



**Universidad Autónoma de Sinaloa**  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas  
*Doctorado en Ciencias Biomédicas*



**“Análisis de mutaciones y perfil de expresión de genes implicados en el desarrollo de neoplasias en tiroides”**

**TESIS**

Que presenta

**Alejandra Paola Martínez Camberos**

Como requisito para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Directores

**Dr. José Geovanni Romero Quintana**

**Dra. Noemí García Magallanes**

Culiacán Rosales, Sinaloa, México. Agosto de 2022



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



El presente proyecto de investigación fue realizado en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la unidad académica de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Sinaloa.

## **DEDICATORIAS**

*Con el más grande cariño y amor a mis padres, por darme las bases para lograr todo lo que me proponga, por inculcarme el esfuerzo y dedicación, respetar mis decisiones y acompañarme siempre.*

*Con todo el amor a mi esposo, porque tu comprensión, compañía y apoyo incondicional me impulsaron a seguir adelante.*

*Y a las personas más especiales que me dejan estos años, con quienes compartí cada paso de este proceso, esto es posible gracias a la trinidad que formamos. Me quedó con su valiosa amistad y un gran equipo.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradezco a mis tutores Dr. José Geovanni Romero Quintana y Dra. Noemí García Magallanes, por su apoyo, comprensión, paciencia y accesibilidad brindada en la realización de este trabajo. Gracias Dra. Noemí por todos estos años de trabajo y oportunidades que hoy vemos culminados.

Un agradecimiento especial a la Dra. Eliakym Arámbula Meraz, de quien siempre pude contar con su asesoría y apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

A la Universidad Politécnica de Sinaloa, quien me vio crecer, y me brindó los espacios necesarios para realizar el proyecto durante el periodo de agosto de 2018 a julio de 2022.

Así mismo, reconozco ampliamente la colaboración del gabinete diagnóstico Álvarez & Arrazola Radiólogos, principalmente del Dr. Marco Antonio Álvarez Arrazola, Lic. Yolanda Yhamylee Gálvez Vázquez, Lic. Fernando Adrián Coronado Nieves y todo el equipo de trabajo del gabinete.

A los pacientes que desinteresadamente aportaron muestras para esta investigación. Y a todas aquellas personas que contribuyeron de alguna u otra forma a la realización de este estudio.

A CONACyT por la beca brindada durante mis estudios.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS .....	VI
ÍNDICE DE CUADROS .....	VII
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. Glándula tiroides .....	5
4.2. Nódulo tiroideo.....	7
4.2.1. Detección y diagnóstico de nódulos tiroideos.....	11
4.3. Cáncer de tiroides.....	16
4.3.1. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides.....	18
4.3.2. Perfiles de expresión de ARNm implicados en neoplasias en tiroides .....	23
4.3.2.1. Claudina 1.....	23
4.3.2.2. Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 .....	24
4.3.2.3. Queratina 19 .....	26
4.4. Antecedentes .....	26
4.4.1. Rutas de señalización en cáncer de tiroides .....	28
V. JUSTIFICACIÓN.....	33
VI. HIPÓTESIS .....	34
VII. OBJETIVOS.....	35
7.1. Objetivo general .....	35
7.2. Objetivos específicos.....	35
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	36
8.1. Tipo de estudio .....	36
8.2. Población .....	36
8.2.1. Tamaño de la muestra .....	36
8.2.2. Recolección de datos .....	37
8.3. Grupos de estudio.....	37
8.3.1. Criterios de inclusión .....	37

8.3.2.	Criterios de exclusión.....	37
8.3.3.	Criterios de eliminación .....	38
8.4.	Diseño metodológico.....	38
8.4.1.	Obtención de la muestra.....	38
8.4.1.1.	Extracción de ácidos nucleicos de PAAF.....	38
8.4.1.2.	Cuantificación y grado de pureza de ácidos nucleicos.....	39
8.4.2.	Análisis molecular.....	39
8.4.2.1.	Genotipificación para identificación de mutaciones .....	40
8.4.2.2.	Análisis de expresión relativa.....	40
8.5.	Análisis estadístico.....	45
IX.	RESULTADOS.....	46
9.1.	Características clínico-patológicas.....	46
9.2.	Expresión relativa de ARNm .....	50
9.2.1.	Análisis de curva ROC.....	54
9.3.	Análisis de mutaciones.....	57
9.4.	Relación entre el perfil de expresión y genotipo.....	64
X.	DISCUSIÓN.....	68
10.1.	Perfil de expresión.....	70
10.2.	Mutaciones genéticas .....	74
10.3.	Relación <i>BRAFV600E</i> y sobre expresión de <i>CLDN1</i> , <i>TIMP1</i> y <i>KRT19</i> .....	76
XI.	CONCLUSIONES.....	79
11.1.	Conclusión general.....	79
11.2.	Conclusiones específicas.....	79
XII.	LIMITACIONES DEL PROYECTO.....	81
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	82
XIV.	ANEXOS.....	94
14.1.	Perspectivas.....	94
14.2.	Carta de consentimiento informado .....	95
14.3.	Cuestionario.....	96
14.4.	Participación en publicaciones y congresos .....	98
XV.	SIGLAS Y ABREVIACIONES.....	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la glándula tiroides. ....	6
Figura 2. Diagrama de seguimiento para un nódulo tiroideo.....	9
Figura 3. Punción por aspiración con aguja fina (PAAF) de tiroides. ....	12
Figura 4. Vías de señalización en cáncer de tiroides. ....	22
Figura 5. Rutas de señalización en cáncer de tiroides.....	32
Figura 6. Expresión relativa de ARNm.....	51
Figura 7. Análisis de correlación entre diferentes expresiones relativas de ARNm en muestras de nódulos tiroideos.....	52
Figura 8. Curva ROC .....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sistema Bethesda de categorías diagnósticas.....	14
Cuadro 2. Mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de neoplasias en tiroides .....	42
Cuadro 3. Genes diana para análisis de expresión .....	43
Cuadro 4. Características epidemiológicas de la población de estudio .....	48
Cuadro 5. Características clínicas de los nódulos tiroideos entre grupos. ....	49
Cuadro 6. Correlación de la expresión de CLDN1, TIMP1 y KRT19 con la edad de los pacientes. ....	53
Cuadro 7. Parámetros de precisión de diagnóstico de CLDN1, TIMP1 y KRT19. ....	56
Cuadro 8. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones en los genes BRAF, PIK3CA y AKT1 en población de estudio. ....	58
Cuadro 9. Frecuencias genotípicas y alélica de la mutación BRAFV600E entre los grupos de estudio.....	59
Cuadro 10. Frecuencias genotípicas y alélicas de BRAFV600E de acuerdo con su edad y sexo.....	60
Cuadro 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de BRAFV600E en pacientes de acuerdo con sus antecedentes de enfermedad funcional de tiroides. ....	62
Cuadro 12. Frecuencias genotípicas y alélicas de BRAFV600E en pacientes de acuerdo con sus características clínicas y antecedentes heredofamiliares de cáncer. ....	63

Cuadro 13. Diferencia de medias de expresión de CLDN1, TIMP1 y KRT19 con las frecuencias genotípicas y alélica de BRAF. ....66

Cuadro 14. Asociaciones genotípicas y alélica de BRAF con el punto de corte para la sobreexpresión de CLDN1, TIMP1 y KRT19 .....67

## I. RESUMEN

**Antecedentes.** Los nódulos tiroideos (NT) son en la mayoría de los casos, los primeros indicadores de cáncer de tiroides (CaT). La evaluación citológica es el principal análisis para distinguir NT benignos de malignos, pero el riesgo de resultados indeterminados es alrededor del 30%. Mutaciones somáticas en genes moduladores de las vías MAPK y P1K3/AKT tienen un papel crucial en CaT. Así mismo, la interacción de estas vías con la desregulación de la expresión de genes que facilitan la tumorigénesis podría ser de utilidad para la toma de decisiones que tienen que ver con la extirpación quirúrgica y el grado resección inicial.

**Objetivo.** Identificar mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1* y analizar el perfil de expresión en *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* en neoplasias malignas tiroideas de población mestiza mexicana.

**Materiales y métodos.** Se analizó la expresión relativa de ARNm en 97 citologías de NT (CaT = 48) por RT-qPCR, así como la genotipificación de las mutaciones rs113488022 (*BRAF*), rs121913273 (*PIK3CA*) y rs121434592 (*AKT1*) por qPCR utilizando sondas específicas.

**Resultados.** Se identificó la sobreexpresión de *CLDN1* ( $41.315 \pm 0.554$ ), *KRT19* ( $11.640 \pm 0.424$ ) y *TIMP1* ( $4.465 \pm 0.301$ ) en pacientes con CaT ( $p < 0.001$ ). No se identificaron mutaciones en *PIK3CA* y *AKT1*. La mutación rs113488022 de *BRAF* (*BRAFV600E*) se observa solo en pacientes con CaT y está asociada con la expresión de los transcritos analizados ( $p < 0.05$ ).

**Conclusión.** *CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1* se sobre expresan en CaT con alto valor predictivo negativo para descartar cáncer. La mutación *BRAFV600E* se identificó exclusivamente en CaT, y está fuertemente asociada con la sobreexpresión de *TIMP1*, lo que podría indicar una conexión biológica entre ellos, que puede ser explicada vía MAPK.

(Palabras clave: *Nódulo tiroideo, Neoplasia en tiroides, Mutación, Expresión.*)

## II. ABSTRACT

**Background.** Thyroid nodules (TN) are, in most cases, the first indicators of thyroid cancer (TC). Cytological evaluation is the main test to distinguish benign from malignant TN, but the risk of indeterminate results is around 30%. Somatic mutations in genes that modulate the MAPK and PIK3/AKT pathways play a crucial role in TC. Also, the interaction of these pathways with the deregulation of the expression of genes that facilitate tumorigenesis could be useful for decision-making related to surgical removal and the degree of initial resection.

**Objective.** Identify mutations in the *BRAF*, *PIK3CA*, and *AKT1* genes and analyze the expression profile in *CLDN1*, *TIMP1*, and *KRT19* in malignant thyroid neoplasms of the Mexican mestizo population.

**Materials and methods.** Relative mRNA expression in 97 TN smears (TC = 48) was analyzed by RT-qPCR, as well as genotyping of rs113488022 (*BRAF*), rs121913273 (*PIK3CA*), and rs121434592 (*AKT1*) mutations by qPCR using specific probes.

**Results.** Overexpression of *CLDN1* ( $41.315 \pm 0.554$ ), *KRT19* ( $11.640 \pm 0.424$ ), and *TIMP1* ( $4.465 \pm 0.301$ ) was identified in patients with TC ( $p < 0.001$ ). Mutations in *PIK3CA* and *AKT1* were not identified. The *BRAF* mutation rs113488022 (*BRAFV600E*) is observed only in patients with TC and is associated with the expression of the analyzed transcripts ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion.** *CLDN1*, *KRT19*, and *TIMP1* are overexpressed in TC with a high negative predictive value to rule out cancer. The *BRAFV600E* mutation was identified exclusively in TC and is strongly associated with *TIMP1* overexpression, which could indicate a biological connection between them, which can be explained via MAPK.

(Keywords: *Thyroid nodule, Thyroid neoplasm, Mutation, Expression.*)

### III. INTRODUCCIÓN

La prevalencia del cáncer de tiroides (CaT) se ha incrementado en las últimas décadas, alcanzando hasta el 7.4% de todas las neoplasias malignas en México (International Agency for Research on Cancer, 2022). Los nódulos tiroideos son en la mayoría de los casos, los primeros indicadores de CaT (Al Dawish, Alwin Robert, Thabet, & Braham, 2018), y las biopsias por aspiración con aguja fina (PAAF) guiadas por ultrasonido de alta resolución han aumentado significativamente su identificación (Sadowski et al., 2019). El Sistema de datos e informes de imágenes tiroideas (TI-RADS) es un método de clasificación estandarizado para evaluar los nódulos tiroideos en función de las características de las imágenes; desempeña un papel importante en el diagnóstico, el seguimiento y las decisiones terapéuticas de la enfermedad tiroidea; sin embargo, no es suficiente para clasificar los casos con CaT (Al Dawish et al., 2018; Tan et al., 2019). La evaluación citológica del nódulo es actualmente el principal análisis para distinguir nódulos benignos de malignos, aunque también existe el riesgo de resultados indeterminados, por lo que aún se necesita un diagnóstico certero para evitar cirugías innecesarias en pacientes con nódulos benignos (Cibas & Ali, 2017).

Los tumores de tiroides son el resultado de cambios en los patrones de expresión génica que son importantes para los procesos reguladores celulares como el crecimiento, la diferenciación, la duplicación de ADN, la reparación de errores de apareamiento y la apoptosis (Agretti et al., 2022). El análisis del perfil de expresión de ARN mensajero en PAAF conduce a la identificación de firmas fenotípicas asociadas con lesiones específicas (Flanagan et al., 2008). *KRT19*, *TIMP1* y *CLDN1* son biomarcadores epiteliales altamente desregulados en el proceso de tumorigénesis (Abdullah et al., 2019; Flanagan et al., 2008; Gowrikumar et al., 2021; Sun et al., 2021), principalmente en la regulación de la proliferación celular, la invasión y la

metástasis (Huang et al., 2014; Ju et al., 2015; Song et al., 2016); además, se plantea la hipótesis de que las mutaciones somáticas en *BRAF*, *AKT1* y *PIK3CA*, activadores de la vía de señalización MAPK y FAK-PI3K/Akt, son un evento temprano independiente en común en la regulación positiva de estos genes (Caruso et al., 2014; Song et al., 2016; X. Wang et al., 2019, p. 19).

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Glándula tiroides

La glándula tiroides (GT) se compone de dos lóbulos que se sitúan a ambos lados de la parte superior de la tráquea, unidos por un istmo, que a veces presenta un lóbulo piramidal que surge del istmo hacia la laringe (Figura 1). A la glándula la conforman numerosos folículos, cada uno tiene una cavidad central rellena de una sustancia coloide y la rodea una monocapa de células epiteliales cuboides llamados tirocitos (ACS, 2019; ATA, 2018).

Es una de las glándulas endocrinas más grandes y la única que posee la capacidad de almacenar grandes cantidades de hormona en un sitio extracelular dentro de un material proteico, que se llama coloide tiroideo. Su función es producir hormonas tiroideas, que se secretan en la sangre y luego se transportan a todos los tejidos del cuerpo. La hormona tiroidea ayuda al cuerpo a usar energía, mantenerse caliente y mantener el cerebro, el corazón, los músculos y otros órganos funcionando correctamente Las hormonas tiroideas son las únicas que requieren de un oligoelemento, el yodo, para su síntesis (ACS, 2019; ATA, 2018; Santiago-Peña & Santiago-Peña, 2020).

Las dos hormonas más importantes secretadas son T4 y T3, tiroxina y triyodotironina, respectivamente. Su secreción la controla la hormona estimulante de tiroides (TSH, por sus siglas en inglés), la cual secreta la adenohipófisis. Las hormonas tiroideas actúan sobre múltiples tejidos y son esenciales para el desarrollo normal, el crecimiento y el metabolismo, en particular para el sistema nervioso y el corazón, el crecimiento normal y la maduración esquelética. Una ausencia o secreción excesiva produce alteraciones en el metabolismo importantes (Santiago-Peña & Santiago-Peña, 2020).

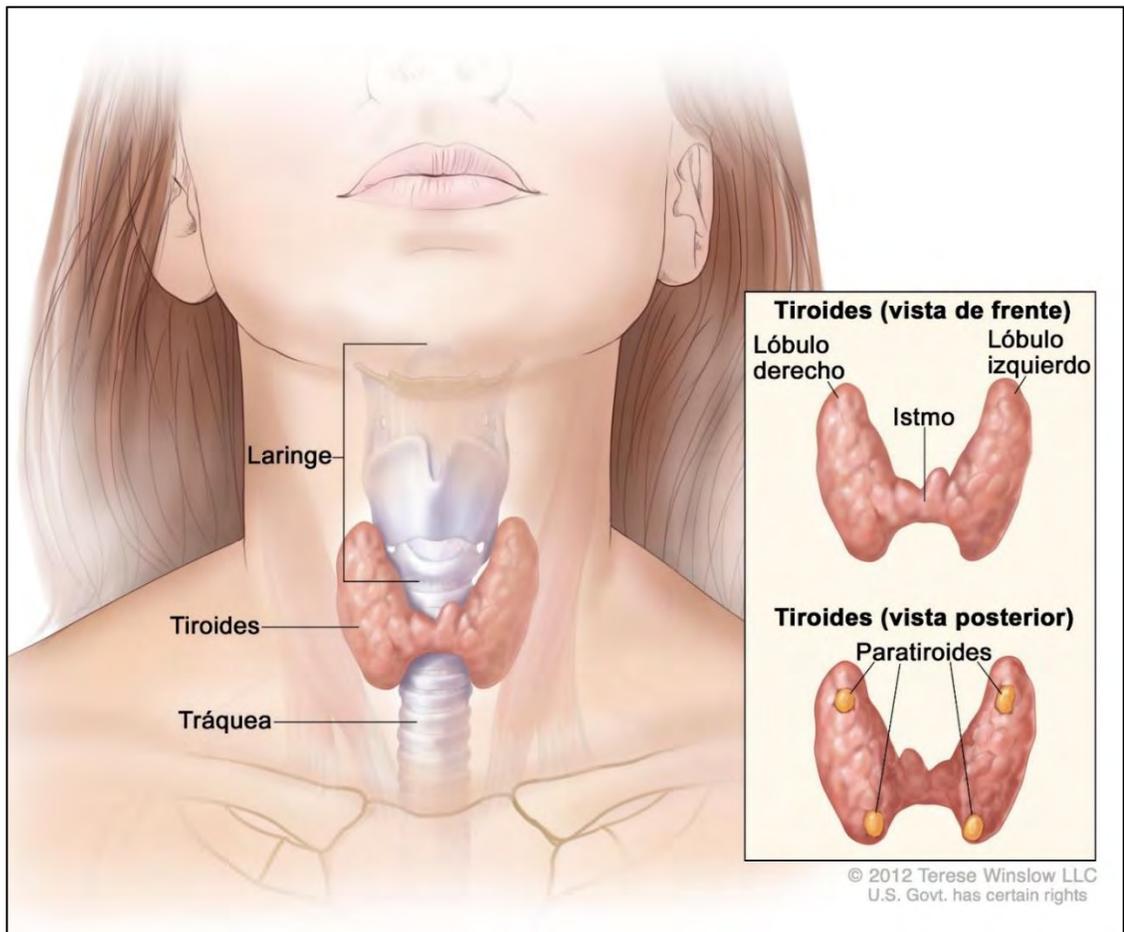


Figura 1. Anatomía de la glándula tiroides.

La tiroides es una glándula endocrina que normalmente se encuentra en la parte frontal inferior del cuello delante de la tráquea. Los dos lóbulos están unidos por un puente, el istmo, el cual en ocasiones tiene el lóbulo piramidal. Tomado de Winslow, T. (2012). Anatomy of the Thyroid and Parathyroid Glands. National Cancer Institute.

La GT tiene dos tipos principales de células; las células foliculares usan yodo de la sangre para producir la hormona tiroidea que ayuda a regular el metabolismo de una persona. Demasiada hormona tiroidea (hipertiroidismo) puede causar que una persona tenga palpitaciones aceleradas o irregulares, dificultad para dormir, intranquilidad, hambre, pérdida de peso y una sensación de calor. Por otra parte, muy poca hormona (hipotiroidismo) causa que una persona sea más lenta, se sienta cansada y gane peso. La cantidad de hormona tiroidea segregada por la GT es regulada por la glándula pituitaria, en la base del cerebro, que produce TSH (Stegmann, Villa, & Marrero, 2018).

El otro tipo celular más importante en esta glándula son las células C (también llamadas células parafoliculares) que producen calcitonina, una hormona que ayuda a controlar cómo el cuerpo usa el calcio. Otras células menos comunes incluyen las células del sistema inmunitario (linfocitos) y las células de apoyo (estromales) (ACS, 2019; Stegmann et al., 2018).

En la GT se pueden originar muchos tipos de crecimientos y tumores, siendo la mayoría de estos benignos (no cancerosos), pero otros pueden ser malignos, es decir, se pueden propagar a los tejidos cercanos y a otras partes del cuerpo. El término médico para una GT anormalmente agrandada es bocio. Algunos bocios son difusos, es decir que toda la glándula está agrandada. Otros bocios son nodulares, lo que significa que la glándula está agrandada y tiene uno o más nódulos (protuberancias) (ACS, 2019).

#### **4.2. Nódulo tiroideo**

Un nódulo tiroideo (NT) se refiere a un crecimiento anormal de células tiroideas que forma una lesión discreta dentro de la GT diferente del parénquima circundante. Algunas lesiones palpables pueden no corresponder a anomalías radiológicas distintas (Recio-Córdova et al., 2020).

En general, solo deben evaluarse los nódulos mayores a 1cm, ya que tienen un mayor potencial de ser cánceres clínicamente significativos. Ocasionalmente, puede haber nódulos menores a 1cm que requieren una evaluación adicional debido a síntomas clínicos (Figura 2). Esto sigue siendo muy improbable, y dadas las consideraciones desfavorables de costo/beneficio, los intentos de diagnosticar y tratar todos esos cánceres de tiroides pequeños en un esfuerzo por evitar resultados extremadamente raros se consideran más dañinos que beneficiosos. La estrategia clínica reconoce que la mayoría de los NT son benignos, pero una pequeña proporción contienen cáncer de tiroides (CaT), aun así, muchos CaT presentan un riesgo mínimo para la salud humana y pueden tratarse de manera efectiva. Con el fin de diagnosticar y tratar el CaT en la etapa más temprana, la mayoría de los NT necesitan algún tipo de evaluación; estos pueden ser descubiertos por la palpación durante un examen físico general o con estudios imagenológicos realizados para evaluaciones médicas, tales como el ultrasonido, tomografía axial computarizada, resonancia magnética o pet-scan (Recio-Córdova et al., 2020; Tamhane & Gharib, 2016).

