3):691-708.
350. Barden, CB, Shister, KW, Zhu, B, Guiter, G, Greenblatt, DY, Zeiger, MA, *et al.* Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(5):1792-800.
351. Zhao, J, Leonard, C, Gensjäger, E, Heitz, PU, Moch, H, Odermatt, B. Differentiation of human follicular thyroid adenomas from carcinomas by gene expression profiling. *Oncology reports*. 2008;19(2):329-37.
352. Giordano, TJ, Kuick, R, Thomas, DG, Misek, DE, Vinco, M, Sanders, D, *et al.* 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.
353. Taniguchi, K, Takano, T, Miyauchi, A, Koizumi, K, Ito, Y, Takamura, Y, *et al.* Differentiation of follicular thyroid adenoma from carcinoma by means of gene expression profiling with adapter-tagged competitive polymerase chain reaction. *Oncology*. 2005;69(5):428-35.
354. Hinsch, N, Frank, M, Doring, C, Vorlander, C, Hansmann, ML. QPRT: a potential marker for follicular thyroid carcinoma including minimal invasive variant; a gene expression, RNA and immunohistochemical study. *BMC cancer*. 2009;9:93.
355. Arora, N, Scognamiglio, T, Lubitz, CC, Moo, TA, Kato, MA, Zhu, B, *et al.* Identification of borderline thyroid tumors by gene expression array analysis. *Cancer*. 2009;115(23):5421-31.
356. Arora, N, Scognamiglio, T, Zhu, B, Fahey, TJ, 3rd. Do benign thyroid nodules have malignant potential? An evidence-based review. *World J Surg*. 2008;32(7):1237-46.
357. Jacques, C, Guillotin, D, Fontaine, JF, Franc, B, Mirebeau-Prunier, D, Fleury, A, *et al.* DNA microarray and miRNA analyses reinforce the classification of follicular thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(5):E981-9.
358. Hebrant, A, Dom, G, Dewaele, M, Andry, G, Tresallet, C, Leteurtre, E, *et al.* mRNA expression in papillary and anaplastic thyroid carcinoma: molecular anatomy of a killing switch. *PloS one*. 2012;7(10):e37807.
359. Eszlinger, M, Wiench, M, Jarzab, B, Krohn, K, Beck, M, Lauter, J, *et al.* Meta- and reanalysis of gene expression profiles of hot and cold thyroid nodules and papillary thyroid carcinoma for gene groups. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(5):1934-42.
360. Chudova, D, Wilde, JI, Wang, ET, Wang, H, Rabbee, N, Egidio, CM, *et al.* Molecular classification of thyroid nodules using high-dimensionality genomic data. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(12):5296-304.
361. Jarzab, B, Wiench, M, Fujarewicz, K, Simek, K, Jarzab, M, Oczko-Wojciechowska, M, *et al.* Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer research*. 2005;65(4):1587-97.
362. Fujarewicz, K, Jarzab, M, Eszlinger, M, Krohn, K, Paschke, R, Oczko-Wojciechowska, M, *et al.* A multi-gene approach to differentiate papillary thyroid carcinoma from benign lesions: gene selection using support vector machines with bootstrapping. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(3):809-26.
363. Weber, F, Eng, C. Gene-expression profiling in differentiated thyroid cancer-- a viable strategy for the practice of genomic medicine? *Future Oncol*. 2005;1(4):497-510.
364. Chung, KW, Kim, SW, Kim, SW. Gene expression profiling of papillary thyroid carcinomas in Korean patients by oligonucleotide microarrays. *Journal of the Korean Surgical Society*. 2012;82(5):271-80.
365. Dom, G, Tarabichi, M, Unger, K, Thomas, G, Oczko-Wojciechowska, M, Bogdanova, T, *et al.* A gene expression signature distinguishes normal tissues of sporadic and radiation-induced papillary thyroid carcinomas. *British journal of cancer*. 2012;107(6):994-1000.

366. Griffith OL, MA, Jones SJ, Wiseman SM. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. *J Clin Oncol* 2006;24:5043-51.
367. Delys, L, Detours, V, Franc, B, Thomas, G, Bogdanova, T, Tronko, M, *et al.* Gene expression and the biological phenotype of papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2007;26(57):7894-903.
368. Nikolova, DN, Zembutsu, H, Sechanov, T, Vidinov, K, Kee, LS, Ivanova, R, *et al.* Genome-wide gene expression profiles of thyroid carcinoma: Identification of molecular targets for treatment of thyroid carcinoma. *Oncology reports*. 2008;20(1):105-21.
369. Wasenius, VM, Hemmer, S, Kettunen, E, Knuutila, S, Franssila, K, Joensuu, H. Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(1):68-75.
370. Detours, V, Wattel, S, Venet, D, Hutsebaut, N, Bogdanova, T, Tronko, MD, *et al.* Absence of a specific radiation signature in post-Chernobyl thyroid cancers. *British journal of cancer*. 2005;92(8):1545-52.
371. Takano, T, Hasegawa, Y, Matsuzuka, F, Miyauchi, A, Yoshida, H, Higashiyama, T, *et al.* Gene expression profiles in thyroid carcinomas. *British journal of cancer*. 2000;83(11):1495-502.
372. Aldred, MAH, Y.; Liyanarachchi, S.; Pellegata, N. S.; Gimm, O.; Jhiang, S. *et al.* Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol* 2004;22:3531-9.
373. Finley, DJ, Zhu, B, Barden, CB, Fahey, TJ, 3rd. Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Annals of surgery*. 2004;240(3):425-36; discussion 36-7.
374. Finley, DJ, Arora, N, Zhu, B, Gallagher, L, Fahey, TJ, 3rd. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(7):3214-23.
375. Mazzanti, C, Zeiger, MA, Costouros, NG, Umbricht, C, Westra, WH, Smith, D, *et al.* Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer research*. 2004;64(8):2898-903.
376. Lubitz, CC, Ugras, SK, Kazam, JJ, Zhu, B, Scognamiglio, T, Chen, YT, *et al.* Microarray analysis of thyroid nodule fine-needle aspirates accurately classifies benign and malignant lesions. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2006;8(4):490-8; quiz 528.
377. Durand, S, Ferraro-Peyret, C, Selmi-Ruby, S, Paulin, C, El Atifi, M, Berger, F, *et al.* Evaluation of gene expression profiles in thyroid nodule biopsy material to diagnose thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(4):1195-202.
378. Prasad, NB, Somervell, H, Tufano, RP, Dackiw, AP, Marohn, MR, Califano, JA, *et al.* Identification of genes differentially expressed in benign versus malignant thyroid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008;14(11):3327-37.
379. Kim, HS, Kim do, H, Kim, JY, Jeoung, NH, Lee, IK, Bong, JG, *et al.* Microarray analysis of papillary thyroid cancers in Korean. *The Korean journal of internal medicine*. 2010;25(4):399-407.

380. Kundel, A, Zarnegar, R, Kato, M, Moo, TA, Zhu, B, Scognamiglio, T, *et al.* Comparison of microarray analysis of fine needle aspirates and tissue specimen in thyroid nodule diagnosis. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B.* 2010;19(1):9-14.
381. Ory, C, Ugolin, N, Levalois, C, Lacroix, L, Caillou, B, Bidart, JM, *et al.* Gene expression signature discriminates sporadic from post-radiotherapy-induced thyroid tumors. *Endocrine-related cancer.* 2011;18(1):193-206.
382. Abend, M, Pfeiffer, RM, Ruf, C, Hatch, M, Bogdanova, TI, Tronko, MD, *et al.* Iodine-131 dose-dependent gene expression: alterations in both normal and tumour thyroid tissues of post-Chernobyl thyroid cancers. *British journal of cancer.* 2013;109(8):2286-94.
383. Zheng, B, Liu, J, Gu, J, Lu, Y, Zhang, W, Li, M, *et al.* A three-gene panel that distinguishes benign from malignant thyroid nodules. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2015;136(7):1646-54.
384. Rosen, JH, M.; Umbricht, C.; Alexander, H.R.; Dackiw, A.P.; Zeiger, M.A.; Libutti, S.K. A six-gene model for differentiating benign from malignant thyroid tumors on the basis of gene expression. *Surgery.* 2005;138:1050-7.
385. Hassell, LA, Gillies, EM, Dunn, ST. Cytologic and molecular diagnosis of thyroid cancers: is it time for routine reflex testing? *Cancer cytopathology.* 2012;120(1):7-17.
386. Krause, K, Eszlinger, M, Gimm, O, Karger, S, Engelhardt, C, Dralle, H, *et al.* TFF3-based candidate gene discrimination of benign and malignant thyroid tumors in a region with borderline iodine deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2008;93(4):1390-3.
387. Hamada, A, Mankovskaya, S, Saenko, V, Rogounovitch, T, Mine, M, Namba, H, *et al.* Diagnostic usefulness of PCR profiling of the differentially expressed marker genes in thyroid papillary carcinomas. *Cancer letters.* 2005;224(2):289-301.
388. Tomei, S, Marchetti, I, Zavaglia, K, Lessi, F, Apollo, A, Aretini, P, *et al.* A molecular computational model improves the preoperative diagnosis of thyroid nodules. *BMC cancer.* 2012;12:396.
389. McIver, B, Castro, MR, Morris, JC, Bernet, V, Smallridge, R, Henry, M, *et al.* An independent study of a gene expression classifier (Afirma) in the evaluation of cytologically indeterminate thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2014;99(11):4069-77.
390. Steward, DL, Kloos, RT. Clinical diagnostic gene expression thyroid testing. *Otolaryngologic clinics of North America.* 2014;47(4):573-93.
391. Rostamzadeh, D, Dabbaghmanesh, MH, Shabani, M, Hosseini, A, Amirghofran, Z. Expression Profile of Human Fc Receptor-Like 1, 2, and 4 Molecules in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Hashimoto's Thyroiditis and Graves' Disease. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme.* 2015;47(9):693-8.
392. Karger, S, Krause, K, Gutknecht, M, Schierle, K, Graf, D, Steinert, F, *et al.* ADM3, TFF3 and LGALS3 are discriminative molecular markers in fine-needle aspiration biopsies of benign and malignant thyroid tumours. *British journal of cancer.* 2012;106(3):562-8.
393. Ferris, RL, Baloch, Z, Bernet, V, Chen, A, Fahey, TJ, 3rd, Ganly, I, *et al.* American Thyroid Association Statement on Surgical Application of Molecular Profiling for Thyroid Nodules: Current Impact on Perioperative Decision Making. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2015;25(7):760-8.