Patológicamente, se clasifican en 5 tipos con características histológicas distintas: nódulos hiperplásicos, neoplásicos, coloides, quísticos y tiroideos. Es fundamental para su evaluación médica diferenciar la enfermedad benigna de la maligna. Los nódulos que aumentan de tamaño son sospechosos de malignidad, pero es probable que las lesiones con un aumento rápido de tamaño durante unas pocas horas sean hemorrágicas. Los cambios hemorrágicos son más comunes en los nódulos malignos que benignos. Un bocio multinodular benigno crece en tamaño a lo largo de los años, pero la malignidad generalmente crece en semanas (Zamora, Khare, & Cassaro, 2022).

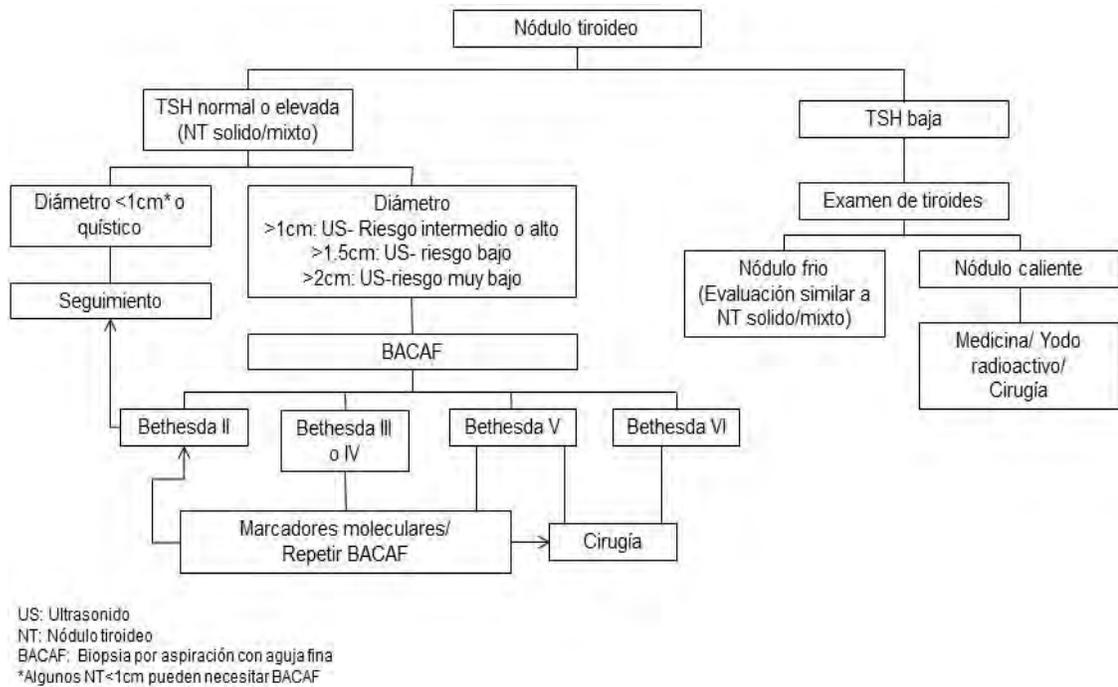


Figura 2. Diagrama de seguimiento para un nódulo tiroideo.

Flujo de evaluación de un nódulo tiroideo según sus características clínicas. Basado de Tamhane, S, & Gharib, H. (2016). Thyroid nodule update on diagnosis and management.

Los NT pueden ser causados por muchos trastornos: benigno (nódulo coloide, tiroiditis de Hashimoto, quiste simple o hemorrágico, adenoma folicular y tiroiditis subaguda) y maligno (cáncer papilar, cáncer folicular, cáncer de células de Hürthle, cáncer anaplásico, cáncer medular, linfoma tiroideo y metástasis de otros tumores, los más comunes son renales, pulmonares y de cabeza-cuello) (Tamhane & Gharib, 2016).

Aunque el CaT es la causa más importante del NT, el cáncer sólo ocurre en menos del 10% de los nódulos. Los tipos de NT no cancerosos más comunes son los llamados nódulos coloides y las neoplasias foliculares. Si un nódulo produce hormona tiroidea independiente de las necesidades del cuerpo, se le llama nódulo autónomo y en ocasiones puede conducir a hipertiroidismo. Si el nódulo está lleno de líquido o sangre, se le llama quiste de la tiroides. No se conoce la causa de los NT no cancerosos (Zamora et al., 2022).

En los últimos años el desarrollo de las nuevas técnicas de ultrasonido ha aumentado la frecuencia de su diagnóstico y por ende su incidencia, por ello resulta muy difícil precisar la prevalencia de malignidad entre los nódulos, porque dependiendo del método diagnóstico la tasa varía ampliamente. Por tal razón, es necesario un estudio juicioso en todo paciente con un NT con el fin de evitar estudios invasivos innecesarios y detectar aquellos con riesgo aumentado de neoplasia (Ríos et al., 2018).

Se han estudiado diversos parámetros clínicos, ecográficos y citológicos, como edad, sexo, nodularidad, nivel de TSH, autoinmunidad tiroidea y hallazgos ecográficos para mejorar la precisión diagnóstica y diferenciar entre nódulos benignos y malignos. La TSH es un factor de riesgo independiente que predice malignidad en un NT, ya que el riesgo de malignidad aumenta en paralelo con el nivel de TSH sérica (Tam et al., 2018; Zamora et al., 2022).

La importancia clínica de los NT se relaciona con la exclusión de malignidad, evaluar su estado funcional y evaluar la presencia de síntomas de presión. Los NT incidentales están siendo diagnosticados con mayor frecuencia en los últimos años con el uso de técnicas de imagen más nueva y altamente sensible, aumentando su prevalencia hasta el 67% en población general, donde la malignidad es del 3-7%, sin embargo, la alta prevalencia requiere que los médicos utilicen enfoques basados en la evidencia para su evaluación y tratamiento (Youssef, Abd-Elmonem, Ghazy, El Shafei, & Zahran, 2020).

#### **4.2.1. Detección y diagnóstico de nódulos tiroideos**

La mayoría de los pacientes con NT no tienen ningún síntoma y se descubren durante el examen del cuello que se hace por otra razón, por ejemplo, durante el examen físico de rutina o cuando el paciente nota un bulto en el cuello al mirarse en el espejo. Algunos pacientes con NT se pueden quejar de dolor en el cuello, la mandíbula o el oído. Si el nódulo es suficientemente grande, puede causar dificultad para tragar o dificultad respiratoria si ejerce presión en el tubo respiratorio. Raras veces, se puede producir ronquera si el nódulo irrita el nervio que va a la laringe (ATA, 2018).

Una vez que se descubre el nódulo, se determina si éste es el único problema o si toda la glándula ha sido afectada por una afección más generalizada tal como el hipertiroidismo o el hipotiroidismo. Los exámenes de laboratorio iniciales pueden incluir pruebas de sangre para medir la cantidad de T4 y TSH para saber si la glándula tiroidea está funcionando normalmente. La mayoría de los pacientes con NT suelen tener pruebas de función tiroidea normales. El siguiente paso puede consistir en una gammagrafía tiroidea, un ultrasonido de tiroidea y/o una biopsia de punción por aspiración con aguja fina (PAAF) de tiroidea (Figura 3) (Recio-Córdova et al., 2020).

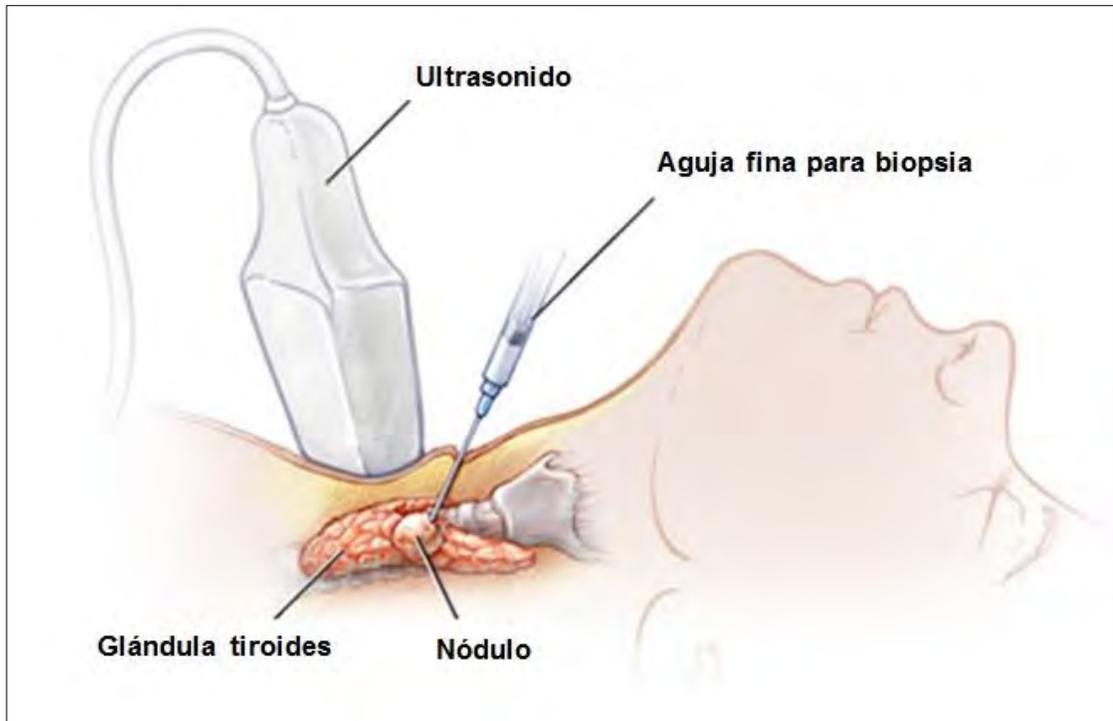


Figura 3. Punción por aspiración con aguja fina (PAAF) de tiroides.

Una PAAF de tiroides guiada por ultrasonido utiliza ondas sonoras para ayudar a colocar una aguja fina (No. 23) adentro de un nódulo o anomalía y así extraer una muestra de tejido.

Modificado de Mayo foundation for medical education and research. (2017). Needle biopsy.

Las características ecográficas junto con los antecedentes familiares y personales del paciente son elementos diagnósticos importantes para poder seleccionar el nódulo que se debe biopsiar (Pimienta Concepción et al., 2017). La ecografía tiroidea permite definir una serie de características de los nódulos: tamaño, forma, márgenes, contenido, ecogenicidad, calcificaciones, vascularización, adenopatías. La combinación de los siguientes signos: estructura sólida, presencia de microcalcificaciones, marcadamente hipoeoico, mal delimitado, más ancho que alto en proyección anteroposterior, son características ecográficas bien conocidas de malignidad en los NT (Recio-Córdova et al., 2020).

La PAAF guiada por ecografía y su posterior análisis citológico representa el estudio más seguro, fiable y costo-efectivo para distinguir el nódulo benigno del maligno. Se encuentra un resultado positivo para cáncer en aproximadamente el 5% de las biopsias, pero otro 10% de los nódulos pueden ser sospechosos de cáncer; todos estos nódulos requieren cirugía. Sin embargo, la tasa de PAAF no diagnóstica varía del 15-20%. Estos nódulos se pueden volver a evaluar con una segunda biopsia o es posible que sea necesario extirparlos mediante cirugía (ATA, 2018).

La clasificación universalmente empleada para informar los resultados de la citología tiroidea es la de comunicado en 2017 como “The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytology” (Cuadro 1). Este sistema incluye seis categorías diagnósticas, cada una con determinado riesgo de malignidad, lo que facilita la toma de decisiones terapéuticas. Las categorías de Bethesda III, IV y V se consideran “indeterminadas” aunque realmente son las categorías III y IV las que representan un problema, ya que la citología no alcanza para predecir cáncer y hasta en un 70% de las veces la cirugía se realiza en forma innecesaria, ya que el nódulo operado resulta benigno (Haugen, 2017; Recio-Córdova et al., 2020).

Cuadro 1. Sistema Bethesda de categorías diagnósticas

	<b>Bethesda</b>	<b>Riesgo de malignidad</b>	<b>Conducta</b>
<b>I</b>	Insuficiente o no diagnóstico	5-10%	Repetir PAAF
<b>II</b>	Benigno	0-3%	Seguimiento
<b>III</b>	Atipia de significado incierto o lesión folicular de significado incierto	6-30%	Repetir PAAF / Estudio genético / Lobectomía
<b>IV</b>	Sospecha de neoplasia folicular o neoplasia folicular	10-40%	Lobectomía / Estudio genético
<b>V</b>	Sospechoso de malignidad	45-75%	Tiroidectomía o lobectomía
<b>VI</b>	Maligno	94-99%	Tiroidectomía o lobectomía

Basado de Haugen, B. R. (2017). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed?

La descripción de cada categoría se describe a continuación: 1) No diagnóstico o Insatisfactorio: no existe el número de grupos celulares y/o de células, suficientes para hacer un diagnóstico citológico. 2) Benigno: hace referencia a algunos quistes, tiroiditis agudas o supurativas, tiroiditis transitorias, tiroiditis crónicas y los adenomas que incluyen diferentes subtipos: macrofoliculares, microfolicular, embrionario, de células de Hürthle, adenomas atípicos, adenomas con papilas y adenomas en anillo de sello. 3) Atipia de significado incierto o lesión folicular de significado incierto: hace referencia al resultado que se obtiene de una muestra suficiente para diagnóstico, con células foliculares con algunas anomalías nucleares propias de los carcinomas, pero también presentes en tejidos tiroideos hiperfuncionantes. 4) Sospecha de neoplasia folicular o neoplasia folicular: aspirados ricos en células foliculares, en cuyo caso la PAAF, no permite definir si es un adenoma o un carcinoma, ya que solo la invasión celular de la cápsula, del tejido perinodular o de los vasos sanguíneos, definirá que se trata de un carcinoma; en el caso de la ausencia de estas invasiones, la lesión se define como un adenoma (benigno). 5) Sospechoso de malignidad: presencia de algunos criterios citológicos o de agrupación celular, pero no a todos los necesarios para definir como maligna a la lesión. 6) Maligno: hace referencia a un carcinoma de tiroides (Cibas & Ali, 2017; Haugen, 2017).

La interpretación histopatológica del tejido tiroideo resecado sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico. Más allá de simplemente confirmar la enfermedad benigna o maligna, la caracterización histopatológica también proporciona información pronóstica importante que predice el riesgo futuro de recurrencia y muerte (Haugen, 2017).

En los últimos años, ha tomado importancia el empleo de técnicas moleculares para el diagnóstico de PAAF indeterminadas, no obstante, la mayoría de estas pruebas resultan costosas y los pacientes prefieren someterse a cirugía. Diversos recursos, tales como el análisis de las

características sospechosas del ultrasonido, los marcadores moleculares, la elastografía y el empleo de aguja gruesa (*Core Needle Biopsy, CNB por sus siglas en inglés*), pueden ayudar en la decisión terapéutica. En el futuro, la evaluación ideal de pacientes con resultados citológicos indeterminados debería incluir estas herramientas de diagnóstico nuevas para evitar tiroidectomías innecesarias (Jung et al., 2020).

### **4.3. Cáncer de tiroides**

El CaT se desarrolla en las células foliculares de la GT, producto de un desequilibrio entre los factores de crecimiento, los receptores de superficie celular, las vías de señalización intracelular y los factores de transcripción que desencadenan una proliferación desordenada, la destrucción de tejidos adyacentes y la diseminación a distancia. Características clínicas (edad, sexo, tamaño del tumor, presencia de adenomegalias), histológicas (diferenciación del tumor, extensión extracapsular, multifocalidad, y subtipo o variante tumoral), hereditarias y de exposición accidental o terapéutica (historia de exposición a radiaciones, absorción de yodo radioactivo) son factores pronóstico para el desarrollo de este carcinoma (Sosa Martín & Ernard Rizo, 2016).

El CaT es un problema de salud pública a nivel mundial estimándose una incidencia anual de 6.6 casos por cada 100 mil habitantes, siendo el 5° cáncer más frecuente representando el 3.9% de todas las neoplasias malignas, el 3° más común en mujeres desplazando al cáncer cervicouterino y el tumor endocrino más frecuente (90%). En nuestro país representa el 4° cáncer más común en ambos sexos y el 2° en la mujer, reportándose en 2020, 11227 nuevos casos de CaT (2085 en hombres y 9142 en mujeres, 1:4.3), que representaron el 5.7% del total de neoplasias malignas, con una incidencia de 8.1 por cada 100 mil habitantes y mortalidad de 0.67 por 100 mil habitantes (International Agency for Research on Cancer, 2022).

Hay cuatro tipos principales de CaT, divididos en dos categorías de acuerdo con su grado de diferenciación. Los tumores bien diferenciados como los papilares son de crecimiento lento originados generalmente en un solo lóbulo de la GT, a pesar de su tasa de crecimiento suelen propagarse a los ganglios linfáticos del cuello y representan alrededor del 80% de los CaT. El otro tipo de tumores diferenciados son los foliculares, los cuales se presentan más comúnmente en los países donde las personas no reciben suficiente yodo en la alimentación y por lo general, no se propagan a los ganglios linfáticos, aunque se pueden propagar a otras partes del cuerpo, tal como los pulmones o los huesos; representan alrededor de uno de cada 10 CaT. El pronóstico del cáncer diferenciado es bueno, con una tasa de supervivencia a 10 años que excede el 90%. El diagnóstico temprano de la enfermedad suele tener curación mediante la cirugía hasta el 98%, con una supervivencia de 20 años (Haugen, 2017; Sosa Martín & Ernand Rizo, 2016). Su factor pronóstico más importante es la metástasis a distancia que se encuentra en solo el 5% de los pacientes, pero con alta tasa de mortalidad a 1 año (50%) (Sipos & Mazzaferri, 2008). Entre el 5% y el 10% de los CaT diferenciados tienen una presencia familiar, sin embargo, en la mayoría de los pedigrís solo dos miembros se ven afectados. Aun así, estos pacientes deben tener una historia cuidadosa y un examen dirigido al cuello como parte del mantenimiento de la salud de rutina (Haugen, 2017).

Por otro lado, también se desarrollan con menor frecuencia tumores poco diferenciados, pero de gran malignidad que producen metástasis con rapidez y tienen un pronóstico más precario, tal es el caso del cáncer medular el cual representa aproximadamente un 5% de los CaT, originándose en las células C de la GT que normalmente produce calcitonina (hormona que ayuda a controlar la cantidad de calcio en la sangre); algunas veces este cáncer se puede propagar a los ganglios linfáticos, los pulmones o al hígado, incluso antes de que se detecte un

NT. Se puede presentar tanto de forma esporádica como familiar o hereditario (20-25% puede surgir en cada generación de una familia) (Haugen et al., 2016; Sosa Martín & Ernand Rizo, 2016).

Y los carcinomas anaplásicos, llamados así debido a que las células cancerosas no se parecen mucho a las células normales de la tiroides al observarlas con el microscopio, se deriva de las células tiroideas foliculares y está asociado con el mayor riesgo de mortalidad de cualquier tumor que se origine en la tiroides, pero representa solo un pequeño porcentaje de los casos de cáncer de tiroides en general (1.3-9.8%; media de 3.6%). Se propaga rápidamente hacia el cuello y otras partes del cuerpo. A pesar de su baja frecuencia los carcinomas anaplásicos son responsable de más de la mitad de las muertes por CaT, con una supervivencia a 1 año del 20% (Bible et al., 2021; Sosa Martín & Ernand Rizo, 2016).

#### **4.3.1. Susceptibilidad genética al cáncer de tiroides**

La iniciación y la progresión del cáncer surgen como consecuencia de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas, como mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos y eventos epigenéticos que inactivan los genes supresores de tumores o activan los protooncogenes. La desregulación este tipo de genes tiene un papel decisivo en el inicio y/o progresión de la carcinogénesis tiroidea. La determinación de las alteraciones moleculares somáticas y/o de línea germinal son marcadores de diagnóstico y pronóstico útil y, herramientas valiosas para el tratamiento pre y postoperatorio los NT (Özdemir & Özdemir, 2014).

Las posibles causas etiológicas genéticas moleculares en el CaT se pueden clasificar de la siguiente manera: 1) Cáncer de tiroides mediado por oncogén. 2) Cáncer de tiroides mediado por gen supresor tumoral. 3) Cáncer de tiroides mediado por genes funcionales. 4) Cáncer de tiroides debido a regulación negativa de miRNA (Özdemir & Özdemir, 2014).

Se han explorado modalidades como el análisis directo de mutaciones, el perfil de expresión génica, secuenciación de última generación y el perfil de expresión de microARN para mejorar la precisión diagnóstica de la citología con PAAF del NT. En el estudio de mutaciones destacan aquellas que ocurren en activadores de las vías de señalización MAPK (Proteína quinasa activada por mitógeno) y P13K/AKT (vía fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa–proteína cinasa B), como lo son el gen *BRAF*, los genes *RAS* (*HRAS*, *NRAS* y *KRAS*), *PIK3CA* y *AKT1*, así como reordenamientos *RET/PTC1/3* y *PAX8/PPAR $\gamma$* , entre otras mutaciones que se han encontrado podrían utilizarse como marcadores moleculares más específicos (Figura 4) (Boufraquech et al., 2019; Roth, Witt, & Steward, 2018). Los marcadores moleculares, solos o en combinación, pueden ser útiles para la estratificación de riesgo de CaT y proporcionar una evaluación de riesgo significativamente más precisa que la mutación de *BRAF* por sí solo (Haugen et al., 2016).