394. Bongiovanni, M, Spitale, A, Faquin, WC, Mazzucchelli, L, Baloch, ZW. The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology: a meta-analysis. *Acta cytologica*. 2012;56(4):333-9.
395. Paskas, S, Jankovic, J, Zivaljevic, V, Tatic, S, Bozic, V, Nikolic, A, *et al.* Malignant risk stratification of thyroid FNA specimens with indeterminate cytology based on molecular testing. *Cancer cytopathology*. 2015;123(8):471-9.
396. Hughes, TR, Mao, M, Jones, AR, Burchard, J, Marton, MJ, Shannon, KW, *et al.* Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nature biotechnology*. 2001;19(4):342-7.
397. Ramakrishnan, R, Dorris, D, Lublinsky, A, Nguyen, A, Domanus, M, Prokhorova, A, *et al.* An assessment of Motorola CodeLink microarray performance for gene expression profiling applications. *Nucleic acids research*. 2002;30(7):e30.
398. Diez, D, Alvarez, R, Dopazo, A. Codelink: an R package for analysis of GE healthcare gene expression bioarrays. *Bioinformatics*. 2007;23(9):1168-9.
399. Willems, JS, Lowhagen, T. Fine-needle aspiration cytology in thyroid disease. *Clin Endocrinol Metab*. 1981;10(2):247-66.
400. Oertel, YC, Oertel, JE. Thyroid cytology and histology. *Bailliere's best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2000;14(4):541-57.
401. Bellido, D, Aguirre, M, Perez Barrios, A, de Agustin, P, Rigopoulou, D, Hawkins Carranza, FG. [Evaluation of fine-needle aspiration puncture in the diagnosis of thyroid nodules]. *Medicina clinica*. 1985;84(7):255-9.
402. Muñoz, N, Cañadas, ML, Cabrera, E, Villar, JM, Becerra, P, López, M, *et al.* Utilidad de la detección de la mutación B-RAFT1799A en muestras obtenidas por punción aspiración con aguja fina en el diagnóstico preoperatorio del cáncer papilar de tiroides. . 2008;19:227-8.
403. Patterson, TA, Lobenhofer, EK, Fulmer-Smentek, SB, Collins, PJ, Chu, TM, Bao, W, *et al.* Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nature biotechnology*. 2006;24(9):1140-50.
404. Giordano, TJ, Beaudenon-Huibregtse, S, Shinde, R, Langfield, L, Vinco, M, Laosinchai-Wolf, W, *et al.* Molecular testing for oncogenic gene mutations in thyroid lesions: a case-control validation study in 413 postsurgical specimens. *Human pathology*. 2014;45(7):1339-47.
405. Jarzab, B, Gubala, E, Lange, D. [DNA microarrays and papillary thyroid carcinoma gene expression profile]. *Endokrynologia Polska*. 2005;56(3):293-301.
406. Lubitz, CC, Gallagher, LA, Finley, DJ, Zhu, B, Fahey, TJ, 3rd. Molecular analysis of minimally invasive follicular carcinomas by gene profiling. *Surgery*. 2005;138(6):1042-8; discussion 8-9.
407. Murphy, KM, Chen, F, Clark, DP. Identification of immunohistochemical biomarkers for papillary thyroid carcinoma using gene expression profiling. *Human pathology*. 2008;39(3):420-6.
408. Deng, LX, Wu, GX, Cao, Y, Fan, B, Gao, X, Luo, L, *et al.* The chromosomal protein HMG2 mediates lipopolysaccharide-induced expression of beta-defensins in A549 cells. *FEBS J*. 2011;278(12):2152-66.
409. Gerlitz, G. HMGs, DNA repair and cancer. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1799(1-2):80-5.

410. Vestner, B, Bustin, M, Gruss, C. Stimulation of replication efficiency of a chromatin template by chromosomal protein HMG-17. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(16):9409-14.
411. Subramanian, M, Gonzalez, RW, Patil, H, Ueda, T, Lim, JH, Kraemer, KH, *et al*. The nucleosome-binding protein HMGN2 modulates global genome repair. *FEBS J*. 2009;276(22):6646-57.
412. Lehtonen, S, Olkkonen, VM, Stapleton, M, Zerial, M, Lehtonen, E. HMG-17, a chromosomal non-histone protein, shows developmental regulation during organogenesis. *Int J Dev Biol*. 1998;42(6):775-82.
413. Kato, H, van Ingen, H, Zhou, BR, Feng, H, Bustin, M, Kay, LE, *et al*. Architecture of the high mobility group nucleosomal protein 2-nucleosome complex as revealed by methyl-based NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(30):12283-8.
414. Landsman, D, Soares, N, Gonzalez, FJ, Bustin, M. Chromosomal protein HMG-17. Complete human cDNA sequence and evidence for a multigene family. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(16):7479-84.
415. Popescu, N, Landsman, D, Bustin, M. Mapping the human gene coding for chromosomal protein HMG-17. *Hum Genet*. 1990;85(3):376-8.
416. Bustin, M, Reeves, R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1996;54:35-100.
417. Cherukuri, S, Hock, R, Ueda, T, Catez, F, Rochman, M, Bustin, M. Cell cycle-dependent binding of HMGN proteins to chromatin. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(5):1816-24.
418. Wu, J, Kim, S, Kwak, MS, Jeong, JB, Min, HJ, Yoon, HG, *et al*. High mobility group nucleosomal binding domain 2 (HMGN2) SUMOylation by the SUMO E3 ligase PIAS1 decreases the binding affinity to nucleosome core particles. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(29):20000-11.
419. Hu, A, Dong, X, Liu, X, Zhang, P, Zhang, Y, Su, N, *et al*. Nucleosome-binding protein HMGN2 exhibits antitumor activity in oral squamous cell carcinoma. *Oncology letters*. 2014;7(1):115-20.
420. Su, L, Hu, A, Luo, Y, Zhou, W, Zhang, P, Feng, Y. HMGN2, a new anti-tumor effector molecule of CD8(+) T cells. *Molecular cancer*. 2014;13:178.
421. Bustin, M. Chromatin unfolding and activation by HMGN(*) chromosomal proteins. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(7):431-7.
422. Amen, M, Espinoza, HM, Cox, C, Liang, X, Wang, J, Link, TM, *et al*. Chromatin-associated HMG-17 is a major regulator of homeodomain transcription factor activity modulated by Wnt/beta-catenin signaling. *Nucleic acids research*. 2008;36(2):462-76.
423. Shakoory, AR, Owen, TA, Shalhoub, V, Stein, JL, Bustin, M, Stein, GS, *et al*. Differential expression of the chromosomal high mobility group proteins 14 and 17 during the onset of differentiation in mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. *Journal of cellular biochemistry*. 1993;51(4):479-87.
424. Kulkeaw, K, Inoue, T, Mizuochi, C, Horio, Y, Ishihama, Y, Sugiyama, D. Ectopic expression of Hmgn2 antagonizes mouse erythroid differentiation in vitro. *Cell Biol Int*. 2012;36(2):195-202.
425. Kondos, H, Anastasiadou, E, Photopoulou, A, Cary, P, Aleporou-Marinou, V, Pataryas, T. Elevated levels of the chromosomal protein HMG 17 in chronic myelogenous leukemia. *Biochem Mol Biol Int*. 1995;36(4):803-9.

426. Spieker, N, Beitsma, M, van Sluis, P, Roobeek, I, den Dunnen, JT, Speleman, F, *et al.* An integrated 5-Mb physical, genetic, and radiation hybrid map of a 1p36.1 region implicated in neuroblastoma pathogenesis. *Genes, chromosomes & cancer.* 2000;27(2):143-52.
427. Fiorillo, AA, Medler, TR, Feeney, YB, Liu, Y, Tommerdahl, KL, Clevenger, CV. HMG2 inducibly binds a novel transactivation domain in nuclear PRLr to coordinate Stat5a-mediated transcription. *Mol Endocrinol.* 2011;25(9):1550-64.
428. Nielsen, E, Welinder, B, Madsen, OD. Protein HMG-17 is hyper-expressed in rat glucagonoma. Single-step isolation and sequencing. *European journal of biochemistry / FEBS.* 1990;192(1):81-6.
429. Saito, A, Suzuki, HI, Horie, M, Ohshima, M, Morishita, Y, Abiko, Y, *et al.* An integrated expression profiling reveals target genes of TGF-beta and TNF-alpha possibly mediated by microRNAs in lung cancer cells. *PloS one.* 2013;8(2):e56587.
430. Liang, G, Xu, E, Yang, C, Zhang, C, Sheng, X, Zhou, X. Nucleosome-binding protein HMG2 exhibits antitumor activity in human SaO2 and U2-OS osteosarcoma cell lines. *Oncology reports.* 2015;33(3):1300-6.
431. Okamura, S, Ng, CC, Koyama, K, Takei, Y, Arakawa, H, Monden, M, *et al.* Identification of seven genes regulated by wild-type p53 in a colon cancer cell line carrying a well-controlled wild-type p53 expression system. *Oncol Res.* 1999;11(6):281-5.
432. Lich, JD, Ting, JP. Monarch-1/PYPAF7 and other CATERPILLER (CLR, NOD, NLR) proteins with negative regulatory functions. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2007;9(5):672-6.
433. Ting, JP, Lovering, RC, Alnemri, ES, Bertin, J, Boss, JM, Davis, BK, *et al.* The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity.* 2008;28(3):285-7.
434. Harton, JA, Linhoff, MW, Zhang, J, Ting, JP. Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol.* 2002;169(8):4088-93.
435. Inohara, N, Ogura, Y, Nunez, G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(1):76-80.
436. Martinon, F, Tschopp, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* 2005;26(8):447-54.
437. Zhong, Y, Kinio, A, Saleh, M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol.* 2013;4:333.
438. Gultekin, Y, Eren, E, Ozoren, N. Overexpressed NLRC3 acts as an anti-inflammatory cytosolic protein. *Journal of innate immunity.* 2015;7(1):25-36.
439. Allen, IC. Non-Inflammasome Forming NLRs in Inflammation and Tumorigenesis. *Front Immunol.* 2014;5:169.
440. Pedra, JH, Cassel, SL, Sutterwala, FS. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):10-6.
441. Janowski, AM, Kolb, R, Zhang, W, Sutterwala, FS. Beneficial and Detrimental Roles of NLRs in Carcinogenesis. *Front Immunol.* 2013;4:370.
442. Martinon, F, Burns, K, Tschopp, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell.* 2002;10(2):417-26.
443. Tattoli, I, Travassos, LH, Carneiro, LA, Magalhaes, JG, Girardin, SE. The Nodosome: Nod1 and Nod2 control bacterial infections and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2007;29(3):289-301.

444. Rosenstiel, P, Huse, K, Till, A, Hampe, J, Hellmig, S, Sina, C, *et al.* A short isoform of NOD2/CARD15, NOD2-S, is an endogenous inhibitor of NOD2/receptor-interacting protein kinase 2-induced signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2006;103(9):3280-5.
445. Le, HT, Harton, JA. Pyrin- and CARD-only Proteins as Regulators of NLR Functions. *Front Immunol.* 2013;4:275.
446. Conti, BJ, Davis, BK, Zhang, J, O'Connor, W, Jr., Williams, KL, Ting, JP. CATERPILLER 16.2 (CLR16.2), a novel NBD/LRR family member that negatively regulates T cell function. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(18):18375-85.
447. Schneider, M, Zimmermann, AG, Roberts, RA, Zhang, L, Swanson, KV, Wen, H, *et al.* The innate immune sensor NLRC3 attenuates Toll-like receptor signaling via modification of the signaling adaptor TRAF6 and transcription factor NF-kappaB. *Nature immunology.* 2012;13(9):823-31.
448. Corver, WE, Ruano, D, Weijers, K, den Hartog, WC, van Nieuwenhuizen, MP, de Miranda, N, *et al.* Genome haploidisation with chromosome 7 retention in oncocytic follicular thyroid carcinoma. *PLoS one.* 2012;7(6):e38287.
449. Zhang, L, Mo, J, Swanson, KV, Wen, H, Petrucelli, A, Gregory, SM, *et al.* NLRC3, a member of the NLR family of proteins, is a negative regulator of innate immune signaling induced by the DNA sensor STING. *Immunity.* 2014;40(3):329-41.
450. Liu, R, Truax, AD, Chen, L, Hu, P, Li, Z, Chen, J, *et al.* Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components. *Oncotarget.* 2015.
451. Gabalec, F, Cap, J, Ryska, A, Vasatko, T, Ceeova, V. Benign fine-needle aspiration cytology of thyroid nodule: to repeat or not to repeat? *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2009;161(6):933-7.
452. Giordano, D, Valcavi, R, Thompson, G, Pedroni, C, Renna, L, Gradoni, P, *et al.* Complications of central neck dissection in patients with papillary thyroid carcinoma: Results of a study on 1087 patients and review of the literature. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association.* 2012.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

¹³¹ I	Yodo radioactivo
¹¹⁸ FDG-PET/TAC	Tomografía por emisión de positrones con ¹⁸ F-fluorodeoxiglucosa asociada a tomografía axial computadorizada.
AACE	<i>American Association of Clical Endocrinologists</i>
ABC	Área bajo la curva ROC
ACH	Adenoma de células de Hürhltle
AcTg	Anticuerpos antitiroglobulina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AF	Adenoma folicular
AGEC	<i>Afirma Gene Expression Clasifer</i>
AGES	<i>Age (edad), Grade ⁽⁴⁵²⁾, Extention (extensión), Size (tamaño)</i>
AJCC	<i>American Joint Commetee on Cancer</i>
AME	<i>Associazione Medici Endocrinology</i>
AMES	<i>Age (edad), Metastasis (metástasis), Extention (extensión), Size (tamaño)</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN copia
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNmTg	ARNm de tiroglobulina
ATA	<i>American Thyroid Association</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AUS	Atipia de significado incierto (<i>Atipia of Undetermined Significance</i>)
BAG	Biopsia con aguja gruesa
BTA	<i>British Thyroid Association</i>
CAT	Cáncer anaplásico de tiroides
CCH	Cáncer de células de Hürhltle
CDT	Cáncer diferenciado de tiroides
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CFT	Carcinoma folicular de tiroides
CFTai	Carcinoma folicular de tiroides altamente invasivo
CFTmi	Carcinoma folicular de tiroides mínimamente invasivo
cga	Campos de gran aumento
CMT	Cáncer medular de tiroides
CPDT	Carcinoma pobremente diferenciado de tiroides
CPT	Cáncer papilar de tiroides
CPT-VF	Variante folicular de carcinoma papilar
C _t	Ciclo umbral
Da (kDa)	Dalton
DDBJ	<i>DNA Database of Japan</i>
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DW-MRI	Imagen de difusión por resonancia magnética

E	Especificidad
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EORTC	<i>European Organization for Research on Treatment of Cancer</i>
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
ESLI	<i>Ep-ICD subcellular localization index</i>
ESMO	<i>European Society of Medical Oncology</i>
EST	Expressed Sequence Tags o secuencias breves de expresión
ETA	<i>European Thyroid Association</i>
EUROCARE	<i>EUROpean CANcer REgistry-based study on survival and care of cancer patients</i>
Ext	Exactitud o precisión de la prueba
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FLUS	Lesión folicular de significado incierto (<i>follicular lesion of uncertain significance</i>)
FN	Falsos negativos
FP	Falsos positivos
g	Gramos
GB	Serie de pacientes con patología benigna
GM	Serie de pacientes con patología maligna
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GLOBOCAN	<i>Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide</i>
GTP	Guanosina trifosfato
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confianza
IHQ	Inmunohistoquímica
MACIS	Metástasis, edad (<i>age</i>), grado de extirpación (<i>completeness</i>), invasión, tamaño (<i>size</i>)
MBq	megabequerelios
mCi	Milicurios (1 Ci= 37 gigabequerelios, 10 ⁹ Bq)
MEN	Neoplasia Endocrina Múltiple
miAF	Microadenoma folicular de tiroides
miCMT	Microcarcinoma medular de tiroides
miCPT	Microcarcinoma papilar de tiroides
miRNA	Micro ARN
mm	Milímetros
MPT	<i>Multiplatform mutation and miRNA test</i>
MRI	Imagen por Resonancia Magnética
mU/l	Miliunidades internacionales/ litro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Network</i>
NCH	Neoplasia de células de Hürthle
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF	Neoplasia folicular
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
NIS	bomba Na ⁺ /I ⁻ (<i>Na⁺/I⁻ symporter</i>)
ng	Nanogramos

NTCTCSG	<i>The National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Group</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	<i>Odds ratio</i>
p.ej.	Por ejemplo
PAAF	Punción-Aspiración con Aguja Fina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTH	Paratohormona, paratrina
qRT-PCR	PCR tras transcripción inversa cuantitativa o en tiempo real
RCP	<i>The Royall College of Pathologists</i>
RCT	Rastreo corporal total con radioyodo
ROC	<i>Receiver operating curve</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Riesgo relativo
RFLP	Polimorfismo de los fragmentos de restricción
RT	Transcriptasa inversa
RT-PCR	PCR tras transcripción inversa
S	Sensibilidad
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results</i>
SEREX	<i>Serological analysis of recombinant cDNA expression cloning</i>
SFE	<i>Société Française d'Endocrinologie</i>
SLAT	Sociedad Latinoamericana del Tiroides
SNF	Sospechosa de neoplasia folicular
SM	Sospchoso de malignidad
SUVmax	Valor máximo de captación estándar (<i>maximum standard uptake value</i>)
T3	Triiodotironina
T4	L-tiroxina o tiroxina
TBSRTC	<i>The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology</i>
Tg	Tiroglobulina
TIC	<i>Tumor-initiating cells</i> o células tumorales con propiedades de células madre
TNM	Tamaño del tumor primario, adenopatías (<i>nodes</i>), metástasis
TPMI	Tumores de potencial maligno incierto
ActPO	Anticuerpos antiperoxidasa o microsomales
TPO	Peroxidasa tiroidea
TSH	Tirotropina, hormona estimulante del tiroides.
TSH-R	Receptor de TSH
TSI	Inmunoglobulina estimulante del tiroides
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
vs.	<i>Versus</i> ; contra
xg	Fuerza centrífuga
µg	Microgramos
µl	Microlitros

ANEXOS

ANEXOS

Anexo I CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE TUMORES TIROIDEOS (OMS)Delellis *et al.*, 2004⁽¹²⁰⁾**Carcinomas de tiroides**

Carcinoma papilar (CP)

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
CP con estroma de tipo fascitis
CP con componente insular focal
CP con células escamosas o mucoepidermoide
CP con carcinoma de células fusiformes y gigantes
Carcinoma combinado papilar y medular
Microcarcinoma papilar

Carcinoma folicular

Variante oncocítica
Variante de células claras

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 plasmocitoma

Timoma ectópico

Angiosarcoma

Tumores de músculo liso

Tumores de la vaina nerviosa periférica

Paraganglioma

Tumor fibroso solitario

Enfermedad de Rosai-Dorfman

Tumor de células foliculares dendríticas

Histiocitosis de células de Langerhans

Tumores secundarios del tiroides

Anexo II CLASIFICACIONES CON VALOR PRONÓSTICO EN CDT

II.1. Clasificación AJCC/UICC (TNM). Thyroid.

Edge *et al.* eds., 2010⁽¹⁵³⁾

Tumor primario (T)

TX	El tumor primario no puede ser evaluado.
T0	No hay evidencia de tumor primario.
T1	Tumor limitado al tiroides de ≤ 2 cm en su dimensión mayor.
	T1a Tumor limitado al tiroides de ≤ 1 cm.
	T1b El tumor mide >1 cm, pero ≤ 2 cm.
T2	Tumor limitado al tiroides de >2 cm, pero ≤ 4 cm en su dimensión mayor.
T3	Tumor >4 cm en su dimensión mayor Cualquier tumor con diseminación mínima fuera del tiroides (p. ej. diseminación hasta el músculo esternotiroideo o los tejidos blandos peritiroideos).
T4a	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad moderadamente avanzada. • Tumor de cualquier tamaño que se extiende más allá de la cápsula tiroidea hasta invadir los tejidos blandos subcutáneos, la laringe, la tráquea, el esófago o el nervio laríngeo recurrente. • Carcinoma anaplásico intratiroideo
T4b	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad muy avanzada. • Tumor que invade la fascia prevertebral o envuelve la arteria carótida o los vasos mediastínicos. • Carcinoma anaplásico con diseminación extratiroidea macroscópica.

Todas las categorías se pueden subdividir en: (s) tumor solitario y (m) tumor multifocal (el tumor más grande determina la clasificación).

Todos los carcinomas anaplásicos se consideran tumores T4.

Ganglios linfáticos regionales (N)

NX	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
	N1a Metástasis hasta Nivel VI (ganglios linfáticos pretraqueales, paratraqueales, y prelaríngeos o delfianos).
	N1b Metástasis en los ganglios cervicales unilaterales, bilaterales o contralaterales (niveles I, II, III, IV o V) o en los ganglios linfáticos retrofaríngeos o mediastínicos superiores (Nivel VII).

Los ganglios linfáticos regionales son los del compartimiento central, los cervicales laterales y los mediastínicos superiores.

Metástasis a distancia (M)

M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Hay metástasis a distancia.

Estadio anatómico/grupos de pronóstico**Estadio**

Papilar o folicular (diferenciado)			
<45 AÑOS			
I	Cualquier T	Cualquier N	M0
II	Cualquier T	Cualquier N	M1
45 AÑOS O MÁS			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1-T3	N1a	M0
IVA	T4a	N0-N1a	M0
	T1-T4a	N1b	M0
IVB	T4b	Cualquier N	M0
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1
Carcinoma medular (todos los grupos de edad)			
I	T1	N0	M0
II	T2-T3	N0	M0
III	T1-T3	N1a	M0
IVA	T4a	N0	M0
	T4a	N1a	M0
	T1-T4a	N1b	M0
IVB	T4b	Cualquier N	M0
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1
Carcinoma anaplásico			
IVA	T4a	Cualquier N	M0
IVB	T4b	Cualquier N	M0
IVC	Cualquier T	Cualquier N	M1

Todos los carcinomas anaplásicos se consideran Estadio IV.

II.2. Sistema AMES

Cady et al. Clínica Lahey, 1988⁽¹⁴⁶⁾

A Edad

M estástasis a distancia

E xtensión 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)

II.3. Sistema AGES

Hay et al. Clínica Mayo, 1987⁽¹⁴⁸⁾

A Edad al diagnóstico: $0,05 \times$ año si el paciente es mayor de 40 años.

G Grado histopatológico del tumor: + 1 si grado histológico 2 y + 3 si grado histológico 3 ó 4.

E Extensión del tumor: + 1 si extratiroidea, + 3 si diseminación a distancia.

S Tamaño del tumor: $+ 0,2 \times$ tamaño del tumor (máximo diámetro en cm.).