La mutación más común en CPT (hasta el 80% casos) ocurre en el gen *BRAF* (ID 673, B-Raf protooncogén) el cual codifica para una quinasa serina-treonina clave en la regulación intracelular de la vía MAPK. Esta mutación también llamada *BRAFV600E*, es una transversión de timina a adenina en la posición 1799 (T1799A) en el exón 15, a nivel proteico traducido a una sustitución de valina por ácido glutámico en el residuo 600 (V600E) adyacente a un residuo de treonina (posición 599), produciendo una conducta similar a fosforilación, por modificación de la estructura terciaria al perderse las interacciones hidrofóbicas entre el segmento P (el lugar de activación de la proteína por medio de fosforilación) y el segmento de actividad de cinasa, dando como resultado que la actividad de cinasa de *BRAFV600E* sea 460 veces más alta que B-Raf nativa (Agarwal, Bychkov, & Jung, 2021; Boufraquech et al., 2019; Gürbüzler, 2016; Mondragón-Terán et al., 2016).

Existe asociación entre la mutación *BRAFV600E* y varios factores de riesgo clínico-patológicos, como la presencia de fenotipos histológicos agresivos, extensión extratiroidea, metástasis ganglionares y a distancia, e inhibición de genes implicados en el metabolismo del yodo por lo que tienen más probabilidades de desarrollar resistencia al yodo radioactivo (78-95%) interfiriendo con la quimioterapia tradicional (Barollo et al., 2014; Haugen et al., 2016). Además, los tumores mutados en *BRAFV600E* tienen una tasa de recurrencia del 8% en comparación con solo el 1% en los tumores de tipo salvaje *BRAF* (Haugen et al., 2016).

También alteraciones de los efectores de la vía PI3K/Akt/mTOR por mutaciones activadoras en *PIK3CA* (ID 5290, subunidad catalítica p110 $\alpha$  del fosfatidilinositol 3-quinasa de clase I), y *AKT1* (ID 207, AKT serine/threonine kinase 1), así como la inactivación de PTEN, que regula negativamente esta vía (Ricarte-Filho et al., 2009). El 80% de las mutaciones activadoras en *PIK3CA* ocurre en uno de los tres puntos calientes en la secuencia de codificación de p110 $\alpha$  dentro del exón 9 y 20. Dos de las mutaciones están ubicadas en el dominio helicoidal de p110 $\alpha$  en las posiciones de residuos E542K y E545K, y el tercer punto caliente (H1047R) está ubicado en la porción C-terminal del dominio quinasa. Estas mutaciones de ganancia de función se correlacionan con una mayor actividad enzimática *in vitro* e inducción de la fosforilación de AKT. Las mutaciones en *PIK3CA* se han reportado en carcinomas de tiroides foliculares, carcinomas de tiroides pobremente diferenciados y carcinomas anaplásicos de tiroides (Gymnopoulos, Elsliger, & Vogt, 2007; Ricarte-Filho et al., 2009).

Por su parte, la proteína conocida como Akt tiene un peso molecular aproximado de 57kDa, que es una cinasa de serina/treonina codificada por el gen *AKT1* (Mondragón-Terán et al., 2016). Una mutación somática en el dominio de homología pleckstrin en *AKT1* producida por una sustitución de ácido glutámico por lisina en el aminoácido 17 (E17K) es también capaz

activar la vía P13K/AKT. Lys 17 altera las interacciones electrostáticas y forma nuevos enlaces de hidrógeno con un ligando fosfoinosítido, aumentando la fosforilación de *AKT1* en el dominio de homología pleckstrin (PHD). Esto, da lugar a cambios estructurales en el PHD que alteran su interacción con el inhibidor VIII de *AKT1/2*, lo que provoca la activación constitutiva de la quinasa *AKT1* hasta 4 veces más, estimulando la señalización río abajo (Carpten et al., 2007; Ricarte-Filho et al., 2009). La activación de *AKT1* está asociada con la invasión tumoral en los subtipos papilar y folicular de CaT. (Ricarte-Filho et al., 2009).

Los descubrimientos de nuevas mutaciones involucrados en la patogénesis del CaT, pueden llegar a ofrecer nuevos objetivos terapéuticos efectivos donde la detección de mutaciones permitiría subclasificar a los pacientes y recomendar un manejo quirúrgico adecuado.

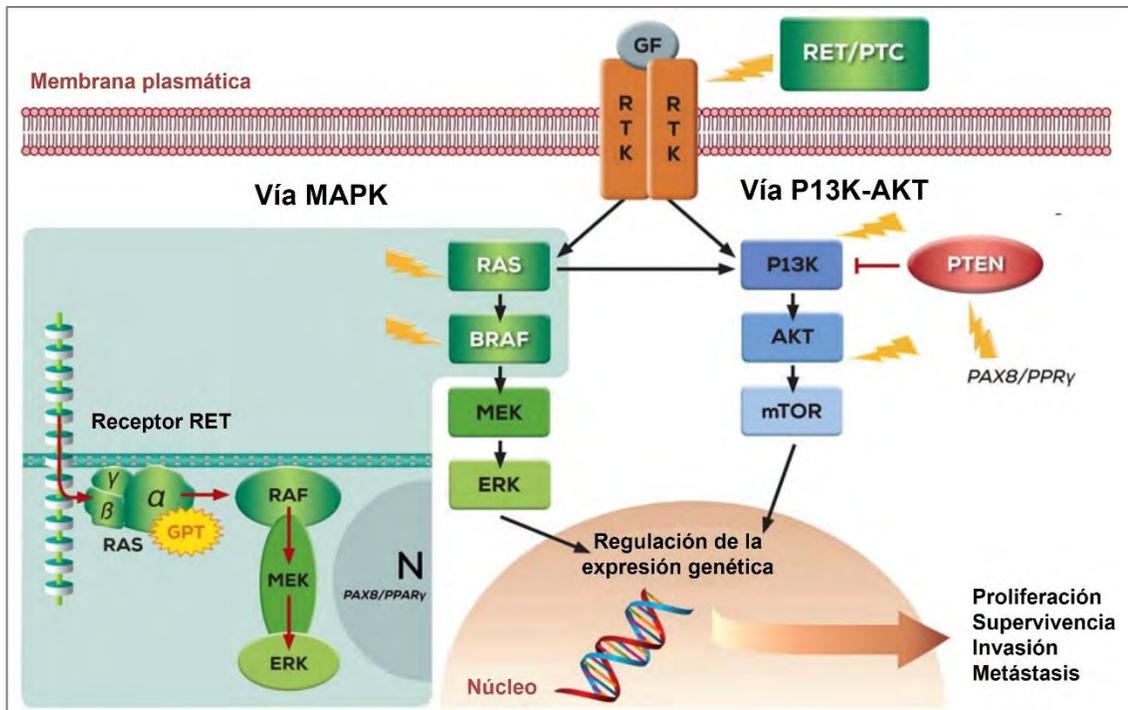


Figura 4. Vías de señalización en cáncer de tiroides.

La patogénesis molecular del cáncer de tiroides implica la desregulación de las vías de señalización MAPK (Proteína quinasa activada por mitógeno) y P13K/AKT (vía fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa–proteína cinasa B). La vía MAPK se activa con frecuencia en el cáncer de tiroides a través de mutaciones puntuales de los genes *BRAF* y *RAS* y reordenamientos *RET/PTC*; la vía P13K/AKT se activa frecuentemente a través de mutaciones puntuales de *PIK3CA*, *AKT1* y mutación/delección de *PTEN*.

Adaptado de Roth, MY, Witt RL, Steward, DL. (2018). Molecular Testing for Thyroid Nodules: Review and Current State.

### 4.3.2. Perfiles de expresión de ARNm implicados en neoplasias en tiroides

Los perfiles de expresión génica ofrecen evidencia adicional para apoyar el modelo de progresión del carcinoma de tiroides. En la tiroides, como en otros órganos, los genes que se encuentran expresados diferencialmente entre el tejido tiroideo normal y los carcinomas tiroideos pueden usarse como objetivos para el diagnóstico y la terapia de base molecular. Desarrollos recientes en tecnologías destinadas a identificar genes expresados diferencialmente, como análisis de expresión por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real, análisis de transcriptoma, hibridación diferencial, entre otros, han identificado algunos genes cuya expresión es diferencial en el CaT (Roth et al., 2018).

El microambiente tumoral contribuye al desarrollo del cáncer y promueve la angiogénesis, invasión, metástasis e inflamación crónica. La adhesión celular determina la polaridad celular y está implicada en el mantenimiento de los tejidos. Las anomalías en la adhesión celular son características morfológicas de los tumores malignos y tienen efectos sobre la biología del cáncer (Qiu et al., 2018).

#### 4.3.2.1. Claudina 1

Se ha demostrado que tanto un aumento como una disminución en la expresión de la proteína del gen Claudina-1 (*CLDN1*) están asociados con la tumorigénesis. *CLDN1* es un miembro de la familia claudina, proteínas integrales de membrana que son cruciales para la formación y función de las uniones estrechas (Zhang et al., 2016). Las uniones estrechas son un modo de adhesión de célula a célula del epitelio normal, unen mecánicamente las células, forman la barrera epitelial contra el transporte paracelular y mantienen la polaridad de las células epiteliales; por lo que se ha relacionado la alteración de las claudinas con la progresión del cáncer (Huang et al., 2014; Qiu et al., 2018; Zhang et al., 2016).

Las células neoplásicas frecuentemente muestran deficiencias estructurales y funcionales en las uniones estrechas. La progresión del cáncer puede explicarse en parte por la pérdida de uniones estrechas. La disminución de *CLDN1* estimula la progresión e invasión del tumor en algunos cánceres, incluido el cáncer de próstata, mama y colon, mientras que, en el carcinoma de células escamosas esofágico y cáncer cérvico uterino, el aumento de la expresión se correlacionó con la progresión tumoral (Ersoz, Mungan, Cobanoglu, Turgutalp, & Ozoran, 2011; Qiu et al., 2018; Zhang et al., 2016). La razón de esta discordancia en la expresión de *CLDN1* entre diferentes tipos de tejido, podría deberse a diferencias en las propiedades del microambiente o del propio tejido (Ersoz et al., 2011).

La sobre expresión de *CLDN1* en cáncer cervicouterino puede aumentar la capacidad anti apoptótica y promover la capacidad invasiva mediante la transformación celular inducida por la desregulación de *CLDN1*, promoviendo el aumento de la proteína mesenquimal vimentina y disminuyendo E-cadherina, lo que induce la transición epitelial-mesenquimal (EMT) a través de la estimulación de SNAI1 (regulador negativo de E-cadherina) por *CLDN1*. La regulación a la baja de E-cadherina se ha caracterizado como el principal marcador responsable de la pérdida de contactos célula-célula en los eventos de EMT, permitiendo la invasión e intravasación de células tumorales en los tejidos circundantes, la circulación sanguínea y linfática. (Zhang et al., 2016).

#### 4.3.2.2. *Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1*

El Inhibidor tisular metaloproteinasas 1 (*TIMP1*), es uno de los miembros principales de la familia de genes *TIMP*. Tiene un peso molecular de 23 KDa, que consta de una estructura de dos dominios que posee actividades de señalización inhibitoras de metaloproteinasas de matriz (MMP) y actividades de señalización similares a las citocinas. Los genes *TIMP* participan en

más funciones biológicas independientes de la MMP, incluidas la antiapoptosis, la antiangiogénesis, la regulación del ciclo celular y las actividades de diferenciación en células epiteliales o derivadas de la sangre (Shou et al., 2022).

La expresión desregulada de *TIMP1* se asocia con un pronóstico desfavorable en una serie de tumores, como el carcinoma papilar de tiroides, cáncer gástrico y cáncer de mama (Song et al., 2016). *TIMP1* tiene un papel importante en la invasión de tumores y la metástasis, debido su contribución en la expresión de las MMP, enzimas proteolíticas que degradan los componentes proteicos de la matriz extracelular durante la invasión del tumor. Por lo tanto, el aumento de la actividad proteolítica asociada con la metástasis tumoral podría ser fácilmente explicada por la reducción de la actividad de *TIMP1* dando como resultado mayor actividad de MMP (Hawthorn et al., 2004).

Por el contrario, otros autores han indicado que la sobreexpresión de *TIMP1* se asocia con peor pronóstico en esta patología, vía independiente de su función natural como inhibidor de MMP. Ensayos de identificación de la proteína en tejido tumoral de cáncer de células renales y tejido adyacente sano, demostraron expresión significativamente mayor en cáncer; además, *TIMP1* se localizaba principalmente en las membranas y el citoplasma de las células cancerosas y las células epiteliales tubulares renales. Así mismo, el silenciamiento de *TIMP1* reprime significativamente las tasas de proliferación, y conduce a la regulación negativa de N-cadherina y la regulación positiva de E-cadherina, proteínas involucradas en la EMT. Mientras que su sobreexpresión acelera la proliferación celular, por lo tanto, su sobreexpresión en cáncer podría promover la proliferación, migración e invasión vía EMT (Shou et al., 2022).

#### 4.3.2.3. Queratina 19

Queratina 19 (*KRT19*) es el miembro más pequeño (40 kDa) de las proteínas de la familia de citoqueratinas de tipo I ácidas; es una proteína de filamento intermedio, parte del andamiaje del citoesqueleto dentro de las células epiteliales responsable de la rigidez estructural, por lo que se utiliza frecuentemente como marcador de células y tejidos epiteliales (Menz et al., 2021). Las queratinas se regulan dinámicamente e interactúan con una variedad de proteínas celulares, incluidas quinasas, receptores, adaptadores y otros tipos de moléculas efectoras para regular las respuestas celulares de apoptosis, migración y crecimiento. *KRT19* se utiliza como marcador para la detección de células tumorales diseminadas en ganglios linfáticos, sangre periférica y médula ósea de pacientes con cáncer de mama, y su positividad podría considerarse como un indicador de pronóstico (Ju et al., 2015).

*KRT19* se expresa diferencialmente en varios tipos de cáncer. Se ha reportado su sobreexpresión en cáncer de mama, tiroides, colon, hígado e intestino, asociándose con malos resultados clínicos en los pacientes promoviendo la proliferación y migración celular (Saha, Kim, Yang, Choi, & Cho, 2018). Resultados contradictorios han descrito correlaciones significativas entre la expresión reducida y características tumorales fenotípicas desfavorables en carcinoma papilar de tiroides y cáncer de mama. (Menz et al., 2021).

#### 4.4. Antecedentes

Las directrices de la Asociación Americana de Tiroides recomiendan la incorporación de pruebas moleculares para manejar pacientes con NT indeterminados con el fin de limitar cirugías innecesarias (Dom et al., 2018), estas pruebas se basan principalmente en el análisis de la expresión génica en ARN o en la detección de mutaciones somáticas. Con los perfiles de expresión de ARN mensajero (ARNm) o microARN, se requiere alta sensibilidad para

recomendar el seguimiento clínico de forma segura. Por el contrario, la detección de mutaciones específicas del ADN y/o reordenamientos cromosómicos, busca confirmar malignidad, por lo que es necesaria una alta especificidad para identificar a los pacientes que se beneficiarían de la cirugía (Livhits et al., 2021; Nikiforov et al., 2011). Actualmente se encuentran disponibles una serie de pruebas basadas en la identificación de cientos de alteraciones simultáneamente. El uso de estas herramientas impacta en la toma de decisiones para el manejo de NT indeterminados, sin embargo, el acceso a estos ensayos es aún limitado, ya que la mayoría de las veces estas pruebas requieren una muestra de PAAF congelada adicional dedicada al estudio molecular, difícil de obtener en la práctica diaria, especialmente porque el diagnóstico de categoría indeterminada no se conoce en el momento de la biopsia (Dom et al., 2018), además de la necesidad de enviar las muestras al extranjero a laboratorios centralizados, el tiempo y alto costo de analizar cientos de alteraciones. Por lo anterior, la cirugía sigue siendo la opción más frecuente para determinar el diagnóstico definitivo de NT indeterminados en la mayor parte del mundo (González et al., 2017; Nikiforov et al., 2011). Esto demuestra que la búsqueda de biomarcadores que puedan ser de utilidad en nuestra población sigue siendo un desafío, en el que es necesario clasificar de inicio su efectividad para confirmar o discriminar cáncer, antes de poder ser evaluados en citologías indeterminadas.

La identificación de mutaciones tiene un alto valor pronóstico dependiendo del gen mutado, por lo tanto las investigaciones genéticas tienen potencial para dirigir el diagnóstico y manejo quirúrgico, pero especialmente para adaptar la terapia y el seguimiento al paciente (Vallejo Casas, Muñoz Márquez, Mesía Nin, Capdevila Castellón, & Aller Pardo, 2014). No obstante, su sensibilidad puede variar, y la investigación actual también hace uso de

clasificadores de expresión basados en ARNm para identificar nódulos sospechosos (Dom et al., 2018).

#### **4.4.1. Rutas de señalización en cáncer de tiroides**

La vía MAPK es una ruta de señalización importante en la que se regulan mecanismos procesos de crecimiento, diferenciación, proliferación, apoptosis y migración celular. Se ha demostrado que los genes que codifican moduladores de la vía MAPK tienen un papel crucial en la transformación maligna del CaT papilar (Barollo et al., 2014)

En tiroides esta vía es activada por la subfamilia ERK-1/2, como respuesta a un estímulo mitogénico, como un factor de crecimiento. Su activación se da cuando un receptor de membrana se une a su ligando. El receptor activa una proteína de tipo G con actividad cinasa (Ras), Ras recluta por fosforilaciones al primer efector de la cascada, una cinasa de la familia Raf, siendo B-Raf (codificada por *BRAF*) la de mayor actividad, esta activa en serie a MEK-1/2 quienes activan a ERK-1/2, que finalmente es translocado dentro del núcleo para fosforilar a factores de transcripción y activar/inhibir genes específicos involucrados principalmente en proliferación celular. Si bien esta cascada de señalización se encuentra de forma constitutiva en todas las células normales del organismo, en la célula cancerosa cada componente de la cadena puede presentar mutaciones que favorecen la hiperactividad de las cinasas participantes, lo que incrementa exponencialmente la actividad celular (Figura 4) (Mondragón-Terán et al., 2016).

Las mutaciones reportadas como más frecuentes en el cáncer papilar de tiroides son: mutaciones en *BRAF*, *RAS* y rearrreglos en el gen *RET/PTC* (receptor de membrana con actividad de tirosincinasa). Todos ellos involucrados en la vía de señalización intracelular que activa al efector nuclear ERK. Estas alteraciones se encuentran exclusivamente en pacientes con cáncer papilar de tiroides (Gürbüzler, 2016; Mondragón-Terán et al., 2016).

La presencia de la mutación *BRAFV600E*, cuya prevalencia ha sido reportada entre el 27 y el 80% en distintas poblaciones de pacientes con CaT, resulta en un incremento de más de 400 veces la actividad de B-Raf, lo que produce la activación río debajo de los efectores de la cascada hasta ERK, que aumentan su capacidad de fosforilación y, con ello, la actividad de diversos genes claves para el metabolismo, proliferación y apoptosis celular llevando a la transformación de células normales en células cancerígenas, además de mantener su proliferación sin necesidad de la proteína Ras, para la activación de la vía de señalización (Mondragón-Terán et al., 2016).

La expresión de *KRT19* es regulada positivamente por moléculas de la vía MAPK activada por HER2; la fosforilación de *KRT19* en el residuo S35 por Akt, también activado por HER2, induce su localización a membrana, una vez en la membrana puede unirse y estabilizar a HER2 por ubiquitinación. A su vez, la fosforilación de *KRT19* en S35 es un requisito absoluto para la transición de una forma filamentosa a una granulosa, que podría ser responsable del desmontaje del filamento (Figura 5) (Ju et al., 2015).

Similar a MAPK, la vía P13K/AKT también juega un papel importante en los tumores tiroideos, y su estimulación aberrante se encuentra en alrededor del 10-15% del CaT folicular, anaplásico y, en menor medida, en carcinoma papilar. Esta vía está implicada en varios procesos celulares como diferenciación, crecimiento, proliferación, apoptosis y angiogénesis. Cabe señalar que existe una importante diafonía entre las vías P13K/AKT y MAPK, lo que refleja una imagen más compleja de los recursos celulares (Barollo et al., 2014; Mondragón-Terán et al., 2016).

En condiciones fisiológicas, la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) se recluta en la capa interna de la membrana plasmática mediante adaptadores de proteínas que pueden activarse mediante múltiples receptores de tirosina quinasa transmembrana. Además, algunas isoformas

tienen un dominio de unión que permite la activación desde RAS (Valvo & Nucera, 2019). La PI3K es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica (p110 o PIK3CA) y una subunidad reguladora (p85). La fosforilación de p85 conduce a un cambio conformacional de dicha proteína que lleva a la unión de la subunidad catalítica. PIK3CA fosforila a PIP2 generando al segundo mensajero PIP3. La acumulación de PIP3 activa la cascada de señalización que inicia con el reclutamiento de AKT a la membrana y su posterior activación por fosforilación. AKT tiene múltiples blancos, que se involucran en procesos de diferenciación, proliferación celular o apoptosis (Figura 5) (Carpten et al., 2007).

Las mutaciones somáticas en el exón 9 y 20 de *PIK3CA*, que codifica la subunidad catalítica p110a de PI3K, son frecuentes en muchos tumores humanos, con una interesante coexistencia con *BRAFV600E* en los tumores indiferenciados. En presencia de estas alteraciones genéticas, la quinasa no es sensible a su subunidad reguladora y no se desactiva (Valvo & Nucera, 2019). Un incremento en la actividad de PI3K/AKT por arriba de lo normal, se asocia con transformación celular oncogénica, principalmente en el carcinoma folicular de tiroides. Por otro lado, los cambios genéticos que utilizan tanto la vía MAPK como la PI3K/Akt se demuestran en el 81% de los CaT anaplásicos (Gürbüzler, 2016). Claudina-1 media sus efectos oncogénicos y metastásicos a través de la activación de la señalización de Src y PI3K/AKT (Gowrikumar et al., 2021). Además, se han reportado sitios de fosforilación por Akt1 y MEK en *KRT19*, asociándose con procesos de invasión y metástasis (Ju et al., 2015).