Gradación AGES Supervivencia 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%

II.4. Sistema MACIS

Hay et al. Clínica Mayo, 1993⁽¹³⁷⁾

M (Metástasis distancia): Positivo= 3, Negativo= 0

A (Age = edad): < 39 años 3,1; Mayor de 40 años= $0,08 \times$ edad en años

C (Completeness = amplitud de la resección): Incompleta= 1; Completa= 0

I (Invasión local): Positiva= 1; Negativa= 0

S (Size = Tamaño): $0,3 \times$ tamaño en cm.

Gradación:

Supervivencia a 20 años

Riesgo mínimo: total $\leq 6,0$ 99%

Riesgo bajo: total 6,01 a 6,99 89%

Riesgo alto: total 7,00 a 7,99 56%

Riesgo máximo: total $\geq 8,0$ 24%

II.5. Grupos de riesgo del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center

Shaha et al., 1994⁽¹⁵¹⁾

	Bajo riesgo	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	72
Supervivencia a 20 años (%)	99	85	85	57

II.6. Sistema EORTC (European Organization for Research on Treatment of Cancer)

Byar et al. 1979⁽¹⁴⁵⁾

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)
 Tipo de células anaplásicas: (+45 puntos)
 Tumor localmente invasivo por fuera del tiroides: (+10 puntos)
 Metástasis a distancia: (+15 puntos)
 Metástasis múltiples: (+15 puntos)

Clasificación:

- Grupo 1: < 50 puntos
 Grupo 2: 50-65 puntos
 Grupo 3: 66-83 puntos
 Grupo 4: 84-108 puntos
 Grupo 5: ≥ 109 puntos

II.7. Sistema SAG

Akslen *et al.*, The Gade Institute, 1993⁽¹⁴⁹⁾

S (Sex = sexo): femenino= 0; masculino= 1

A (Age= edad): <70 años=0; ≥ 70= 1

G (Grade= grado histológico): grado 1=0; grado 2=1

Clasificación Supervivencia a 15 años

SAG-I: 0 98,3%

SAG-II: 1 88%

SAG-III: 2-3 39%

II.8. Grupos de riesgo de recidiva según la ATA

Cooper *et al.* 2009⁽¹⁾

	Bajo riesgo	Riesgo intermedio	Alto riesgo
Metástasis ganglionares	No	Sí	-
Metástasis a distancia	No	No	Sí
Grado de resección	Completa	-	incompleta
Invasión locorregional	No	Microscópica	Macroscópica
Variedad tumoral agresiva* o Invasión vascular	No	Sí	-
Rastreo post-ablación	No Sólo lecho (restos)	Si Captación fuera del lecho tiroideo	-
Tg (seguimiento post ablación)			Desproporcionada respecto a la medida durante la ablación

*Células altas, insular o columnar

II.9. Sistema del NTCTCSG

Sherman *et al.* 1998⁽¹³⁹⁾

	Tipo tumoral			
	Cáncer papilar		Cáncer folicular	
	<45 años	≥45 años	<45 años	≥45 años
Tamaño del tumor primario (cm)				
<1	I	I	I	II
1-4	I	II	I	III
>4	II	III	II	III
Descripción del tumor primario				
Multifocal microscópico	I	II	I	III
Multifocal macroscópico o invasión capsular macroscópica	I	II	II	III
Extensión extratiroidea microscópica	I	II	I	III
Extensión extratiroidea macroscópica	II	III	II	III
Pobremente diferenciado	NA	NA	III	III
Metástasis				
Ganglios linfáticos cervicales	I	III	I	III
Ganglios linfáticos extracervicales	III	IV	III	IV
			Carcinoma medular	
Hiperplasia de células C			I	
Tamaño tumoral < 1 cm			II	
Tamaño tumoral ≥ 1 cm o ganglios cervicales positivos			III	
Invasión extraglandular o metástasis extracervicales			IV	

NA: no aplicable; todos los cánceres anaplásicos son estadio IV

(Reproducida con permiso de John Wiley & Sons, Inc: [Cancer](#) 1;83(5):1012-21., ©1998.)

II.10 Otros sistemas

- *Clinical Class, Universidad de Chicago 1990, DeGroot et al.* ⁽¹⁴⁷⁾: usa una clasificación basada en el tamaño del tumor, los ganglios y las metástasis, sin tener en consideración la edad y con su uso restringido al CDT.
- *Clasificación de Ohio, Universidad de Ohio 1994, Mazzaferri et al.* ⁽¹⁵⁰⁾: se basa en el tamaño tumoral, la presencia de metástasis ganglionares, la multifocalidad, la extensión extra tiroidea y las metástasis a distancias.
- *Clasificación de Noguchi, Noguchi Thyroid Clinic 1994* ⁽¹⁵²⁾: diferencia los factores pronósticos entre mujeres y hombres. Para las primeras son la edad, adenopatías macroscópicas, el tamaño tumoral y el número de otros tejidos u órganos peritiroideos afectados, mientras que para los hombres son la edad y las metástasis linfáticas. Según esto hay tres grupos: excelente (supervivencia a los 10 años del 98,4% para hombres y 99,3% para mujeres), intermedio (supervivencia a los 10 años de 90,1% y 96,4%, respectivamente) y, pobre (supervivencia a los 10 años del 74,4% y 88,8%, respectivamente).

Anexo III CONSENTIMIENTO

III.I. DOCUMENTO INFORMATIVO

Se le invita a participar en el estudio autorizado

Estudio del perfil de expresión génica para valoración diagnóstica y del pronóstico de los pacientes con lesiones nodulares tiroideas.

El objetivo del estudio es medir los niveles de expresión de diferentes genes en muestras de sangre y tejido que va a extirparse de pacientes con enfermedad nodular del tiroides, y así conocer qué genes distinguen el grupo de enfermos con lesiones benignas y a los que sufren lesiones malignas. La profundización en este tipo de estudio permitiría, en un futuro, evitar intervenciones quirúrgicas innecesarias y realizar un tratamiento más adaptado a las necesidades y características de cada enfermo.

Si usted acepta participar, se le pedirá consentimiento para la realización de ¹⁸FDG-PET/TAC. El día de la intervención quirúrgica y antes de la misma se le extraerán 15 ml de sangre. Asimismo, se obtendrá una pequeña muestra del tejido presente en el nódulo que usted presenta en el tiroides, bien durante la intervención quirúrgica, bien mediante punción antes de la operación. En este caso, debe saber que la punción está indicada para un mejor conocimiento preoperatorio de su lesión.

En estas muestras se realizará un análisis de la expresión de genes, y se utilizarán SÓLO Y EXCLUSIVAMENTE para el estudio de este proyecto. Los resultados obtenidos en el estudio no podrán ser utilizados más que con el fin de profundizar en el conocimiento científico del objetivo de trabajo.

Este tipo de proyecto pretende describir la situación del paciente en cuanto a la expresión de los genes relacionados con los tumores del tiroides. Por tanto NO HAY NINGUN RIESGO POTENCIAL para el participante. En cuanto a los beneficios esperados, éstos servirán para aumentar y profundizar en el conocimiento científico de esta patología, para, en un futuro, llegar a establecer una terapia mas adecuada y lo más personalizada posible. Los valores obtenidos no influirán para decidir el tratamiento de su problema en particular.

La negativa a participar en este estudio NO tiene ninguna repercusión en la atención médica que usted necesita. La participación en este estudio es absolutamente VOLUNTARIA, y en cualquier momento del estudio, puede interrumpirse a voluntad del participante.

La información de este estudio es CONFIDENCIAL y solamente será utilizada a efectos de publicaciones científicas, no apareciendo en ningún informe el nombre o identidad del participante en este estudio.

**SERVICIOS DE CIRUGÍA GENERAL, ENDOCRINOLOGÍA, MEDICINA
NUCLEAR, RADIOLOGÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA.
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES**

III.II. DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**Nº Historia:**.....D./ Dña.: de..... años de edad,
(Nombre y dos apellidos del paciente)

con domicilio en y D.N.I. nº

D./Dña.: de años de edad,
(Nombre y dos apellidos)

con domicilio en y D.N.I. nº

en calidad de de

(Representante legal, familiar o allegado) (Nombre y dos apellidos del paciente)

DECLARO:

Que el/la

Doctor/a./Dña _____
(Nombre y dos apellidos del facultativo que proporciona la información)

me ha comunicado que se me invita a participar en el estudio autorizado

Estudio del perfil de expresión génica para valoración diagnóstica y del pronóstico de los pacientes con lesiones nodulares tiroideas.

Me ha explicado que el objetivo del proyecto es medir los niveles de expresión génica en muestras de tejido tiroideo y sangre periférica de pacientes con lesiones nodulares del tiroides y conocer qué genes distinguen el grupo de pacientes con lesiones benignas frente al grupo de lesiones malignas. La profundización en este tipo de estudio permitiría, en un futuro, evitar intervenciones quirúrgicas innecesarias y realizar un tratamiento más adaptado a las necesidades y características de cada enfermo.

También se me ha informado que mi participación consiste en permitir la extracción de 15 ml de sangre, antes de la intervención quirúrgica. Asimismo, se obtendrá una pequeña muestra del tejido presente en el nódulo que tengo en el tiroides, bien durante la intervención quirúrgica, bien mediante punción antes de la operación. En este caso, sé que la punción está indicada para un mejor conocimiento preoperatorio de mi lesión. También se me ha informado que puedo aceptar la realización de un ¹⁸FDG-PET/TAC preoperatorio, en cuyo caso firmaré el documento de consentimiento habitual del centro.

En estas muestras se procederá a realizar un análisis de la expresión de genes. Las muestras de sangre **SÓLO Y EXCLUSIVAMENTE** se utilizarán para el estudio de este proyecto. Los resultados obtenidos en el estudio no podrán ser utilizados más que con el fin de profundizar en el conocimiento científico del objetivo de trabajo.

Asimismo comprendo que mi participación es absolutamente **VOLUNTARIA** y, en cualquier momento del estudio, puedo interrumpir mi participación. La negativa a participar en este estudio **NO** tiene ninguna repercusión en la atención médica que voy a recibir.

Comprendo que la información de este estudio es **CONFIDENCIAL** y solamente será utilizada a efectos de publicaciones científicas, no apareciendo en ningún informe el nombre o identidad del participante en este estudio.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Y en tales condiciones **CONSIENTO** en participar en dicho proyecto de investigación.

En Granada a de de 200.....

Fdo.: El/la Médico Fdo.: El Paciente Fdo.: El representante legal, Familiar o allegado

Anexo IV GENES NOBRADOS EN ESTA TESIS DOCTORAL

A

ABCC3	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3</i>
ACCN1	<i>Neuronal amiloride-sensitive cation channel 1</i>
ACO1	<i>Aconitase 1, Soluble</i>
ACTB	<i>B-actina</i>
ADAMTS1	<i>A Disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1</i>
ADAMTS8 A	<i>A Disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8</i>
ADM (ADM3)	<i>Adrenomedulina</i>
ADORA1	<i>Adenosine A1 receptor</i>
AGTR1	<i>Angiotensin II receptor type1</i>
AHR	<i>Aryl Hydrocarbon receptor</i>
AIM2	<i>Absent in Melanoma 2</i>
AKAP250	<i>Gravin a kinase-anchoring protein 250</i>
AKAP9	<i>A Kinase anchor protein 9</i>
AKT1 (AKT, PKB)	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 1</i>
ALCAM (CD166)	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
ALDH1A1	<i>ALDH family member that catalyzes the oxidation of retinal to retinoic acid</i>
ALDO A	<i>Aldolasa A, fructosa-bisfosfato</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase g</i>
AMOT (KIAA1071)	<i>Homo sapiens angiostatin-binding protein 1 mRNA, internal fragment of plasminogen</i>
Ang-1	<i>Angiopoietin 1</i>
ANGPT2	<i>Homo sapiens angiopoietin-2 mRNA</i>
ANKRD46	<i>Ankyrin Repeat Domain 46</i>
ANLN	<i>Anilin, actin-binding protein</i>
ANXA1	<i>Anexina A1</i>
APC	<i>Gen de la poliposis adenomatosa familiar</i>
ARG2	<i>Arginasa 2</i>
ARHI (DIRAS3)	<i>DIRAS Family, GTP-Binding RAS-Like 3</i>
ARHN	<i>Ras homolog gene family, member N</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>
AURKC	<i>Aurora Kinase C</i>
AWA	<i>Anticuerpo frente a WDR1 (WD Repeat Domain 1)</i>
AXL	<i>Tyrosine-protein kinase receptor</i>

B

Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL11A	<i>B-Cell CLL/Lymphoma 11A (Zinc Finger Protein)</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BIKE	<i>BMP-2 inducible kinase</i>
BIRC	<i>Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing</i>
BIRC5	<i>Survivin, effector cell peptidase receptor 1</i>
BRAF	<i>Serina-treonina quinasa de la familia raf</i>
BSG (EMMPRIN)	<i>Basigin (OK blood group)</i>

C

c-MET (MET)	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
C11orf8 (MPPED2)	<i>Metallophosphoesterase Domain Containing 2</i>
C1orf24 (FAM129A)	<i>Family With Sequence Similarity 129, Member A</i>
C1orf9	<i>SUN Domain Containing Ossification Factor</i>
C21orf4	<i>Chromosome 21 Open Reading Frame 4</i>
C5orf41	<i>CREB3 Regulatory Factor</i>
C6orf62	<i>Chromosome 6 Open Reading Frame 62</i>
CA12	<i>Carbonic anhydrase XII</i>
CA4	<i>Carbonic anhydrase IV</i>
CALCA	<i>Gen que codifica la calcitonina (también CALC1)</i>
CAPN3	<i>Nuclear fact Calpain 3 (p94)or (erythroid-derived 2)-like 3</i>
CAV1	<i>Caveolina 1; otras isoformas CAV2 y CAV3</i>
CCN1 (CYR61)	<i>Cysteine-Rich, Angiogenic Inducer, 61</i>

CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CCNE1	Ciclina E1
CCR7	Receptor de la quimoquina CC7
CD25 (IL-2R α)	Receptor alfa de IL-2
CD47	<i>Integrin Associated Protein</i>
CD56 (NCAM)	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
CDH (E-CAD; CDH1)	Gen que codifica la E-caderina
CDH3	<i>Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)</i>
CDKN1A (p21)	Inhibidor dependiente de ciclina; también, Cip1
CDKN1B (p27)	Inhibidor dependiente de ciclina
CDKN2A (p16)	Inhibidor dependiente de ciclina
CDX2	<i>Caudal type homeo box transcription factor 2</i>
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CEACAM6	<i>Carcinoembryonic antigen – related cell adhesion molecule 6</i>
CENPA	<i>Centromere protein A</i>
CGD	<i>Chronic granulomatous disease</i>
CHI3L1 (YKL-40)	<i>Chitinase 3-Like 1 (Cartilage Glycoprotein-39)</i>
CIITA	<i>Class II, Major Histocompatibility Complex, Transactivator</i>
CITED1 (MSG1)	Cbp/ p300-interacting transactivator. Codifica a la proteína específica del melanocito 1 (MSG1)
CK	Citoqueratina: 19 (CK19), 7 (CK7), 8 78kDA (CK8 78 kDA)
CKS2	<i>CDC28 protein kinase regulatory subunit 2</i>
CLA	Antígeno leucocitario común
CLDN1	Claudina 1
CLDN10	Claudina 10
CLG (PLEKHG2)	<i>Pleckstrin Homology Domain Containing, Family G (With RhoGef Domain) Member 2</i>
CLR (CATERPILLER)	<i>CARD, Transcription Enhancer, R (purine)-binding, Pyrin, Lots of Leucine Repeats</i>
CNN3	<i>Calponin 3, acidic</i>
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
CPSF2	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2</i>
CRABP1	<i>Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1</i>
CTNNB1	Gen que codifica la β -catenina
CTSB	Cathepsin B
CXCR1	<i>High-affinity receptor for the CXC chemokine interleukin-8</i>
CXCR4	Receptor de la quimoquina CXCR4

D

DAMP	Patrones moleculares asociados al peligro
DAPK	Proteína quinasa asociada a muerte celular; DAPK1: isoforma 1
DBNL	<i>Encoding drebrin-like</i>
DDI2	<i>DNA-Damage Inducible 1 Homolog 2 (S. Cerevisiae)</i>
DICER1	Miembro de la familia de genes ribonucleasa III (RNasIII)
DLG3	<i>Neuroendocrine-DLG, tumor suppressor protein interacting with the adenomatous polyposis coli protein</i>
DNAJA2	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2</i>
DPC4 (SMAD4)	<i>Homozygous deletion target in pancreatic carcinoma</i>
DPP4	<i>Dipeptidylpeptidase 4</i>
DPT	Dermatopontina; <i>Tyrosine-Rich Acidic Matrix Protein</i>
DUOXA1	<i>Dual oxidase activator 1</i>
DUSP1	<i>Dual specificity phosphatase 1</i>
DUSP4	<i>Dual specificity phosphatase 4</i>
DUSP5	<i>Dual specificity phosphatase 5</i>
DUSP6	<i>Dual specificity phosphatase 6</i>

E

E2F (E2F1)	Proteína asociada a retinoblastoma; factor de transcripción E2F
ECM1	<i>Extracellular matrix protein, 1</i>
EDG1	<i>Homo sapiens endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1 mRNA</i>
EFNB2	<i>Homo sapiens ephrin-B2</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR (ErbB1; HER1)	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGR1	<i>Early growth response 1</i>
EGR2	<i>Early growth response 2</i>
EIF1AX	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A, X-Linked</i>

ELMO1	<i>Engulfment and cell motility 1</i>
EMCN	Endomucina
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i> (inductor de la metaloproteasa de matriz extracelular)
ENG	<i>Homo sapiens endoglin (Osler-Rendu-Weber syndrome 1)</i>
ENPP2	Autotaxina
EpCAM	Molécula de adhesión epitelial: EpEX dominio extracelular y Ep-ICD dominio intracelular
EPS8	<i>Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 8</i>
ERAP2	<i>Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2</i>
ERBB2 (ErbB2; HER2)	Receptor de EGF-2; Neu; v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)
ERK	MAP-quinasa. <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ETV6	<i>Ets Variant 6</i>
EVA1	<i>Epithelial V-like antigen</i>

F

FAM13A1	<i>Family with sequence similarity 13, member A1</i>
FAM20A	<i>Family with sequence similarity 20, member A</i>
FCER1G	<i>Fc-ε-receptor γ-chain</i>
FCGBP	<i>Fc fragment of IgG binding HGD protein Homogentisate 1,2-dioxygenase</i>
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos : -7 (FGF-7); β- (β-FGF)
FGFR1	<i>Fibroblast growth factor receptor1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)</i>
FGFR1OP2	<i>FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) Oncogene Partner 2</i>
FGFR2	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2
FLRT2	<i>Fibronectin leucine rich transmembrane protein 2</i>
FN1	fibronectina 1
FOS (C-FOS)	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog; oncogen c-fos
FOSB	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B</i>
FOXA2	<i>Forkhead box A2</i>
FOXE1 (TTF-2)	<i>Forkhead Box E1</i>
FOXO3	<i>Forkhead Box O3</i>
FTHFD	<i>Formyltetrahydrofolate dehydrogenase</i>

G

GABRB2	<i>γ-aminobutyric acid⁽⁴⁵¹⁾ A receptor, β2</i>
GADD153 (DDIT3)	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible protein</i>
GAL3 (LGALS3)	Galectina-3 (Lectin, galactoside-binding, soluble 3)
GALIG	Galectin-3 internal gene
GAPDH (GAPD)	Gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa
GAPDHS	Gliceraldeído-3-fosfato-deshidrogenasa, espermatogénica
GARS	<i>Glycyl-tRNA-synthetase</i>
GAS1	<i>Growth arrest-specific 1</i>
GBA3	<i>Cytosolic glucosidase, β, acid 3</i>
GDNF	Factor de crecimiento neurotrófico derivado de células gliales, codificado por <i>ret</i>
GJB3	<i>Gap junction protein, beta 3, 31kDa</i>
GLI1	<i>GLI Family Zinc Finger 1</i>
GLI2	<i>GLI Family Zinc Finger 2</i>
GLTSCR2	<i>Glioma tumor suppressor candidate region gene 2</i>
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GNAL	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein), Alpha Activating Activity Polypeptide, Olfactory Type</i>
GOLT1A	Golgi Transport 1A
GOT1	Transaminasa glutámico oxalacética, soluble (aspartato aminotransferasa 1)
GPER1	<i>G protein-coupled estrogen receptor 1</i>
GPX	Glutación peroxidasa
GPX1	Glutación peroxidasa 1
GSP (GNAS1 o GSA)	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein (G Protein)</i>

H

HARSL	<i>Histidyl-TRNA synthetase-like</i>
HAT	Acetiltransferasa de histonas
HBA1	<i>Hemoglobin, α -chain</i>
HBB	<i>Hemoglobin, beta</i>
HBME (-1)	Anticuerpo mesotelial Hector Battifora (1)
HER2 (ERBB2)	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
HET-E	<i>Incompatibility locus protein from Podospora anserina</i>
HEY2	<i>Hes-Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2</i>
HGD (HGD1)	<i>Homogentisate 1,2-Dioxygenase</i>