Así mismo, la sobreexpresión de *TIMPI* está asociada con la activación constitutiva de FAK, un regulador corriente arriba de la vía PI3K/Akt. La fosforilación de AKT podría regular al alza la ciclina D1 y a la baja los inhibidores p21 y p27 de la ciclina D quinasa, lo que promueve la progresión del ciclo celular. Además, AKT fosforila a BAD, liberando su interacción con Bcl-

2 (miembro anti apoptótico de la familia bcl-2) y activación de este último. La familia MAPK también puede fosforilar a BAD, liberando a Bcl-2 anti apoptótico en las células (Song et al., 2016).

Por último, la vía de señalización de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) desempeña un papel importante en el desarrollo y la progresión del cáncer, proporcionando un vínculo mecánico entre la inflamación y el cáncer. NF- $\kappa$ B puede inducir la proliferación tumoral, bloquear la apoptosis y promover la angiogénesis y la invasión. En CaT la vía NF- $\kappa$ B tiene un papel oncogénico, principalmente por 1) la activación de NF- $\kappa$ B por *BRAFV600E* de forma independiente a MEK (Figura 5); 2) RET/PTC3, a través de la estabilización de la quinasa inductora de NF- $\kappa$ B (NIK); 3) PAX8/PPAR $\gamma$ , debido a la reducción de la abundancia de proteína PPAR $\gamma$ . Además, la activación constitutiva de la vía P13K-AKT debido a la inactivación de *PTEN* aumenta la actividad de NF- $\kappa$ B, lo que acelera la progresión del cáncer (Valvo & Nucera, 2019). El aumento de la actividad de NF- $\kappa$ B se asocia con carcinogénesis tiroidea y progresión tumoral (Bommarito et al., 2011).

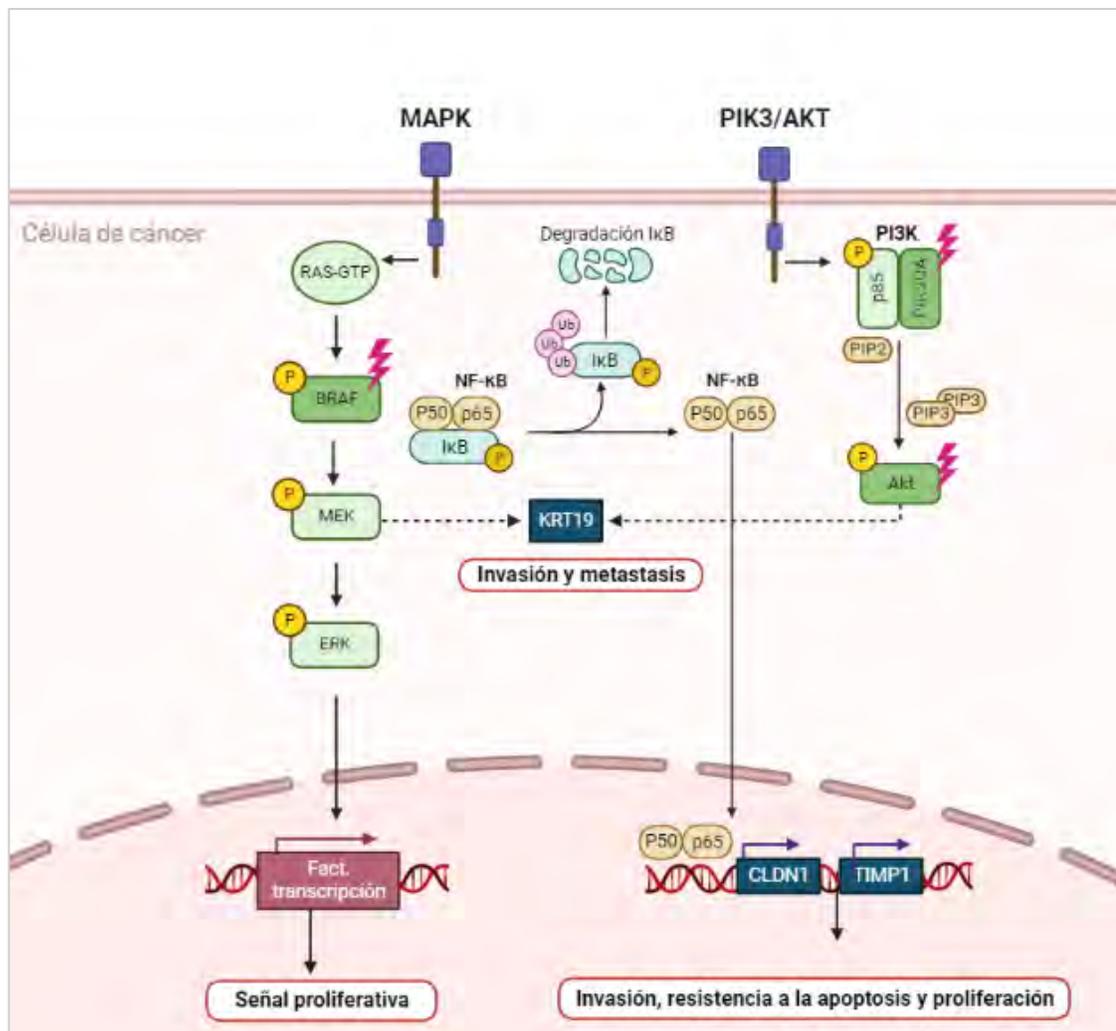


Figura 5. Rutas de señalización en cáncer de tiroides

Mutaciones puntuales en los genes *BRAF*, *PIK3CA* y *AKT1*, incrementan la actividad de las vías MAPK y PIK/AKT, asociándose con transformaciones celulares oncogénicas. Mutaciones puntuales en *BRAF*, también pueden influenciar la actividad del NF-κB por fosforilación de su inhibidor IκB, promoviendo su degradación. Con lo que NF-κB se libera para su translocación a núcleo, promoviendo la transcripción de distintos blancos, entre ellos *CLDN1* y *TIMP1*, donde la conexión se puede denotar por tumores más agresivos. Además, se han reportado sitios de fosforilación por Akt1 y MEK en *KRT19*, asociándose con procesos de invasión y metástasis.

## V. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de tiroides (CaT) es un problema de salud pública a nivel mundial. En México representa el 4° lugar nacional y el 2° más frecuente en la mujer. Los nódulos tiroideos (NT) constituyen una de las entidades clínicas más comunes del sistema endocrinológico, y debido a que aproximadamente un 10% de estos nódulos representan malignidad es importante clasificarlos, estratificar el riesgo de CaT, proporcionar un tratamiento médico adecuado y seleccionar los pacientes que se pueden beneficiar de manejo quirúrgico.

Si bien hay un aumento significativo en la detección del CaT debido a la utilización de la biopsia por aspiración con aguja fina en combinación con ultrasonido, en ocasiones el resultado es ineficaz para el diagnóstico, por lo tanto, se requieren herramientas mejoradas.

Las pruebas moleculares basadas en detección de mutaciones somáticas o cambios en la expresión génica colaboran en el diagnóstico de esta patología, sobre todo en el caso de los indeterminados. El desafío es elegir la combinación de genes cuyo perfil discrimine nódulos benignos de malignos en muestras citológicas. Mutaciones puntuales en *BRAF*, *PIK3CA* o *AKT1* inciden en la sobre activación de las rutas de señalización MAPK y PI3K/Akt, de gran importancia en la tumorigénesis tiroidea. Así mismo, la desregulación de la expresión de *KRT19*, *TIMP1* y *CLDN1*, facilita la proliferación, invasión y metástasis de células cancerígenas en diversos tumores. Por lo anterior, esta serie de marcadores ADN-ARN podría confirmar malignidad en neoplasias tiroideas, con base en la evidencia bibliográfica sobre interacciones de estos genes a través de las rutas de señalización MAPK y PI3K/Akt, por lo que resulta de interés analizar asociaciones entre ellos.

## VI. HIPÓTESIS

La identificación de mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1* y el perfil de expresión en *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*, confirma malignidad en neoplasias tiroideas.

## VII. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

Identificar mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA*, *AKT1* y analizar el perfil de expresión en *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* en neoplasias malignas tiroideas de población mestiza mexicana.

### 7.2. Objetivos específicos

7.2.1. Analizar mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA* y *AKT1* en pacientes con cáncer de tiroides y neoplasia benigna.

7.2.2. Cuantificar la expresión de los genes *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* de pacientes con cáncer de tiroides y neoplasia benigna.

7.2.3. Comparar el perfil de mutaciones y de expresión en pacientes con cáncer de tiroides y neoplasia benigna.

7.2.4. Asociar el perfil de expresión y mutaciones genéticas de cada paciente con las características clínicas.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal, observacional y comparativo. El estudio biológico fue in vitro donde se buscaron mutaciones en genes asociados al cáncer de tiroides (CaT) de ADN extraído de biopsias de punción por aspiración con aguja fina (PAAF) de la población de estudio. Y se evaluó el perfil de mutaciones de genes implicados en el desarrollo de nódulos tiroideos (NT) en las mismas muestras. Así mismo se realizó la toma de muestra sanguínea para estudios posteriores.

### 8.2. Población

Pacientes de sexo indistinto con presencia de nódulos tiroideos.

#### 8.2.1. Tamaño de la muestra

Pacientes que accedieron a participar en el proyecto con firma de consentimiento informado (Anexo), durante el periodo de agosto de 2018 a agosto de 2021.

Fórmula para la comparación de dos proporciones:

$$n = \frac{\left[ Z_{\alpha} * \sqrt{2p(1-p)} + Z_{\beta} * \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)} = 73$$

Z<sub>α</sub> = Valor Z correspondiente al riesgo deseado = 1.645 = α = 0.05

Z<sub>β</sub> = Valor Z correspondiente al riesgo deseado = 0.842

p<sub>1</sub> = Valor de la proporción en el grupo de referencia, placebo, control o tratamiento habitual = 0.7

$p_2$  = Valor de la proporción en el grupo del nuevo tratamiento, intervención o técnica = 0.5

$p$  = Media de las dos proporciones  $p_1$  y  $p_2$

### **8.2.2. Recolección de datos**

La recolección de los datos se realizó mediante aplicación de cuestionario directo a las pacientes (Ver Anexo) y/o revisión de su expediente clínico evaluado por un médico adscrito a cada institución, recopilando los datos clínicos y patológicos de las pacientes que incluye los siguientes parámetros: sexo, edad, diagnóstico histológico, factores clínico-patológicos, antecedentes familiares de CaT y enfermedad autoinmune de tiroides.

### **8.3. Grupos de estudio**

En el estudio se incluyeron todos los pacientes que aceptaron participar en el estudio, estos fueron clasificados en dos grupos que se describen a continuación.

- Pacientes con cáncer de tiroides (PCT)
- Pacientes con neoplasia benigna (PNB)

#### **8.3.1. Criterios de inclusión**

- Diagnóstico histológico del nódulo tiroideo realizado por un médico especialista.
- Ser de nacionalidad mexicana.
- Las muestras de biopsias de tejidos se estratificarán por diagnóstico citológico.

#### **8.3.2. Criterios de exclusión**

- Pacientes sin estudio citológico.

- Pacientes que hayan recibido terapia con yodo radioactivo antes de la toma de muestra.

### **8.3.3. Criterios de eliminación**

- Muestra no apta para el estudio.
- Pacientes que decidan retirarse voluntariamente durante la investigación.

## **8.4. Diseño metodológico**

### **8.4.1. Obtención de la muestra**

Aceptada la participación en el proyecto, se procedió a la obtención de la muestra. La muestra se colectó en 350µL de solución RNA protect Cell Reagent (Qiagen NV, DE) y se transporta al Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica de Sinaloa para ser almacenadas a -20°C hasta su análisis molecular.

#### *8.4.1.1. Extracción de ácidos nucleicos de PAAF*

##### *8.4.1.1.1. Ácido desoxirribonucleico (ADN)*

Para la extracción de ADN de células en circulación se utilizó el kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen NV, DE). El kit purifica ADN total con un tamaño de hasta 50 kb, con fragmentos predominantes de aproximadamente 20–30 kb (Qiagen, 2016). Las muestras almacenadas en RNA protect Cell Reagent se centrifugan a 10,000G por 10 min, posteriormente se retira el sobrenadante y se realiza un lavado con 1ml de PBS 1X homogenizando con vortex. Se realiza otra centrifugación a 4,500G durante 5 min, al finalizar se retira el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 200µL de PBS 1X. A continuación, se realiza la metodología sugerida por el fabricante, la cual consiste en el lisado de las células y purificación del ADN

utilizando una columna de centrifugación QIAmp Mini Spin para recuperar el ADN después de una serie de lavados en 50µL de buffer suministrado por el proveedor.

#### 8.4.1.1.2. *Ácido ribonucleico (ARN)*

Para la extracción de ARN total de células en circulación se utilizó el kit comercial RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen NV, DE) siguiendo las instrucciones del proveedor. El kit purifica ARN desde  $5 \times 10^5$  células con una concentración final de hasta 45µg libre de ADN genómico. Las muestras se lisan primero y se homogenizan. El lisado se pasa a través de una columna de centrifugación gDNA Eliminator. Posterior a ello la muestra se aplica a una columna de rotación RNeasy MinElute uniendo el ARN a la membrana y eliminando los contaminantes (Qiagen, 2014).

#### 8.4.1.2. *Cuantificación y grado de pureza de ácidos nucleicos*

La concentración de los ácidos nucleicos se evaluó por espectrofotometría utilizando NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific, US).

La integridad y se verificó en geles de agarosa al 1.5% con 0.5µg de material genético.

#### 8.4.2. *Análisis molecular*

El análisis molecular de las muestras se dividió en dos partes. La identificación de mutaciones de *PIK3CA* (rs121913273), *AKT1* (rs121434592) y *BRAF* (rs113488022), se realizó por discriminación alélica por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). En el caso del perfil de expresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*, se determinó la expresión relativa de cada gen por qPCR, con la retro transcripción previa del ARNm. A continuación, se detalla la metodología utilizada en cada caso.

#### 8.4.2.1. Genotipificación para identificación de mutaciones

Se analizaron las mutaciones en los genes de interés (Cuadro 2) por medio de la técnica de qPCR utilizando sondas específicas en un termociclador en tiempo real StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, US). La reacción de amplificación para el gen *BRAF* (rs113488022) se llevó a cabo utilizando sonda TaqMan de la siguiente manera: 5 $\mu$ L de GoTaq® Probe qPCR Master Mix 2x (Promega Corporation, US), 0.5 $\mu$ L de Taqman® genotyping assay 20X, 2.5 $\mu$ L de agua estéril y 2 $\mu$ L de ADN (25ng/ $\mu$ L) en un volumen de 10 $\mu$ L, con las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C durante 1 minuto.

En el caso de los genes *PIK3CA* (rs121913273) y *AKT1* (rs121434592) se realizó con sondas alelo específicas de la siguiente manera: 2.65 $\mu$ L de rhAmp Genotyping Master Mix 2X (previamente preparado con rhAmp Reporter Mix 40X), 0.25 $\mu$ L sonda rhAmp SNP Assay 20X, 0.10 $\mu$ L de agua estéril y 2 $\mu$ L de ADN (25ng/ $\mu$ L) en un volumen de 5 $\mu$ L, con las siguientes condiciones: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C por 20 segundos, seguido de una etapa de inactivación de la enzima durante 15 min a 99.9°C.

#### 8.4.2.2. Análisis de expresión relativa

##### 8.4.2.2.1. Obtención de ADN complementario (ADNc) de ARN total

Se utilizó el kit GoTaq 2-step RT-qPCR system Probe (Promega Corporation, US) para la obtención de ADN complementario (ADNc) de ARN total de los genes de interés (Cuadro 3) de la siguiente manera: Para un volumen de 20  $\mu$ L de reacción se utilizaron 2  $\mu$ g de ARN total, adicionando 0.5  $\mu$ g de random primers y ajustando el volumen a 7  $\mu$ L con agua libre de

ARNasas, se procede a incubar a 70°C durante 5 minutos; posteriormente se realiza otra incubación a 4°C por 5 minutos. Se procede a realizar una mezcla de reacción que contiene 4.9 µL de agua libre de nucleasas, 4 µL de buffer GoScript 5X, 1.6 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µL de dNTP mix (10mM cada dNTP), 0.5 µL de inhibidor RNasin y 1µL de enzima GoScript Reverse Transcriptase, para un volumen final de 13 µL, el cual se adiciona a la mezcla de reacción anterior para obtener un volumen final de 20 µL. Una vez realizado lo anterior, se procede a colocar el tubo de reacción en un termociclador T100TM (Bio-Rad Laboratories, US) de la siguiente manera: 5 minutos a 25°C, 45 minutos a 42°C y 15 minutos a 70°C.

#### *8.4.2.2.2. Amplificación y cuantificación de ADNc*

La amplificación y cuantificación se realizó mediante qPCR, utilizando sondas TaqMan® y PrimeTime® Gene Expression Máster (2X) (Integrated DNA Technologies, US). Se realizaron reacciones multiplex de qPCR. Todas las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el termociclador en tiempo real StepOnePlus (Applied Biosystem, US) de la siguiente manera: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 20 segundos a 60°C. Se realizó cuantificación relativa utilizando como gen de referencia a β-Actina.

Cuadro 2. Mutaciones genéticas asociadas al desarrollo de neoplasias en tiroides

<b>Gen</b>	<b>SNP</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Aminoácido</b>
<i>BRAF</i>	rs113488022	c.1799T>A	V600E
<i>PIK3CA</i>	rs121913273	c.1624G>A	E542K
<i>AKT1</i>	rs121434592	c.49G>A	E17K

Cuadro 3. Genes diana para análisis de expresión

<b>Gen</b>	<b>ID</b>
<i>CLDN1</i>	9076
<i>TIMP1</i>	7076
<i>KRT19</i>	3880

#### 8.4.2.2.3. *Análisis de expresión génica relativa*

Para el análisis de la expresión génica relativa se utilizó el método descrito por el grupo de investigación de Taylor (Taylor et al., 2019) basado en el método doble  $\Delta C_t$ . Las fórmulas se describen a continuación:

$$\Delta Cq \text{ gen diana} = \bar{x} Cq \text{ grupo control} - Cq \text{ por muestra}$$

$$\Delta Cq \text{ gen normalizador} = \bar{x} Cq \text{ grupo control} - Cq \text{ por muestra}$$

$$RQ = 2^{\Delta Cq}$$

$$\text{Expresión relativa normalizada} = \frac{RQ \text{ gen diana}}{RQ \text{ gen normalizador}}$$

$$\text{Proporción de cambio} = \bar{x} \text{ geométrica de la expresión relativa normalizada}$$

Donde:

$Cq$  = Ciclo cuantitativo

$RQ$  = Cantidad relativa; el valor 2 es basado en una eficiencia de reacción del 100%, se realizaron ajustes según la eficiencia de cada gen.

$$\bar{x} = \text{Media}$$

Los datos normalizados se transformaron en  $\log_2$  para su análisis estadístico.

Se realizaron curvas de calibración mediante las cuales se obtuvieron las pendientes utilizadas para el cálculo de la eficiencia mediante la siguiente fórmula:

$$E = [10^{\frac{-1}{\text{pendiente}}}] - 1$$

## 8.5. Análisis estadístico

Los datos se organizaron en cuadros y gráficos. Se utilizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión de datos a base de medias y desviaciones estándar para las variables continuas y, mediante frecuencias y proporciones en el caso de variables categóricas. Se evaluaron asociaciones entre variables cualitativas con la prueba de Chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), o la prueba exacta de Fisher, y razón de momios (RM) con intervalos de confianza (IC) del 95%. Para las variables cuantitativas se utilizó la prueba de t de Student cuando la distribución de la variable se ajustó a la normalidad, o la prueba U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis en caso contrario. Las correlaciones bivariadas se analizaron mediante la prueba de Spearman para la expresión del nivel de ARNm y la edad. Por regresión logística se generaron curvas de características operativas del receptor (ROC) en cada expresión relativa de ARNm y edad para distinguir grupos benignos y malignos. Se realizaron modelos predictivos integrando diferentes variables mediante random forest utilizando el programa Orange, v3.27.1. Se probaron modelos con 100-500 árboles, y se utilizó el rendimiento de validación cruzada de 20 veces para ajustar el modelo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, UK). Una  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativa.

## IX. RESULTADOS

### 9.1. Características clínico-patológicas

En el estudio se incluyeron un total de 97 pacientes con nódulos tiroideos que asistieron a toma de biopsia por PAAF en las instalaciones de Álvarez & Arrazola Radiólogos y que aceptaron participar en el estudio voluntariamente, cumpliendo los criterios de inclusión previamente establecidos en el proyecto. Las muestras citológicas de los pacientes fueron diagnosticadas por un médico patólogo, clasificando a 48 pacientes como Bethesda V o VI, por lo que forman parte del grupo de Pacientes con cáncer de tiroides (PCT) y 47 Pacientes con neoplasia benigna (PNB), correspondiente a aquellos con Bethesda II.

Los PCT tenían una edad promedio de  $47.5 \pm 15.2$  años, y el grupo de PNB de  $51.3 \pm 14.5$  años ( $p = 0.138$ ). Del total de pacientes el 88% ( $n= 85$ ) son mujeres, con una proporción de 7 mujeres por cada hombre ( $p=0.970$ ) (Cuadro 4). Se observó una edad media para las mujeres de  $48.3 \pm 14.7$  años y en el caso de los hombres de  $57.4 \pm 15.2$  años, representando una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.037$ ), esta asociación desaparecía al evaluar solo a los PCT ( $p = 0.137$ ).

En el Cuadro 4 se muestra un resumen de las características epidemiológicas entre grupos. En nuestros pacientes, el 27.8% indicó presentar algún tipo de enfermedad funcional de tiroides, siendo el hipotiroidismo la enfermedad más frecuente en ambos grupos, identificada en el 63.9% de los pacientes que confirmaron presentar algún tipo de afección. Al realizar el análisis estadístico entre grupos no identificamos diferencias significativas, entre la presencia o ausencia de la enfermedad ( $p = 0.286$ ).