HGF	Factor de crecimiento hepatocítico
HGF-R (MET; HGFR)	receptor del HGF
HIF1	Factor inducible por hipoxia1; HIF-1 α ; HIF-1 β : isoformas alfa y beta
HIST1H4B	<i>Histone 1, h4b</i>
HLA-DPB1	<i>Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>
HMGA	<i>High mobility group AT-hook</i>
HMGA2	<i>High mobility group AT-hook 2, transcript variant 1</i>
HMGB	<i>high mobility group-box</i>
HMG2	<i>High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 2+</i>
HMWCK	Citoqueratina de alto peso molecular
HNRNP1	<i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H1 (H)</i>
HP1- α	<i>Heterochromatin protein 1 homologue- α</i>
Hs.24183	Desconocido
Hs.296031 (PKD3)	<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase, Isozyme 3</i>
HSP	<i>Heat shock protein. HSP gp96 (glicoproteína 96)</i>
I	
IFN- γ	Interferón gamma
IG- FBP	<i>Insulin-like growth factor binding</i>
IGF	Factor de Crecimiento Insulinico (-I y -II)
IGSF1	<i>Immunoglobulin superfamily, member 1</i>
ITPR1	<i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor, Type 1</i>
IL-	Interleuquina- (IL-11; IL-2; IL-1 β o p17; IL-6; IL-8; IL-12p40; IL-18; IL-33)
IL13RA1	<i>Interleukin 13 receptor, alpha 1</i>
IMPACT	<i>Impact homolog</i>
ITGA5	<i>Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>
ITIH5	<i>Inter-Alpha-Trypsin Inhibitor Heavy Chain Family, Member 5</i>
ITM1 (STT3A)	<i>Integral Membrane Protein 1</i>
I κ B α	<i>NF-Kappa-B Inhibitor Alpha</i>
J	
JUN (AP-1, c-jun)	Protooncogen jun; factor de transcripción AP-1
K	
KAT2B	<i>K(Lysine) Acetyltransferase 2B</i>
KCNAB1	<i>Potassium voltage- gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1</i>
KCNJ2	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2</i>
KEAP1	kelch-like ECH-associated protein 1
Ki67 (MKI67)	<i>Marker Of Proliferation Ki-67</i>
KIAA0830 (ENDOD1)	<i>Endonuclease Domain Containing 1</i>
KIAA1128 (CCSER2)	<i>Coiled-Coil Serine-Rich Protein 2</i>
KIT	<i>v-Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; protooncogene c-Kit</i>
KLHDC8A	<i>Kelch domain containing 8A</i>
KLK7	<i>Kallikrein-related peptidase</i>
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue
KRT19	Queratina 19 tipo I
L	
LAMB3	<i>Laminin, Beta 3</i>
LARS	<i>Leucyl-TRNA Synthetase</i>
LDH-A	Lactato deshidrogenasa A
LGALS3 (GAL3)	Galectin-3 (Lectin, galactoside-binding, soluble 3)
LRP1B	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1B</i>
LRP4	<i>Low density lipoprotein receptor- related protein gene</i>
LRR	<i>Leucine rich region</i>
LRRK2	<i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
LSM4	<i>LSM4 homolog, U6 small nuclear RNA associated</i>
LSM7	<i>LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated</i>
LYVE-1	<i>Lymphatic vessel endotelial hyaluronan receptor 1</i>
M	
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MARVELD2	<i>MARVEL domain containing 2</i>
MATN2	Matrilina 2
MCM7 (CDC47)	<i>Minichromosoma maintenance deficient 7.</i>

MEK	MAP–quinasa-quinasa
MET (c-MET)	Receptor del factor de crecimiento hepatocítico (HGFR)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIC-1	<i>Macrophage inhibitory cytokine-1</i>
MIG	<i>Monocyte induced gamma interferon</i>
MK	Midkine
MKRN2	<i>Makorin ring finger protein 2</i>
MLL	<i>Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia</i>
MMP-11	<i>Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)</i>
MMP-7	Metaloproteasa de matriz-7; también matrilisina-1
MMP-9	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>
MNG	<i>Multinodular goiter gene (-1, -2, -3)</i>
MRC2	<i>Mannose receptor, C type 2</i>
MST1 (STK4)	<i>mammalian STE20-like protein kinase 1.</i>
MT	<i>Metallothionein</i>
MTMR4	<i>Myotubularin related protein 4</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MUC1	<i>Mucin 1, cell surface associated</i>
myc (c-myc)	Protooncogen myc; <i>V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>

N

NACHT-LLR (NLR)	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP), MHC class II transcription activator (CIITA), incompatibility locus protein from Podospora anserina (HET-E), and telomerase-associated protein (TP1)-Leucine rich repeat</i>
NAIP	<i>NLR Family, Apoptosis Inhibitory Protein</i>
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NATH (NAA15)	<i>N(Alpha)-Acetyltransferase 15, NatA Auxiliary Subunit</i>
NBD	<i>Nucleotide-binding domain</i>
NCAM (CD56)	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NDOR1	<i>NADPH Dependent Diflavin Oxidoreductase 1</i>
NELL2	Protein kinase C-binding protein NELL2; <i>Neural Epidermal Growth Factor-Like 2</i>
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NFE2L3	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3</i>
NGEF	<i>Neuronal guanine nucleotide exchange factor</i>
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NGF-R (NTRK1)	<i>Neurotrophic tyrosine kinase receptor 1, receptor del NGF</i>
NID2	<i>Nidogen 2 (osteonidogen)</i>
NIS (SLC26A4)	Pendrina. Bomba sodio-yodo
NKX2.1 (TTF-1; TITF1)	NK2 Homeobox 1
NLR	<i>NB-LLR-related gene family</i>
NLRA	<i>NLR Family, Acid Domain Containing</i>
NLRB	<i>NLR Family, BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat) Domain</i>
NLRC	<i>NLR Family, CARD (caspase recruitment domain) Domain</i>
NLRP	<i>NLR Family, Pyrin Domain</i>
NLRP1	<i>NLR Family, Pyrin Domain Containing 1</i>
NLRP3	<i>NLR Family, Pyrin Domain Containing 3</i>
NLRX1	<i>NLR Family Member X1</i>
NMU	Neuromedina U
NOD	<i>Nucleotide-oligomerization domain</i>
NOD	<i>Nucleotide-oligomerization domain</i>
NOD-LRR	<i>Nucleotide-oligomerization domain-Leucin rich repeat</i>
NOD2	<i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain Containing 2</i>
NR4A1	<i>Nuclear receptor subfamily 4</i>
NR4A3	<i>Nuclear receptor subfamily 4, group A</i>
NRCAM	<i>Neuronal cell adhesion molecule</i>
NRP2	<i>Neuropilin 2</i>
NTRK1	Receptor neurotrófico tirosina quinasa del factor de crecimiento nervioso (NGF)
NTRK2	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i>
NTRK3	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3</i>

O

OCIAD1	<i>Ovarian cancer immunoreactive antigendomain containing 1</i>
ODZ1	<i>Tenascin M1, odz, odd Oz/ten-m homolog 1 (Drosophila)</i>

P

p15 (CDKN2B)	Inhibidor 2B de la quinasa dependiente de ciclina. Inhibe CDK4 y CDK6
p16 (CDKN2A)	Inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina
p17	IL-1 β
P21 (CDKN1A)	Inhibidor 1A de la quinasa dependiente de ciclina
p27 (CDKN1B)	Inhibidor 1B de la quinasa dependiente de ciclina
P4HA2	<i>Prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide II</i>
p53	Factor de transcripción nuclear
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAX8	<i>Paired box 8</i> ; Factor de transcripción de tiroides
PAX8-PPAR γ	Reordenamiento de PAX8-PPAR γ
PBP	<i>Prostatic binding protein</i>
PCSK2	<i>Protein convertase 2</i>
PCYOX1	<i>Prenylcysteine oxidase 1</i>
PDE5A	<i>Phosphodiesterase 5A</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHLDA1	<i>Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1</i>
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit, alpha isoform</i>
PITX2	<i>Paired-Like Homeodomain Transcription Factor 2</i>
PK	Proteína quinasa
PKB (AKT)	Proteína quinasa B
PKD1	<i>Polykystic kidney disease-1</i>
PKP4	<i>Plakophilin 4</i>
PLAB	<i>Prostate differentiation factor</i>
PLAG1	<i>Pleomorphic adenoma gene 1</i>
PLAU	<i>Plasminogen activator, urokinase</i>
PLEC1	<i>Plectin 1, intermediate filament binding protein 500 kd</i>
PLEKHG4B	<i>Pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4B</i>
PPAR γ	<i>Perixome proliferator-activated receptor γ</i>
PPP6C	<i>Protein phosphatase 6, catalytic subunit</i>
PPR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PRKCD	Proteína quinasa C, δ
PRL	Prolactina
PRLr	Receptor de prolactina
PROS1,	Proteína S
PRSS3	<i>Mesotrypsin; protease serine 3</i>
PSD3	Pleckstrin and Sec7 domain containing 3
PSEN2	Presenilina 2
PSMB6	<i>Proteasome subunit, β type, 6</i>
PSMF1(PI31)	<i>Proteasome inhibitor subunit 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i> ; también fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTMA	<i>Prothymosin-R</i>
PTPRS	<i>Protein tyrosine phosphatase</i>

Q

QPCT	<i>Glutaminy-peptide cyclotransferase</i>
QPRT	<i>Quinolate phosphoribosyltransferase</i>

R

RAF	MAP-quinasa-quinasa-quinasa
RAG2	<i>Recombination activating gene 2</i>
RAP1GA1	<i>RAP1, GTPase-activating protein</i>
RAP1GAP	GTPasa inhibidora de la proteína relacionada con RAS 1
RAPTOR	<i>Regulatory associated protein of mTor</i>
RAR α	Receptor del ácido retinoico α
RAR β 2	Receptor del ácido retinoico β 2
RAS	Gen que codifica p21: <i>protein activator (GTPase activating protein) 1</i>
RASSF1	<i>Ras association domain family 1</i> ; RASSF1A: <i>isoform A</i>
Rb	Gen del retinoblastoma. Codifica la fosfoproteína nuclear 110-kd
RDH12	Retinol deshidrogenasa 12
RET	<i>REarranged during Transfection protooncogene</i> . Codifica el receptor para GDNF

RET/PTC	Reordenamiento de RET en CPT
RGS4	<i>Regulator of G-protein signaling 4</i>
RIG-I (DDX58)	<i>Retinoic Acid-Inducible Gene 1 Protein; DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 58</i>
RIL	<i>PDZ and LIM domain 4</i>
RIP-2	<i>Receptor-interacting protein 2</i>
RIZ1	<i>Retinoblastoma-interacting zinc finger protein 1</i>
RPH3AL	<i>Rabphilin 3A-like (without C2 domains)</i>
RTK	Receptor de membrana con actividad tirosinquinasa
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1 (acute myeloid 6.47 leukemia 1; aml1 oncogene)</i>
Runx2	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
RXRG	<i>Retinoid X receptor gene</i>

S

S100	Familia de proteínas de unión a calcio
S100A6	<i>S100 calcium-binding protein A10</i>
S100A10	<i>S100 calcium-binding protein A10</i>
S100C	
SCEL	<i>Sciellin</i>
SCG5	Secretogranina V
SDBCAG84	<i>Serologically defined breast cancer antigen 84</i>
SELP	Selectina P
SERPINA1	<i>Serine (or cysteine) inhibitor, clade A, member 1; (α-1 antiproteinase, antitrypsin)</i>
SERPINE1	<i>Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1</i>
SET (I2PP2A9)	Oncoproteína inhibidora de la proteína supresora de tumor fosfatasa 2A.
SFTPB	<i>Surfactant, pulmonary associated protein</i>
SH2D1A	<i>SH2 Domain Containing 1⁹; Signaling Lymphocytic Activation Molecule-Associated Protein</i>
SLC26A4 (NIS)	<i>Solute carrier family 26, member 4.</i> Pendrina.
SLC34A2,	<i>Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2</i>
SLC4A4	<i>Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4</i>
SLC5A8 (AIT)	Transportador apical de yodo
SLCO2A1	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1</i>
SLIT1	<i>Slit homolog 1 (Drosophila)</i>
SLUG	Miembro de SNAIL superfamily of zinc finger transcriptional factors implicados en la transición epitelial-mesenquimal
SNAI1 (Snail)	Miembro de <i>zinc-finger transcription factors</i>
SON	<i>SON DNA binding protein</i>
SOX4	<i>SRY (sex determining region Y)-box 4</i>
SPARC	<i>Osteonectin, secreted protein, acidic, cysteine-rich</i>
SPINT2,	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2
SPOCK1	<i>Sparc/ osteonectin CWCV and kazal-like domain proteoglycan</i>
SPUVE	Protease, serine, 23
ST14	<i>Suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)</i>
STAT3	Transductor de señales y activador transcripcional 3
STAT5a	Transductor de señales y activador transcripcional 5a
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
STRN	<i>Striatin; Calmodulin Binding Protein</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>
SYNGR2	<i>Synaptogyrin 2</i>
SYTL5	<i>Synaptotagmin-like 5</i>