En cuanto a los antecedentes familiares de cáncer, identificamos que el 62% de nuestro grupo PCT tenían familiares con cáncer, el 32.3% (n=9) de ellos con CaT donde el 55.5% la relación era con un familiar de primer grado. Sin embargo, el análisis no mostró relación entre los antecedentes familiares y la presencia de CaT, a pesar de que los PNB el 55.1% no tenía familiares con cáncer ( $p = 0.176$ ). Nuestro estudio reveló que haber presentado algún tipo de cáncer previo aumentó más de nueve veces el riesgo de desarrollar lesiones malignas de tiroides ( $p = 0.016$ ; OR 9.14, IC 95% 1.10-76.15), de ellos el 8.3% de los PCT presentan recidiva de la enfermedad; no se encontraron otras asociaciones estadísticas entre grupos y factores de riesgo.

En el Cuadro 5 se observan las características clínicas de los nódulos tiroides entre grupos; respecto al diagnóstico histológico se reportaron 3 categorías, todas ellas dentro de las formas bien diferenciadas, caracterizadas por ser de crecimiento lento. La variante papilar se identifica solo en pacientes con CaT en el 89.6% de los pacientes ( $p < 0.001$ ) y el carcinoma folicular representa un 8.3% dentro de los pacientes con nódulos malignos. Los tumores de células Hürthe representan el 2.1% de los tumores cancerígenos y 4.1% de las neoplasias benignas. Al clasificar los tipos histológicos por localización del nódulo, podemos destacar que los nódulos en un solo lóbulo de la glándula se observan en cada tipo de variante, solo se observan ganglios afectados dentro del carcinoma papilar, representando el 4.9%. En este mismo tipo identificamos que el 2.2% tiene recurrencia del cáncer, puesto que ya se había removido la glándula y volvían a observarse células de carcinoma papilar tras la biopsia.

Cuadro 4. Características epidemiológicas de la población de estudio

Variable	Frecuencia	PCT, % (N = 48)	PNB, % (N = 49)	p
Edad (años)		47.5 ± 15.2	51.3 ± 14.5	0.138 <sup>†</sup>
<45	31	38.8	25.5	0.165
>45	65	61.2	74.5	
Sexo				
Masculino	12	12	12.2	0.970
Femenino	85	88	87.8	
Enfermedad funcional de tiroides				
Si	27	32	22.4	0.286
No	70	68	77.6	
Tipo de enfermedad funcional de tiroides				
Hipotiroidismo	17	68.8	54.5	-
Hipertiroidismo	4	18.8	9.1	
Tiroiditis de Hashimoto	3	6.3	18.2	
Tiroiditis	2	0	18.2	
Otra	1	6.3	0	
Enfermedades respiratorias				
Si	18	16.6	20.8	0.570
No	79	83.3	79.2	
Heredofamiliares de cáncer				
Cáncer de tiroides	14	20	10.2	0.176
Otro tipo de cáncer	38	42	34.7	
Ninguno	45	38	55.1	
Cáncer previo				
Si	9	16	2	<b>0.016</b> ; RM 9.14 (IC 95% 1.10-76.15)
No	88	84	98	
Fumador				
Si	7	4	10.2	0.210
No	90	96	89.8	

Chi cuadrada de Pearson

<sup>†</sup>U Mann Whitney

Cuadro 5. Características clínicas de los nódulos tiroideos entre grupos.

<b>Variable</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>PCT, % (N = 48)</b>	<b>PNB, % (N = 49)</b>
<b>Subtipo histológico</b>			
Folicular	51	8.3	95.9
Papilar	43	89.6	0
Hürthle	3	2.1	4.1
<b>Localización del nódulo</b>			
Unilateral	80	89.1	79.6
Unilateral + Istmo	4	2.2	6.1
Bilateral	4	0	8.2
Istmo	4	2.2	6.1
Ganglio cervical	2	4.3	0
Lecho quirúrgico	1	2.2	0
<b>Metástasis</b>			
Si	3	6.3	0
No	45	93.7	0
<b>Recurrencia del cáncer</b>			
Si	4	8.3	0
No	44	91.7	0

## 9.2. Expresión relativa de ARNm

Para determinar si el nivel de transcrito de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* se correlacionan clínicamente con los nódulos tiroideos malignos, se determinó su expresión relativa en 97 muestras provenientes de PAAF (malignos, n = 48). Como se muestra en la Figura 6, la proporción de cambio relativa en los tres genes es significativamente mayor en los PCT con respecto a los PNB ( $p < 0.0001$ ). El nivel medio de expresión de ARNm  $\pm$  error estándar de los PCT en *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* fue  $41.315 \pm 0.554$ ,  $4.465 \pm 0.301$  y  $11.640 \pm 0.424$  veces mayor, respectivamente.

Se realizó el análisis de correlación para establecer relaciones entre la expresión relativa del ARNm, identificando una fuerte relación positiva entre la expresión relativa de los tres genes ( $p < 0.0001$ ), los coeficientes de correlación entre genes se muestran en la Figura 7. Además, se evaluaron las correlaciones entre edad y expresión génica (Cuadro 6), identificándose una correlación débil estadísticamente significativa con el nivel de ARNm de *KRT19* (Rho = -0.310;  $p = 0.036$ ) y *CLDN1* (Rho = -0.341;  $p = 0.022$ ).

Categorizando a los pacientes por subtipo patológico, el grupo de subtipo papilar (clasificado con el peor pronóstico) exhibe los niveles de expresión más altos en cada caso ( $p < 0.0001$ ), las veces de cambio en escala logarítmica para cada gen fueron *TIMP1* de  $2.40 \pm 1.96$ , *CLDN1* con  $5.51 \pm 3.22$  y  $3.70 \pm 2.73$  para *KRT19*. Los tipos celulares principalmente observados en lesiones tiroideas en nuestro estudio, macrófagos ( $p = 0.216$ ), células gigantes multinucleadas ( $p = 0.849$ ), linfocitos ( $p = 0.556$ ) y macrófagos con hemosiderina ( $p = 0.393$ ) se identificaron sin diferencia entre nódulos malignos y benignos. No se observó correlación entre estas células inmunitarias y los niveles de ARNm.

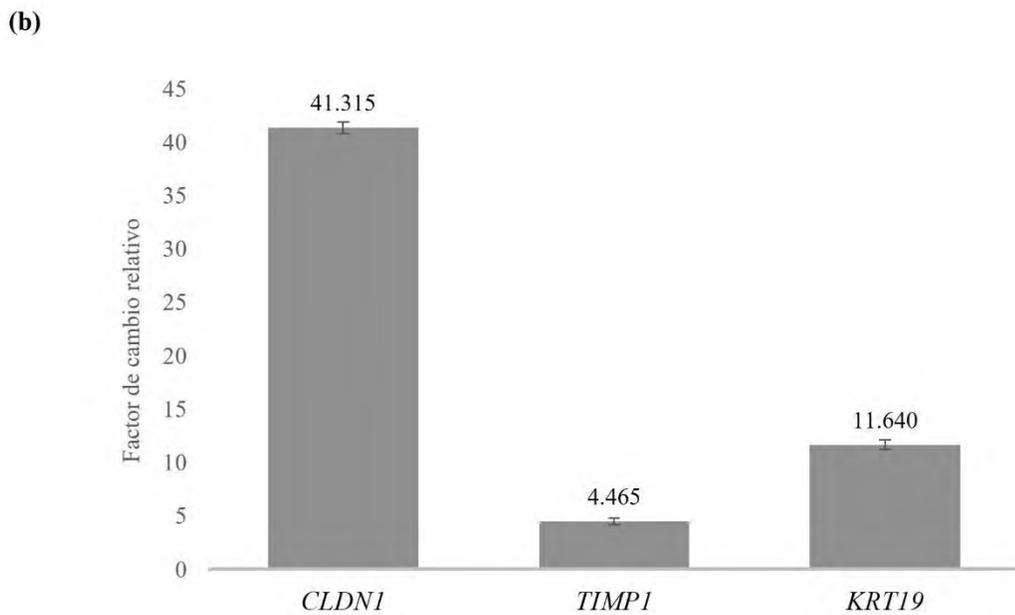
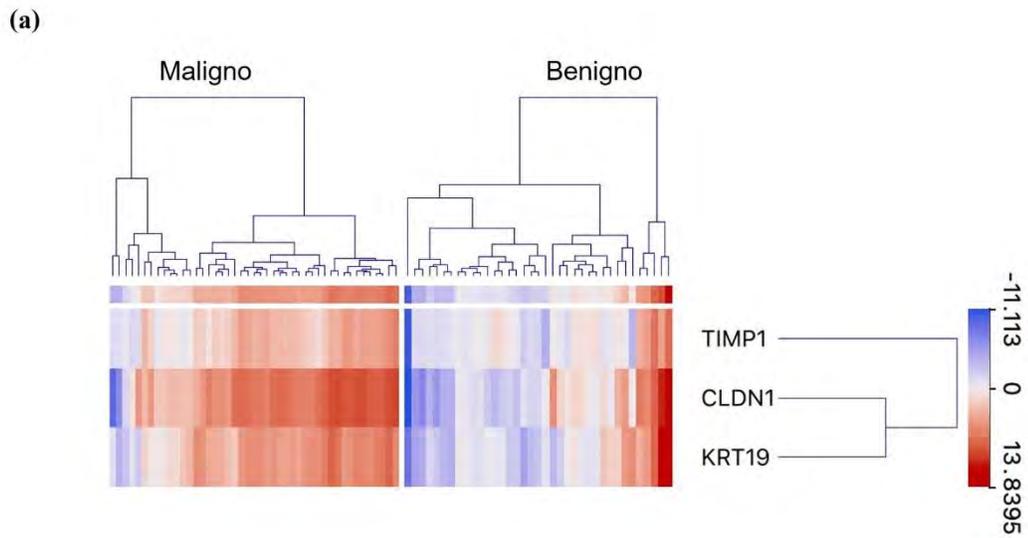


Figura 6. Expresión relativa de ARNm.

(a) Mapa de calor que representa la expresión de ARNm en *TIMP1*, *CLDN1* y *KRT19*. La barra de color en el lado derecho muestra los cambios log<sub>2</sub> veces de la comparación de nódulos benignos versus nódulos malignos. Análisis generado por el programa Orange v3.27.1. (b) Nivel de expresión relativo en el grupo maligno.

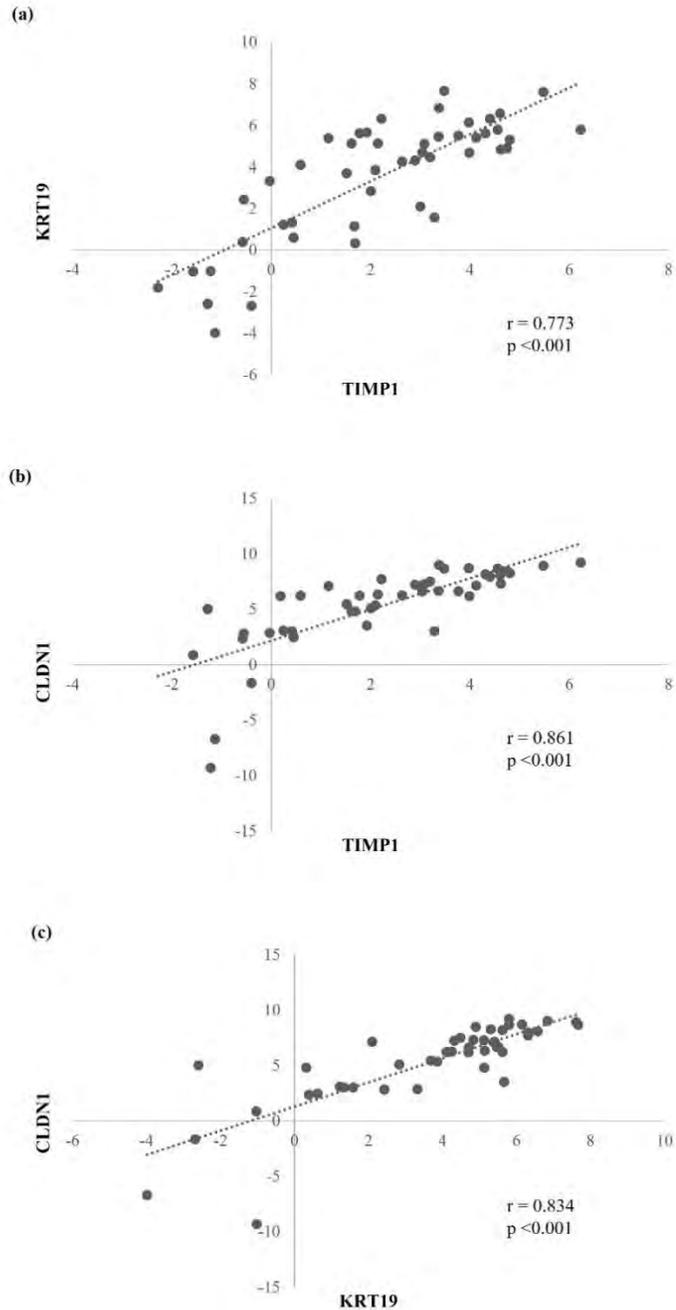


Figura 7. Análisis de correlación entre diferentes expresiones relativas de ARNm en muestras de nódulos tiroideos.

(a) *KRT19* frente a *TIMP1*; (b) *CLDN1* frente a *TIMP1*; (c) *CLDN1* frente a *KRT19*. Los puntos en cada gráfico corresponden a los valores de expresión génica respectivos de log2 normalizados.

Cuadro 6. Correlación de la expresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* con la edad de los pacientes.

<b>Gen</b>	<b>Edad</b>	
	<b>Coficiente</b>	<b>p</b>
<b><i>KRT19</i></b>	-0.310	<b>0.036</b>
<b><i>CLDN1</i></b>	-0.341	<b>0.022</b>
<b><i>TIMP1</i></b>	-0.203	0.171

Correlación de Spearman

### 9.2.1. Análisis de curva ROC

Se generó una curva ROC de los tres genes para evaluar las características predictivas (tasa de verdaderos positivos frente a su tasa de falsos positivos) para discriminar entre PCT y PNB (Figura 8). Los resultados muestran que, los tres genes tienen la capacidad de distinguir lesiones benignas de malignas ( $p < 0.001$ ). El AUC, IC, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada gen se muestran en el Cuadro 7; se utilizó el índice de Youden para seleccionar el punto de corte más adecuado en cada gen según el valor de sensibilidad y especificidad más alto conjuntamente [sensibilidad + (1-especificidad)], identificando para *CLDN1* expresión mayor a 1.94, *TIMPI* superior a 1.46 y en el caso de *KRT19* arriba de 0.21. El mejor VPN se observa en la expresión relativa de *CLDN1* (95.8%).

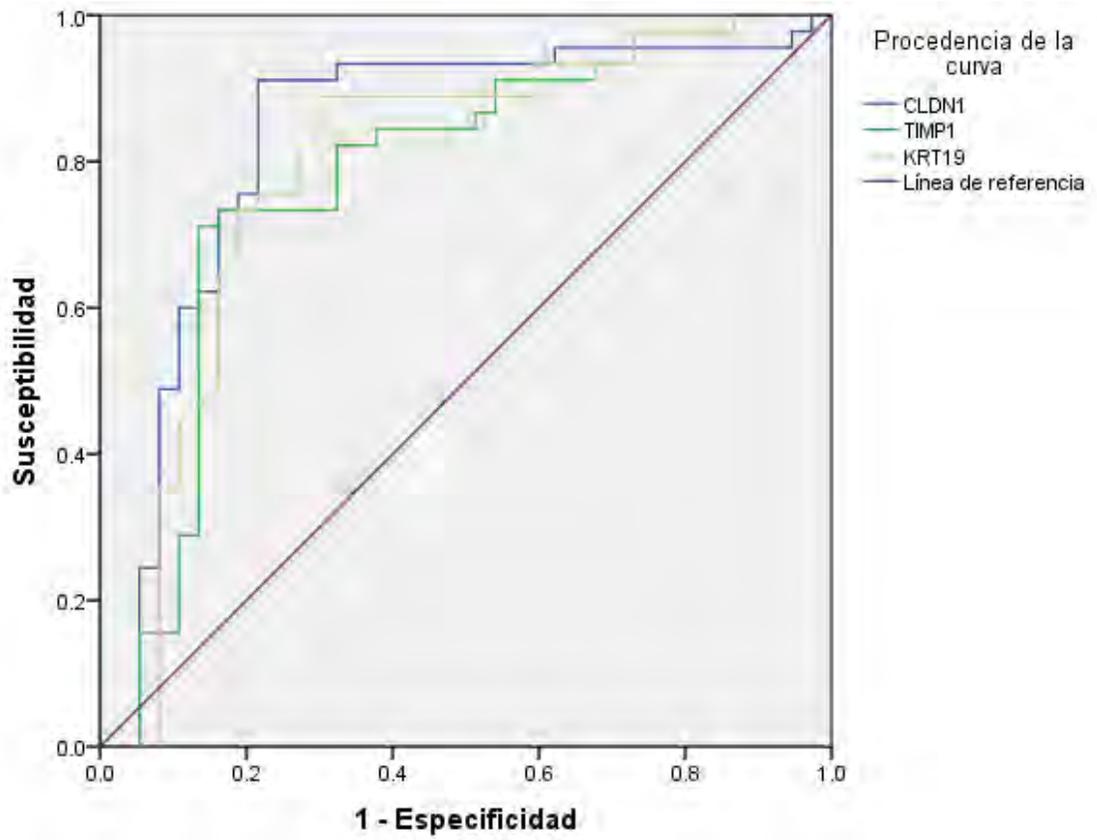


Figura 8. Curva ROC

Análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC) *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* para diferenciar entre grupos.

Cuadro 7. Parámetros de precisión de diagnóstico de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*.

<b>Gen</b>	<b>AUC</b>	<b>p</b>	<b>IC 95%</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<i>CLDN1</i>	0.832	<0.001	0.733-0.932	92%	59.2%	41.1%	95.8%
<i>TIMP1</i>	0.777	<0.001	0.669-0.886	70%	81.6%	54.2%	89.7%
<i>KRT19</i>	0.793	<0.001	0.687-0.900	88%	61.2%	41.4%	94.1%

Chi Cuadrada de Pearson; AUC, Área bajo la curva; IC, Intervalo de confianza; VPP, Valor predictivo positivo; VPN, Valor predictivo negativo

### 9.3. Análisis de mutaciones

Mediante discriminación alélica se caracterizó el genotipo de rs113488022 (*BRAF*; *BRAFV600E*), rs121913273 (*PIK3CA*) y rs121434592 (*AKT1*), en 94 pacientes (PCT n=46); las frecuencias genotípicas y alélicas se observan en el Cuadro 8. El 100% de los pacientes presentaron genotipo GG (homocigoto normal) tanto para *PIK3CA*, como en *AKT1*. En el caso de *BRAFV600E* se identificaron las 3 variantes genotípicas: 70.2% TT (homocigoto normal), 17% TA (heterocigoto y 12.8% AA (homocigoto mutado), con una frecuencia general para el alelo mutado (A) de 0.210.

Para *BRAFV600E*, todos los PNB son homocigotos normales y el cambio T/A solo se observa en los PCT con una frecuencia alélica de A de 0.430 en sus dos variantes genotípicas, lo que indica penetrancia completa de la mutación. Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los PCT y PNB al comparar las frecuencias genotípicas entre grupos, identificándose como factor de riesgo de nódulos malignos ser heterocigoto u homocigoto mutado, lo cual es consistente con el modelo de herencia dominante que presenta la mutación, ya que el mayor valor de riesgo (RM 3.667, IC 95%: 2.473 – 5.437) se observa al comparar entre grupos a los portadores del alelo A respecto a los no portadores ( $p < 0.001$ ) (Cuadro 9).

Se realizaron asociaciones entre portadores y no portadores del alelo mutado (A) en *BRAFV600E* con las características epidemiológicas. Analizando el total de la población de estudio se observó una diferencia significativa entre las medias de edad ( $p = 0.029$ ), observando que los pacientes portadores del alelo mutado tienen una media de edad menor ( $44.19 \pm 15.86$ ) respecto a los homocigotos normales ( $51.47 \pm 13.73$ ), esta asociación se mantenía al categorizar a los pacientes como  $>45$  años ( $p = 0.020$ ); sin embargo, al analizar exclusivamente a los PCT bajo las mismas características no se identificaron diferencias significativas (Cuadro 10).

Cuadro 8. Frecuencias genotípicas y alélicas de las mutaciones en los genes *BRAF*, *PIK3CA* y *AKT1* en población de estudio.

<b>Gen (mutación)</b>	<b>Genotipo</b>	<b>Frecuencia (%)</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia</b>
<i>BRAF</i> (rs113488022)	TT	66 (70.2)	T	0.79
	TA	16 (17)	A	0.21
	AA	12 (12.8)		
<i>PIK3CA</i> (rs121913273)	GG	94 (100)	G	1
			A	0
<i>AKT1</i> (rs121434592)	GG	94 (100)	G	1
			A	0

Cuadro 9. Frecuencias genotípicas y alélica de la mutación *BRAFV600E* entre los grupos de estudio.

<b>Genotipo</b>	<b>PCT n=46 (%)</b>	<b>PNB n=48 (%)</b>	<b>p</b>	<b>RM (IC 95%)</b>	
	TT	18 (39.1)	48 (100)	<0.001	0.273 (0.184-0.404)
	TA	16 (34.8)	-	<0.001	2.600 (1.964 – 3.443)
<i>BRAFV600E</i>	AA	12 (26.1)	-	<0.001	2.412 (1.865 – 3.119)
	T	0.570	1	<0.001	0.273 (0.184 – 0.404)
	A	0.430	0	<0.001	3.667 (2.473 – 5.437)

Chi Cuadrada de Pearson; Razón de momios (RM); Intervalo de confianza (IC).

Cuadro 10. Frecuencias genotípicas y alélicas de *BRAFV600E* de acuerdo con su edad y sexo.

Genotipo	Edad (años) Media $\pm$ DE	p <sup>a</sup>	Edad >45	p <sup>b</sup>	Sexo		p <sup>b</sup>
					Femenino	Masculino	
<i>Población de estudio, n=94 (%)</i>							
<b>TT</b>	51.47 $\pm$ 13.73	<b>0.029</b>	49 (77.8)	<b>0.020</b>	57 (68.7)	9 (81.8)	0.370
<b>TA</b>	44.33 $\pm$ 15.60	0.171	9 (14.3)	0.397	15 (18.1)	1 (9.1)	0.456
<b>AA</b>	44 $\pm$ 16.86	0.149	5 (7.9)	<b>0.026</b>	11 (13.3)	1 (9.1)	0.697
<b>Portador A</b>	44.19 $\pm$ 15.86	<b>0.029</b>	14 (22.2)	<b>0.020</b>	26 (31.3)	2 (18.2)	0.370
<i>Cáncer de tiroides, n=46 (%)</i>							
<b>TT</b>	51.50 $\pm$ 11.43	0.099	14 (50)	0.079	15 (36.6)	3 (60)	0.365
<b>TA</b>	44.33 $\pm$ 15.60	0.372	9 (32.1)	0.828	15 (36.6)	1 (20)	0.645
<b>AA</b>	44.0 $\pm$ 16.86	0.394	5 (17.9)	0.086	11 (26.8)	1 (20)	0.743
<b>Portador A</b>	44.19 $\pm$ 15.86)	0.099	14 (51.9)	0.079	26 (92.9)	2 (7.1)	0.365

DE, Desviación estándar.

<sup>a</sup> U de Mann Whitney; <sup>b</sup> Chi cuadrada de Pearson.

Respecto al género, no se identificó diferencia significativa al comparar con los genotipos de *BRAFV600E* (Cuadro 10). Siguiendo con las características epidemiológicas, se analizaron asociaciones entre los genotipos y las enfermedades funcionales de la tiroides (Cuadro 11) en el total de la población de estudio, así como solo entre los PCT, en ninguno de los casos se identificaron diferencias estadísticamente significativas.

Previamente identificamos como factor de riesgo para el desarrollo de CaT el haber presentado algún tipo de cáncer previo (Cuadro 4). Al evaluar si entre los genotipos se mantenía esta relación, confirmamos la misma asociación (Cuadro 12), en donde el riesgo aumenta 4.565 veces (IC 95%: 1.010-20.643) para los portadores del alelo A en población total; el 71.4% de los pacientes que indicaron presentar algún tipo de cáncer con anterioridad eran positivos a *BRAFV600E*, de ellos el 50% presentaron CaT con recidiva de la enfermedad menor a 10 años. En el análisis solo de los PCT estas asociaciones no resultaban significativas. No se identificó una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo de los pacientes con sus antecedentes heredofamiliares de cáncer (Cuadro 12).

Se analizaron asociaciones entre los genotipos y las variantes histológicas de los nódulos (Cuadro 12), identificando diferencias significativas al comparar entre la población de estudio total, donde los portadores del alelo A tienen un riesgo 48.286 veces mayor (IC 95%: 10.202-228.543) de presentar carcinoma papilar sobre las otras variantes ( $p < 0.001$ ). Evaluando solo a los PCT el genotipo ya no representa un factor diferencial entre el tipo de variante histológica, en donde el 58.7% de los carcinomas papilares son portadores del alelo A. Se identificó un paciente con genotipo AA y diagnóstico de carcinoma folicular.

Cuadro 11. Frecuencias genotípicas y alélicas de *BRAFV600E* en pacientes de acuerdo con sus antecedentes de enfermedad funcional de tiroides.

Genotipo	Si	p	RM (IC 95%)	Enfermedad en tiroides		
				Hipotiroidismo	Hipertiroidismo	Otra
<i>Población de estudio, n=94 (%)</i>						
<b>TT</b>	16 (61.5)	0.255	0.576 (0.221-1.449)	9 (56.2)	2 (50)	5 (83.3)
<b>TA</b>	7 (26.9)	0.114	2.415 (0.792-7.364)	4 (25.0)	2 (50)	1 (16.7)
<b>AA</b>	3 (11.5)	0.825	0.855 (0.212-3.442)	3 (18.8)	0	0
<b>Portador A</b>	10 (38.5)	0.255	1.736 (0.667-4.517)	7 (43.8)	2 (50)	1 (16.7)
<i>Cáncer de tiroides, n=46 (%)</i>						
<b>TT</b>	6 (37.5)	0.869	0.900 (0.258-3.136)	4 (36.4)	1 (33.3)	1 (50)
<b>TA</b>	7 (43.8)	0.351	1.815 (0.515-6.392)	4 (36.4)	2 (66.7)	1 (50)
<b>AA</b>	3 (18.8)	0.408	0.538 (0.123-2.362)	3 (27.3)	0	0
<b>Portador A</b>	10 (62.5)	0.869	1.111 (0.319-3.871)	7 (63.6)	2 (66.7)	1 (50)

Chi Cuadrada de Pearson. Razón de momios (RM); Intervalo de confianza (IC).

Cuadro 12. Frecuencias genotípicas y alélicas de *BRAFV600E* en pacientes de acuerdo con sus características clínicas y antecedentes heredofamiliares de cáncer.

Genotipo	Diagnóstico histológico			p <sup>†</sup>	RM (IC 95%) <sup>†</sup>	Cáncer previo	p	RM (IC 95%)	Heredofamiliares		p
	Folicular	Papilar	Hürthle						Cáncer de tiroides	Otro cáncer	
<i>Población de estudio, n=94 (%)</i>											
<b>TT</b>	49 (98)	14 (34.1)	3 (100)	< <b>0.00.1</b>	0.021 (0.004-0.098)	3 (37.5)	<b>0.034</b>	0.219 (0.048-0.990)	10 (71.4)	23 (62.2)	0.362
<b>TA</b>	0	16 (39)	0	< <b>0.00.1</b>	3.250 (2.330-4.534)	3 (37.5)	0.107	3.369 (0.716-15.845)	4 (28.6)	8 (21.6)	0.158
<b>AA</b>	1 (2)	11 (26.8)	0	<b>0.002</b>	8.667 (1.779-42.215)	2 (25)	0.278	2.533 (0.449-14.301)	0	6 (16.2)	0.287
<b>Portador A</b>	1 (2)	27 (65.9)	0	< <b>0.00.1</b>	48.286 (10.202-228.543)	5 (62.5)	<b>0.034</b>	4.565 (1.010-20.643)	4 (28.6)	14 (37.8)	0.362
<i>Cáncer de tiroides, n=46 (%)</i>											
<b>TT</b>	3 (75)	14 (34.1)	1 (100)	0.191	0.269 (0.044-1.657)	2 (28.6)	0.688	0.575 (0.099-3.341)	5 (55.6)	6 (30)	0.417
<b>TA</b>	0	16 (39)	0	0.078	1.250 (1.045-1.495)	3 (42.9)	0.681	1.500 (0.291-7.720)	4 (44.4)	8 (40)	0.459
<b>AA</b>	1 (25)	11 (26.8)	0	0.644	0.667 (0.106-4.206)	2 (28.6)	0.871	1.160 (0.194-6.951)	0	6 (30)	0.130
<b>Portador A</b>	1 (25)	27 (65.9)	0	0.191	3.714 (0.603-22.866)	5 (71.4)	0.688	1.739 (0.299-10.104)	4 (44.4)	14 (70)	0.417

Chi Cuadrada de Pearson. Razón de momios (RM); Intervalo de confianza (IC).

<sup>†</sup>Análisis Papilar vs Otro

#### 9.4. Relación entre el perfil de expresión y genotipo

Con el objetivo de identificar si existe asociación entre el genotipo de cada paciente con el nivel de expresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*, se realizaron estadísticos para el contraste de medias de expresión de cada gen entre los grupos de genotipos de *BRAFV600E*, identificando en cada caso una diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 13), tanto para el análisis de la población total ( $p < 0.001$ ) como evaluando solo a los PCT ( $p \leq 0.001$ ).

Respecto a la población total, se puede observar que en cada gen la media de expresión de los portadores del alelo A es mucho mayor respecto a los homocigotos normales (TT), lo cual corresponde con el hecho de que el 100% de los PNB tienen genotipo TT, y ya se había demostrado previamente la sobreexpresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* en los PCT es estadísticamente significativa sobre los PNB (Figura 6). El comportamiento se mantiene al analizar solo dentro de los PCT, lo que podría sugerir una posible relación entre el alelo mutado y la expresión de estos genes, que sería interesante evaluar en estudios posteriores.

Del mismo modo, se realizó el análisis de asociación entre las frecuencias de cada genotipo de *BRAF* y portadores del alelo A, con los puntos de corte de expresión previamente determinados mediante el índice de Youden para *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* para diferenciar cuando el valor log de expresión es diferencial de una patología maligna. En el Cuadro 14 se observa que, para la población total de estudio, existe diferencia significativa entre cada combinación de categorías *BRAF* con el valor de corte de expresión, representando un factor de riesgo ser portador del alelo mutado en cada caso. Así mismo, la relación se mantiene al comparar solo dentro de los PCT, siendo un factor de protección el genotipo homocigoto normal, al contrastar con la expresión de *CLDN1*, *TIMP1* o *KRT19*. La relación más fuerte se identifica con el valor de corte de *TIMP1*, donde el 87.1% de los PCT con valores de *TIMP1*

por arriba del punto de corte son portadores del alelo A ( $p < 0.05$ ), lo que representa hasta 94.5 (IC 95%: 9.623-927.972) veces más riesgo, esta relación se observa desde el genotipo heterocigoto, indicando fuertemente una posible relación entre la mutación *BRAFV600E* con la sobreexpresión de *TIMP1*. En el caso de *CLDN1* ( $p = 0.019$ ) y *KRT19* ( $p = 0.002$ ), si bien representa un factor de riesgo ser portador del alelo mutado, no se identifica diferencia significativa entre los genotipos TA (*CLDN1*  $p = 0.282$ ; *KRT19*  $p = 0.078$ ) y AA (*CLDN1*  $p = 0.560$ ; *KRT19*  $p = 0.317$ ), de acuerdo con el valor de corte de expresión seleccionado para esos genes.

Cuadro 13. Diferencia de medias de expresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* con las frecuencias genotípicas y alélica de *BRAF*.

Genotipo	CLDN1		TIMP1		KRT19	
	Media ± Error estándar	p	Media ± Error estándar	p	Media ± Error estándar	p
<i>Población de estudio, n=94 (%)</i>						
<b>TT</b>	0.711 ± 0.680		0.055 ± 0.312		0.367 ± 0.513	
<b>TA</b>	6.867 ± 0.409	<b>&lt;0.001</b>	3.069 ± 0.345	<b>&lt;0.001</b>	4.975 ± 0.428	<b>&lt;0.001</b>
<b>AA</b>	7.501 ± 0.406		3.772 ± 0.358		4.925 ± 0.564	
<b>Portador A</b>	7.141 ± 0.293	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	3.370 ± 0.254	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	4.953 ± 0.337	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>
<i>Cáncer de tiroides, n=46 (%)</i>						
<b>TT</b>	2.281 ± 1.153		0.153 ± 0.359		1.275 ± 0.756	
<b>TA</b>	6.867 ± 0.409	<b>&lt;0.001</b>	3.069 ± 0.345	<b>&lt;0.001</b>	4.975 ± 0.428	<b>0.001</b>
<b>AA</b>	7.501 ± 0.406		3.772 ± 0.358		4.924 ± 0.564	
<b>Portador A</b>	7.141 ± 0.293	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	3.370 ± 0.254	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>	4.953 ± 0.337	<b>&lt;0.001<sup>†</sup></b>

Kruskal-Wallis

<sup>†</sup> U Mann Whitney

Cuadro 14. Asociaciones genotípicas y alélica de *BRAF* con el punto de corte para la sobreexpresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*

Genotipo	CLDN1 > 1.94	p	RM (IC 95%)	TIMP >1.46	p	RM (IC 95%)	KRT19 >0.21	p	RM (IC 95%)
<i>Población de estudio, n=94 (%)</i>									
<b>TT</b>	34 (54.8)	<b>&lt;0.001</b>	0.515 (0.408-0.651)	13 (32.5)	<b>&lt;0.001</b>	0.009 (0.001-0.073)	31 (52.5)	<b>&lt;0.001</b>	0.470 (0.363-0.607)
<b>TA</b>	16 (25.8)	<b>0.002</b>	1.696 (1.409-2.040)	15 (37.5)	<b>&lt;0.001</b>	31.800 (3.975-254.377)	16 (27.1)	<b>0.001</b>	1.814 (1.485-2.216)
<b>AA</b>	12 (19.4)	<b>0.008</b>	1.640 (1.379-1.950)	12 (30)	<b>&lt;0.001</b>	2.929 (2.168-3.955)	12 (20.3)	<b>0.004</b>	1.745 (1.447-2.103)
<b>Portador A</b>	28 (45.2)	<b>&lt;0.001</b>	1.941 (1.536-2.453)	27 (67.5)	<b>&lt;0.001</b>	110.077 (13.669-886.477)	28 (47.5)	<b>&lt;0.001</b>	2.129 (1.648-2.751)
<i>Cáncer de tiroides, n=46 (%)</i>									
<b>TT</b>	14 (33.3)	<b>0.019</b>	0.778 (0.608-0.996)	4 (12.9)	<b>&lt;0.001</b>	0.011 (0.001-0.104)	12 (30)	<b>0.002</b>	0.667 (0.481-0.924)
<b>TA</b>	16 (38.1)	0.282	1.154 (1.003-1.328)	15 (48.4)	<b>0.005</b>	13.125 (1.533-112.402)	16 (40)	0.078	1.250 (1.045-1.495)
<b>AA</b>	12 (28.6)	0.560	1.133 (1.002-1.281)	12 (38.7)	<b>0.005</b>	1.789 (1.327-2.412)	12 (30)	0.317	1.214 (1.039-1.419)
<b>Portador A</b>	28 (66.7)	<b>0.019</b>	1.286 (1.004-1.646)	27 (87.1)	<b>&lt;0.001</b>	94.5 (9.623-927.972)	28 (70)	<b>0.002</b>	1.5 (1.082-2.079)

Chi Cuadrada de Pearson; Razón de momios (RM); Intervalo de confianza (IC).

## X. DISCUSIÓN

El CaT es un problema de salud pública a nivel internacional, afectando en mayor proporción a la población femenina y todos los grupos de edad, en algunos casos iniciando en edades tempranas. Por lo tanto, el análisis mutacional y de expresión cobra relevancia al identificar genes asociados con el desarrollo de esta neoplasia donde, su caracterización se relaciona con el pronóstico de la enfermedad y mecanismo moleculares de la carcinogénesis.

Los hallazgos clínico-patológicos de los PCT fueron consistentes con la revisión bibliográfica. En el diagnóstico histológico del nódulo se reportaron 3 categorías, todas ellas dentro de las formas bien diferenciadas, caracterizadas por ser de crecimiento lento, donde la frecuencia de los subtipos histológicos coinciden con las indicadas a nivel mundial para esta patología (Haugen, 2017; Sosa Martín & Ernand Rizo, 2016), siendo el carcinoma papilar el más prevalente dentro del CaT en el 89.6% de los casos. La baja prevalencia del CaT folicular se puede deber a que estos son más comunes ante la deficiencia de yodo en la dieta, en el caso de nuestro país, la mayoría de las personas obtienen suficiente yodo en la alimentación por medio de la sal de mesa, donde el exceso de yodo se ha llegado a asociar con el riesgo de carcinoma papilar. Los tumores de Hürthe debido a sus características clínico-patológicas se consideran un grupo aparte de los tumores foliculares en la nueva clasificación de la OMS. Estos consisten en células con agrandamiento del citoplasma ocasionado por la acumulación de mitocondria; en el caso de los malignos pueden desarrollar metástasis a ganglios linfáticos cervicales y tienen tumores más grandes y se presentan en menos del 5%, en nuestro estudio representan el 2% de los tumores cancerígenos y 4.1% de las neoplasias benignas (ACS, 2019; Cameselle-Teijeiro & Sobrinho-Simões, 2018). Al clasificar los tipos histológicos por localización del nódulo, podemos destacar que los nódulos en un solo lóbulo de la glándula se

observan en cada tipo de variante, coincidiendo con lo reportado por Sosa & Ernard, quienes indican que los tumores diferenciados son de crecimiento lento y generalmente unilaterales (Sosa Martín & Ernand Rizo, 2016). Solo se observan ganglios afectados dentro del CPT, representando el 4.9% y de acuerdo con la ACS estos carcinomas a pesar de su crecimiento lento se propagan comúnmente a los ganglios linfáticos del cuello (ACS, 2019).

De los PCT, el 88% son mujeres, con una proporción de 7 mujeres por cada varón, mayor de lo reportado por GLOBOCAN en 2020 para población mexicana donde indican una relación de 1 hombre por cada 4 mujeres (International Agency for Research on Cancer, 2022). La mayor prevalencia de mujeres podría estar relacionada con la concentración de estrógenos. Esta hormona se encuentra en mayor concentración en el sexo femenino y es un factor de crecimiento potente tanto para las células tiroideas benignas como para las malignas. Una de las vías por la cual ejerce su efecto promotor del crecimiento es a través de las rutas MAPK y PI3K/Akt, estimuladas por un receptor de estrógeno unido a la membrana (Derwahl & Nicula, 2014). Además, en nuestra investigación, las mujeres tenían una edad de aparición significativamente más temprana que los hombres, lo cual ha sido reportado anteriormente (Dinets et al., 2015).

En nuestros pacientes la frecuencia de enfermedades funcionales de la tiroides era similar entre los grupos de estudio, siendo el hipotiroidismo la principal afección. Algunos autores han identificado una correlación positiva entre el CaT y enfermedades no autoinmunes de tiroides (Rodríguez Ramos, Boffill Corrales, & Rodríguez Soria, 2016), en nuestro caso no se identificó tal asociación.

El 9.1% de los pacientes indico haber tenido algún tipo de cáncer con anterioridad. Al dividir por grupos la frecuencia incrementa en casos de malignidad del nódulo, con un riesgo mayor de 9 veces de presentar CaT si se tiene un antecedente de cáncer, tal y como se ha

demostrado anteriormente donde el riesgo se triplica (Rodríguez Ramos et al., 2016). Al evaluar si el CaT previo influía en este riesgo, no se observó dicha asociación, por lo tanto, la aparición de nódulos malignos podría representar en algunos casos la recurrencia de la enfermedad o ser producto de un cáncer primario.

En CaT, como en otras neoplasias malignas, los antecedentes heredofamiliares pueden representar un riesgo en cuanto al desarrollo de cáncer (Recio-Córdova et al., 2020). Específicamente en los antecedentes de CaT es evidente una diferencia entre grupos, con el doble de frecuencia en los PCT respecto a los PNB, sin embargo, no representa una diferencia estadísticamente significativa. Otros investigadores han señalado que entre el 5-10% de los carcinomas diferenciados, como el papilar, tienen un antecedente familiar, y que tener antecedentes puede representar hasta 4 veces mayor riesgo, de acuerdo con Xu y cols en población americana (Haugen et al., 2016; Xu, Li, Wei, El-Naggar, & Sturgis, 2012). Las estimaciones de probabilidad sugieren que cuando solo dos familiares de primer grado están afectados, la probabilidad de que sea un caso esporádico es del 62% (Haugen et al., 2016), en nuestro caso, en la mayoría de las genealogías solo se ve afectado un familiar y en el caso de dos o más miembros de primer grado la frecuencia entre grupos es similar.

### **10.1. Perfil de expresión**

El desarrollo del carcinoma de tiroides está fuertemente influenciado por una serie de alteraciones moleculares, algunas específicas de esta patología (Lu et al., 2018). La clasificación de los tumores humanos en distintos grupos según su origen y apariencia histopatológica ha sido la base para el diagnóstico y tratamiento. Esta clasificación generalmente se basa en la arquitectura celular y solo en antígenos específicos de células. Por el contrario, los ensayos de

expresión génica tienen el potencial de identificar miles de características únicas para cada tipo de tumor (Agretti et al., 2022).

La desregulación de la expresión de *CLDN1* se ha informado previamente en tumores epiteliales (Gowrikumar et al., 2021), en donde su proteína generalmente está mal localizada fuera de las uniones estrechas, y su desregulación no contribuyen al sellado de las uniones ni a la regulación de la barrera paracelular (Piontek et al., 2020). Por lo tanto, la regulación positiva aumenta la permeabilidad paracelular, favoreciendo la progresión tumoral al promover la migración e invasión celular y metástasis vía EMT (Gowrikumar et al., 2021; Piontek et al., 2020; Zhang et al., 2016). En nuestro estudio, se identificó una mayor expresión de *CLDN1* en los PCT, coincidiendo con lo reportado previamente en carcinoma papilar de tiroides, donde la sobre expresión se relaciona también con metástasis a ganglios linfáticos (Piontek et al., 2020) y en cáncer colorrectal *CLDN1* aumenta de manera específica por etapa y se correlaciona con EMT, invasión, metástasis y peor pronóstico (Gowrikumar et al., 2021).

En nuestra investigación, *CLDN1* presenta un valor de AUC de 0.832, de acuerdo con un estudio realizado por el grupo de Gowrikumar en donde evalúan la capacidad de este gen para discriminar cáncer colorrectal tomando información como referencia la base Atlas del Genoma del Cáncer, obtuvieron un valor de AUC de 0.920. Este mismo estudio reportó una correlación positiva entre la expresión de *CLDN1* y *PIK3CA*, la cual no había sido reportada previamente (Gowrikumar et al., 2021) En nuestra investigación no analizamos esta asociación, pero podría resultar de interés para estudios futuros.