T

TACSTD2 (TROP2; GA733-1)	<i>Tumor-associated calcium signal transducer 2 SH2 domain protein 1A</i>
TARSH (ABI3BP)	<i>ABI Family, Member 3 (NESH) Binding Protein</i>
TBCA	<i>Tubulin folding cofactor A</i>
TBX3	<i>T-box protein 3</i>
TC1 (C8orf4)	<i>Thyroid Cancer Protein 1Chromosome 8 Open Reading Frame 4</i>
TERT (hTERT)	Transcriptasa inversa de la telomerasa humana
TFCP2L1	<i>Transcription factor CP2-like 1</i>
TFF	Familia Trefoil: contienen al menos un dominio de 40 aminoácidos con tres disulfuros.
TFF3	<i>Trefoil factor 3 (intestinal)</i>
Tg (TG)	Tiroglobulina
TGB1	Factor transformador de crecimiento- β 1
TGF- α (TGFA)	factor transformador de crecimiento- α
TGF- β	Factor transformador de crecimiento- β

TGFBR1	<i>Transforming growth factor, beta receptor I</i>
TGFβR2	<i>Transforming growth factor β II receptor</i>
THBS2	<i>Thrombospondin 2</i>
ThOX1	Thyroid oxidase 1
ThOX2	Thyroid oxidase 2
TIMP-1 (TIMP, TIMP1)	<i>Erythroid potentiating activity metalloproteinase inhibitor 1</i>
TIMP3	Inhibidor tisular de la metaloproteínasa 3
TIPARP	TCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase
TM7SF2	<i>Transmembrane 7 superfamily member 2</i>
TM7SF4	Transmembrane 7 superfamily member 4
TMPRSS4	<i>Transmembrane protease, serine 4</i>
TNC	Tenascina C
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
TNRC6C (KIAA1582)	<i>Trinucleotide Repeat Containing 6C</i>
TOP2A	Topoisomerase DNA II alpha 170 kDa
TP1	<i>Telomerase-associated protein</i>
TPO (TPO5)	Peroxidasa tiroidea
TRAF6	<i>TNF Receptor-Associated Factor 6, E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
TRIB1	<i>Tribbles homologue 1</i>
TRIM2	<i>Tripartite motif-containing 2</i>
TRK	<i>Tropomyosin receptor kinase</i> . Oncogen formado por reordenamientos de NTRK1. Son 4: TRK, TRK-T1, TRKT2 y TRK-T3.
TRNT1	<i>TRNA Nucleotidyl Transferase, CCA-Adding, 1</i>
TROP2 (TAC-STD2)	<i>Trophoblastic cell surface antigen 2, también tumor associated calcium signal transducer 2</i>
TTF-1 (TITF1; NKX2.1)	Factor de transcripción tiroideo-I
TTF-2 (FOXE1)	<i>Forkhead Box E1</i>
U	
UBE2C	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2C</i>
UCP3	<i>Uncoupling Protein 3 (Mitochondrial, Proton Carrier)</i>
URKL1	<i>Uridine kinase-like 1</i>
V	
VDAC1	<i>Voltage-Dependent Anion Channel 1</i>
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VHL	<i>Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor, E3 Ubiquitin Protein Ligase</i>
W	
WDR1	WD repeat domain 1
Wnt	<i>Wingless pathway</i>
X	
XTP1 (DEPDC1B)	<i>HBxAg transactivated protein 1; DEP Domain Containing 1B</i>
Y	
YKL-40 (CHI3L1)	<i>Chitinase 3-Like 1 (Cartilage Glycoprotein-39)</i>
Z	
ZDHC2	<i>Zinc finger, DHHC domain containing 2</i>

Anexo V DATOS EN BRUTO Y NORMALIZADOS DE LOS GENES OBTENIDOS EN ESTE ESTUDIO

V.I. SANGRE PERIFÉRICA

	BU618895.1	FLJ21986	AW301414.1	AA890028.1	NOD3	PCGEM1	SUCLG2	CTAGE3	BX099693.1
pac1									
<i>Raw Data</i>	1,432434082	11,56410217	16	6,088890076	3,430233002	9,879310608	1	6,315788269	33,37999725
	11,57143021	4,490566254	7,67307663	10,66666794	5,4375	10,9743576	11,64516449	8,079544067	20,94736481
<i>Normalized</i>	0,086342717	0,697048479	0,964430744	0,367019549	0,206763885	0,59549443	0,060276921	0,380696274	2,012043473
	1,322449166	0,513207572	0,876923043	1,219047764	0,621428571	1,254212298	1,330875942	0,923376465	2,393984549
pac2									
<i>Raw Data</i>	4,764705658	7,032608032	4	3,57831192	0,333332062	6,555557251	3,22618866	4,900001526	5,674999237
	6,52381134	3,6941185	11,05405426	11,72727203	7,142856598	9,299999237	9,394737244	5,635295868	33,4146347
<i>Normalized</i>	0,760097757	1,121888732	0,638106789	0,570836282	0,053175363	1,045786397	0,514663221	0,78168106	0,905313885
	0,71761933	0,406353081	1,215946108	1,290000071	0,785714316	1,023000033	1,033421215	0,619882616	3,675610238
pac3									
<i>Raw Data</i>	2,5625	6,84375	7,366664886	5,386363983	3,099998474	7,275863647	8,105262756	4,541175842	32,0851059
	9,035713196	2,599998474	10,74285889	8,557376862	3,689655304	11,44117737	7,03225708	9,090908051	5,205883026
<i>Normalized</i>	0,091053289	0,243178906	0,261759636	0,191393622	0,110152217	0,258533196	0,288004227	0,161361559	1,140079772
	0,403103717	0,115991846	0,479263369	0,381764045	0,164603915	0,510416945	0,313724983	0,405566085	0,232246282
pac4									
<i>Raw Data</i>	8,894737244	7,875	2,341175079	17,1111145	8,368419647	3,29032135	1,163265228	5,773586273	22,04762268
	5,80644989	3,938774109	2,599998474	7,970588684	0,233333588	5,932582855	1,870967865	1,266666412	4,099998474
<i>Normalized</i>	0,485977385	0,430262503	0,127913632	0,93489155	0,45722123	0,17977167	0,06355675	0,315448594	1,20460512
	0,645161099	0,437641568	0,288888719	0,885620965	0,025925954	0,659175873	0,207885318	0,140740712	0,455555386
pac5									
<i>Raw Data</i>	8,659091949	47,54838562	12,87096405	9,269233704	9,853660583	4,333332062	8,379310608	1,727272034	42,13725281
	9,936168671	5,599998474	7,264152527	26,46875	11,56756592	3,206897736	4,114284515	15,80555725	36,91304016
<i>Normalized</i>	0,364146666	1,999584507	0,54127138	0,389805371	0,414382671	0,182232552	0,352380832	0,072638142	1,772026469
	0,607930121	0,342627814	0,444446675	1,619452218	0,707744804	0,196209404	0,251726552	0,967040179	2,258471018
pac6									
<i>Raw Data</i>	14	24,08107758	20,61363983	11,77142715	20,51219559	9,129032135	0,024391174	37,56989288	57,49180603
	32,54545593	20,97727203	31,36538696	45,22222137	4,463413239	64,30000305	51,09900665	6,485713959	75,69696808
<i>Normalized</i>	0,395008152	0,679444425	0,581611127	0,332129263	0,578748891	0,257574437	0,000688194	1,060029568	1,622123718
	0,835607416	0,538593286	0,805309042	1,161084472	0,114598524	1,650908178	1,311971446	0,166521271	1,943526248
pac7									
<i>Raw Data</i>	9,862068176	213,1935425	20,24324036	16,0116272	5,272727966	0,419353485	3,202381134	11,375	18,07499695
	8,943180084	4,372093201	21,85416412	4,82352829	4,0338974	12,20429993	3,783130646	9,835292816	25,46376801
<i>Normalized</i>	0,411777429	8,901610424	0,84522935	0,668544018	0,220155684	0,017509542	0,133711129	0,474947868	0,754697255
	0,328856654	0,160769651	0,803616524	0,177369723	0,148333589	0,448773837	0,139112449	0,361661228	0,936348085
pac8									
<i>Raw Data</i>	5,927272797	4,90625	4,114940643	8,660713196	2,436782837	8,882354736	6,706897736	6,540538788	13,59523773
	6,142856598	5,927711487	7,666667938	15,84444427	0,433334351	13,17647171	8,17307663	5,309089661	16,96969604
<i>Normalized</i>	0,291184295	0,241025341	0,202151332	0,425467792	0,119709842	0,436356195	0,329484294	0,321311713	0,667882153
	0,211366915	0,203964079	0,263799085	0,545184678	0,014910416	0,453383556	0,281223884	0,182678186	0,583902983
pac9									
<i>Raw Data</i>	8,894737244	7,875	2,341175079	17,1111145	8,368419647	3,29032135	1,163265228	5,773586273	22,04762268
	5,80644989	3,938774109	2,599998474	7,970588684	0,233333588	5,932582855	1,870967865	1,266666412	4,099998474
<i>Normalized</i>	0,485977385	0,430262503	0,127913632	0,93489155	0,45722123	0,17977167	0,06355675	0,315448594	1,20460512
	0,645161099	0,437641568	0,288888719	0,885620965	0,025925954	0,659175873	0,207885318	0,140740712	0,455555386
pac10									
<i>Raw Data</i>	4,724136353	8,563831329	5,454544067	6,80644989	12,48648834	22,80232239	11,43119431	2,037036896	68,6842041
	4,387096405	3,620689392	7,543861389	7,580646515	3,981132507	17,73529053	5,457141876	1,020000458	40,85185242
<i>Normalized</i>	0,159334769	0,288839268	0,183969821	0,229566643	0,421141895	0,769072377	0,38554914	0,068704792	2,316567726
	0,388217874	0,320397869	0,667562679	0,670817826	0,352293785	1,569410868	0,482907103	0,090260704	3,615014994
Fold	2,48219439877	1,79453143063	1,66135099953	1,56891051951	1,47531327327	1,37209808681	1,238230556	1,20161953937	0,956071684326

Todos los experimentos están hechos por duplicado

Raw: datos brutos; normalized: datos normalizados; Fold: número de veces en que el gen está sobreexpresado

V.II. TEJIDO

	GDF11	SCGB2A1	FGF12	ATP2C1	ASRGL1	HMG2	ZNF568	ERH	MGC45438	PHF20
pac1										
<i>Raw Data</i>	25,50980377	5,361446381	26,80000305	264,8979492	46,81034851	79,7361145	5,352939606	16,62745285	6717,01416	70,171875
	31,64814758	13,88043594	42,85964966	986,0754395	235,3896179	110,3287659	117,3678131	30,72000122	9332,310547	270,0281677
<i>Normalized</i>	2,338224709	0,491429355	2,456484178	24,28050548	4,29062938	7,308600051	0,490649625	1,524069783	615,6804899	6,431943322
	1,121479313	0,491865179	1,518768526	34,94243079	8,341233442	3,909594653	4,159029342	1,088589649	330,6984459	9,568680228
pac2										
<i>Raw Data</i>	36,12000275	43,36363983	56,96226501	1481,577759	231,6407776	111,3802795	302,9610291	76,27941132	4941,428711	358,1282043
	31,26190186	8,717647552	52,90566254	504,0865479	60,63768005	66,42253876	46,44615173	58,05714417	4265,143066	125,8026276
<i>Normalized</i>	1,189580793	1,428143664	1,876002526	48,79447151	7,628887013	3,66821238	9,977757302	2,512195894	162,7416455	11,79464011
	2,404761681	0,670588273	4,069666349	38,7758883	4,664436927	5,109426058	3,572780903	4,465934167	328,0879282	9,677125197
pac3										
<i>Raw Data</i>	6,090908051	-0,660377502	9,916667938	407,8192749	26,63043213	36,36363983	28,82608795	5,907405853	819,5316162	62,91802979
	5,196079254	3,484848022	8,722221375	362,4303894	5,857143402	30,30612183	26,97727203	8,114284515	907,4177246	44,30232239
<i>Normalized</i>	0,666375776	-0,072248599	1,084933024	44,61746647	2,913502342	3,9783639	3,15371806	0,646299719	89,66085386	6,883546848
	0,627316998	0,420721912	1,053024302	43,75582681	0,707126554	3,658825133	3,256936718	0,979628746	109,5515552	5,348571208
pac4										
<i>Raw Data</i>	113	277,5	558,6913452	3175,867432	1300,04541	149,5066681	418,7391357	99,30882263	10366,54199	532,9466553
	25,17391205	169,4305573	334,8125	2141,414795	206,1415863	80,31428528	255,6080933	79,57142639	6376,336426	331,2236938
<i>Normalized</i>	2,613801685	6,418849271	12,923083	73,4609526	30,07133525	3,458237	9,685850076	2,297111221	239,7883622	12,32758288
	0,936300351	6,301678099	12,45277495	79,64623933	7,667081669	2,987151673	9,506903296	2,959522315	237,1568639	12,31929548
pac5										
<i>Raw Data</i>	14,88888931	1,392158508	8,15625	704,9898071	19,12121582	46,62294769	29,79244995	25,95237732	864,706665	37,06349182
	11,91666794	0,310344696	8,831459045	619	4,339286804	47,59648895	23,2156868	4,886363983	786,1428833	68,20967865
<i>Normalized</i>	1,774635073	0,165934024	0,972158971	84,02907776	2,27909413	5,557077929	3,551018849	3,093313279	103,0660342	4,417668177
	1,377464559	0,035873184	1,020840885	71,55108848	0,50158432	5,501745706	2,683534184	0,564821747	90,87137156	7,884453557
pac6										
<i>Raw Data</i>	22,49090958	3,933334351	18,96491241	292,931366	49,96511841	60,09859467	65,41025543	27,88524628	5194,782227	71,16417694
	33,13793182	26,59574127	38,41304016	2039,130859	456,8974304	123,0800018	445,1891785	100,5585632	6731,330566	526,9078979
<i>Normalized</i>	2,089423173	0,365409852	1,761855266	27,21355408	4,641798762	5,583206669	6,076664128	2,590561291	482,5993508	6,611207958
	0,907667988	0,728473433	1,052156395	55,8530271	12,51469686	3,371235665	12,19400076	2,754359845	184,375214	14,4323259
pac7										
<i>Raw Data</i>	34,1875	6,804595947	37,03636169	1162,434814	81,21875	37	101,6865692	37,08695984	8580,59668	142,3548431
	32,52631378	4,071430206	45,80850983	1661,067383	222,6164246	46,01754761	229,5396729	49,31578827	7782,962402	256,0161438
<i>Normalized</i>	2,941287786	0,58542669	3,186386787	100,0089308	6,987574914	3,183258445	8,748503519	3,190739949	738,2231579	12,24735829
	1,55086778	0,194127437	2,184168252	79,20036377	10,61444105	2,194135258	10,94454432	2,351396705	371,0947911	12,20695315
pac8										
<i>Raw Data</i>	7,28125	9,194442749	3,586208344	12,16666794	79,81944275	31,98181915	8,685394287	4,831325531	36,93617249	81,33823395
	6,757575989	5,366664886	5,912086487	30,60655975	43,52307892	43,25396729	7,033332825	0,366664886	27,83333588	53,1875
<i>Normalized</i>	1,161553764	1,466759085	0,572095973	1,940908352	6,377326862	5,101953981	0,693936169	0,386007983	2,951086062	6,498673586
	0,713409846	0,566568778	0,624149949	3,231191348	4,594812262	4,566401647	1,185248184	0,038709493	2,938416954	5,615103142
pac9										
<i>Raw Data</i>	11,05263138	8,866664886	5,617977142	32,26229858	38,77777863	23,77358246	3,935482025	5,911766052	15,91891861	26,15555573
	5,885715485	6,120483398	1,099998474	14,07143021	4,540229797	14,03125	1,428569794	5,296703339	10,92307663	58,75806427
<i>Normalized</i>	1,511609744	1,212646707	0,768340923	4,412343381	4,449908466	4,006293481	0,538234993	0,808520873	2,177146026	3,577156565
	1,177143097	1,22409668	0,219999695	2,814286041	0,908045959	2,80625	0,285713959	1,059340668	2,184615326	4,223943334
pac10										
<i>Raw Data</i>	8,266666412	0,689655304	12	229,5384521	8,732559204	31,0192337	22,10526276	2,10843277	7,059524536	38,14814758
	0,92307663	7,888889313	2,632183075	30,83516693	6,215686798	31,0192337	37,93877563	2,10843277	6,342857361	6,333332062
<i>Normalized</i>	0,735776577	0,049577279	1,068062806	16,50083996	0,777243474	8,631438944	1,589081914	0,586694336	0,628334632	3,395384796
	0,256856106	2,1951692	0,732433551	1,729442257	1,729582413	8,631438944	2,458675828	0,586694336	1,764969005	1,762318487
Fold	5,3718066153	5,3694113031	3,6341212367	3,3702788064	2,5001201036	2,4801001789	1,6173091054	1,4878678391	1,2940468450	1,021630659:

Todos los experimentos están hechos por duplicado

Raw: datos brutos; *normalized*: datos normalizados; *Fold*: número de veces en que el gen está sobreexpresado

Anexo VI. GENES RELACIONADOS HMNG2

Los genes que aparecen en la Fig. 31 son los siguientes:

CREB1

Camp Responsive Element Binding Protein 1

Factor de transcripción que actúa mediante fosforilación. Interviene de diferentes procesos celulares, incluyendo la sincronización del ritmo circadiano y la diferenciación de los adipocitos

EP300

E1A Binding Protein P300

Funciona como una acetiltransferasa de histonas y regula la transcripción remodelando la cromatina. También actúa en proteínas no histonas.

HIF1A

Hypoxia Inducible Factor 1, Alpha Subunit (Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor)

Es un regulador transcripcional de la respuesta adaptativa a la hipoxia. Juega un papel esencial en la vascularización embriológica, en la angiogénesis tumoral y en la fisiopatología de la enfermedad isquémica.

HMGN1

High mobility group nucleosome binding domain 1

Se une al lado interno del nucleosoma alterando la interacción entre el ADN y el octámero de histonas. Podría influir en el proceso que mantiene a los genes transcribibles en una conformación única de la cromatina

HMGN3

High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 3

Se une al nucleosoma regulando la estructura de la cromatina. Así que influye en la transcripción, la replicación y la reparación del ADN. También afecta a insulina y glucagón, modulando la expresión de los genes pancreáticos que regulan la secreción de insulina.

HMGNS

High Mobility Group Nucleosome Binding Domain 5

Fundamentalmente se une a la eucromatina y se piensa que modula la transcripción de forma similar al resto de las proteínas HMGN.

HSP90AA1

Heat Shock Protein 90kda Alpha (Cytosolic), Class A Member 1

Promueve la maduración, el mantenimiento estructural y la regulación apropiada de dianas específicas que intervienen en el control del ciclo celular y en las señales de transducción.

KAT2B

K(Lysine) Acetyltransferase 2B

Descrita en el texto. Funciona como una acetiltransferasa de histonas para promover la activación de la transcripción.

PRKCA

Protein Kinase C, Alpha o Calcium-Activated, Phospholipid- And Diacylglycerol (DAG)-Dependent Serine/Threonine-Protein Kinase

Interviene en la regulación positiva y negativa de la proliferación celular, apoptosis, diferenciación, migración y adhesión, génesis tumoral, hipertrofia cardíaca, angiogénesis, función plaquetaria e inflamación, bien por fosforilación directa de proteínas diana, bien activando cascadas de señalización.

PSMD4

Proteasome (Prosome, Macropain) 26S Subunit, Non-Atpase, 4

Probablemente interviene en la destrucción de conjugados con ubiquitina. Modula la secreción de los fluidos intestinales.

RANBP2

RAN Binding Protein 2 o E3 SUMO-protein ligase

Facilita la conjugación de SUMO1 y SUMO2. Se considera un factor transportador.

RANGAP1

Ran GTPase activating protein 1

Activador tipo GTPasa de Ran, proteína nuclear relacionada con Ras.

SRY

Sex Determining Region Y

Regulador transcripcional que controla el cambio hacia el sexo masculino.

SUMO1

SMT3 Suppressor Of Mif Two 3 Homolog 1 (S. Cerevisiae)

Proteína relacionada con la ubiquitina. Se une covalentemente a proteínas modificándolas. A través de este mecanismo juega un papel crucial en numerosos procesos celulares: transporte nuclear, replicación y reparación de ADN, mitosis y señales de transducción.

SUMO2

SMT3 Suppressor Of Mif Two 3 Homolog 2 (S. Cerevisiae)

Isoforma de la anterior.

TP53

Tumor Protein P53

Supresor tumoral que actúa deteniendo el crecimiento o mediante apoptosis. Interviene en el ciclo celular, inhibiendo la división celular controlando los genes que intervienen en este proceso.

UBA2

Ubiquitin-Like Modifier Activating Enzyme 2

Este heterodímero actúa como una ligasa para SUMO1, SUMO2, SUMO3, y probablemente SUMO4. Media la activación de esta familia de proteínas.

UBC

Ubiquitin C

La proteína se un precursor poliubiquitina. La conjugación de los monómeros o polímeros de ubiquitina provocan varios efectos en las células, en función de los residuos con los que se conjuga. La ubiquitinización se ha relacionado con la degradación proteica, la reparación del ADN, la regulación del ciclo celular, la modificación de las quinasas, la endocitosis, y la regulación de otras vías de señalización celular.

UBE2I

Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2I

Actúa como factor catalítico de los complejos formados por SUMO1, SUMO2, SUMO3 y SUMO4

ZNF219

Zinc Finger Protein 219

Podría intervenir en la regulación de la transcripción.

Siempre parece imposible hasta que se hace.

Atribuida a Nelson Mandela.

GRANADA, 11 DE NOVIEMBRE DE 2015