Se identificó la sobreexpresión de *TIMPI* en nódulos malignos, este comportamiento contrasta con su principal mecanismo de acción como inhibidor de metaloproteinasas (MMPs); sin embargo, otros investigadores han identificado que *TIMPI* participa principalmente en la

regulación de la matriz extracelular, la EMT y las vías de transducción de señales P13K/AKT y MAPK, apoyando el papel en la proliferación, invasión tumoral y metástasis (Qiu et al., 2018; Shou et al., 2022; Song et al., 2016). La sobreexpresión de *TIMP1* ha sido asociada con mal pronóstico en otros carcinomas como en el caso del cáncer de mama (Cheng et al., 2016), colón (Song et al., 2016) y cáncer de células renales (Kallakury et al., 2001; Shou et al., 2022).

En nuestro estudio evaluamos el nivel de expresión del transcrito de *TIMP1* en muestras de citología líquidas, confirmando que el nivel aumenta significativamente en PCT. *TIMP1* es una proteína secretora que podría detectarse en sangre y fluidos corporales; en cáncer de mama se ha demostrado que los niveles séricos de la proteína de *TIMP1* aumentan significativamente, asociándose con mal pronóstico (Cheng et al., 2016), por lo que sería de interés analizar sus niveles séricos como biomarcador para CaT papilar.

Se han evaluado las características predictivas de *TIMP1* para la detección de otros tipos de cáncer en población china, en el caso del cáncer de células renales, los resultados indicaron que *TIMP1* puede distinguir adecuadamente a los pacientes con cáncer con un AUC de 0.885 (Shou et al., 2022) y para cáncer gástrico de 0.767 (Y.-Y. Wang, Li, Zhao, & Wang, 2013), en nuestro caso se alcanzó un valor similar de AUC de 0.777, indicando su potencial uso para la detección de esta patología en conjunto de otros marcadores de malignidad.

*KRT19* es un marcador inmunohistoquímico frecuentemente utilizado para determinar carcinomas malignos de páncreas, mama, colon, seroso de alto grado, ovario, urotelial, esófago y estómago. En la tiroides, se puede encontrar con expresión de baja a moderada en los folículos tiroideos normales pero con una mayor expresión en transformaciones malignas (Dinets et al., 2015; Menz et al., 2021). En nuestros resultados, su expresión aumentó significativamente solo en los PCT, con una sensibilidad del 88%, se han reportado resultados similares donde la

expresión de *KRT19* es significativamente mayor en muestras de carcinoma papilar (Dinets et al., 2015; Flanagan et al., 2008; Ju et al., 2015) respecto a lesiones benignas, asociándose con metástasis a ganglios linfáticos, aumento del tamaño del tumor y estadio avanzado (Ju et al., 2015). Cuando se realizan ensayos inmunohistoquímicos para evaluar la presencia de la proteína en el tejido o suero, se llega a distintas conclusiones, en algunos casos el tejido adyacente morfológicamente normal que rodea a las células cancerígenas no presentan positividad para *KRT19* (Dinets et al., 2015); sin embargo, otras investigaciones reportan patrones de intensidad moderada en varias lesiones benignas, lo cual se puede deber a las diferencias en laboratorios, especificidades de anticuerpos y observadores (Flanagan et al., 2008), por lo que si bien no se debe descartar su uso como marcador inmunohistoquímico para el diagnóstico de CaT, su sobreexpresión debe ser acompañado de otros biomarcadores que aumenten la especificidad.

Ha quedado claro que un solo marcador no es suficiente para el diagnóstico de CaT, por lo tanto, muchos investigadores optan por paneles para evaluar las lesiones tiroideas. Al realizar un análisis predictivo mediante curvas ROC para determinar la capacidad de cada gen en la diferenciación entre nódulos benignos y malignos, identificamos que individualmente presentan resultados favorables. Por ello, la capacidad colectiva de estos marcadores, junto con características que previamente se identificaron como factores de riesgo para el desarrollo de CaT (Bogović Crnčić, Ilić Tomaš, Giroto, & Grbac Ivanković, 2020; Román-González, Giraldo, Monsalve, Vélez, & Restrepo, 2013), se incluyeron para evaluar estos modelos. Los resultados obtenidos por el modelo random forest mostraron como variables significativas la expresión de los tres genes de estudio junto con el antecedente personal de cáncer, representando un AUC (0.821), con mejor precisión y un VPP (85.7%). Entre las ventajas de utilizar estos modelos está la identificación de variables de riesgo que no están asociadas linealmente con la

variable de estudio, pero que junto con otros marcadores pueden determinar la dirección del diagnóstico. Además, nuestros resultados destacan la importancia del análisis de expresión y muestran un potencial interesante como biomarcadores de ARNm para la detección del CaT.

Los resultados demostraron una fuerte correlación entre la expresión de estos genes en los PCT. La correlación observada entre *KRT19*, *TIMP1* y *CLDN1* puede sugerir interacciones funcionales entre estos productos génicos durante la progresión del cáncer de tiroides. Se ha demostrado que la alteración genética de los activadores de la vía MAPK y P13K/AKT podría afectar su expresión, lo que llevaría a la transformación celular oncogénica, favoreciendo principalmente la proliferación tumoral y la metástasis (Bommarito et al., 2011; Caruso et al., 2014; Huang et al., 2014; Ju et al., 2015; Song et al., 2016; X. Wang et al., 2019).

## **10.2. Mutaciones genéticas**

Una mutación en cualquier proteína involucrada en la cascada de señalización intracelular mediada por un receptor del tipo tirosina cinasa puede determinar que una célula normal se convierta en célula cancerígena (Mondragón-Terán et al., 2016). Existe una serie de alteraciones somáticas, como mutaciones y reordenamientos genéticos, directamente implicados en la tumorigénesis tiroidea (Macerola & Basolo, 2018).

En nuestro estudio se analizaron muestras de NT en búsqueda de las mutaciones rs121913273 en *PIK3CA*, rs121434592 de *AKT1* y rs113488022 *BRAF* (mutación *BRAFV60E*). Estas mutaciones se localizan en regiones codificantes, las cuales se caracterizan por aumentar la actividad a nivel proteína, provocando la sobre activación de las vías de señalización de la cual forman parte, lo que da información sobre el pronóstico de la enfermedad (Gymnopoulos et al., 2007; Mondragón-Terán et al., 2016; Ricarte-Filho et al., 2009). En nuestro estudio no se detectaron las mutaciones en rs121913273 (*PIK3CA*) y rs121434592 (*AKT1*) en las muestras

analizadas. Esto podría deberse a que las mutaciones en estos genes son más frecuentes en el CaT folicular así como en las formas poco diferenciadas del CaT (anaplásicos) (Gymnopoulos et al., 2007; Ricarte-Filho et al., 2009). Mutaciones en el gen *AKT1* se han reportado en carcinomas papilares, pero en menor frecuencia (Ricarte-Filho et al., 2009). En nuestro estudio la baja frecuencia de PCT con subtipo folicular disminuye las probabilidades de identificar estas mutaciones. No obstante, su inclusión en la caracterización molecular de los NT puede agregar especificidad, ya que de identificarse aumentan la capacidad invasiva de las células (Ricarte-Filho et al., 2009).

La mutación *BRAFV600E* (rs113488022) es la alteración genética más frecuente en melanoma, leucemia de células pilosas y CaT (~60%) (Valvo & Nucera, 2019). En CaT se encuentra presente en hasta el 80% de los carcinomas papilares clásicos y en algunas ocasiones se observa en la variante folicular del carcinoma papilar, formas de CaT poco diferenciado y anaplásicos que coexisten con el carcinoma papilar o surgen de él (Agarwal et al., 2021; Kebebew et al., 2007). En nuestro caso, la mutación *BRAFV600E* presenta penetrancia completa coincidiendo con su patrón de herencia dominante, ya que todos los pacientes portadores de la mutación presentaban CaT papilar, y un caso de CaT folicular, sin embargo es necesaria la confirmación histológica del tejido por medio de cirugía para comprobar este último hallazgo ya que el único reporte que se tiene *BRAF* positivo en carcinoma folicular es para la mutación *BRAFK601E* (Pennelli et al., 2011).

En nuestro estudio, los pacientes *BRAFV600E* positivos tienen una media de edad menor respecto a los no portadores, esta asociación se identificaba en el análisis de población total, por lo que la presencia de la mutación podría tener un papel impulsor en el inicio temprano del tumor tiroideo (Kebebew et al., 2007; Valvo & Nucera, 2019). De acuerdo con nuestros

resultados, el riesgo de CaT aumenta significativamente cuando se tiene un antecedente de cáncer previo y estado positivo *BRAFV600E*, esta relación solo se identifica al analizar a toda la población, ya que al analizar esta asociación solo entre los PCT, no resultaba significativo, lo que demuestra que el estado de *BRAF* se asocia con mayor riesgo de enfermedad recurrente. En diversas ocasiones se ha reportado que esta mutación se asocia con un fenotipo tumoral agresivo y recidiva del 8% en comparación con el 1% en los tumores de tipo salvaje *BRAF* (Agarwal et al., 2021; Haugen et al., 2016; Valvo & Nucera, 2019).

### **10.3. Relación *BRAFV600E* y sobre expresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19***

En el presente estudio identificamos una relación entre la mutación *BRAFV600E* con la sobreexpresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*, algunos autores han identificado algunas conexiones que podrían explicar este mecanismo.

La asociación de esta mutación con *KRT19* había sido reportada previamente en un estudio en tejido de pacientes con CaT, donde la sobreexpresión de *KRT19* solo se identificaba cuando se albergaba la mutación *BRAFV600E*, comprobado por la transfección de células tumorales tiroideas con un plásmido que contenía *BRAFV600E*, observándose que la mutación inducía la expresión de *KRT19*, lo que posteriormente provocaba metástasis a ganglios linfáticos vía inducción de EMT, esto último identificado por el silenciamiento de *KRT19* (X. Wang et al., 2019). La sobreexpresión de *KRT19* es regulada por MEK/ERK, quinasas río abajo de *BRAF* en la vía MAPK (Ju et al., 2015), por lo tanto, podría sugerir una conexión entre la mutación *BRAFV600E* y la sobreexpresión de *KRT19*.

Así mismo, la correlación entre *CLDN1* y *BRAFV600E* se había reportado anteriormente solo en pólipos colorrectales, donde la expresión de la proteína y ARNm de *CLDN1* estaba significativamente elevada en pólipos con mutación *BRAFV600E* (Caruso et al., 2014). Este es

el primer reporte en donde se identifica dicha asociación en CaT y no ha sido reportado un vínculo directo establecido biológicamente entre la mutación oncogénica y la regulación de la expresión de *CLDN1*.

Un estudio realizado en líneas celulares propone que la hiperactivación del sistema NF- $\kappa$ B, podría ser el vínculo entre la mutación *BRAFV600E* y la sobreexpresión de *TIMP1*. Se ha demostrado que MAPK induce la activación de la señalización de NF- $\kappa$ B, sin embargo, *BRAFV600E* también influye en su activación por fosforilación de su inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$ , independiente de MEK-ERK (Bommarito et al., 2011). El NF- $\kappa$ B activado se traslada al núcleo induciendo la transcripción de varios genes inhibidores de apoptosis (inhibidor de caspasa-8 FLIP, inhibidor de las proteínas de apoptosis c-IAP1/2 y XIAP, y miembros de la familia Bcl2 de reguladores de apoptosis), promotores de angiogénesis (factor de crecimiento de fibroblastos básico, IL-8, MMP-9) y metástasis (Twist-1) (Xia, Shen, & Verma, 2014). En ese mismo estudio, la activación de NF- $\kappa$ B da como resultado una mayor expresión de *TIMP1* promoviendo la proliferación (Bommarito et al., 2011). Además, en cáncer colorrectal y de mama la unión de *TIMP1* con CD63 aumenta la proliferación celular a través de la fosforilación de Akt en Ser-473, resultando en mayor proliferación, invasión e inhibición de la apoptosis (Bommarito et al., 2011; Song et al., 2016).

La sobreexpresión de *TIMP1* observada en pacientes *BRAFV600E* en nuestro estudio fue  $3.370 \pm 0.254$ , respecto a los nódulos sin la mutación, similar a lo reportado por otros investigadores donde se identificó un aumento de  $4.03 \pm 0.46$  veces en comparación con los nódulos *BRAF* silvestre en población italiana, asociándose con mayor invasión tumoral (Bommarito et al., 2011).

La caracterización de estas alteraciones revela el papel esencial de la señalización de MAPK y PI3K/AKT en la promoción de la iniciación y progresión del CaT (Valvo & Nucera, 2019). Se comprobó que la detección de una sola alteración somática (*BRAFV600E*) en muestras de citología es indicativo de malignidad, sin embargo, no son lo suficientemente sensibles para excluir malignidad cuando la prueba es negativa, y se pueden obtener falsos negativos en hasta el 30% de los tumores malignos (Macerola & Basolo, 2018; Vallejo Casas et al., 2014), por lo tanto, es necesario complementar estos análisis. Las diferencias en el perfil de expresión génica entre tumores malignos y benignos se han empezado a explotar con fines diagnósticos (Vallejo Casas et al., 2014). En nuestra investigación, la sobreexpresión de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19* es diferencial entre citologías benignas de malignas con un alto valor de sensibilidad; además se identificaron asociaciones entre su desregulación con la positividad de la mutación *BRAFV600E*, los cuales se mantenían cuando se comparaban con los puntos de corte de la expresión determinados en cada gen para la diferenciación de nódulos malignos de benignos, lo que resulta de interés para el diagnóstico, en donde se podría seleccionar adecuadamente cuáles de ellos se beneficiarían realmente de un manejo quirúrgico o el grado de resección inicial de la cirugía practicada. La conexión debe explorarse a fondo, ya que es prometedora para fines de diagnóstico preoperatorio y podría proporcionar nuevos conocimientos sobre nuestra comprensión de la etiología del carcinoma de tiroides.

## XI. CONCLUSIONES

### 11.1. Conclusión general

*CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1* se sobre expresan significativamente en PCT y se observó una correlación positiva entre sus expresiones. Como biomarcadores individuales, el nivel de transcripción de cada gen demostró un alto valor predictivo negativo para descartar cáncer.

La mutación en *BRAFV600E* se identificó exclusivamente en PCT, y está fuertemente asociada con la sobreexpresión de *TIMP1*, lo que podría indicar una conexión biológica entre ellos, que puede ser explicada vía MAPK.

### 11.2. Conclusiones específicas

- Los pacientes que han padecido cáncer previamente tienen un riesgo nueve veces mayor de desarrollar lesiones malignas.
- El nivel de expresión de *CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1* es significativamente mayor en los PCT en comparación con los PNB.
- Existe correlación débil estadísticamente significativa de la edad con el nivel de ARNm de *KRT19* y *CLDN1*.
- Se determinaron puntos de corte del valor de expresión de *CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1* para determinar cuando la sobreexpresión es significativa de una lesión maligna.
- *CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1* son buenos biomarcadores individuales para distinguir lesiones benignas de malignas de acuerdo con sus características predictivas.
- No se identificaron las mutaciones rs121913273 y rs121434592 de *PIK3CA* y *AKT1* respectivamente.

- Se identificó un paciente genotipo homocigoto mutado para la mutación *BRAFV600E* con diagnóstico de carcinoma folicular.
- Se identificó como factor de riesgo para el desarrollo de CaT, el ser portador del alelo mutado A de la mutación *BRAFV600E* y haber presentado algún tipo de cáncer previamente.
- La media de expresión de *CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1* es significativamente mayor entre los portadores del alelo mutado en *BRAFV600E*, en población total, así como solo entre PCT.
- Se observó diferencia significativa entre cada combinación de genotipos de la mutación *BRAFV600E* con el valor de corte de expresión para *CLDN1*, *KRT19* y *TIMP1*, representando un factor de riesgo ser portador del alelo mutado en cada caso.
- Existe una fuerte asociación entre la expresión de *TIMP1* por arriba del punto de corte con los portadores del alelo mutado en *BRAFV600E*.

## **XII. LIMITACIONES DEL PROYECTO**

1. Este estudio está limitado por la falta de confirmación histopatológica que puede impedir la identificación de casos falsos negativos, lo que disminuiría la sensibilidad y el VPN de pruebas futuras.
2. Obtención y viabilidad de las muestras

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, M. I., Junit, S. M., Ng, K. L., Jayapalan, J. J., Karikalan, B., & Hashim, O. H. (2019). Papillary Thyroid Cancer: Genetic Alterations and Molecular Biomarker Investigations. *International Journal of Medical Sciences*, 16(3), 450-460. <https://doi.org/10.7150/ijms.29935>
- ACS. (2019). ¿Qué es cáncer de tiroides? Recuperado 18 de enero de 2022, de <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-tiroides/acerca/que-es-cancer-de-tiroides.html>
- Agarwal, S., Bychkov, A., & Jung, C.-K. (2021). Emerging Biomarkers in Thyroid Practice and Research. *Cancers*, 14(1), 204. <https://doi.org/10.3390/cancers14010204>
- Agretti, P., De Marco, G., Ferrarini, E., Di Cosmo, C., Montanelli, L., Bagattini, B., ... Tonacchera, M. (2022). Gene expression profile in functioning and non-functioning nodules of autonomous multinodular goiter from an area of iodine deficiency: Unexpected common characteristics between the two entities. *Journal of Endocrinological Investigation*, 45(2), 399-411. <https://doi.org/10.1007/s40618-021-01660-y>
- Al Dawish, M. A., Alwin Robert, A., Thabet, M. A., & Braham, R. (2018). Thyroid Nodule Management: Thyroid-Stimulating Hormone, Ultrasound, and Cytological Classification System for Predicting Malignancy. *Cancer Informatics*, 17, 1176935118765132. <https://doi.org/10.1177/1176935118765132>
- ATA. (2018). Nódulos Tiroideos. Recuperado 18 de enero de 2022, de American Thyroid Association website: <https://www.thyroid.org/nodulos-tiroideos/>

- Barollo, S., Pezzani, R., Cristiani, A., Redaelli, M., Zambonin, L., Rubin, B., ... Mian, C. (2014). Prevalence, Tumorigenic Role, and Biochemical Implications of Rare BRAF Alterations. *Thyroid*, *24*(5), 809-819. <https://doi.org/10.1089/thy.2013.0403>
- Bible, K. C., Kebebew, E., Brierley, J., Brito, J. P., Cabanillas, M. E., Clark, T. J., ... Wong-Clark, C. K. (2021). 2021 American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid*, *31*(3), 337-386. <https://doi.org/10.1089/thy.2020.0944>
- Bogović Crnčić, T., Ilić Tomaš, M., Giroto, N., & Grbac Ivanković, S. (2020). Risk Factors for Thyroid Cancer: What Do We Know So Far? *Acta Clinica Croatica*, *59*(Suppl 1), 66-72. <https://doi.org/10.20471/acc.2020.59.s1.08>
- Bommarito, A., Richiusa, P., Carissimi, E., Pizzolanti, G., Rodolico, V., Zito, G., ... Giordano, C. (2011). BRAFV600E mutation, TIMP-1 upregulation, and NF-κB activation: Closing the loop on the papillary thyroid cancer trilogy. *Endocrine-Related Cancer*, *18*(6), 669-685. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0076>
- Boufraqueh, M., Patel, D., Nilubol, N., Powers, A., King, T., Shell, J., ... Kebebew, E. (2019). Lysyl Oxidase Is a Key Player in BRAF/MAPK Pathway-Driven Thyroid Cancer Aggressiveness. *Thyroid*, *29*(1), 79-92. <https://doi.org/10.1089/thy.2018.0424>
- Cameselle-Teijeiro, J. M., & Sobrinho-Simões, M. (2018). Nueva clasificación de la OMS de los tumores tiroideos: Una categorización pragmática de las neoplasias de la glándula tiroides. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, *65*(3), 133-135. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.11.012>

- Carpten, J. D., Faber, A. L., Horn, C., Donoho, G. P., Briggs, S. L., Robbins, C. M., ... Thomas, J. E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, *448*(7152), 439-444. <https://doi.org/10.1038/nature05933>
- Caruso, M., Fung, K. Y. C., Moore, J., Brierley, G. V., Cosgrove, L. J., Thomas, M., ... Ruszkiewicz, A. (2014). Claudin-1 Expression Is Elevated in Colorectal Cancer Precursor Lesions Harboring the BRAF V600E Mutation. *Translational Oncology*, *7*(4), 456-463. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2014.05.009>
- Cheng, G., Fan, X., Hao, M., Wang, J., Zhou, X., & Sun, X. (2016). Higher levels of TIMP-1 expression are associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer*, *15*, 30. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0515-5>
- Cibas, E. S., & Ali, S. Z. (2017). The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid*, *27*(11), 1341-1346. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0500>
- Derwahl, M., & Nicula, D. (2014). Estrogen and its role in thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *21*(5), T273-T283. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0053>
- Dinets, A., Pernemalm, M., Kjellin, H., Sviatoha, V., Sofiadis, A., Juhlin, C. C., ... Höög, A. (2015). Differential Protein Expression Profiles of Cyst Fluid from Papillary Thyroid Carcinoma and Benign Thyroid Lesions. *PLoS ONE*, *10*(5), e0126472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126472>
- Dom, G., Frank, S., Floor, S., Kehagias, P., Libert, F., Hoang, C., ... Maenhaut, C. (2018). Thyroid follicular adenomas and carcinomas: Molecular profiling provides evidence for a continuous evolution. *Oncotarget*, *9*(12), 10343-10359. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23130>

- Ersoz, S., Mungan, S., Cobanoglu, U., Turgutalp, H., & Ozoran, Y. (2011). Prognostic importance of Claudin-1 and Claudin-4 expression in colon carcinomas. *Pathology - Research and Practice*, 207(5), 285-289. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.01.011>
- Flanagan, J. N., Pineda, P., Knapp, P. E., De Las Morenas, A., Lee, S. L., & Braverman, L. E. (2008). Expression of cytokeratin 19 in the diagnosis of thyroid papillary carcinoma by quantitative polymerase chain reaction. *Endocrine Practice: Official Journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 14(2), 168-174. <https://doi.org/10.4158/EP.14.2.168>
- González, H. E., Martínez, J. R., Vargas-Salas, S., Solar, A., Veliz, L., Cruz, F., ... Urra, S. (2017). A 10-Gene Classifier for Indeterminate Thyroid Nodules: Development and Multicenter Accuracy Study. *Thyroid*, 27(8), 1058-1067. <https://doi.org/10.1089/thy.2017.0067>
- Gowrikumar, S., Primeaux, M., Pravoverov, K., Wu, C., Szeglin, B. C., Sauv e, C.-E. G., ... Dhawan, P. (2021). A Claudin-Based Molecular Signature Identifies High-Risk, Chemoresistant Colorectal Cancer Patients. *Cells*, 10(9), 2211. <https://doi.org/10.3390/cells10092211>
- G urb uzler, L. (2016). The Role and Importance of Molecular Tests in Approach to Thyroid Nodules. *Turkish Archives of Otorhinolaryngology*, 54(2), 74-78. <https://doi.org/10.5152/tao.2015.1276>
- Gymnopoulos, M., Elsliger, M.-A., & Vogt, P. K. (2007). Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

*United States of America*, 104(13), 5569-5574.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0701005104>

Haugen, B. R. (2017). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: What is new and what has changed? *Cancer*, 123(3), 372-381. <https://doi.org/10.1002/cncr.30360>

Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., ... Wartofsky, L. (2016). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*, 26(1), 1-133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>

Hawthorn, L., Stein, L., Varma, R., Wiseman, S., Loree, T., & Tan, D. (2004). TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. *Head & Neck*, 26(12), 1069-1083. <https://doi.org/10.1002/hed.20099>

Huang, J., Zhang, L., He, C., Qu, Y., Li, J., Zhang, J., ... Zhu, Z. (2014). Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer. *Oncotarget*, 6(3), 1652-1665.

International Agency for Research on Cancer. (2022, junio). Cancer today. Recuperado 21 de junio de 2022, de <http://gco.iarc.fr/today/home>

- Ju, J. -h, Oh, S., Lee, K. -m, Yang, W., Nam, K. S., Moon, H.-G., ... Shin, I. (2015). Cytokeratin19 induced by HER2/ERK binds and stabilizes HER2 on cell membranes. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), 665-676. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.155>
- Jung, C. K., Baek, J. H., Na, D. G., Oh, Y. L., Yi, K. H., & Kang, H.-C. (2020). 2019 Practice guidelines for thyroid core needle biopsy: A report of the Clinical Practice Guidelines Development Committee of the Korean Thyroid Association. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 54(1), 64-86. <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.12.04>
- Kallakury, B. V., Karikehalli, S., Haholu, A., Sheehan, C. E., Azumi, N., & Ross, J. S. (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(10), 3113-3119.
- Kebebew, E., Weng, J., Bauer, J., Ranvier, G., Clark, O. H., Duh, Q.-Y., ... Griffin, A. (2007). The Prevalence and Prognostic Value of BRAF Mutation in Thyroid Cancer. *Annals of Surgery*, 246(3), 466-471. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318148563d>
- Livhits, M. J., Zhu, C. Y., Kuo, E. J., Nguyen, D. T., Kim, J., Tseng, C.-H., ... Yeh, M. W. (2021). Effectiveness of Molecular Testing Techniques for Diagnosis of Indeterminate Thyroid Nodules: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, 7(1), 70-77. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.5935>
- Lu, M., Xu, X., Xi, B., Dai, Q., Li, C., Su, L., ... Yang, J. (2018). Molecular Network-Based Identification of Competing Endogenous RNAs in Thyroid Carcinoma. *Genes*, 9(1), 44. <https://doi.org/10.3390/genes9010044>

- Macerola, E., & Basolo, F. (2018). Current methodologies for molecular screening of thyroid nodules. *Gland Surgery*, 7(Suppl 1), S1-S7. <https://doi.org/10.21037/gland.2017.08.04>
- Menz, A., Bauer, R., Kluth, M., Marie von Bargen, C., Gorbokon, N., Viehweger, F., ... Bernreuther, C. (2021). Diagnostic and prognostic impact of cytokeratin 19 expression analysis in human tumors: A tissue microarray study of 13,172 tumors. *Human Pathology*, 115, 19-36. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2021.05.012>
- Mondragón-Terán, P., López-Hernández, L. B., Gutiérrez-Salinas, J., Suárez-Cuenca, J. A., Luna-Ceballos, R. I., & Erazo Valle-Solís, A. (2016). Mecanismos de señalización intracelular en cáncer de tiroides. *Cirugía y Cirujanos*, 84(5), 434-443. <https://doi.org/10.1016/j.circir.2016.05.017>
- Nikiforov, Y. E., Otori, N. P., Hodak, S. P., Carty, S. E., LeBeau, S. O., Ferris, R. L., ... Nikiforova, M. N. (2011). 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*, 96(11), 3390-3397. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1469>
- Özdemir, S., & Özdemir, Ö. (2014). Tiroid kanserinde moleküler etyolojik faktörler. *Cumhuriyet Medical Journal*, 36(1), 128-146. <https://doi.org/10.7197/cmj.v36i1.1008002565>
- Pennelli, G., Vianello, F., Barollo, S., Pezzani, R., Merante Boschini, I., Pelizzo, M. R., ... Mian, C. (2011). BRAF(K601E) mutation in a patient with a follicular thyroid carcinoma. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 21(12), 1393-1396. <https://doi.org/10.1089/thy.2011.0120>

- Piontek, A., Eichner, M., Zwanziger, D., Beier, L., Protze, J., Walther, W., ... Krause, G. (2020). Targeting claudin-overexpressing thyroid and lung cancer by modified *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Molecular Oncology*, 14(2), 261-276. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12615>
- Qiagen. (2014). RNeasy Plus Kits. Recuperado 19 de julio de 2022, de [https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-plus-kits/?cmpid=PC\\_QF\\_SP\\_rneasy-sales-brand\\_0421\\_SEA\\_GA&gclid=CjwKCAjwrNmWBhA4EiwAHbjEQESXTMZFrSSV3pTtP0tUtyTC8FWOxiGRbWRMriZSF3K\\_VA4O6\\_M97RoCzo0QAvD\\_BwE](https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/total-rna/rneasy-plus-kits/?cmpid=PC_QF_SP_rneasy-sales-brand_0421_SEA_GA&gclid=CjwKCAjwrNmWBhA4EiwAHbjEQESXTMZFrSSV3pTtP0tUtyTC8FWOxiGRbWRMriZSF3K_VA4O6_M97RoCzo0QAvD_BwE)
- Qiagen. (2016). QIAamp DNA Accessory Set, Micro and Mini Kits—QIAGEN. Recuperado 19 de julio de 2022, de <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-kits/>
- Qiu, J., Zhang, W., Zang, C., Liu, X., Liu, F., Ge, R., ... Xia, Q. (2018). Identification of key genes and miRNAs markers of papillary thyroid cancer. *Biological Research*, 51, 45. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0188-1>
- Recio-Córdova, J. M., Higuera-Mínguez, C., García-Duque, M., Alan-Peinado, A. R., Iglesias-López, R. A., Corrales-Hernández, J. J., ... Corrales-Hernández, J. J. (2020). Evaluación endocrinológica del paciente con enfermedad nodular tiroidea. *Revista ORL*, 11(3), 265-272. <https://doi.org/10.14201/orl.21524>

- Ricarte-Filho, J. C., Ryder, M., Chitale, D. A., Rivera, M., Heguy, A., Ladanyi, M., ... Fagin, J. A. (2009). Mutational Profile Of Advanced Primary and Metastatic Radioactive Iodine-Refractory Thyroid Cancers Reveals Distinct Pathogenetic Roles for BRAF, PIK3CA and AKT1. *Cancer research*, 69(11), 4885-4893. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0727>
- Ríos, A., Rodríguez, J. M., Torregrosa, N. M., Torregrosa, B., Cepero, A., Abellán, M. D., ... Parrilla, P. (2018). Evaluación del nódulo tiroideo con ecografía y elastografía de alta resolución sin la punción-aspiración con aguja fina. *Medicina Clínica*, 151(3), 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2017.09.016>
- Rodríguez Ramos, J. F., Boffill Corrales, A. M., & Rodríguez Soria, A. (2016). Factores de riesgo de las enfermedades tiroideas. Hospital del Seguro Social Ambato. *Revista de Ciencias Médicas de Pinar del Río*, 20(5), 113-128.
- Román-González, A., Giraldo, L. R., Monsalve, C. A., Vélez, A., & Restrepo, J. G. (2013). *Nódulo tiroideo, enfoque y manejo. Revisión de la literatura*. 26, 10.
- Roth, M. Y., Witt, R. L., & Steward, D. L. (2018). Molecular testing for thyroid nodules: Review and current state. *Cancer*, 124(5), 888-898. <https://doi.org/10.1002/cncr.30708>
- Sadowski, S. M., Petrenko, V., Meyer, P., Pusztaszeri, M., Brulhart-Meynet, M.-C., Heddad Masson, M., ... Dibner, C. (2019). Validation of molecular biomarkers for preoperative diagnostics of human papillary thyroid carcinoma in fine needle aspirates. *Gland Surgery*, 8(Suppl 2), S62-S76. <https://doi.org/10.21037/gs.2018.11.04>
- Saha, S. K., Kim, K., Yang, G.-M., Choi, H. Y., & Cho, S.-G. (2018). Cytokeratin 19 (KRT19) has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive

- and More Drug-Sensitive Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1423. <https://doi.org/10.3390/ijms19051423>
- Santiago-Peña, L. F., & Santiago-Peña, L. F. (2020). Fisiología de la glándula tiroides. Disfunción y parámetros funcionales de laboratorio en patología de tiroides. *Revista ORL*, 11(3), 253-257. <https://doi.org/10.14201/orl.21514>
- Shou, Y., Liu, Y., Xu, J., Liu, J., Xu, T., Tong, J., ... Zhang, X. (2022). TIMP1 Indicates Poor Prognosis of Renal Cell Carcinoma and Accelerates Tumorigenesis via EMT Signaling Pathway. *Frontiers in Genetics*, 13, 648134. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.648134>
- Sipos, J. A., & Mazzaferri, E. L. (2008). The therapeutic management of differentiated thyroid cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(15), 2627-2637. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.15.2627>
- Song, G., Xu, S., Zhang, H., Wang, Y., Xiao, C., Jiang, T., ... Wang, X. (2016). TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35(1), 148. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0427-7>
- Sosa Martín, G., & Ernand Rizo, S. (2016). Aspectos actuales del carcinoma bien diferenciado de tiroides. *Revista Cubana de Cirugía*, 55(1), 0-0.
- Stegmann, M. F. H., Villa, M. R., & Marrero, M. M. (2018). *Libro Virtual de Formación en Otorrinolaringología SEORL*. España.
- Sun, T., Guan, Q., Wang, Y., Qian, K., Sun, W., Ji, Q., ... Xiang, J. (2021). Identification of differentially expressed genes and signaling pathways in papillary thyroid cancer: A

- study based on integrated microarray and bioinformatics analysis. *Gland Surgery*, 10(2), 629-644. <https://doi.org/10.21037/gs-20-673>
- Tam, A. A., Ozdemir, D., Aydin, C., Bestepe, N., Ulusoy, S., Sungu, N., ... Cakir, B. (2018). Association between preoperative thyrotrophin and clinicopathological and aggressive features of papillary thyroid cancer. *Endocrine*, 59(3), 565-572. <https://doi.org/10.1007/s12020-018-1523-6>
- Tamhane, S., & Gharib, H. (2016). Thyroid nodule update on diagnosis and management. *Clinical Diabetes and Endocrinology*, 2, 17. <https://doi.org/10.1186/s40842-016-0035-7>
- Tan, H., Li, Z., Li, N., Qian, J., Fan, F., Zhong, H., ... Li, Z. (2019). Thyroid imaging reporting and data system combined with Bethesda classification in qualitative thyroid nodule diagnosis. *Medicine*, 98(50), e18320. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018320>
- Vallejo Casas, J. A., Muñoz Márquez, J., Mesía Nin, R., Capdevila Castellón, J., & Aller Pardo, J. (2014). *Pautas de actuación y seguimiento. Cáncer diferenciado de tiroides*. International Marketing & Communication, S.A.
- Valvo, V., & Nucera, C. (2019). Coding molecular determinants of thyroid cancer development and progression. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 48(1), 37-59. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2018.10.003>
- Wang, X., Xu, X., Peng, C., Qin, Y., Gao, T., Jing, J., & Zhao, H. (2019). BRAFV600E-induced KRT19 expression in thyroid cancer promotes lymph node metastasis via EMT. *Oncology Letters*, 18(1), 927-935. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10360>

- Wang, Y.-Y., Li, L., Zhao, Z.-S., & Wang, H.-J. (2013). Clinical utility of measuring expression levels of KAP1, TIMP1 and STC2 in peripheral blood of patients with gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, *11*, 81. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-81>
- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer immunology research*, *2*(9), 823-830. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>
- Xu, L., Li, G., Wei, Q., El-Naggar, A. K., & Sturgis, E. M. (2012). Family History of Cancer and Risk of Sporadic Differentiated Thyroid Carcinoma. *Cancer*, *118*(5), 1228-1235. <https://doi.org/10.1002/cncr.26398>
- Youssef, A., Abd-Elmonem, M. H., Ghazy, R. A. M., El Shafei, M. M., & Zahran, M. (2020). The diagnostic value of ultrasonography in detection of different types of thyroid nodules. *The Egyptian Journal of Otolaryngology*, *36*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s43163-020-00025-1>
- Zamora, E. A., Khare, S., & Cassaro, S. (2022). Thyroid Nodule. En *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535422/>
- Zhang, W., Li, W., Wang, X., Hu, Z., Zhu, D., Ding, W., ... Wang, H. (2016). CLDN1 expression in cervical cancer cells is related to tumor invasion and metastasis. *Oncotarget*, *7*(52), 87449-87461. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13871>

## XIV. ANEXOS

### 14.1. Perspectivas

14.1.1 Genotipificar la mutación *BRAFV600E* y realizar el perfil de expresión de ARNm de *CLDN1*, *TIMP1* y *KRT19*, en muestras de citologías con diagnóstico indeterminado (Bethesda III y IV).

14.1.2 Realizar el seguimiento de las citologías indeterminadas y recuperar el diagnóstico histológico de aquellas que se hayan sometido a cirugía.

14.1.3 Evaluar el valor predictivo como clasificador de nódulos indeterminados del panel de expresión con la mutación en *BRAF*.

14.1.4 Cuantificar los niveles séricos de las proteínas de *TIMP1*, *CLDN1*, y correlacionar con su expresión en tejido.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(TODOS LOS DATOS AQUÍ EMITIDOS SON COMPLETAMENTE CONFIDENCIALES)

MAZATLÁN, SINALOA A \_\_\_\_\_ DEL MES \_\_\_\_\_ DE 20\_\_

Por medio del presente acepto participar en el protocolo de investigación titulado:

*Análisis de mutaciones y perfil de expresión de genes implicados en el desarrollo de neoplasias en tiroides*

El objetivo del estudio es:

**GENERAR INFORMACIÓN QUE CONTRIBUYAN AL ENTENDIMIENTO DEL PADECIMIENTO DE NODULOS TIROIDEOS PARA SU PRECISA CLASIFICACIÓN.**

Se me ha explicado que mi participación consistirá en:

**DONAR UNA MUESTRA DE 8mL DE SANGRE PERIFÉRICA Y TEJIDO PARA SU ANÁLISIS EXPERIMENTAL Y CONTESTAR CUESTIONARIO ANEXO.**

**Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio.**

El Investigador responsable se compromete, en caso de ser necesario a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo.

El Investigador responsable me ha dado seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este y estudios posteriores y, de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. De igual manera me ha informado que las muestras donadas en este estudio serán utilizadas única y exclusivamente para fines de investigación y no así con propósitos distintos al objetivo del estudio. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, en caso de ser necesario, aunque esta pudiera hacerme cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y firma del paciente



Dra. Noemí García Magallanes

Responsable del Proyecto de Investigación

Colaborador del área Oncológica

Colaborador del área Oncológica

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: (669) 180 0695 ext. 145, Laboratorio de Biomedicina Molecular. Ing. en Biotecnología, UPSIN. Correo electrónico [biomedicina@upsin.edu.mx](mailto:biomedicina@upsin.edu.mx)

**14.3. Cuestionario****CUESTIONARIO****INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL VOLUNTARIO**

NOMBRE COMPLETO: \_\_\_\_\_

Tel. o Cel: \_\_\_\_\_

EDAD (Años): \_\_\_\_\_ USTED ES ORIGINARIO DE: \_\_\_\_\_

ESCOLARIDAD: \_\_\_\_\_ OFICIO O PROFESIÓN: \_\_\_\_\_

PROPORCIONE EL LUGAR DE ORIGEN (Ciudad, Estado) DE SU:

MADRE: \_\_\_\_\_ PADRE: \_\_\_\_\_

ABUELA MATERNA: \_\_\_\_\_ ABUELO MATERNO: \_\_\_\_\_

ABUELA PATERNA: \_\_\_\_\_ ABUELO PATERNO: \_\_\_\_\_

1 ¿USTED ESTA TOMANDO ALGÚN MEDICAMENTO? a) NO b) SI

¿CUÁL MEDICAMENTO? \_\_\_\_\_

2.- ¿PADECE DE ALGUNA ENFERMEDAD EN GLÁNDULA TIROIDES? a) NO b) SI

¿CUÁL? \_\_\_\_\_

3.- ¿FUMA? a) NO b) SI c) Antes d) Fumador pasivo

¿POR CUÁNTO TIEMPO? \_\_\_\_\_ ¿CUÁNTOS CIGARROS AL DÍA? \_\_\_\_\_

4.- ¿EN LOS ÚLTIMOS 2 AÑOS, USTED SE HA SOMETIDO A LOS SIGUIENTES TRATAMIENTOS?

I.- RADIOGRAFÍAS: a) NO b) SI ¿QUÉ ÁREA DEL CUERPO? \_\_\_\_\_

II.- RESONANCIAS: a) NO b) SI III.- TOMOGRAFÍAS: a) NO b) SI

IV.- MASTOGRAFÍA: a) NO b) SI V.- RADIOTERAPIA: a) NO b) SI

5.- ¿SE HA SOMETIDO A TRATAMIENTOS HORMONALES? a) NO b) SI

¿POR CUÁNTO TIEMPO? \_\_\_\_\_

6.- ¿CONSUME O HA CONSUMIDO ÁCIDO FÓLICO? a) NO b) SI ¿POR CUÁNTO

TIEMPO? \_\_\_\_\_

7. ¿CONSUME O HA CONSUMIDO CALCIO? a) NO b) SI ¿POR CUÁNTO TIEMPO? \_\_\_\_\_

8. ¿PADECE FRECUENTEMENTE ENFERMEDADES DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS? a) NO b) SI

¿DE QUÉ TIPO? \_\_\_\_\_

9. ¿HA PADECIDO ANTERIORMENTE ALGÚN TIPO DE CÁNCER? a) NO b) SI ¿QUÉ TIPO DE CÁNCER? \_\_\_\_\_ ¿QUÉ EDAD TENÍA AL DIAGNÓSTICO? \_\_\_\_\_

10. ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES DE CÁNCER Y OTROS SINDROMES (*Poliposis adenomatosa familiar, enfermedad de Cowden, complejo de Carney tipo I, tiroiditis de Hashimoto, carcinoma familiar de tiroides no medular, etc.*):

	FAMILIAR	EDAD EN QUE LO PRESENTÓ
TIROIDES		
COLÓN		
OTRO		

**INFORMACIÓN PARA COMPLETAR POR EL ENCUESTADOR**

CÓDIGO DE TOMA \_\_\_\_\_

ORIGEN DE LA MUESTRA: \_\_\_\_\_

PESO (Kg): \_\_\_\_\_ ALTURA (M): \_\_\_\_\_ IMC: \_\_\_\_\_

#### 14.4. Participación en publicaciones y congresos

##### Publicaciones

Chávez-Peña TC\*, Martínez-Camberos AP\*, Cossio-Gurrola G, Arámbula Meraz E, Herrera I, Romo-Martínez EJ, García-Magallanes N. (2020). Prevalence of UGT1A1 (TA)n promoter polymorphism in Panamanians neonates with G6PD deficiency. *J Genet.* 99, 63. doi: 10.1007/s12041-020-01223-9

Martínez-Camberos A, Álvarez-Arrazola M, Arámbula-Meraz E, Romero-Quintana J, Luque-Ortega F, Romo-Martínez E, Sánchez-Urbina R, Cedano-Prieto D, González-Castillo A, García-Magallanes N. (2022). Dysregulation of KRT19, TIMP1, and CLDN1 gene expression is associated with thyroid cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 617(Pt 1):55-59. doi: 10.1016/j.bbrc.2022.05.093.

Bergez-Hernández, F, Arámbula-Meraz, E, Álvarez-Arrazola, M, Irigoyen-Arredondo, M, Luque-Ortega, F, Martínez-Camberos, A, Cedano Prieto, D, Contreras Gutiérrez, J, Martínez Valenzuela, C, García-Magallanes, N. (2022). Expression analysis of miRNAs and their potential role as biomarkers for prostate cancer detection. *AJMH*. (aceptado – archivo aún no disponible).

##### Congresos

2nd biotechnology world symposium-11° Encuentro nacional de biotecnología. 16 al 20 de octubre de 2018. San José del Cabo, BCS.

37° Congreso nacional de oncología. 6 al 9 de noviembre de 2019. Mérida, Yucatán.

VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. 1 y 2 de octubre de 2020.

## **XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES**

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AUC: Área Bajo la Curva

CaT: Cáncer de tiroides

EMT: Transición Epitelio-Mesenquimal

GT: Glándula tiroides

IC: Intervalo de confianza

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MMP: Metaloproteinasas de matriz

NF-kB: Factor nuclear kappa B

NT: Nódulo tiroideo

P13K/AKT: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa–proteína cinasa B

PAAF: Punción por aspiración con aguja fina

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PCT: Paciente con cáncer de tiroides

PNB: Paciente con nódulo benigno

RM: Razón de momios

ROC: Característica Operativa del Receptor

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo