



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

**CLASIFICACION DE NODULOS TIROIDEOS CONFORME A LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
*TRIP12, CAPZB, TFF3, CTCF Y HMMR.***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
EDUARDO GONZALEZ FLORES

TUTOR
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN

CIUDAD UNIVERSITARIA, ABRIL 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice

| | |
|---|----|
| Agradecimientos..... | i |
| Introducción | |
| • Nódulo tiroideo..... | 1 |
| • Clasificación molecular de nódulos tiroideos..... | 5 |
| • Marcadores moleculares potenciales en nódulos tiroideos benignos..... | 8 |
| • Marcadores moleculares potenciales en nódulos tiroideos malignos..... | 14 |
| Planteamiento del problema..... | 20 |
| Justificación..... | 20 |
| Pregunta de investigación..... | 21 |
| Objetivos..... | 21 |
| Diseño del estudio..... | 22 |
| Selección de pacientes..... | 22 |
| Materiales y métodos..... | 23 |
| Resultados..... | 26 |
| Discusión..... | 32 |
| Conclusiones..... | 49 |
| Referencias..... | 50 |

Agradecimientos

La presente investigación no hubiera sido posible sin la vital colaboración, apoyo logístico y revisión de conceptos de:

- Dr. Sergio Juárez, laboratorio de oncología del INP.
- L.BE. Raquel Toquiantzi Huerta, UAM-Iztapalapa.
- Dr. Bernardo Pérez Enríquez, clínica de tiroides del INCMNSZ.
- Fundación para la Salud y Educación Dr. Salvador Zubirán (FUNSAED).

*A Kika,
Raquel, Chico, Edgar, Manolo,
Vane, Natalia, Cris y al futuro...*

Introducción

Nódulo tiroideo

El nódulo tiroideo es una lesión discreta dentro de la glándula tiroides que es radiológicamente distinta del resto del parénquima tiroideo.¹ Durante el examen físico un nódulo tiroideo se considera presente cuando una porción de la tiroides tiene una consistencia diferente al resto de la glándula. En el ultrasonido tiroideo, un nódulo está definido como una lesión focal parenquimatosa de diferente ecotextura al resto de la glándula. La prevalencia del nódulo tiroideo, definida a partir del hallazgo ultrasonográfico, se incrementa de forma lineal de tal modo que en personas de 60 años y más puede alcanzar prevalencia de hasta 68%¹.

La capacidad diagnóstica del examen físico está limitada a que solo 4 a 7% de las lesiones son palpables. El hallazgo mediante exploración física de un nódulo en la región tiroidea traduce la presencia de una lesión que potencialmente puede representar un verdadero nódulo o bien una lesión no dependiente de la tiroides.

La evaluación del nódulo tiroideo se centra en distinguir a las lesiones dependientes de la tiroides y de estas, identificar a las lesiones benignas de las lesiones malignas. El proceso diagnóstico del nódulo tiroideo se esperaría que tuviera una elevada sensibilidad y especificidad, así como una alta precisión diagnóstica.

Existen factores, identificados mediante la historia clínica, que permiten identificar a los pacientes que tienen mayor riesgo de que al presentar un nódulo tiroideo éste sea maligno: edad <20 años o >65 años, historia familiar (representada por 2 familiares en primer grado con diagnóstico de cáncer folicular o papilar de tiroides), nódulos tiroideos asociados a

síndromes clínicos¹ (síndrome de Cowden, síndrome PTEN, poliposis adenomatosa familiar, neoplasia endócrina múltiple tipo 2, síndrome de Werner), historia de radioterapia antes de los 18 años de edad administrada a cabeza, cuello o mediastino, rápido crecimiento del nódulo, dolor, disfonía y disfagia.

La evaluación inicial de un nódulo tiroideo comprende:

1. La medición de hormonas tiroideas, principalmente TSH, donde un valor elevado aún dentro del rango de la normalidad es un factor de predicción para malignidad.¹
2. Estudios por imagen: el USG es el principal método de imagen utilizado, su primer función en la evaluación del nódulo tiroideo es corroborar la presencia de dicha lesión, determinar sus dimensiones con precisión e identificar una serie de características (ecogenicidad, calcificaciones, consistencia, morfología) que en su conjunto pueden ayudar a discernir sobre la naturaleza benigna o maligna de una lesión^{1, 2}.
3. Biopsia por Aspiración con Aguja Fina (BAAF): la BAAF produce una muestra de tejido para estudio citológico, y es la prueba estándar para determinar si una lesión requiere o no de resección quirúrgica. El objetivo primordial de la BAAF es reducir el número de cirugías tiroideas innecesarias, mediante la identificación de aquellos nódulos que son benignos o por lo menos poco probable de ser malignos, para este propósito, la BAAF es el método de mayor precisión en comparación con cualquier otro o la combinación de otros. De acuerdo con las recomendaciones de la American Thyroid Association (ATA), la decisión para realizar una BAAF se debe basar en la combinación de la información obtenida por la historia clínica (factores de riesgo ya mencionados) y las características ultrasonográficas de la lesión¹.

Clasificación citopatológica de aspirados de nódulos tiroideos (Sistema de Bethesda)

En el año 2006, un equipo multidisciplinario dirigido por el Dr. Andrea Abati, entonces Director de Citopatología del National Cancer Institute (EUA), integró 8 comités con tareas específicas cuyo trabajo derivó en la publicación del Sistema de Bethesda para el Reporte de la Citopatología Tiroidea (TBSRTC, The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology)³.

El TBSRTC tiene 6 distintas categorías diagnósticas. Está construido sobre el concepto del abordaje probabilístico donde cada grupo diagnóstico tiene implícito un cierto valor predictivo positivo, el cual varía generalmente de <1% en el diagnóstico de “benigno” hasta 99% para el diagnóstico de “maligno”. Este abordaje permitió el desarrollo de un algoritmo terapéutico ligado a cada categoría diagnóstica. Las 6 categorías diagnósticas están claramente definidas, son morfológicamente distintas y aseguran una mejor correlación cito-histológica y reproducibilidad inter-observador³.

- *Bethesda I. No diagnóstica/ muestra insatisfactoria*: son especímenes que tienen un número inadecuado de células foliculares o la preparación se encuentra comprometida debido a la presencia de sangre, grosor del extendido, artefactos de desecación, etc. Este diagnóstico ocurre en 2 a 20% de los casos, aunque se recomienda que como medida de calidad para cualquier laboratorio de patología el diagnóstico de Bethesda I debe de ser reportado con una frecuencia menor al 10% de los casos³.

- Bethesda II. Benigno: esta categoría incluye todos los aspirados celulares adecuados compuestos de proporciones variables de coloides y células foliculares benignas, donde la mayoría muestra una arquitectura macrofolicular. Otros diagnósticos de benignidad incluye tiroiditis linfocítica, tiroiditis granulomatosa y enfermedad de Graves-Basedow³.
- *Bethesda III. Atipia de Significado Indeterminado (ASI) o Lesión Folicular de Significado Indeterminado (LFSI)*: la categoría está reservada para aspirados que contienen células foliculares, células linfoides u otros tipos celulares con atipia nuclear o arquitectónica, que es más pronunciada que la observada en lesiones benignas/reactivas, y no suficientes para ser clasificadas como neoplasia folicular, sospechoso de malignidad o maligna³. Este diagnóstico tiene implícita la repetición de la BAAF. La trascendencia clínica del diagnóstico de ASI/LFSI se encuentra en el riesgo de malignidad estimado entre 5% a 15%, aunque existen reportes de hasta 27.5%⁴. El método ideal para distinguir estas lesiones indeterminadas como carcinomas o como lesiones benignas, sin considerar las características morfológicas, no se encuentra definido.
- *Bethesda IV. Sospecha de neoplasia folicular/ neoplasia folicular*: las características citomorfológicas no permiten la distinción de adenoma folicular de carcinoma folicular, debido a esto, la confirmación diagnóstica requiere realizar una lobectomía diagnóstica. El término “sospechoso de neoplasia folicular” fue propuesto posterior a los estudios que mostraron que hasta 35% de los casos en seguimiento histológico revelan ser nódulos benignos. La citomorfología frecuentemente muestra una alta

celularidad con coloide escaso o ausente, la característica diagnóstica clave es la identificación de un patrón predominantemente microfolicular con estructuras tipo “roseta” de tamaño semejante³.

- *Bethesda V. Sospechoso de malignidad*: son casos que tienen suficiente atipia celular pero carecen de las características cualitativas y cuantitativas suficientes para concluir el diagnóstico de cáncer o bien son escasamente celulares para confirmar el diagnóstico de malignidad. La categoría de “sospechoso de carcinoma papilar” es el integrante más común de esta categoría y debido a su valor predictivo positivo elevado se opta por realizar lobectomía o tiroidectomía total. La mayoría (60-75%) se confirman como carcinoma papilar de tiroides.
- *Bethesda VI. Malignos*: esta categoría es empleada en casos donde las características citomorfológicas son diagnósticas de cáncer. El valor predictivo del diagnóstico de Bethesda VI es de 97 a 99% para cáncer tiroideo.

Clasificación molecular de nódulos tiroideos

Los marcadores moleculares representan una alternativa para la clasificación y diagnóstico preoperatorio en el caso de citologías indeterminadas. Se han ensayado marcadores inmunohistoquímicos, mutaciones somáticas, microRNA (miRNA) y biomarcadores de expresión génica.

- *Inmunohistoquímicos*: múltiples centros han reportado su experiencia con el uso de estudios inmunohistoquímicos en un intento de distinguir lesiones indeterminadas como benignas o malignas. Algunos marcadores ensayados son: galectina-3, fibronectina-1,

HBME-1, citoqueratina-19, y CITED-1⁵. La mayor limitante es su falta de sensibilidad y especificidad para distinguir atipia, LFSI, neoplasia folicular, neoplasia de células de Hürthle de los casos sospechosos y malignos⁶.

- *Mutaciones somáticas*: están presentes en 42% de los carcinomas papilares de tiroides, y en 65% de los carcinomas foliculares de tiroides. El estudio de las mutaciones se ha enfocado principalmente a la determinación de *BRAF V600E*, *RET/PTC*, *PAX8/PPAR γ* , tanto de forma aislada como en conjunto. En su desempeño individual, la prevalencia de las mutaciones en *BRAF* en lesiones indeterminadas (Bethesda III a V) varían entre 15 y 40%; se estima que al menos 45% de las lesiones reportadas como variedad clásica *del* carcinoma papilar de tiroides son portadoras de mutación en *BRAF*⁷. En el caso de las mutaciones del gen *RAS* (*HRAS*, *KRAS* y *NRAS*), se encuentra presente en 40-50% de las lesiones reportadas como variedad folicular del cáncer papilar de tiroides, y en 10% de la variedad clásica, así mismo se encuentra presente en 20 a 40% de los nódulos benignos, por lo que el valor como marcador de riesgo de progresión a malignidad es incierto⁷. La fusión *RET/PTC*, una forma de rearreglo cromosómico, está representada por 12 posibles variantes, de las cuales 80% corresponden a *RET/PTC1* y *RET/PTC2*; esta fusión de oncogenes se encuentra presente en 5 a 35% de las lesiones diagnosticadas como cáncer papilar de tiroides, en particular en aquellos individuos expuestos a radiación ionizante⁷. La fusión *PAX8/PPAR γ* se encuentra en 23 a 63% de las lesiones diagnosticadas como cáncer folicular de tiroides, sin embargo también está presente en 2 a 13% de las lesiones tiroideas benignas⁸. En su desempeño conjunto para el diagnóstico de lesiones indeterminadas: el estudio de Nikiforov en 2009⁹ evaluó a 86 pacientes (52 con lesiones

indeterminadas) mediante determinación de mutaciones en tejido obtenido por BAAF de *N-, H-, KRAS, BRAF, RET/PTC, PAX8/PPARγ* mostró una sensibilidad de 71%, especificidad del 100%, falsos positivos 0 y 6 falsos negativos. El estudio de Moses en 2010⁹ evaluó a 110 lesiones indeterminadas mediante estudio citológico y análisis molecular de muestras obtenida por BAAF para determinar mutaciones en *BRAF, RET/PTC, NRAS, KRAS*; reportó sensibilidad del 38%, especificidad 95%, falsos positivos 4 y falsos negativos 21. El estudio de Otori en 2012⁹ evaluó a 117 biopsias obtenidas por BAAF con diagnóstico de LFSI y ASI, para identificar mutaciones en *BRAF, NRAS, HRAS, PAX8/PPARγ*, mostró sensibilidad de estos marcadores del 60%, especificidad del 100%, falsos positivos 0, y falsos negativos 8. Finalmente el estudio de Cantara en 2010⁹, en el que analizó 41 muestras des BAAF con diagnóstico indeterminado para probar la presencia de mutaciones en *N-, H-, KRAS, BRAF, RET/PTC, PAX8/PPARγ*, encontró sensibilidad del 85.7%, especificidad de 80.4%. Las diferencias en los valores de sensibilidad y especificidad entre los 4 diferentes estudios es atribuida a la diferente metodología para el procesamiento de las muestras y principalmente al sistema de clasificación empleado ⁸. Filicori y cols, mostraron que cuando el estudio de las mutaciones es negativo, existe un riesgo de malignidad residual cercano al 22%⁶. Estudios de costo-efectividad muestran que la estrategia de incluir la determinación de mutaciones somáticas a las recomendaciones de la ATA es costo efectivo siempre que se ofrezca la determinación de las mutaciones por menos de \$870 USD; el costo actual de las plataformas para determinar mutaciones somáticas (MiRInform por Asuragen) va de \$600 a \$2400 USD.

- *Plataformas de análisis de expresión génica*: representa una alternativa novedosa para la

evaluación de nódulos tiroideos indeterminados mediante BAAF, consiste en el empleo de un clasificador de expresión génica que utiliza datos genómicos de alta dimensionalidad para clasificar a los nódulos tiroideos desde una base molecular. El clasificador comercializado bajo el nombre Veracyte Afirmar es un clasificador basado en múltiples genes que utiliza RNAm extraído de BAAF y mide la expresión de 167 genes con el objetivo de distinguir nódulos benignos de aquellos sospechosos. En el estudio de validación donde se estudiaron 24 nódulos indeterminados, estimó que para el diagnóstico de malignidad la sensibilidad fue de 85 a 100% y de 40 a 73% para estudio histopatológico y estudio citopatológico respectivamente¹⁰. El estudio multicéntrico de validación para la plataforma Afirmar realizado en 265 nódulos indeterminados, de los 85 nódulos identificados en la histopatología como malignos, el clasificador predice correctamente a 78, dando una sensibilidad de 92%, especificidad del 52% y valor predictivo negativo del 95% para Bethesda III, 94% para Bethesda IV, y 85% para Bethesda V¹¹. Un estudio patrocinado por el fabricante de la plataforma, mostró que comparado con la decisión clínica basada en los elementos tradicionales (TSH, ultrasonido y BAAF) el empleo de Afirmar en el contexto de la práctica clínica cotidiana estuvo asociado con una reducción en la tasa de recomendación de cirugía de 74% (cuando la decisión se basó en características clínicas y citopatológicas del nódulo) a 7.6% (cuando en la toma de decisiones fue incluida la información aportada por el clasificador de expresión génica)¹².

- *MicroRNA*: son RNA cortos, no codificantes, en promedio de 22 nucleótidos de extensión. Funcionan como reguladores negativos y positivos para la expresión de genes codificantes de proteínas, y están involucrados en el desarrollo celular, apoptosis, crecimiento y

respuesta inmune^{8,13}. Pueden actuar también como reguladores de la expresión de genes supresores de tumores y oncogenes. La desregulación y expresión alterada de los miRNA ha sido descrita en diferentes tipos de carcinoma tiroideo. El estudio de Keutgen¹⁴ realizado en 105 nódulos indeterminados encontró que mediante el uso de una batería de 4 miRNA (miR-222, miR-328, miR-197, miR-21) fue posible discriminar adecuadamente entre nódulos benignos o malignos con una sensibilidad del 100% y especificidad de 86%. En resumen, la detección de mutaciones somáticas es incapaz de detectar 50-70% de los casos de malignidad. Esto debido a que la carcinogénesis tiroidea no se explica únicamente a partir de la presencia de mutaciones somáticas sino que existen múltiples defectos moleculares en diversas vías metabólicas y de señalización que contribuyen a la transformación neoplásica¹⁵. En 2014 el Atlas Genome Research Network evaluó mediante múltiples plataformas moleculares (arreglos de SNP's, exomas, RNA-seq, miRNA-seq y metilación del DNA) a 390 carcinomas papilares, identificó que el comportamiento clínico, histopatología y expresión de genes de diferenciación tiroidea se agrupan conforme a una firma molecular en aquellos con características relacionadas con señalización BRAF^{V600E} y aquellos con características asociadas a señalización RAS. Esta distinción disminuyó la proporción de tumores sin defecto oncogénico molecular identificado, de 25% a 3.5%¹⁵. Mientras no sean conocidas en su totalidad las alteraciones genéticas causales de los diferentes tipos de cáncer tiroideo, se requerirá de abordajes moleculares adicionales para el diagnóstico e identificación de las lesiones indeterminadas y de aquellas que son negativas para mutación somática pero que muestran histología maligna, y para la identificación molecular de lesiones benignas⁶.

Marcadores moleculares potenciales en nódulos tiroideos benignos

Proteína CAPZB

CAPZB fue identificada a partir del estudio de Teumer y cols., quienes realizaron un estudio de GWAS en 4910 individuos con diagnóstico de bocio eutiroideo, con edades de 20 a 81 años, residentes en Alemania (región con deficiencia de yodo). El estudio se realizó con el objetivo de evaluar los polimorfismos asociados con la presencia de bocio y con el volumen tiroideo. Los polimorfismos (SNP's) identificados como relacionados con el volumen tiroideo fueron rs12138950, rs1354920, rs17767491, y rs12091047; por otro lado los asociados a la presencia de bocio fueron rs12138950, rs1023683, rs3813579 y rs12033437¹⁶, de estos SNP's, dos se encuentran en relación con la región que codifica para el gen CAPZB, y uno con el factor de crecimiento fibroblástico 7 (FGF7)¹⁶.

La proteína CAP (actin capping protein) fue descrita por Murayama en la década de 1960 y 1970, su función es la de cubrir (del inglés "to cap") los extremos libres de los filamentos de actina en el citoesqueleto. Su actividad inhibe la adición y pérdida de nuevos residuos de actina. CAP es un heterodímero α/β , cada unidad tiene una masa de ~30 kDa, cada subunidad en forma de monómero es inestable, mientras que el heterodímero mantiene la estabilidad. Estructuralmente su forma semeja a la cabeza de un hongo. Las funciones fisiológicas de CAP son las de cubrir los extremos libres de los residuos de actina del citoesqueleto, y atar estos extremos libres a otras estructuras. Aunque CAP está compuesta por 2 subunidades, estas no son idénticas y no guardan simetría en congruencia con la asimetría de los extremos de los filamentos de actina¹⁷.

Los vertebrados poseen 2 isoformas de cada subunidad, y una isoforma adicional expresada únicamente en células germinales masculinas. Para la subunidad α las isoformas $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son codificadas por genes diferentes, mientras que para la subunidad β las isoformas son producto de empalme alternativo del mismo gen. Las isoformas β son tejido específicas y la ausencia de una isoforma no es remplazada por otra isoforma en el mismo tejido.

CAP es regulada por dos proteínas, CARMIL y V-1/miotrofina, ambas interactúan con CAP e inhiben su capacidad para cubrir el extremo de los residuos de actina. CARMIL tiene la capacidad de remover a CAP una vez que esta ha interactuado con los residuos de actina. V-1 por su parte impide la interacción de CAP con residuos de actina, pero una vez que esta ha ocurrido, V-1 es incapaz de remover a CAP. Otras moléculas que participan en la regulación de CAP es PIP_2 la cual modula su actividad cerca de membranas y CKIP-1 la cual modula cambios en la morfología celular¹⁷.

Las funciones de CAP han sido develadas conforme a las siguientes observaciones: en células murinas de melanoma, mediante siRNA contra CAP disminuye la formación de protrusiones tipo lamelipodios e incremento en los filipodios; la inactivación aguda de CAP en fibroblastos mediante láser resulta en un incremento local en la concentración de extremos de actina libres con la protrusión en consecuencia de estructuras dependientes de actina. Este modelo de acción de CAP conocido como “modelo de nucleación dendrítica” aparenta ser contradictorio, sin embargo es explicado por Wear y Cooper¹⁸ quienes proponen que CAP existe en 2 estados: activo e inactivo, ambos estados resultan en un movimiento de membrana; en la forma activa se genera protrusión de la membrana mediada por el complejo Arp2/3, ya que su presencia permite la polimerización de actina

hacia los extremos de la membrana celular dando lugar a lamelipodios. En la forma inactiva el cambio de membrana en forma de filipodios resulta de la inhibición de solo una pequeña región celular, mediado proteínas como CARMIL, PIP₂ y V-1, esta inhibición local permite que en la región adyacente continúe el proceso de polimerización de actina generando estructuras como los filipodios. Un tercer movimiento membranal es la endocitosis en la que la dinámica de la actina es regulada por CP y otras como Arp2/3.

El rs12138950 identificado en el estudio de Teumer y cols¹⁶, corresponde con la región CAPZB del cromosoma 1p36 y codifica para dos subunidades β de la proteína CAP o “barbed-end actin binding protein”.

En la tiroides, proteínas con esta actividad interactúan con el citoesqueleto y participan en la formación de microvellosidad para endocitar material coloide al interior celular para su posterior procesamiento a las hormonas tiroideas tiroxina y triyodotironina. Las proteínas CAP son reguladas por cAMP, segundo mensajero resultado de la activación del TSHR (receptor de TSH) por TSH. Los autores de este estudio proponen que formas con baja actividad de esta proteína disminuyen la capacidad del tirocito para endocitar coloide reduciendo a su vez la producción de T3/T4, lo que induce una compensación hipotálamo-hipofisiaria para producir TSH que estimularía la hiperplasia y el incremento del volumen tiroideo¹⁶. No existen estudios que cuantifiquen la expresión de CAPZB en tejido tiroideo.

TRIP12 (Interactor del receptor de hormonas tiroideas 12)

TRIP12 (o ULF por “Ubiquitin ligase of ARF”) es una secuencia candidata identificada en el primer escrutinio completo del genoma para el estudio de bocio eutiroideo realizado en 18

familias de Dinamarca, Alemania y Eslovaquia; mediante estudio de ligamiento que empleó 450 marcadores de microsatélite distribuidos uniformemente cada 11 cM. El estudio de ligamiento identificó regiones en los cromosomas 2q, 3p, 7q y 8p con valores LOD no paramétricos de 2.54, 2.25, 1.87 y 1.79, respectivamente. La región identificada en 2q, con el score LOD mayor corresponde a una región donde se encuentran 170 genes conocidos que abarcan un total de 23 Mb, entre esta multitud de genes se identificó como candidato plausible a TRIP12, sin embargo la secuenciación del gen no mostró variaciones entre las diferentes familias estudiadas¹⁹.

TRIP12/ULF (2q36.3) codifica para una proteína con un dominio HECT con actividad de ligasa (E3) de ubiquitina, el nombre que inicialmente recibió fue asignado debido a su interacción con el receptor de hormonas tiroideas; actualmente TRIP12 es más conocida por su actividad como ligasa (E3) de ubiquitina²⁰. La función de TRIP12 fue comprendida a partir de la generación un modelo murino en el cual el dominio HECT de la proteína fue mutado, el resultado de esta intervención resulto en letalidad en fase embrionaria (E8.5) sin cambios anatómicos gruesos evidentes; siguiendo la misma técnica pero en un modelo de cultivo celular se observó persistencia de la viabilidad del cultivo pero falta de progresión del ciclo celular. Los autores consideraron que TRIP12 es un factor involucrado en la regulación de la expresión genética global basados en el papel sugerido por los efectos embrionarios²⁰.

El papel de TRIP12 en la proliferación celular es comprensible a partir de la siguiente perspectiva: p53 es un proteína con actividad tumor supresora, actúa en forma de sensor de las condiciones del medio intracelular (nutrientes, oxigenación, pool de nucleósidos) y su activación genera respuestas de arresto del ciclo celular y apoptosis. p53 es regulada por

múltiples proteínas de las cuales ARF modula positivamente a p53. Mdm2 es una ligasa de ubiquitina E3 que degrada (modulador negativo) a p53 permitiendo la continuidad del ciclo celular; ARF, que reside en el núcleo celular, inhibe directamente a Mdm2, el resultado de esta interacción es la persistencia de la actividad tumor supresora de p53. La actividad de ARF ocurre en respuesta a la actividad de algunos oncogenes como Myc y la proteína RAS mutada²¹. TRIP12/ULF posee actividad de ligasa de ubiquitina E3 específica para proteínas sin residuos de lisina como lo es ARF. La acción que normalmente TRIP12/ULF ejerce sobre ARF evitará la acción de p53 lo que dará lugar a progresión del ciclo celular, de modo inverso la inhibición de TRIP12/ULF permitirá la estabilidad ARF, permitiendo la actividad de arresto del ciclo celular relacionada con p53. Bajo el modelo expuesto, la pérdida de la regulación por TRIP12 puede traducirse en un incremento en la capacidad proliferativa celular y disminución de la apoptosis, que puede relacionarse con algunas neoplasias²¹ (Fig.1).

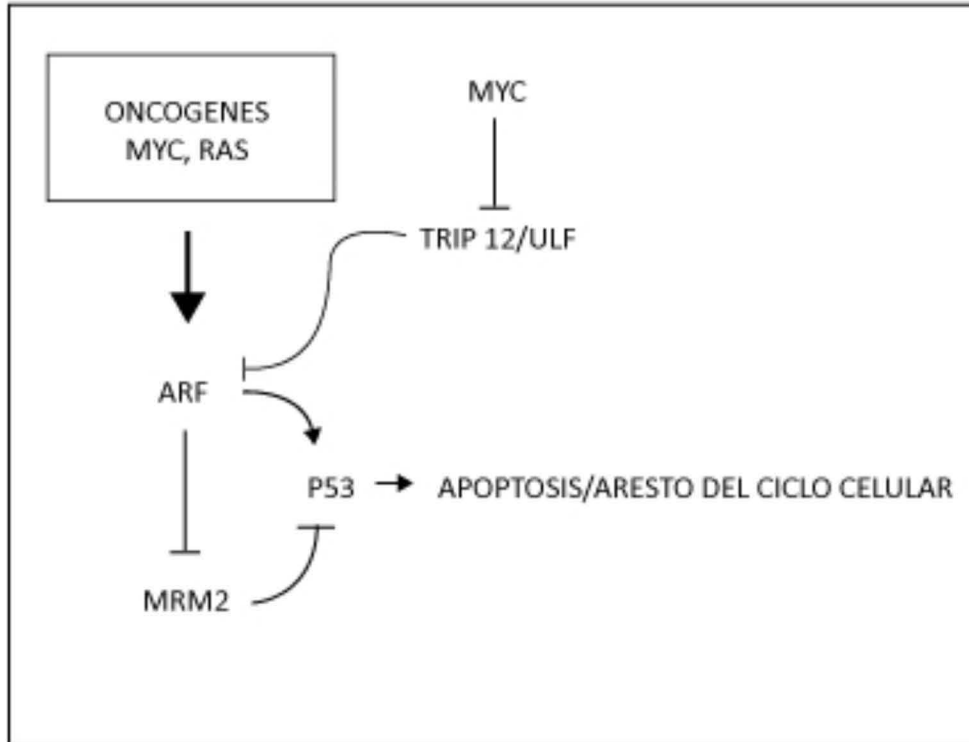


Figura 1. Función normal de TRIP12/ULF.

P53 actúa como tumor supresor mediante la regulación de la apoptosis y arresto del ciclo celular. P53 es regulado de forma positiva por ARF e inhibido por MDM2. TRIP12 modula de forma negativa a ARF mediante su actividad de ligasa de ubiquitina específica; MYC y RAS (mutada) actúan sobre TRIP12/ULF. La inhibición que sobre ARF ejerce TRIP12/ULF, en consecuencia inhibirá a P53 favoreciendo progresión del ciclo celular y actividad proliferativa.

Otro papel de TRIP12 se ha identificado en la respuesta de reparación del daño al DNA mediante la interacción que guarda con RNF168. RNF168 es una proteína con actividad de amplificación de la ubiquitinización de histonas cuya función esta principalmente involucrada en la reparación del daño al DNA. TRIP12 actúa como una proteína desubiquitinizante que evita que la actividad de RNF168 tenga consecuencias negativas como represión transcripcional no programada o limitación en la expresión de genes tumor supresores; este mecanismo es empleado por las células para coordinar la dinámica de reparación del DNA y evitar el excesivo silenciamiento transcripcional²².

Se desconoce la expresión de TRIP12 en tejido tiroideo, si bien la secuenciación en las familias estudiadas por Bayer y cols¹⁹, no mostró variación, no existen estudios que hayan

medido la expresión del gen *TRIP12* en tejido tiroideo y específicamente si existe cambio en la expresión de acuerdo con el tipo de patología tiroidea.

Marcadores moleculares potenciales en nódulos tiroideos malignos

TFF3

TFF3 fue identificado de forma consistente en 2 meta-análisis como diferencialmente expresado entre lesiones malignas y benignas^{23,24}.

Los factores trefoil son péptidos resistentes a proteasas que poseen una estructura de tres asas en forma de trébol (trefoil). Existen tres familias, todas producidas en el tracto gastrointestinal por las células secretoras de mucina. TFF inhibe la apoptosis, estimula la migración, la cicatrización y fosforila residuos de tirosina en la beta-catenina, lo cual reduce la adhesión célula-célula y estimula la migración en las células intestinales^{25,26}.

El grupo de Takano y Yamada reportaron la existencia de expresión diferencial de ARNm de TFF3 entre adenomas foliculares y carcinomas foliculares, reportaron que los niveles de ARNm de TFF3 se encontraron notoriamente disminuidos en 7 carcinomas foliculares del tipo invasivo, reportaron sensibilidad del 80%, y especificidad del 91.5%, aunque estos valores no atrajeron inicialmente la atención de la comunidad médica, posteriormente la reproducibilidad puso énfasis en su potencial para diferenciar adenoma folicular de carcinoma folicular²⁷.

TFF3 es un marcador universal de tumores tiroideos derivados de células foliculares, el cual se encuentra regulado a la alta en la tiroides normal, bocio nodular, 80% de adenomas foliculares, 20% de los carcinomas foliculares mínimamente invasivos; se encuentra

regulado a la baja en carcinoma anaplásico, carcinoma papilar²⁵, carcinoma folicular ampliamente invasivo, 80% de los carcinomas foliculares mínimamente invasivos y 20% de los adenomas foliculares.

En el estudio de Foukakis y cols., realizado con el objetivo de determinar un grupo de marcadores de expresión para discriminar entre adenoma folicular, adenoma folicular atípico, carcinoma folicular mínimamente invasivo y carcinoma folicular ampliamente invasivo, mediante el empleo de un modelo basado en la expresión de 2 genes (TFF3 y TERT) se estimó una especificidad del 94%. El estudio observó además regulación a la baja del ARNm de TFF3 en todos los casos de carcinoma folicular amplia y mínimamente invasivos²⁸.

Con el fin de determinar si existe una asociación como lesión premaligna, entre el bocio y el carcinoma papilar de tiroides, Hawthorn y cols., evaluaron 3 muestras de bocio y 5 lesiones de carcinoma papilar con su contraparte de tejido sano respectivamente, mediante el empleo del análisis mediante GeneChip y posterior cuantificación por RT-PCR. El estudio mostró que TFF3 se encuentra subexpresado en cáncer papilar tiroideo (-6.81 veces) y bocio (-3.8 veces) comparado con tejido normal respectivamente; cuando se hizo la combinación de los datos de la expresión de genes de carcinoma papilar y bocio, comparados contra tejido normal, únicamente el gen TFF3 se halló como subexpresado en todas las muestras, aunque en esta comparación la magnitud del cambio fue de -1.4 veces para bocio vs normal, y -44.6 veces para tumor vs normal²⁵.

TFF3 se conoce que se encuentra sobre-expresado en otros tipos de cáncer como es el caso de tumores mucinosos de páncreas, carcinoma de células renales y líneas celulares de cáncer gástrico y mamario.

La hipótesis de Hawthorn y cols., es que la menor expresión de TFF3 en bocio y cáncer papilar tiroideo está relacionada con su menor potencial metastásico²⁵, situación potencialmente contradictoria con las observaciones de Foukakis y cols. acerca del cáncer folicular tiroideo, el cual se distingue precisamente por su comportamiento de mayor agresividad, y que mostró igualmente menor expresión de TFF3.

CTCF

El principal resultado de las interacciones genéticas mediadas por CTCF es la regulación de la transcripción a varios niveles: iniciación, selección del promotor, interrupción del promotor y empalme (splicing). Estudios basados en técnicas de microscopía y de captura de conformación cromosómica (3C) mostraron que el factor de unión-CCCTC (CTCF) es responsable de acercar la brecha entre la organización nuclear y la expresión genética²⁹.

CTCF contiene un dominio de unión al DNA altamente conservado que tiene la estructura de 11 dedos de zinc. El grupo de Chen H y cols., identificaron y caracterizaron sitios ubicuos de unión de CTCF en 38 diferentes tipos de células humanas, estos sitios de unión fueron clasificados como tipo celular-específico, común y ubicuo; en total fueron identificados cerca de 326,840 sitios de unión de CTCF, de estos 126,200 fueron tipo celular-específicos y el resto fueron ubicuos, distribuidos de forma general a lo largo del genoma y localizados en cercanía con miríadas de genes lo que sugiere que CTCF tiene una función genómica, así mismo se observó que CTCF actúa como un elemento aislante entre la eucromatina y la heterocromatina³⁰.

La interacción genómica que posee CTCF radica en la presencia de secuencias consenso ricas en regiones CpG. La metilación de las citosinas en las CpG (metilcitosina) da lugar a que CTCF posea una menor afinidad por estos sitios, de forma contraria, las formas oxidadas de la metilcitosina (como son hidroximetilcitosina, formilcitosina y corboxilcitosina) dadas por la actividad enzimática de las enzimas TET, dan lugar a incremento en la afinidad de CTCF por CpG²⁹.

La interacción de CTCF con la cromatina requiere de la presencia de dos proteínas: cohesina y TFIIC. Las cohesinas son un grupo de proteínas compuestas por los heterodímeros Smc1/Smc3 y dos subunidades Scc1 y Scc3, entre sus funciones se encuentra el mantener unidas a las cromátides hermanas al momento de la replicación del DNA funciones necesarias para la adecuada segregación cromosómica, reparación del DNA y para evitar recombinaciones inapropiadas entre regiones repetitivas. La localización de las cohesinas en la cromatina no está determinada por la transcripción sino por el contexto de la secuencia local y la estructura de la cromatina. CTCF y cohesinas se localizan extensamente en células mamíferas y en conjunto actúan en forma de puente que une la secuencia de DNA con el estado epigenético³¹.

TFIIC es una proteína con función aislante y limitante entre la heterocromatina y eucromatina posiblemente mediante el resultado de la interacción TFIIC con las secuencias de caja B (B-box), cuyo resultado es la marginación de segmentos de DNA hacia la periferia nuclear, este proceso da lugar a sitios que actúan como pausas en la horquilla de replicación³². La actividad de TFIIC es requerida para la transcripción de tRNA, la subunidad 5S de rRNA, RNA Pol II, ncRNA y SINEs (elementos nucleares cortos)²⁹.

Las observaciones sugieren que la función de CTCF en la expresión génica es el resultado de su habilidad para acercar secuencias que se encuentran distantes, esta afirmación se sustenta en estudios basados en la técnica de inmunoprecipitación cromosómica (ChIP) que sugieren que una de las funciones principales de CTCF es la de dirigir los elementos regulatorios con sus respectivos promotores²⁹. Como parte del consorcio ENCODE, mediante la técnica 5C (chromosome conformation capture carbon copy), fueron analizadas 44 regiones de DNA de 30Mb cada una (equivalente al 1% del genoma), en las líneas celulares GM12878, K562 y HeLa-S3. Se evaluó para determinar la presencia de siete estados de modificación de la cromatina: facilitador (enhancer), facilitador débil, sitio de inicio de la transcripción (TSS), regiones predichas flanqueadoras del promotor, elementos aislantes (CTCF) y región del transcrito. Se encontró que la interacción entre asas distantes estaba enriquecida en elementos facilitadores, facilitadores débiles y CTCF. El hallazgo de mayor interés fue el que la mayor parte de las interacciones del sitio de inicio de la transcripción (TSS) con CTCF se encontraron “rio arriba” (upstream), y estas interacciones no ocurrieron necesariamente con el TSS más cercano, esto se observó únicamente en el 27% del total de las interacciones; además contrario a la conceptualización pasada sobre CTCF como un elemento aislante del genoma que actuaría bloqueando estas interacciones entre TSS y elementos regulatorios distales, se encontró que 79% de las interacciones entre TSS y otros elementos regulatorios no estaban impedidas por uno o más sitios de unión de CTCF. El estudio aportó valiosa información sobre el panorama que las asas de cromatina utilizan para poner en cercanía genes y elementos distantes regulatorios³³.

En una escala global, las interacciones mediadas por CTCF y otras proteínas arquitectónicas

(TFCIII, cohesina) resultan en la formación de “dominios de asociación topológica” (TAD: topological associated domains). Estos TAD representan la estructura organizativa de los genomas eucariontes. A una escala local, el papel de CTCF parece ser el de un fino modulador de las interacciones intracromosómicas dentro de los TAD con el fin de regular varios aspectos de la expresión génica²⁹.

Recientemente fue descrita la posible contribución que las mutaciones somáticas en los sitios de unión de CTCF pueden aportar a la fisiopatología del cáncer; el grupo Katainen, et al; identificó en muestras de cáncer colorectal que existe un acumulo de mutaciones en los sitios de unión de cohesina que se localizan en el sitio de unión a CTCF o en el sitio inmediatamente adyacente a este, con el posible resultado de la pérdida de la afinidad de estos sitios por CTCF y dar lugar en consecuencia a expresión genética aberrante, cambios epigenéticos así como inestabilidad genética³⁴.

La expresión de CTCF en neoplasias tiroideas, especialmente carcinoma papilar tiroideo no se conoce.

HMMR

El receptor de motilidad mediado por hialuronano (HMMR) es un oncogén que se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de neoplasias como leucemias y tumores sólidos³⁵.

Las células tumorales así como los fibroblastos producen citosinas y quimiocinas proinflamatorias cuya función es reclutar y activar células de la inmunidad innata incluidos macrófagos y neutrófilos. Los macrófagos son una pieza clave en la generación de un microambiente inflamatorio. La interacción entre las células tumorales, fibroblastos y las

células inflamatorias producen factores que remodelan la matriz extracelular (MEC) para dar lugar a un microambiente óptimo que sustenta el crecimiento tumoral y promueve la progresión maligna. La MEC está compuesta por proteínas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos que dan soporte y organización tisular. Un componente principal de la MEC es el ácido hialurónico (HA). El HA es sintetizado en la superficie de diversos tipos celulares en forma de un polímero aniónico, esto ocurre particularmente en sitios de heridas en cicatrización y en tumores^{36, 37}.

Uno de los receptores de HA es HMMR (también conocido como RHAMM), este puede estar localizado sobre la superficie celular o bien ser una proteína citoplasmática; la expresión de HMMR se encuentra estrechamente regulada de tal modo que solo ocurre bajo situaciones de estrés celular, la expresión de HMMR es inconstante y varía conforme a la progresión del ciclo celular, específicamente, la mayor expresión de HMMR se observa en las fases G2/M del ciclo. La activación de HMMR por su ligando transduce señales intracelulares (como ERK 1,2) que dan lugar a motilidad celular e invasión tumoral, en especial la forma intracelular de HMMR funciona como una proteína de andamiaje para formar complejos entre ERK1, 2 y MEK1, este mecanismo se ha propuesto como una vía mediante la cual HMMR incrementa la duración e intensidad de las señales oncogénicas³⁶.

La sobreexpresión de HMMR en diferentes tipos de cáncer es el resultado del ambiente inflamatorio dado por la presencia de las células de la inmunidad innata y sus citocinas asociadas como IL-1 β y TGF- α .³⁶

La expresión de HMMR en tejido tiroideo benigno o maligno no se conoce; no existen reportes sobre la expresión de HMMR en neoplasias malignas tiroideas.

Planteamiento del problema

La distinción certera de un nódulo tiroideo como benigno o maligno se logra únicamente luego de realizar cirugía tiroidea (hemitiroidectomía o tiroidectomía total), lo que implica el riesgo de complicaciones quirúrgicas (hipoparatiroidismo, lesión del nervio laríngeo recurrente e hipotiroidismo). Existe un área de oportunidad para la innovación mediante el uso de las herramientas de la biología molecular. El uso de microarreglos para discriminar lesiones tiroideas benignas y malignas ha permitido un adecuado diagnóstico, sin embargo, el costo de esta tecnología la hace poco factible para el uso rutinario en el medio clínico nacional. Estudios, han identificado genes asociados al fenotipo de bocio y carcinoma tiroideo respectivamente, algunos corroborados a nivel tisular y con alta reproducibilidad, así como otros marcadores conocidos en otras neoplasias que potencialmente pueden ser utilizados como clasificadores de benignidad o malignidad en nódulos tiroideos. La identificación de un perfil de clasificación molecular para la discriminación de lesiones tiroideas benignas y malignas puede permitir la implementación de una herramienta diagnóstica para nódulos tiroideos indeterminados de forma preoperatoria a bajo costo y con alta sensibilidad y especificidad.

Justificación

Los nódulos tiroideos son altamente prevalentes, especialmente posterior a los 50 años. La citología tiroidea (sistema de clasificación de Bethesda) no permite realizar el diagnóstico certero en algunos tipos de nódulos tiroideos, particularmente los clasificados como Bethesda III, IV y V. La tecnología actual para clasificación benigno-maligno es costosa y de

acceso limitado en el medio clínico nacional. En los últimos 10 años se han identificados marcadores de benignidad y de malignidad no relacionados con mutaciones somáticas, reproducibles, que pueden ser empleados como herramienta de clasificación en muestras quirúrgicas de nódulo tiroideos, con el fin último de generar una herramienta diagnóstica para uso rutinario en la clínica.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los valores de expresión de ARNm de los genes *TRIP12*, *CAPZB*, *TFF3*, *CTCF* y *HMMR*, en tejido tiroideo obtenido de piezas quirúrgicas, entre lesiones diagnosticadas por histopatología como benignas y malignas?

Objetivos

Primario

1. Determinar la concentración de los ARNm de los genes *TRIP12*, *CAPZB*, *TFF3*, *CTCF* y *HMMR* en nódulos tiroideos diagnosticados por histopatología como benignos (bocio, adenoma folicular) o malignos (cáncer papilar y folicular en sus respectivas subvariedades).
2. Comparar los niveles de ARNm de *TRIP12*, *CAPZB*, *TFF3*, *CTCF* y *HMMR*, entre las lesiones benignas, malignas y normales.

Secundario

1. En las muestras malignas, evaluar la existencia de un gradiente de expresión conforme a la presencia de características de agresividad de cada variedad de neoplasia.
2. Evaluar el desempeño diagnóstico de cada gen en forma individual y en conjunto.

Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional y transversal. Fué realizado en las instalaciones del Departamento de Endocrinología y Metabolismo del INCMNSZ, Departamento de Bioquímica del INCMNSZ y el Laboratorio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría.

Selección de pacientes

Criterios de inclusión

- I. Pacientes que acudan a consulta en la Clínica de Tiroides del INCMNSZ.
- II. Cualquier sexo
- III. Mayores de 18 años
- IV. Pacientes en quienes tras realizar la evaluación diagnóstica indicada por la presencia de un nódulo tiroideo se decida, en sesión conjunta (clínica de tiroides, patología, radiología y cirugía endocrina) que se realizará hemitiroidectomía o tiroidectomía total.
- V. Pacientes con bocio evidente o con síntomas obstructivos en quienes se decida, en sesión conjunta (clínica de tiroides, patología, radiología y cirugía endocrina) que se realizará tiroidectomía total.
- VI. Pacientes en quienes tras el procedimiento quirúrgico se cuente con el reporte

histopatológico definitivo de bocio, tiroiditis linfocítica, adenoma folicular, carcinoma papilar y carcinoma folicular (en sus diferentes subvariedades).

VII. Pacientes que firmen el formato de consentimiento.

Criterios de exclusión

I. Pacientes que no acepten firmar el formato de consentimiento.

Materiales y métodos

Cálculo del tamaño de muestra

Con base en el valor de expresión del transcrito *TTF2 (FOXE1)* reportado por Youben, et.al., con un valor de 0.36 para sujetos con carcinoma papilar de tiroides y 0.10 para sujetos sin carcinoma papilar de tiroides, con un valor $\alpha=0.05$, se estimó mediante el método de proporciones un tamaño de muestra de 40 a 70 sujetos por grupo³⁸.

Obtención de la muestra.

Los pacientes en quienes tras realizar la evaluación diagnóstica indicada por la presencia de un nódulo tiroideo fue decidido, en sesión conjunta de los servicios (clínica de tiroides, patología, radiología y cirugía endocrina) que se realizará hemitiroidectomía o tiroidectomía total, se les entregó durante el preoperatorio la carta de consentimiento informado. Durante el trans-operatorio, una vez realizada la resección de la lesión de interés, se solicitaron 2 fragmentos de tejido de cada paciente, uno del tejido nodular y otro del tejido

tiroideo que por inspección sea de aspecto normal y que se haya encontrado alejado (contralateral) del sitio del tejido nodular; en caso de que se trate de una lesión de bocio difuso se tomaron 2 muestras, una de cada lóbulo tiroideo.

De la muestra obtenida de la lesión durante el trans-operatorio, se seccionó un fragmento de aproximadamente 0.5 cc, el cual fue preservado en nitrógeno líquido y fue enviado para su estudio molecular. El resto de la pieza fue enviada al servicio de patología para su estudio histopatológico.

Procesamiento de la muestra

El tejido nodular obtenido en el trans-operatorio se mantuvo en congelación a una temperatura de -70°C durante el tiempo suficiente hasta que fue completado el tamaño de muestra requerido.

Aislamiento de ARNm

La muestra que analizar, una vez descongelada fue colocada en 1ml de Tripure Isolation Reagent, posteriormente se realizó lisis del tejido mediante sonicación. El lisado fue transferido a un tubo Eppendorf para homogenizar y se mantuvo en incubación durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se colocaron 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de Tripure; la mezcla fue homogeneizada y posteriormente centrifugada a 12,000 rpm por 15 minutos a una temperatura de 4°C para obtener la separación de la fase acuosa, esta fue retirada mediante el uso de una pipeta y posteriormente transferida a un nuevo tubo de 1.5 ml.

A solución recuperada se agregó 0.5ml de isopropanol por cada mililitro de Tripure, fue incubada durante 5 a 10 minutos a una temperatura ambiente, posteriormente se realizó centrifugación a 12,000 rpm, durante 10 minutos a 4°C.

Tras este paso, la solución obtenida tuvo un sobrenadante el cual fue eliminado; el contenido residual del tubo fue lavado con etanol al 75% se homogenizó, la solución fue centrifugada a 7500 rpm a 4°C y se obtuvo nuevamente el sobrenadante. El excedente fue eliminado mediante desecación en la campana. El material que se encontró en el fondo corresponde al RNA, y fue suspendido en agua destilada e incubado a 58°C. Finalmente, se evaluó la integridad de RNA mediante genes de agarosa.

Síntesis de cDNA.

El cDNA fue realizado utilizando 5 µg de ARN total. Primero se procedió a la degradación de DNA con DNasa, para ello fueron colocados 5 µg de ARN total en un tubo de 0.2 ml, se agregó 1 ml de buffer para DNasa 10x, 1U de DNasa y se llevó a un volumen de 10 µl. La mezcla se colocó en el termociclador a 37°C por 30 min, al finalizar se agregó 1 µl de EDTA 50 mM y se incubó a 65°C por 10 min. Posteriormente, se preparó una mezcla maestra que contenía: 4 µl de Buffer para la Transcriptor RT a 5X, random primers 3.2 µg, 20 unidades de inhibidor de RNasas, 20 mM de DNTP's y 10 unidades de la enzima Transcriptor Reverse Transcriptase (ROCHE). La mezcla se incubó en el termociclador a 25°C 10 min, 55°C por 30 min y 85°C por 5 min. La mezcla de reacción fue almacenada a -20°C hasta su uso.

Amplificación por PCR.

Ya que se tuvo la síntesis de cDNA se procedió a verificar la amplificación utilizando el gen constitutivo RPL4, para ello se realizó una dilución del cDNA stock 1:25, y se utilizó 1 µl del cDNA diluido para la PCR punto final. Para ello se utilizó la polimerasa KAPA 2G Fast HotStart ReadyMix White Dye. Las reacciones se realizaron a un volumen final de 15 µl y la mezcla de reacción contenía 7.5 del Buffer KAPA 2G a 2X, que a su vez contenía (0.15 unidades de polimerasa, 0.2 mM DNTP's y 1.5 mM de MgCl₂), primer Sentido 5' CGAATGAGAGCTGGCAAAGGCAAA 3' a 5mM y anti sentido 5' ACGCCAAGTGCCGTACAATTCATC 3' 5mM, 1 µl del cDNA diluido 1:25. La mezcla de reacción se incubó en el termociclador Proflex de Applied biosystems con el siguiente protocolo. 95°C 5 min, 95°C 15 segundos, 60°C 15 segundos, 72°C 15 segundos por 30 ciclos y finalmente a 72°C 10 min. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa (1.5%) a 80 Volts.

Amplificación por PCR en tiempo Real.

Ya que se había corroborado la amplificación por PCR del gen constitutivo, se procedió a realizar la PCR cuantitativa. Para ellos se emplearon a los iniciadores **CAPZB** Fw 5'GCCATCTCTCCCTGAGAATAAAG 3' y Rv 5'CCACACGGTCTCTATGGAAATG 3'; **HMMR** Fw 5'GCGTTAACAGCCAGTGAGATAG 3'y RV 5' TGCTGAACATCCTCTGCATTT; **CTCF** Fw 5' TGACACAGTCATAGCCCGAAAA 3' y Rv 5' TGCCTTGCTCAATATAGGAATGC 3'; **TRIP12** Fw 5'TGTCCAACCGGCCTAATAAC 3' y Rv 5' CCTCCTATTGAGTCGTCTTGTG 3'; **TFF3** Fw 5' TTTCTGTCCCTTTGCTCCCG 3' y Rv 5' TCAGGCACGAAGAACTGTCC 3'.

Se empleó el 2x KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 5 ul, iniciador Forward 1 ul a 5 μ M, iniciador Reverse 1ul a 5 μ M, Templado 1 μ l de la dilución 1:25 del cDNA inicial. Se corrieron en el termociclador Step One de Applied Biosystems con el siguiente programa de amplificación 95°C 3 min, 30 ciclos a 95°C 10 seg, 60°C 30 seg. A continuación, se realizó una curva melting para todos los iniciadores con el siguiente programa, 50°C a 95°C con un rampeo de 0.2°C. Finalmente, se determinó la expresión mediante el método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.³⁹

Resultados

Durante el periodo comprendido de marzo 2013 a marzo 2015 se reclutaron 56 pacientes candidatos a tiroidectomía por los criterios de inclusión mencionados, de estos, 48 pacientes fueron mujeres (85%) la media de edad en años de los pacientes analizados fue de 52.1 ± 17.44 para los pacientes con bocio, 48.1 ± 16.4 para los pacientes con carcinoma papilar, y 73.5 ± 0.7 para los pacientes con carcinoma folicular. Se obtuvieron 27 muestras de tejido normal, 34 muestras con diagnóstico de carcinoma papilar de tiroides, 2 muestras de carcinoma folicular de tiroides y 2 muestras con diagnóstico de adenoma folicular tiroideo.

Para responder a los objetivos primarios del estudio (determinación de las concentraciones de cada gen en los diferentes tipos de tejido), se obtuvo el valor $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para los genes *TRIP12*, *CAPZB*, *TFF3*, *HMMR* y *CTCF*.

Para el caso del bocio en comparación contra las medianas en tejido normal (**Tabla1**), se halló una sobreexpresión significativa para los genes *TRIP12* (4.06 vs 1.68, $p=0.008$), *CAPZB* (58.4 vs 1.03, $p=0.001$) y *HMMR* (12.67 vs 0.50, $p=0.03$) en el bocio.

| | Normal (n=27) | Bocio (n=21) | <i>p</i> | Ca. Papilar (n=34) | <i>p</i> | Ca. Folicular (n=2) | <i>p</i> | A. Folicular (n=2) | <i>p</i> |
|---------------|----------------------|----------------------|--------------|-----------------------|--------------|------------------------|-------------|-----------------------|----------|
| <i>TRIP12</i> | 1.68 (0.81-3.02) | 4.06 (1.99-11.6) | 0.008 | 3.22 (0.52-5.48) | 0.11 | 14.92 (3.82-26.02) | 0.142 | 2.70 (0.48-4.91) | 0.759 |
| <i>CAPZB</i> | 1.03 (0.4-5.9) | 58.4 (4.81-99.9) | 0.001 | 5.28 (0.32-39.43) | 0.14 | 29.79 (17.99-41.59) | 0.04 | 7.82 (0.34-15.31) | 0.93 |
| <i>TFF3</i> | 0.747 (0.27-2.86) | 1.20 (0.38-11.5) | 0.86 | 0.15 (0.05-1.35) | 0.018 | 2.04 (1.04-3.05) | 0.5 | 0.60 (0.01-1.19) | 0.75 |
| <i>HMMR</i> | 0.50 (0.19-9.74) | 12.67 (0.93-20.8) | 0.03 | 4.36 (0.34-20.84) | 0.11 | 63.18 (14.7-111.59) | 0.04 | 5.77 (0.92-11.35) | 0.85 |
| <i>CTCF</i> | 1.42 (0.21-2.52) | 2.69 (0.74-13.0) | 0.139 | 1.05 (0.22-3.37) | 0.6 | 14.83 (1.98-27.69) | 0.142 | 1.17 (0.03-2.31) | 0.759 |

Tabla 1. Expresión comparativa de los 5 genes de estudio en bocio, carcinoma papilar, carcinoma folicular y adenoma folicular, respecto a tejido morfológicamente normal (prueba de U Mann-Whitney)

Para la comparación de tejido normal vs carcinoma papilar de tiroides, se encontró una subexpresión significativa para el gen *TFF3* (0.15 vs 0.747, $p=0.018$) en el carcinoma papilar. En la comparación de carcinoma folicular vs tejido normal, se observó la sobreexpresión en los genes *HMMR* (29.79 vs 1.03, $p=0.04$) y *CAPZB* (63.18 vs 0.5, $p=0.04$) en el carcinoma folicular.

El problema clínico de mayor relevancia es la distinción de tejido neoplásico maligno respecto al tejido benigno (bocio), esto cobra mayor relevancia en el caso de las categorías citológicas de Bethesda III a V, conforme a esto se evaluó la expresión de los 5 genes en tejido neoplásico con respecto al bocio (**Tabla 2**). Se encontró una subexpresión de *CAPZB* (5.28 vs 58.4, $p=0.02$) y de *TFF3* (0.15 vs 1.20, $p=0.03$) en el carcinoma papilar tiroideo respecto al bocio. No encontramos diferencia estadísticamente significativa en la comparación entre adenoma y carcinoma folicular tiroideo contra bocio.

| | Bocio (n=21) | Carcinoma Papilar (n=34) | <i>p</i> | Carcinoma folicular (n=2) | <i>p</i> | Adenoma folicular (n=2) | <i>p</i> |
|---------------|-----------------------|--------------------------------|-------------|---------------------------------|----------|-------------------------------|----------|
| <i>TRIP12</i> | 4.06 (1.99-11.6) | 3.22 (0.52-5.48) | 0.12 | 14.92 (3.82-26.02) | 0.51 | 2.70 (0.48-4.91) | 0.44 |
| <i>CAPZB</i> | 58.4 (4.81-99.93) | 5.28 (0.32-39.43) | 0.02 | 29.79 (17.99-41.59) | 0.74 | 7.82 (0.34-15.31) | 0.23 |
| <i>TFF3</i> | 1.20 (0.38-11.57) | 0.15 (0.05-1.35) | 0.03 | 2.04 (1.04-3.05) | 1 | 0.60 (0.01-1.19) | 0.25 |
| <i>HMMR</i> | 12.67 (0.93-20.80) | 4.36 (0.34-20.84) | 0.41 | 63.18 (14.7-111.59) | 0.15 | 5.77 (0.92-11.35) | 0.27 |
| <i>CTCF</i> | 2.69 (0.74-13.03) | 1.05 (0.22-3.37) | 0.07 | 14.83 (1.98-27.69) | 0.66 | 1.17 (0.03-2.31) | 0.19 |

Tabla 2. Expresión comparativa de los 5 genes de estudio en carcinoma papilar, carcinoma folicular y adenoma folicular, respecto a bocio (prueba de U Mann-Whitney).

Con base en la mayor prevalencia de carcinoma papilar de tiroides respecto a otras lesiones malignas de tiroides, se evaluó el desempeño diagnóstico de los genes CAPZB y TFF3 para distinguir entre carcinoma papilar y bocio, para esto, categorizamos los valores de expresión de ambos genes por deciles. En el caso de CAPZB, el valor de corte de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 1.59, correspondiente con la percentila 40, para el diagnóstico de malignidad tiene una sensibilidad de 69.44% y especificidad de 21.74%, con un área bajo la curva de 0.365. Para el caso de TFF3, el valor de 0.122, que corresponde con la percentila 30, para el diagnóstico de malignidad tiene una sensibilidad del 76.47% y especificidad de 18.18% con un área bajo la curva de 0.359 (Tabla 3 y Tabla 4).

| CAPZB | Percentila | Sensibilidad | Especificidad | LR+ | LR- |
|--------------|-------------------|---------------------|----------------------|------------|------------|
| 0.154 | 10 | 100 | 0 | 1 | |
| 0.352 | 20 | 88.89 | 8.7 | 0.97 | 1.27 |
| 0.546 | 30 | 75 | 13.04 | 0.86 | 1.91 |
| 1.593 | 40 | 69.44 | 21.74 | 0.88 | 1.4 |
| 5.249 | 50 | 58.33 | 21.74 | 0.74 | 1.91 |
| 17.938 | 60 | 52.78 | 30.43 | 0.75 | 1.55 |
| 28.045 | 70 | 50 | 43.48 | 0.88 | 1.15 |
| 56.251 | 80 | 33.33 | 47.83 | 0.64 | 1.39 |
| 103.523 | 90 | 13.89 | 52.17 | 0.29 | 1.65 |
| >103.523 | 100 | 8.33 | 82.6 | 0.47 | 1.1 |

Tabla 3. Desempeño diagnóstico del gen CAPZB para la discriminación de tejido maligno contra bocio.

| TFF3 | Percentila | Sensibilidad | Especificidad | LR+ | LR- |
|-------------|-------------------|---------------------|----------------------|------------|------------|
| 0.015 | 10 | 100 | 0 | 1 | |
| 0.046 | 20 | 82.35 | 4.55 | 0.86 | 3.88 |
| 0.122 | 30 | 76.47 | 18.18 | 0.93 | 1.29 |
| 0.373 | 40 | 55.88 | 22.73 | 0.72 | 1.94 |
| 0.588 | 50 | 41.18 | 27.27 | 0.56 | 2.15 |
| 1.175 | 60 | 38.24 | 36.36 | 0.6 | 1.69 |
| 2.268 | 70 | 26.47 | 50 | 0.52 | 1.47 |
| 5.362 | 80 | 23.53 | 63.64 | 0.64 | 1.2 |
| 20.069 | 90 | 17.65 | 72.73 | 0.64 | 1.13 |
| >20.069 | 100 | 8.82 | 86.36 | 0.64 | 1.05 |

Tabla 4. Desempeño diagnóstico del gen TFF3 para la discriminación de tejido maligno contra bocio.

Los resultados anteriores sugieren que con el valor de sensibilidad promedio para ambos genes de alrededor de 70% y especificidad promedio de 20%, esto implicaría que 70% de las lesiones malignas serían correctamente distinguidas como tal, mientras que 80% de las lesiones benignas por diagnóstico histopatológico serían inadecuadamente clasificadas como malignas e innecesariamente tratadas quirúrgicamente. Por tanto, la utilidad diagnóstica para la discriminación entre lesión maligna y benigna con base en la expresión

de los genes *CAPZB* y *TFF3* para los puntos de corte seleccionados, se encuentra limitada. Dentro del carcinoma papilar de tiroides existen subclases que se distinguen por un comportamiento clínico característico; el microcarcinoma papilar es una lesión de baja agresividad comparada con la forma clásica del carcinoma papilar, mientras que la variedad folicular del carcinoma papilar se considera como un fenotipo intermedio de agresividad entre el carcinoma papilar y el carcinoma folicular, teniendo un comportamiento más cercano con el carcinoma folicular. En nuestra muestra de lesiones diagnosticadas como carcinoma papilar, existen 8 microcarcinomas, 16 de la variedad clásica y 8 de la variedad folicular del carcinoma papilar de tiroides.

Evaluamos la expresión de los 5 genes de estudio con respecto a la sub-variedad de carcinoma papilar (**Tabla 5**); encontramos que existe un gradiente de expresión incremental, estadísticamente significativo, para *TRIP12* ($p=0.013$), *CAPZB* ($p=0.006$), *HMMR* ($p=0.02$) y *CTCF* ($p=0.04$) que se explica conforme al incremento del tamaño de la lesión ya que los valores de expresión son normalizados con respecto a una secuencia “housekeeping”.

| Gen | Microcarcinoma papilar (n=8) | Variedad clásica del carcinoma papilar (n=16) | Variedad folicular del carcinoma papilar (n=7) | p |
|----------------------|-------------------------------------|--|---|--------------|
| <i>TRIP12</i> | 1.34 (0.416-2.88) | 3.63 (1.13-4.36) | 8.87 (4.69-35.87) | 0.013 |
| <i>CAPZB</i> | 0.46 (0.23-0.76) | 5.2 (0.45-31.6) | 60.02 (37.87-207.63) | 0.006 |
| <i>TFF3</i> | 0.127 (0.039-2.81) | 0.094 (0.02- 0.599) | 0.96 (0.262-20.06) | 0.21 |
| <i>HMMR</i> | 2.27 (0.36-2.7) | 5.62 (0.24-11.34) | 24.07 (7.79-89.25) | 0.02 |
| <i>CTCF</i> | 0.55 (0.19-0.9) | 1.05 (0.18-2.21) | 4.53 (3.21-55.46) | 0.041 |

Tabla 5. Expresión de los genes de estudio conforme a la variedad de carcinoma papilar tiroideo.

En fechas recientes fue publicado un documento que revisó la literatura publicada sobre la variedad folicular del carcinoma papilar de tiroides con la finalidad de emitir un consenso sobre la agresividad mayor de este tipo de lesiones con respecto a la variedad clásica del carcinoma papilar de tiroides. Con base en la probabilidad de recurrencia de las lesiones diagnosticadas como variedad folicular del carcinoma papilar de tiroides, se estimó que aquellas lesiones sin características de invasividad al diagnóstico, tienen una menor tasa de recurrencia con respecto a aquellas claramente invasoras (invasión: capsular, linfovascular, perineural, y a tejidos adyacentes peritiroideos).

Conforme a estos datos, realizamos un sub-análisis del grupo de muestras con diagnóstico de variedad folicular del carcinoma papilar tiroideo (n=8); estas muestras fueron clasificadas como invasoras (n=4) si contaban con al menos una característica de invasividad, y fueron comparadas contra las muestras sin características de invasividad (n=3).

Observamos que para el gen *TRIP12* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 5.87 (IQR: 4.69-8.87) vs 23.23 (IQR:5.5-62.5), $p=0.25$; para el gen *CAPZB* en el caso de muestras no invasoras el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fue de 61.1 (IQR: 37.8-254.5) vs 51.8 (IQR:22-133.8), $p=0.66$; en el caso de *TFF3* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 0.41 (IQR: 0.16-1.51) vs 20.06 (IQR:0.26-86.2), $p=0.77$; respecto a *HMMR* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 51.8 (IQR: 24.1-89.2) vs 14.16 (IQR:4.53-69.9), $p=0.75$; finalmente para *CTCF* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 4.1 (IQR: 3.2-4.5) vs 30.2 (IQR:2.8-95.2), $p=0.25$ (**Tabla 6**). Lo anterior sugiere que la clasificación recientemente propuesta basada en características histopatológicas y comportamiento clínico, puede tener un sustento biológico conforme a la expresión de los genes *TRIP12*,

TFF3, *HMMR* y *CTCF*, sin embargo, la comparación no alcanzó significancia estadística posiblemente debido al limitado número de muestras analizadas.

| | No invasor (n=3) | Invasor (n=4) | <i>p</i> |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------|
| <i>TRIP12</i> | 5.87 (4.69-8.87) | 23.23 (5.5-62.5) | 0.25 |
| <i>CAPZB</i> | 61.1 (37.8-254.5) | 51.8 (22.0-133.8) | 0.66 |
| <i>TFF3</i> | 0.41 (0.16-1.51) | 20.06 (0.26-86.2) | 0.77 |
| <i>HMMR</i> | 51.8 (24.1-89.2) | 14.16 (4.53-69.9) | 0.75 |
| <i>CTCF</i> | 4.1 (3.2-4.5) | 30.2 (2.8-95.2) | 0.25 |

Prueba de U de Mann-Whitney

Tabla 6. Comparación de la expresión de los genes de estudio entre muestras de la variedad folicular del carcinoma papilar, con características de invasividad y aquellas no invasoras.

Un análisis semejante realizamos para el caso del microcarcinoma tiroideo; observamos que para el gen *TRIP12* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 1.34 (IQR: 0.55-1.94) vs 1.54 (IQR:0.19-10.6), $p=0.55$; para el gen *CAPZB* en el caso de muestras no invasoras el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ fue de 0.30 (IQR: 0.23-0.76) vs 0.61 (IQR:0.27-14.2), $p=0.4$; en el caso de *TFF3* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 0.12 (IQR: 0.01-4.4) vs 0.13 (IQR:0.06-1.17), $p=0.46$; respecto a *HMMR* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 1.3 (IQR: 0.2-2.7) vs 2.3 (IQR:1.3-13.2), $p=0.31$; para *CTCF* el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para muestras no invasoras fue de 0.55 (IQR: 0.31-0.55) vs 11.1 (IQR:0.10-209), $p=0.5$ (Tabla 7). Lo anterior sugiere que los genes *CTCF*, *HMMR* y *CAPZB* pueden ser empleados como marcadores de agresividad, esta hipótesis requiere de comprobación mediante el análisis de un número mayor de muestras de microcarcinoma.

| | No invasor (n=5) | Invasor (n=4) | <i>p</i> |
|----------------------|---------------------|---------------------|----------|
| <i>TRIP12</i> | 1.34 (0.55-1.94) | 1.54 (0.19-10.6) | 0.55 |
| <i>CAPZB</i> | 0.30 (0.23-0.76) | 0.61 (0.27-14.2) | 0.4 |
| <i>TFF3</i> | 0.12 (0.01-4.4) | 0.13 (0.06-1.17) | 0.46 |
| <i>HMMR</i> | 1.3 (0.2-2.7) | 2.3 (1.3-13.2) | 0.31 |
| <i>CTCF</i> | 0.55 (0.31-0.55) | 11.1 (0.10-209) | 0.5 |

Prueba de U de Mann-Whitney

Tabla 7. Comparación de la expresión de los genes de estudio entre muestras de microcarcinoma tiroideo con características de invasividad y aquellas no invasoras.

Estos resultados deben de tomarse con precaución ya que constituyen resultados post-hoc debido a que el tamaño de muestra fue estimado para la distinción de lesión neoplásica maligna vs bocio.

Discusión

En el presente estudio fueron analizados los genes *TRIP12*, *CAPZB*, *TFF3*, *HMMR* y *CTCF*, con el objetivo primario de evaluar su expresión en tejido normal, bocio, carcinoma papilar de tiroides y carcinoma folicular de tiroides. El análisis del conjunto de genes no permite hacer la discriminación entre lesiones tifoideas benignas y malignas.

CAPZB

En nuestro análisis, para el caso de *CAPZB*, reportamos la existencia de diferencias significativas para la comparación bocio vs tejido normal con una sobre expresión en el caso

del bocio (58.4, IQR: 4.81-99.93. vs 1.03, IQR:0.4-5.9; $p=0.001$), y una sub-expresión para la comparación bocio vs carcinoma papilar de tiroides (58.4, IQR: 4.81-99.93 vs 5.28, IQR:0.32-39.43; $p=0.02$).

Los resultados de la sobre expresión de *CAPZB* en bocio respecto a tejido tiroideo normal pueden representar el mecanismo por el cual la deficiencia de yodo se asocia con el desarrollo de bocio en algunos individuos; en estos, la mayor expresión de *CAPZB* al actuar como inhibidor de la polimerización de actina hace menos eficiente el proceso de endocitosis del coloide para su posterior procesamiento en las hormonas T4 y T3. Lo anterior puede guardar relación con los datos publicados previamente en el escrutinio completo del genoma (GWAS) realizado por Teumer¹⁶ et .al, quienes identificaron a *CAPZB* como la secuencia líder asociada con bocio y volumen tiroideo; el grupo identificó un polimorfismo asociado (rs12138950) que se localizó río arriba de la región de *CAPZB*, esta ubicación llevó a la hipótesis de que esta región puede actuar como un modulador de la actividad del promotor de *CAPZB*. De forma independiente, el grupo de Panicker, et al⁴⁰., reportó un GWAS para identificar las bases genéticas del “tirostato” en un grupo de 2014 individuos proveniente de una cohorte de gemelos en el Reino Unido. El grupo identificó un polimorfismo (rs10917469) en el locus 1p36.13 que también se encuentra río arriba de *CAPZB*. Si bien, en nuestro estudio no se hizo secuenciación de *CAPZB* para identificar los polimorfismos y relacionarlos con el fenotipo, los datos teóricos vertidos pueden servir para vincular nuestros datos con información ya conocida.

Por lo tanto, la mayor expresión de *CAPZB* respecto a tejido normal guarda concordancia con los datos previos obtenidos a partir de GWAS. A pesar de estos antecedentes, a nuestro

conocimiento este es el primer reporte sobre la expresión determinada de forma directa en el tejido tiroideo.

La expresión diferencial entre bocio y carcinoma papilar de tiroides, con una menor expresión en el caso del segundo, no ha sido reportada en la literatura. Siguiendo la misma línea de eventos utilizada para explicar la expresión diferencial de CAPZB entre bocio y tejido normal, la más eficiente polimerización de actina, determinada por menores niveles de expresión de CAPZB en carcinoma papilar y la más eficiente formación de la copa endocítica para el procesamiento de tiroglobulina y producción de las hormonas T4 y T3, provocará una disminución de la producción de TRH y TSH en hipotálamo e hipófisis respectivamente. La TSH es un factor de diferenciación y crecimiento de la tiroides, es posible que niveles menores de TSH permitan la pérdida gradual de la diferenciación tiroidea, que llevaría del carcinoma diferenciado de tiroides (papilar y folicular) al pobremente diferenciado y anaplásico.

Los datos anteriores pueden apoyarse en las observaciones de Gudmundsson et al⁴¹ quienes a través de un estudio de GWAS para la identificación de variantes asociadas con TSH y el riesgo de desarrollar carcinoma papilar de tiroides; identificaron a 1p36.13, este, es el mismo loci que Treumer, et al., habían reportado en su GWAS para el estudio de los factores genéticos asociados con bocio y volumen tiroideo. Gudmundsson et al., describen un polimorfismo en CAPZB asociado con valores menores de TSH (diferencia de -0.130, $p=1 \times 10^{-20}$), y riesgo de cáncer papilar de tiroides (OR=1.34, $p=0.014$); sin embargo, estos hallazgos no lograron ser replicados. Aunque no se ha propuesto una hipótesis que explique estos hallazgos, es posible que el polimorfismo asociado para el caso de TSH/carcinoma

papilar sea, a diferencia del polimorfismo asociado a bocio/volumen tiroideo, un polimorfismo asociado con disminución de la función de CAPZB. La confirmación de lo anterior requiere de hacer secuenciación en el gen de CAPZB en las muestras de nuestro grupo y correlacionarlas con el fenotipo.

Queda también por explorar el comportamiento de CAPZB en lesiones con diferentes características de invasividad así como en las lesiones pobremente diferenciadas y anaplásicas, donde esperaríamos un gradiente de expresión en decremento desde lesiones de bocio, lesiones diferenciadas, pobremente diferenciadas y la menor expresión en lesiones anaplásicas (**Fig. 2**).

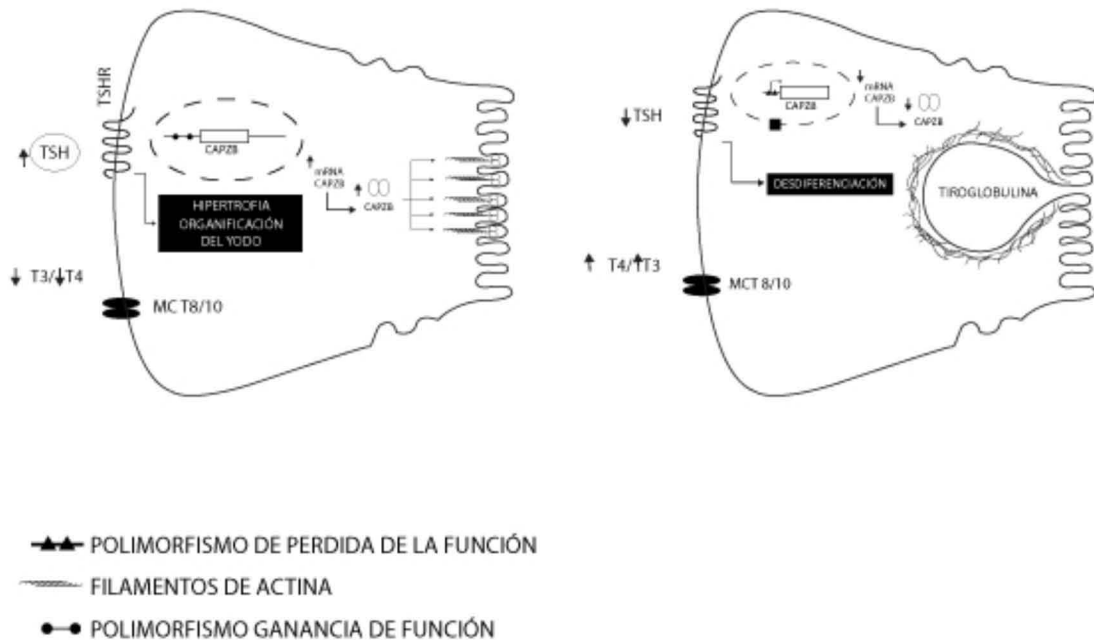


Figura 2. Modelo teórico del papel de CAPZB en la génesis tumoral tiroidea.

CAPZB actúa como un inhibidor de la polimerización de actina, proceso celular necesario para la endocitosis del coloide. Bajo el modelo propuesto un polimorfismo en la región reguladora del gen CAPZB asociado a ganancia de función (**panel izquierdo**) evitará la polimerización de actina, evitará la endocitosis del coloide que llevará a menor producción de hormonas tiroideas y en consecuencia elevación en los valores de TSH, que a su vez dará lugar a hipertrofia e hiperplasia tiroidea (bocio). Por el contrario, un polimorfismo asociado con pérdida de la función de CAPZB (**panel derecho**) llevará a una capacidad conservada o mayor para la síntesis de hormonas tiroideas lo que llevará a menores valores de TSH, esto,

posiblemente se traduzca en des-diferenciación al disminuir la expresión de los genes tiroides específicos dependientes de TSH.

Aunque los resultados del nivel de expresión del gen CAPZB sugieren utilidad potencial como herramienta para la distinción de lesiones benignas de lesiones malignas, el desempeño diagnóstico de CAPZB utilizando como valor de corte de 1.59 (percentila 40) es realmente limitado con un sensibilidad de 69.4% y especificidad de 21.74%. Este pobre desempeño puede deberse a que existe sobreposición entre los valores de expresión de bocio y carcinoma papilar, situación que puede estar relacionada con que la hiperplasia tiroidea (bocio) es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma papilar tiroideo^{42, 43}.

TFF3

En nuestro análisis, TFF3 mostró una subexpresión significativa para el caso de la comparación carcinoma papilar tiroideo contra tejido normal [0.15 (IQR:0.05-1.35) vs 0.74 (IQR:0.27-2.86), $p=0.018$] y contra bocio [0.15 (IQR:0.05-1.35) vs 1.20 (IQR:0.38-11.75), $p=0.03$]. No encontramos diferencia significativa para expresión de TFF3 en la comparación de microcarcinoma, variedad clásica del carcinoma papilar y variedad folicular del carcinoma papilar ($p=0.21$) El desempeño diagnóstico evaluado para TFF3 para un valor de corte de 0.373 (percentila 40) tuvo una sensibilidad de 76.4% y especificidad de 18.18%.

La mayor parte de los reportes que existen sobre el papel biológico de TFF3 provienen de estudios realizados en neoplasias gastrointestinales. TFF3 es el principal constituyente de las células caliciformes en intestino grueso y delgado; en mucosa normal no hay expresión de TFF3, mientras que en sitios de metaplasia intestinal se torna intensamente positiva. Previamente, TFF3 había sido detectada en glándulas lacrimales, próstata, mama, útero,

tracto respiratorio, hipotálamo, hipófisis y riñón. Su papel en la carcinogénesis no es del todo claro, sin embargo, existen reportes de que se encuentra asociado con rasgos tumorales como tamaño, angiogénesis, metástasis linfática, invasividad, recurrencia y estadios avanzados⁴⁴.

En el estudio de Li Yong, et al., evaluaron la capacidad predictiva de sobrevida de acuerdo a la presencia/ausencia de tinción histoquímica en pacientes con cáncer gástrico; encontraron que el grupo con tinción positiva para TFF3 tiene una menor sobrevida respecto al grupo con tinción negativa ($p=0.0028$), así mismo en el análisis multivariado se identificó una razón de riesgo de 2.02 (IC 95%: 1.24-3.3, $p=0.007$) para la expresión positiva de TFF3⁴⁵.

Contrario a lo que se observa en las neoplasias gástricas donde la expresión mayor o la tinción intensa de TFF3 están asociados con características de invasividad y agresividad, nuestros datos concuerdan con lo reportado previamente por los grupos de Takano²⁷ y Foukakis²⁸ sobre la menor expresión en lesiones malignas y bocio respecto a tejido normal. Contrario a nuestros hallazgos, el grupo de Yamada, reportó una sensibilidad de 80% y especificidad de 91.5%, las diferencias observadas entre estos reportes y nuestros datos, posiblemente sean debidas a que este grupo realizó la comparación entre lesiones de carcinoma folicular contra adenoma folicular; en contraste, en nuestro análisis comparamos carcinoma papilar contra bocio.

El papel biológico TFF3 en tejido tiroideo no se conoce, sin embargo su presencia en las células caliciformes gastrointestinales así como en otros órganos secretores puede sugerir que tiene un papel en la maquinaria secretora de las células foliculares tiroideas, y que la

transformación neoplásica tanto benigna como maligna lleva a una posible disminución de la capacidad secretora y menor expresión de TFF3. Un hallazgo que debe ser interpretado con precaución, es el comportamiento de TFF3 en la variedad folicular del carcinoma papilar de tiroides, en donde la expresión para aquellas muestras no invasores fue de 0.41 (IQR:0.16-1.51), mientras que las muestras invasoras tuvieron una expresión de 20.06 (IQR:0.26-86.2), sin embargo, el tamaño de la muestra analizada no permitió corroborar una diferencia estadística. El comportamiento de TFF3 en la variedad folicular del carcinoma papilar de tiroides parece seguir el comportamiento esperado descrito para otras neoplasias no tiroideas.

TRIP12

Para el caso de *TRIP12*, encontramos una sobre-expresión significativa ($p=0.008$) en el tejido de bocio (4.06, IQR:1.99-11.6) vs tejido normal (1.68, IQR:0.81-3.02); no hallamos diferencias en tejido maligno comparado con tejido normal. Encontramos una diferencia significativa ($p=0.013$) para la comparación entre microcarcinoma (1.34, IQR:0.41-2.88), variedad clásica del carcinoma papilar (3.63; IQR:1.13-4.36) y variedad folicular del carcinoma papilar (8.87; IQR:4.69-35.87), comportamiento que sugiere la existencia de un gradiente de expresión conforme se incrementa el grado de agresividad de la lesión. *TRIP12* actúa como un oncogen que modula la actividad tumor supresora de p53²¹, un incremento en la expresión o en la actividad de *TRIP12* estaría asociada con la presencia de cáncer. Existen pocos estudios que relacionan directamente a *TRIP12* con algún proceso neoplásico. El grupo de Gao P, et al, estudió a un grupo de pacientes con diagnóstico de leucemia

mieloide aguda que entraron en remisión luego del tratamiento, el estudio tuvo el objetivo de identificar eventos de empalme a nivel de la totalidad del transcriptoma en células mononucleares de sangre periférica. El grupo identificó una variante de *TRIP12* que carece del exón 3, la ausencia del cual modifica la actividad de ligasa de ubiquitina de TRIP12. Este fenómeno libera la represión que TRIP12 ejerce sobre ARF permitiendo a su vez la actividad de p53 (arresto del ciclo celular/apoptosis)⁴⁶. Sin embargo, los resultados pueden limitar su generalización debido al tamaño de muestra (8 pacientes).

Guiyuan Li, et al., realizaron un análisis del transcriptoma mediante RNA-Seq en adenocarcinoma pulmonar en 18 muestras (12 adenocarcinomas y 6 controles normales), con el objetivo de identificar mutaciones somáticas de alta frecuencia, de alto riesgo y de alto nivel de expresión. En este estudio la mutación de mayor frecuencia, riesgo y nivel de expresión fue atribuida a *TRIP12*, seguido de otros genes como *CTNND1*, *DUSP6*, *MDH1*, *RBM5* y *STAT2*, los cuales actúan como genes tumor supresor⁴⁷.

La asociación de *TRIP12* con bocio fue reportada por Bayer et al, donde identificaron un polimorfismo en *TRIP12* asociado con bocio, sin embargo sus resultados no fueron concluyentes ya que no encontraron variaciones tras la secuenciación de TRIP12 tanto en los casos como en los controles¹⁹.

Nuestros resultados van en sentido contrario a lo publicado y al papel fisiológico asignado a TRIP12, es decir, esperábamos una sobre expresión en lesiones de carcinoma papilar de tiroides comparado con tejido normal. Sin embargo la expresión que reportamos respecto a microcarcinoma, variedad clásica y variedad folicular del carcinoma papilar coincide con lo reportado: i) a menor expresión menor agresividad (microcarcinoma) y ii) a mayor

expresión mayor agresividad (variedad folicular del carcinoma papilar).

La expresión diferencial de *TRIP12* en bocio respecto a tejido normal, y la existencia de este aparente gradiente de expresión puede guardar sentido con el modelo de continuidad para la oncogénesis propuesto por Berger, Knudson y Pandolfi. Este modelo sugiere que a diferencia del modelo discreto de los 2 hits, en donde es necesaria la pérdida de ambos alelos para generar la malignización de las células, en el modelo continuo para el caso de los oncogenes el gradual incremento en la expresión de estos se asocia a una transformación neoplásica gradual. Sin embargo, estos cambios fenotípicos pueden ser “salvados” por ciertos mecanismos de rescate como la senescencia celular⁴⁸.

Nosotros proponemos que el bocio representa un incremento en la expresión del oncogen *TRIP12* cuyo efecto es “salvado” por algún mecanismo aún por establecerse (ej. senescencia celular), y que la malignización del tejido tiroideo representada por la pérdida de este teórico mecanismo de rescate que llevaría a la pérdida de la capacidad de estabilizar a p53 y en consecuencia a desregulación del ciclo celular **(Fig. 3)**.

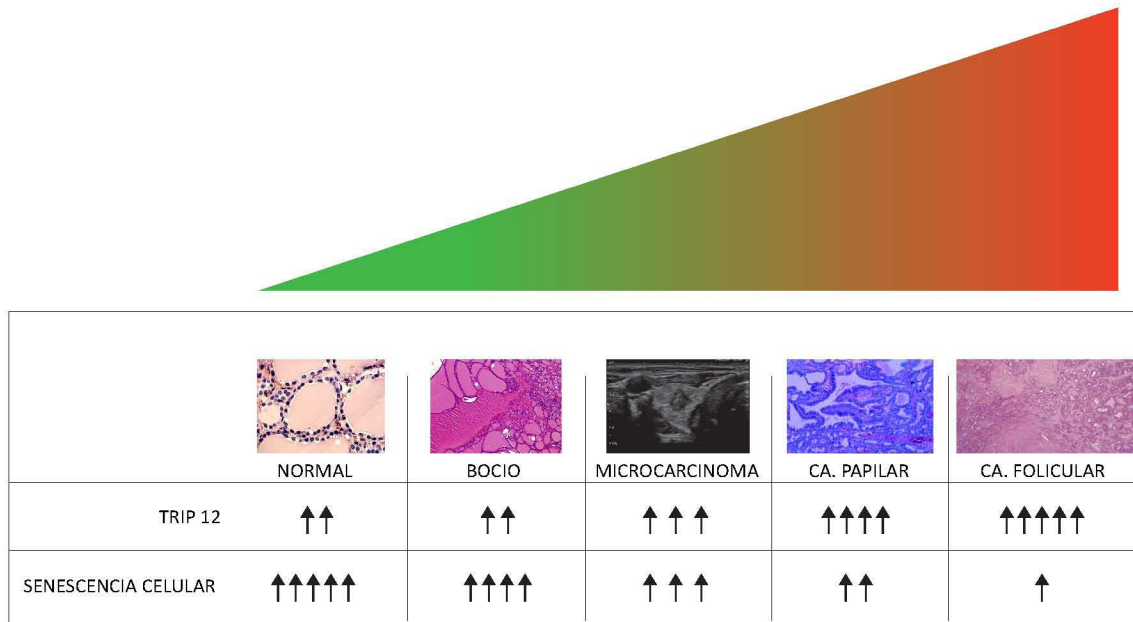


Figura 3. Hipótesis sobre la función de TRIP12 en la transformación neoplásica tiroidea.

TRIP12 actúa como un estabilizador de p53 a través de su acción sobre ARF. Es posible que TRIP12 siga el modelo oncogénico de “continuidad”; en este modelo existe un gradiente inverso entre la expresión de TRIP12 y el mecanismo de senescencia celular, de tal modo que en tejido normal y bocio la función de TRIP12 es contrarrestada por la senescencia celular, este efecto antineoplásico de la senescencia celular se encuentra perdido en los carcinomas papilar y folicular respectivamente donde el efecto pro-oncogénico de TRIP12 resulta dominante.

CTCF

Los valores de expresión de *CTCF* para la comparación carcinoma tiroideo contra tejido normal y bocio no mostró la existencia de diferencias significativas. Encontramos una diferencia significativa ($p=0.041$) para la expresión de *CTCF* entre las tres sub variedades del carcinoma papilar tiroideo: microcarcinoma (0.55, IQR:0.19-0.9), variedad clásica (1.05, IQR:0.18-2.21) y variedad folicular (4.53, IQR: 3.21-55.46).

En nuestra búsqueda en la literatura no encontramos reportes previos sobre el papel de *CTCF* en las neoplasias tiroideas.

En líneas previas se mencionó el papel que posee *CTCF* como un elemento estructural de la cromatina que mantiene asociaciones funcionales intra e intercromosómicas, que se

alterna con una función como factor de transcripción asociado a la polimerasa II (Pol II)²⁹. En una revisión reciente, Kazanets et al⁴⁹., analizan el papel de la pérdida de genes tumor supresor como uno de los mecanismos fundamentales en la carcinogénesis; los autores proponen que la pérdida de la función tumor supresora es debida a uno de cinco mecanismos o a la interacción entre ellos. Entre estos mecanismos, se encuentran alteraciones en la unión de CTCF con los elementos genómicos con las siguientes consecuencias:

- La pérdida de la función aislante entre los dominios de cromatina, que define estructuralmente dominios epigenéticos (isolated neighborhoods)⁵⁰. La pérdida de unión de CTCF permitirá la extensión de la heterocromatina (transcripcionalmente silente) hacia regiones que pueden albergar otros genes entre los que puede existir genes tumor supresores.
- Los sitios de interacción de CTCF con los nucleosomas enriquecidos con la variante de histonas H2A.Z que se asocia con regiones de menor metilación del DNA (eucromatina). La pérdida de la interacción de CTCF lleva a la pérdida de H2A.Z con el posterior incremento en la metilación del DNA, cambio epigenético que lleva al silenciamiento de diversos genes entre ellos, posiblemente, genes tumor supresor.

Los mecanismos responsables de la disfunción de CTCF se desconocen pero se propone: mutación en los sitios de unión de CTCF, mutación o variantes alélicas en la propia proteína CTCF, alteraciones postraduccionales en la proteína CTCF (como su estado de poli-ADP-

ribosilación), pérdida de la interacción CTCF con RNAs largos no codificantes, así como alteraciones en la interacción CTCF con otros cofactores necesarios para la función de la proteína⁴⁹.

Esta hipótesis no ha tenido validación clínica, sin embargo, nuestros resultados pueden apoyar su validez. Proponemos que el valor incremental de CTCF a partir de microcarcinoma, variedad clásica del carcinoma papilar y variedad folicular del carcinoma papilar puede ser debida a que frente a la pérdida de interacción funcional CTCF-cromatina, la célula neoplásica intente reparar esta deficiencia mediante un incremento en la transcripción del gen de *CTCF* (**Fig.4**).

Es posible que CTCF se encuentre desregulado en las células circundantes a la lesión neoplásica, lo que explicaría la ausencia de diferencias significativas entre tejido neoplásico, bocio y tejido normal⁴⁹.

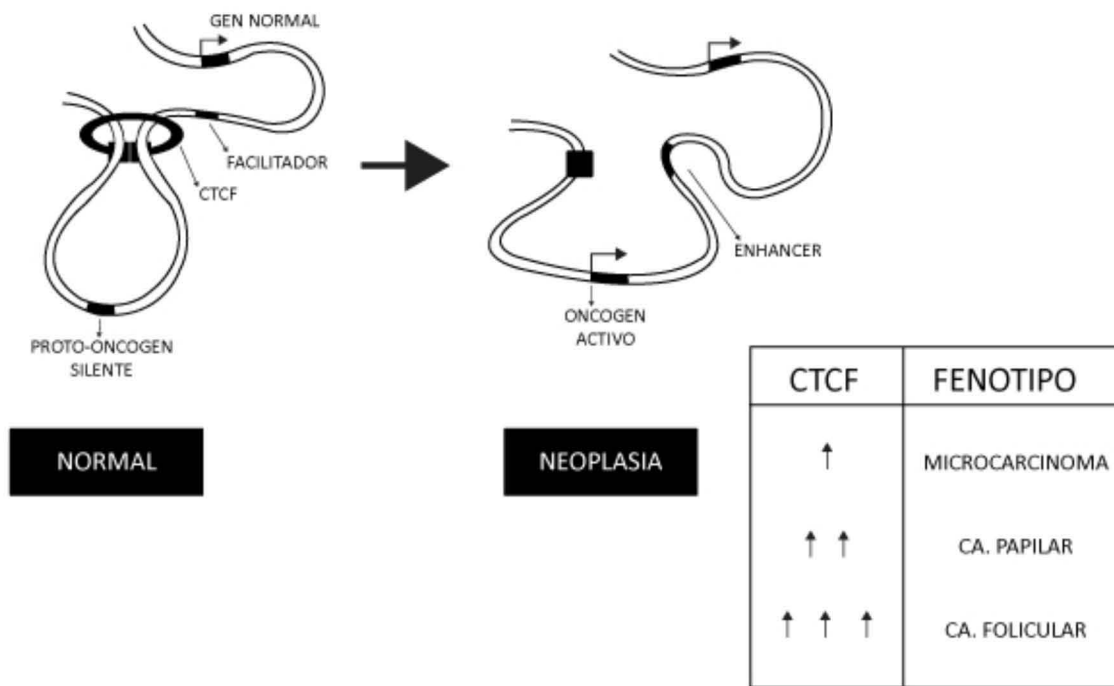


Figura 4. Función hipotética de CTCF en la transformación neoplásica tiroidea.

CTCF actúa como un aislante a lo largo de la cromatina entre regiones transcripcionalmente silentes y activas. La pérdida de la función de CTCF (debida a mutaciones en sitios de unión, en la proteína CTCF misma o alteraciones post-traduccionales) puede ser compensada mediante incremento en la actividad transcripcional del gen CTCF con valores gradualmente mayores a partir de microcarcinoma, carcinoma papilar y variedad folicular del carcinoma papilar de tiroides, esto posiblemente asociado a la mayor agresividad asociada a cada variedad del carcinoma tiroideo.

HMMR

En la expresión de *HMMR* observamos una diferencia significativa ($p=0.03$) para la comparación tejido normal (0.5; IQR:0.19-9.74) contra bocio (12.67; IQR:0.93-20.8). La comparación bocio contra tejido neoplásico maligno no mostró diferencias significativas. Semejante al comportamiento de la expresión de los genes *TRIP12*, *CAPZB* y *CTCF*, observamos un gradiente de expresión significativo ($p=0.02$) para la comparación entre microcarcinoma (2.27, IQR:0.36-2.7), variedad clásica del carcinoma papilar (5.62, IQR:0.24-11.34) y variedad folicular del carcinoma papilar (24.07, IQR:7.79-89.25).

El ácido hialurónico (HA) es un componente integral del estroma tisular, una estructura que

se encuentra en remodelación constante, especialmente en condiciones de daño tisular y proliferación neoplásica; es sintetizado a partir de la actividad de las enzimas HAS (sintasas de ácido hialurónico) cuya expresión y actividad tiene regulación tejido-específica. El ácido hialurónico puede existir en forma de polímeros y de oligómeros (mediado por hialuronidasa), la existencia de ambas formas cobra relevancia ya que las formas poliméricas se encuentran asociadas con actividad antiinflamatoria y anti-proliferativa, mientras que las formas oligoméricas se asocian con inflamación tisular y proliferación celular. HMMR representa a uno de los 2 receptores conocidos de ácido hialurónico junto con CD44, a diferencia de este, la expresión de HMMR es inducible como respuesta al daño tisular, estrés celular y de forma normal durante las fases G2/M del ciclo celular. HMMR funciona como un co-receptor junto con receptores asociados a tirosina cinasa (EGFR, PDGFR, c-MET, ERK 1 y 2) mediante la modulación de la intensidad y duración de la señalización de dichas vías de transducción. En el estroma neoplásico la interacción del ácido hialurónico con HMMR lleva a un cambio en la transcripción de genes involucrados en las vías de migración celular, así como a la expresión de mediadores inflamatorios con actividad pro-tumoral. Este juego de interacción HA-HMMR-ERK es posiblemente iniciada y sostenida por la presencia de mediadores inflamatorios como IL-1 β y TGF- α que dan lugar a un círculo vicioso. Una vez establecido este sistema de auto-estimulación el incremento en la actividad de señalización de vías de crecimiento como ERK 1 y 2 incrementa a su vez la síntesis y fragmentación de HA así como la mayor expresión de HMMR, mientras que el propio HA (especialmente en la forma oligomérica) puede incrementar la expresión de IL-1 β ⁵¹.

La mayor parte de los estudios publicados asocian a HMMR con diferentes desenlaces negativos en cáncer de mama. Un estudio asoció los polimorfismos de HMMR con incremento en el riesgo de cáncer mamario mediante la interacción con BRCA1/2 para conferir dicho riesgo⁵². Si bien no existen reportes del papel de HMMR en la fisiología tiroidea, estudios previos les han asociado con algunas patologías tiroideas.

El grupo de Gianoukakis, et al., evaluaron el contenido de HA en cultivos celulares obtenidos de muestras quirúrgicas en pacientes con enfermedad de Grave`s y tiroiditis de Hashimoto (enfermedad tiroidea autoinmune), comparados contra tejido sano obtenido de la misma pieza quirúrgica. Mediante RT-PCR se evaluó la expresión de HAS sintasa. El grupo observó que la producción de HA es prácticamente indetectable en tejido tiroideo control mientras que en tejido proveniente de tejido afectado por enfermedad tiroidea autoinmune el RNA mensajero de HA fue abundante. En este estudio se identificó que la fuente de HA en tejido tiroideo proviene de las propias células foliculares, así como de los fibroblastos residentes, donde estos últimos aportaron la mayor proporción de HA. La producción de HA ocurrió en respuesta a la estimulación con IL-1 β e IGF-1, mediado por la inducción de las 3 isoformas de HA sintasa en células foliculares tiroideas y HAS3 en fibroblastos tiroideos⁵³.

En otro trabajo, el grupo de Böhm, et al., evaluó la expresión del HA en 170 muestras de carcinoma papilar y 34 carcinomas foliculares tiroideos, mediante el uso de una sonda de afinidad biotinilada específica para HA. El grupo reportó la presencia de HA en tejido tiroideo normal (hallazgo contrario al del grupo de Gianoukakis et al.), así como una amplia expresión en 43% de las muestras de carcinoma tiroideo, con una mayor expresión en carcinoma papilar comparado con carcinoma folicular ($p=0.004$), así mismo, se reportó una

correlación moderada ($\rho=0.22-0.28$, $p<0.001$) entre la expresión de HA y la intensidad de la tinción para CD44. En forma paralela se evaluó la intensidad de la tinción para HA en el estroma tiroideo, encontrando tinción débil a moderada para estroma tiroideo normal, mientras que tinción intensa se observó en estroma tiroideo neoplásico sin diferencias para la tinción entre carcinoma papilar y folicular. En el análisis uni-variado la tinción estromal en tejido neoplásico mostró asociación significativa con la presencia de metástasis a distancia ($p=0.044$). En el análisis de sobrevida la tinción estromal perdió significancia estadística mientras que la conservaron los factores pronóstico clásicos (edad, género y estadio TNM)⁵⁴.

En una publicación independiente, el grupo de Böhm, realizó una sub-análisis de la misma cohorte de pacientes que el estudio previo, en esta ocasión para el estudio del comportamiento de CD44. Mediante histoquímica se evaluó la expresión de CD44s, CD44v3 y CD44v6. Entre sus hallazgos reportaron la expresión de CD44s y CD44v6 en tejido tiroideo aparentemente sano adyacente al sitio de la neoplasia; la expresión de CD44s fue mayor en carcinoma papilar comparado con carcinoma folicular ($p<0.001$), además fue reportada una asociación inversa entre la expresión de CD44s y edad mayor de 60 años ($p<0.0001$), presencia de metástasis a distancia ($p=0.021$), estadio TNM ($p=0.003$) y recurrencia de la enfermedad ($p=0.049$). En un modelo multivariado para sobrevida libre de enfermedad que incluyó los factores tradicionales (edad, género, tipo de tumor, estadio TNM, valor de TSH y tiroglobulina), únicamente conservaron significancia estadística la concentración sérica de tiroglobulina ($p<0.001$) y la expresión CD44s ($p=0.040$)⁵⁵.

Nuestros hallazgos pueden ser compatibles con la información previamente discutida. La diferencia en la expresión de HMMR entre bocio y tejido normal ($p=0.03$) puede estar en relación con la función que IL-1 β tiene al incrementar la producción de HA e inducción de HMMR (esto con relación a que el bocio puede tener un origen autoinmune-inflamatorio y representa una forma de estrés celular). La ausencia de diferencia ($p=0.41$) entre bocio y carcinoma papilar puede estar asociada a que el bocio así como en carcinoma papilar tiroideo pueden compartir un origen inflamatorio (tiroiditis autoinmune) que llevará a mayor expresión de HA, esto a su vez, puede incrementar la expresión de HMMR como respuesta a la actividad proliferativa e inflamatoria respectivamente.

HMMR y CD44s son ambos receptores de HA, el primero inducible y el segundo constitutivo, la menor expresión de CD44 reportada por Böhn puede ser debida a una regulación a la baja de este receptor, mediada posiblemente por IL-1 β , mientras que paralelamente ocurre un incremento en la expresión de HMMR posiblemente actuando como un mecanismo de compensación y mediado igualmente por IL-1 β (**Fig 5**).

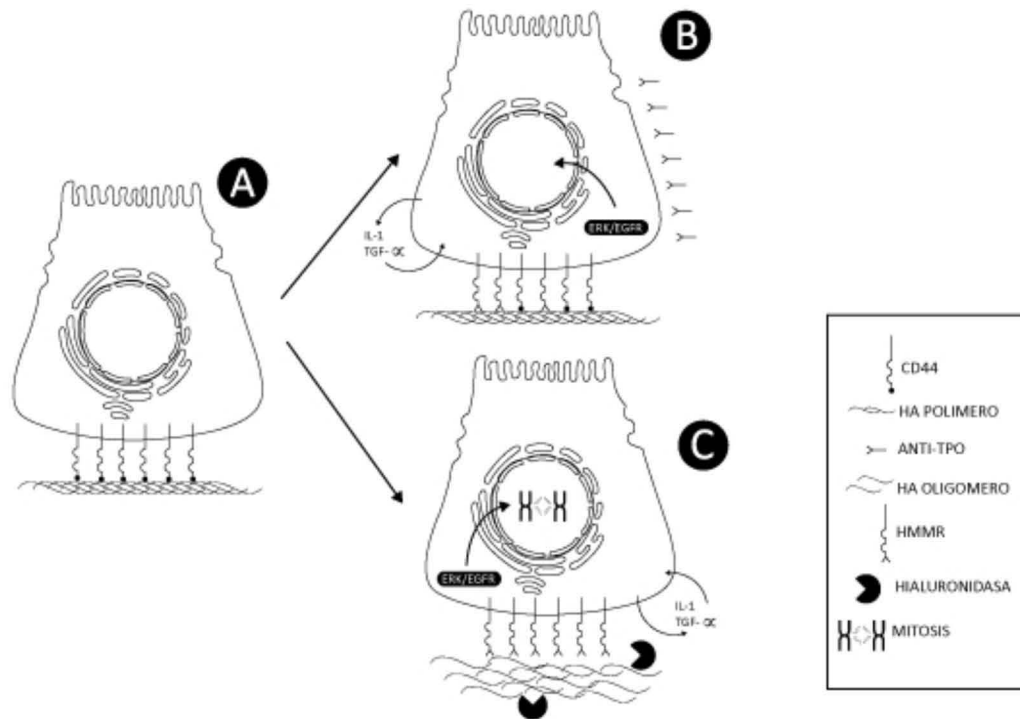


Figura 5. Modelo teórico sobre la función de HMMR en la carcinogénesis tiroidea.

HMMR es un receptor de HA inducible bajo condiciones de estrés celular (ej. Inflamación, actividad proliferativa). **A) Normal:** En ausencia de actividad inflamatoria o proliferativa, la célula folicular tiroidea expresa predominantemente CD44 que interactúa con la forma polimérica de HA. **B) Autoinmunidad:** En condiciones inflamatorias (ej. Autoinmunidad tiroidea) la célula folicular produce IL-1 y TGF- α que en forma autocrina favorece el cambio en la expresión de HMMR (sin pérdida de CD44) que a su vez modulará las vías de señalización intracelular asociadas con crecimiento celular. **C) Neoplasia:** La malignización de la célula folicular tiroidea está asociada con un cambio de la expresión predominante hacia HMMR como resultado de la actividad mitótica incrementada (estrés celular) y el ambiente proinflamatorio; estos 2 estímulos (mitótico e inflamatorio) sostienen la expresión de HMMR que a su vez, favorece la continuidad de las vías de crecimiento celular. La actividad de hialuronidasa da lugar a fragmentos de HA (oligómeros) que favorecen la invasividad de la lesión.

Variedad folicular del carcinoma papilar tiroideo

Esta variante fue identificada en la década de 1970's como un tumor compuesto de folículos neoplásicos (a diferencia del carcinoma papilar donde el patrón del crecimiento es en forma de papilas), donde las células foliculares muestran características nucleares atípicas⁵⁶. Existen 2 variedades: las variantes encapsuladas sin y con invasión.

En un consenso publicado recientemente, el grupo de trabajo de Nikifirov emitieron un consenso que permite el diagnóstico y discriminación entre ambas variantes, invasora y no, de la variedad folicular del carcinoma papilar tiroideo. En el grupo sin invasión, en el

seguimiento a 13 años no hubo recurrencia y predominan mutaciones en RAS, características que se comparten con el adenoma y carcinoma foliculares. El grupo propone la categoría NIFTP (Non Invasive Follicular Thyroid neoplasm with Papillary-like nuclear features) que sustituye a la variedad encapsulada no invasora, y le considera como la lesión precursora de la variedad encapsulada con invasión⁵⁷.

Una clasificación como la mencionada tendrá mayor sustento si traduce un comportamiento biológico diferente; con base en lo anterior evaluamos el desempeño de nuestros 5 genes en las muestras de variedad folicular del carcinoma papilar dividido en las categorías de invasor y no invasor. Encontramos una mayor expresión en muestras invasoras de TRIP12, TFF3 y CTCF, sin embargo aunque las diferencias de expresión no alcanzaron significancia estadística, los valores de expresión guardan sentido con lo expuesto previamente para TRIP12 y CTCF respecto a la mayor expresión en tejido maligno. La validez de estos resultados está limitada por el tamaño de muestra y requieren de confirmación con un estudio específicamente diseñado para este fin.

Microcarcinoma papilar de tiroides

Los microcarcinomas tiroideos son lesiones neoplásicas malignas tiroideas que miden 1 cm o menos. Son lesiones de alta prevalencia; estudios de necropsias reportan la presencia de microcarcinomas papilares tiroideos ocultos en 5 a 36% de la población, con base en estas cifras se estima que en la población de EUA y Europa existen de 20 millones a 48 millones de adultos afectados, esto, representa un reservorio potencial de lesiones malignas tiroideas al momento desconocidas. En estudios realizados en muestras obtenidas de

tiroidectomía realizadas por patologías benignas, la prevalencia de microcarcinoma tiroideo es del 10%. Aunque la prevalencia de estas lesiones es alta, el pronóstico es excelente; la mortalidad atribuible a estas lesiones alcanza 0.3%, mientras que el riesgo de recurrencia va de 1 a 5%. Los factores que confieren un pronóstico desfavorable en el microcarcinoma tiroideo comprenden: extensión extratiroidea microscópica, localización subcapsular del tumor primario, enfermedad multifocal así como metástasis locoregional⁵⁸. La diferencia respecto al pronóstico en aquellas lesiones con características de invasión con respecto a las no invasoras es explicada parcialmente a partir del comportamiento genético de cada una. Un estudio de meta-análisis en 2247 pacientes reportó un OR de 2.09 (IC 95%:1.31-3.33, $p=0.02$) para aquellas lesiones reportadas como portadoras de la mutación en el gen *BRAF V600E*⁵⁹.

Con base en la información previa, evaluamos la expresión de nuestros 5 genes en muestras de microcarcinoma papilar de tiroides clasificadas de acuerdo con si mostraron al menos una característica de invasividad y las comparamos contra muestras no invasoras. La expresión de ninguno de los 5 marcadores alcanzó significancia estadística, limitación posiblemente asociada al tamaño de muestra, sin embargo, se puede observar que los valores de expresión para muestras invasores fueron mayores para los genes HMMR, CTCF y CAPZB. Los resultados para HMMR y CTCF guardan sentido con lo anotado previamente sobre la función en la transformación maligna. Para el caso de CAPZB, el hallazgo de menor expresión en las variantes invasoras de microcarcinoma va en contra de la hipótesis propuesta para explicar la menor expresión de CAPZB en carcinoma papilar respecto a bocio, esperaríamos una posible menor expresión en las formas invasoras.

Estas diferencias en la magnitud de la expresión de los marcadores HMMR, CTCF y CAPZB, requieren de un estudio específico con mayor tamaño de muestra.

Conclusiones

El desempeño diagnóstico individual para los genes que mostraron significancia estadística no es adecuado para proponer su uso como prueba discriminatoria entre lesiones tiroideas benignas y malignas.

Las principales contribuciones de este estudio son: i) la información obtenida sobre la expresión a nivel tisular tiroideo de CAPZB, apoya la hipótesis derivada de los estudios de GWAS, sobre el comportamiento de CAPZB en bocio y posiblemente en carcinoma papilar de tiroides; ii) aporta información sobre la expresión de CTCF en tejido tiroideo, y sugiere la existencia de un gradiente de expresión conforme a la presencia de características de agresividad; sugiere además que CTCF se encuentra involucrado en la carcinogénesis tiroidea; iii) aporta información sobre la expresión de HMMR en tejido tiroideo y complementa la información conocida sobre la fisiología del HA en la tiroides; iv) sugiere a TRIP12 como un participante en la carcinogénesis tiroidea como una molécula oncogénica posiblemente modulada de forma positiva por Myc y RAS, y de forma negativa por el mecanismo de senescencia celular.

El estudio posee también varias limitaciones: i) el tamaño de muestra fue calculado para la expresión del transcrito de *FOXE1 (TTF2)*, sin embargo por motivos técnicos este transcrito no pudo ser amplificado en nuestro ensayo; ii) el tejido control o normal, fue definido conforme a si este se encontró lejano al sitio de la lesión principal, no fue corroborado por

histopatología, esto es relevante ya que el carcinoma tiroideo es multifocal, con lesiones microscópicas satélites que pudieron estar embebidas en el tejido considerado como normal de forma apreciativa.

La carcinogénesis tiroidea, al igual que la carcinogénesis en general es un fenómeno biológico complejo^{60, 15}. El empleo de plataformas digitales que permiten el análisis de la expresión de múltiples genes (Oncotype, Affirma, etc), son muestra de la necesidad de realizar abordajes técnicos complejos con análisis estadísticos robustos para poder resolver desde una perspectiva práctica el paradigma clínico de benignidad vs malignidad.

Perspectivas

- Estudio del desempeño de *CTCF* y *HMMR* en muestras de microcarcinoma papilar de tiroides y variedad folicular del carcinoma papilar. Evaluar inclusive por inmunohistoquímica.
- Corroborar la hipótesis vertida sobre la expresión de *CAPZB* en muestras de carcinoma tiroideo poco diferenciado y anaplásico.
- Aprender la construcción de microarreglos así como el diseño de protocolos de análisis estadístico que involucren información genómica, proteómica y metabolómica.

Referencias

1. Haugen, B. R. *et al.* 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid* **26**, thy.2015.0020 (2015).
2. Hoang, J. K. & Sosa, J. A. Imaging Thyroid Disease: Updates, imaging approach, and management pearls. *Radiol Clin N Am* **53**, 145–161 (2015).
3. Ali, S. Z. Thyroid Cytopathology: Bethesda and Beyond. *Acta Cytol.* **55**, 4–12 (2010).
4. Ho, A. S. *et al.* Malignancy rate in thyroid nodules classified as Bethesda category III (AUS/FLUS). *Thyroid* **24**, 832–9 (2014).
5. Fadda, G. & Rossi, E. Immunohistochemical Diagnosis of thyroid tumors. *Surg. Pathol. Clin.* **7**, 475–602 (2014).
6. Ferraz, C., Eszlinger, M. & Paschke, R. Current state and future perspective of molecular diagnosis of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 2016–2026 (2011).
7. Keutgen, X. M., Filicori, F. & Fahey, T. J. Molecular diagnosis for indeterminate thyroid nodules on fine needle aspiration: advances and limitations. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 613–23 (2013).
8. Duick, D. S. Overview of molecular biomarkers for enhancing the management of cytologically indeterminate thyroid nodules and thyroid cancer. *Endocr. Pract.* **18**, 611–615 (2012).
9. M. Cerutti, J. Employing Genetic Markers to Improve Diagnosis of Thyroid Tumor

- Fine Needle Biopsy. *Curr. Genomics* **12**, 589–596 (2011).
10. Walsh, P. S. *et al.* Analytical performance verification of a molecular diagnostic for cytology-indeterminate thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* **97**, E2297-306 (2012).
 11. Alexander, E. K. *et al.* Preoperative Diagnosis of Benign Thyroid Nodules with Indeterminate Cytology. *N. Engl. J. Med.* **367**, 705–715 (2012).
 12. Duick, D. S. *et al.* The Impact of Benign Gene Expression Classifier Test Results on the Endocrinologist–Patient Decision to Operate on Patients with Thyroid Nodules with Indeterminate Fine-Needle Aspiration Cytopathology. *Thyroid* **22**, 996–1001 (2012).
 13. Valinezhad Orang, A., Safaralizadeh, R. & Kazemzadeh-Bavili, M. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int. J. Genomics* **2014**, 970607 (2014).
 14. Keutgen, X. M. *et al.* A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2032–2038 (2012).
 15. Agrawal, N. *et al.* Integrated Genomic Characterization of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cell* **159**, 676–690 (2014).
 16. Teumer, A. *et al.* Genome-wide association study identifies four genetic loci associated with thyroid volume and goiter risk. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 664–673 (2011).
 17. Cooper, J. A. & Sept, D. New Insights into Mechanism and Regulation of Actin

- Capping Protein. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **267**, 183–206 (2008).
18. Wear, M. A. & Cooper, J. A. Capping protein: New insights into mechanism and regulation. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 418–428 (2004).
 19. Bayer, Y. *et al.* Genome-wide linkage analysis reveals evidence for four new susceptibility loci for familial euthyroid goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 4044–52 (2004).
 20. Kajiro, M. *et al.* The E3 Ubiquitin Ligase Activity of Trip12 Is Essential for Mouse Embryogenesis. *PLoS One* **6**, e25871 (2011).
 21. Collado, M. & Serrano, M. The TRIP from ULF to ARF. *Cancer Cell* **17**, 317–318 (2010).
 22. Gudjonsson, T. *et al.* TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell* **150**, 697–709 (2012).
 23. Griffith, O. L., Melck, A., Jones, S. J. M. & Wiseman, S. M. Meta-analysis and meta-review of thyroid cancer gene expression profiling studies identifies important diagnostic biomarkers. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5043–5051 (2006).
 24. Wiseman, S. M. *et al.* Whole-transcriptome profiling of thyroid nodules identifies expression-based signatures for accurate thyroid cancer diagnosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, 4072–4079 (2013).
 25. Hawthorn, L. *et al.* TIMP1 and SERPIN-A overexpression and TFF3 and CRABP1 underexpression as biomarkers for papillary thyroid carcinoma. *Head Neck* **26**, 1069–1083 (2004).
 26. Takano, T. & Yamada, H. Trefoil factor 3 (TFF3): a promising indicator for diagnosing

- thyroid follicular carcinoma. *Endocr. J.* **56**, 9–16 (2009).
27. Takano, T., Miyauchi, A., Yoshida, H., Kuma, K. & Amino, N. High-throughput differential screening of mRNAs by serial analysis of gene expression: decreased expression of trefoil factor 3 mRNA in thyroid follicular carcinomas. *Br. J. Cancer* **90**, 1600–1605 (2004).
 28. Foukakis, T. *et al.* A PCR-based expression signature of malignancy in follicular thyroid tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **14**, 381–391 (2007).
 29. Ong, C.-T. & Corces, V. G. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 234–46 (2014).
 30. Chen, H., Tian, Y., Shu, W., Bo, X. & Wang, S. Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLoS One* **7**, e41374 (2012).
 31. Parelho, V. *et al.* Cohesins Functionally Associate with CTCF on Mammalian Chromosome Arms. *Cell* **132**, 422–433 (2008).
 32. Noma, K., Cam, H. P., Maraia, R. J. & Grewal, S. I. S. A Role for TFIIIC Transcription Factor Complex in Genome Organization. *Cell* **125**, 859–872 (2006).
 33. Sanyal, A., Lajoie, B. R., Jain, G. & Dekker, J. The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature* **489**, 109–113 (2012).
 34. Katainen, R. *et al.* CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer. *Nat. Publ. Gr.* **47**, (2015).
 35. Tilghman, J. *et al.* HMMR maintains the stemness and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res.* **74**, 3168–3179 (2014).

36. Schwertfeger, K. L., Cowman, M. K., Telmer, P. G., Turley, E. A. & McCarthy, J. B. Hyaluronan, Inflammation, and Breast Cancer Progression. *Front. Immunol.* **6**, 236 (2015).
37. Naor, D. Editorial: Interaction Between Hyaluronic Acid and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulates the Activity of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **7**, 39 (2016).
38. Fan, Y. *et al.* Expression and clinical significance of FOXE1 in papillary thyroid carcinoma. *Mol. Med. Rep.* **8**, 123–127 (2013).
39. MW, P. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45
40. Panicker, V. *et al.* A Locus on Chromosome 1p36 Is Associated with Thyrotropin and Thyroid Function as Identified by Genome-wide Association Study. *The American Journal of Human Genetics* **87**, (2010).
41. Gudmundsson, J. *et al.* Discovery of common variants associated with low TSH levels and thyroid cancer risk. *Nat. Genet.* **44**, (2012).
42. Pradhan, G. B., Shrestha, R., Shrestha, S., Neupane, J. & Bhattachan, C. L. The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter: prospective study. *Nepal Med. Coll. J.* **13**, 169–71 (2011).
43. Gandolfi, P. P. *et al.* The incidence of thyroid carcinoma in multinodular goiter: retrospective analysis. *Acta Biomed.* **75**, 114–7 (2004).
44. Xiao, P. *et al.* Trefoil factors: Gastrointestinal-specific proteins associated with gastric cancer. *Clin. Chim. Acta* **450**, 127–134 (2015).

45. Li, Y. *et al.* Prognostic significance of the co-expression of nucleophosmin and trefoil factor 3 in postoperative gastric cancer patients. *Mol. Clin. Oncol.* **2**, 1055–1061 (2014).
46. Gao, P., Jin, Z., Cheng, Y. & Cao, X. RNA-Seq analysis identifies aberrant RNA splicing of TRIP12 in acute myeloid leukemia patients at remission. *Tumour Biol.* **35**, 9585–90 (2014).
47. Li, G. *et al.* Identification of mutant genes with high-frequency, high-risk, and high-expression in lung adenocarcinoma. *Thorac. cancer* **5**, 211–8 (2014).
48. Berger, A. H., Knudson, A. G. & Pandolfi, P. P. A continuum model for tumour suppression. *Nature* **476**, 163–169 (2011).
49. Kazanets, A., Shorstova, T., Hilmi, K., Marques, M. & Witcher, M. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes: Paradigms, puzzles, and potential. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1865**, 275–288 (2016).
50. Hnisz, D., Day, D. S. & Young, R. A. Insulated Neighborhoods: Structural and Functional Units of Mammalian Gene Control. *Cell* **167**, 1188–1200 (2016).
51. Schwertfeger, K. L., Cowman, M. K., Telmer, P. G., Turley, E. a & McCarthy, J. B. Hyaluronan, Inflammation, and Breast Cancer Progression. *Front. Immunol.* **6**, 236 (2015).
52. Blanco, I. *et al.* Assessing Associations between the AURKA-HMMR-TPX2-TUBG1 Functional Module and Breast Cancer Risk in BRCA1/2 Mutation Carriers. *PLoS One* **10**, e0120020 (2015).
53. Gianoukakis, A. G. *et al.* Hyaluronan Accumulation in Thyroid Tissue: Evidence for

- Contributions from Epithelial Cells and Fibroblasts. *Endocrinology* **148**, 54–62 (2007).
54. Bhm, J. *et al.* Hyaluronan expression in differentiated thyroid carcinoma. *J. Pathol.* **196**, 180–185 (2002).
 55. Böhm, J. P. *et al.* Reduced CD44 standard expression is associated with tumour recurrence and unfavourable outcome in differentiated thyroid carcinoma. *J. Pathol.* **192**, 321–327 (2000).
 56. Tallini, G., Tuttle, R. M. & Ghossein, R. A. THE HISTORY OF THE FOLLICULAR VARIANT OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, jc.2016-2976 (2016).
 57. Nikiforov, Y. E. *et al.* Nomenclature Revision for Encapsulated Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *JAMA Oncol.* **2**, 1023 (2016).
 58. Leboulleux, S., Tuttle, R. M., Pacini, F. & Schlumberger, M. Papillary thyroid microcarcinoma: time to shift from surgery to active surveillance? *Lancet Diabetes Endocrinol.* **4**, 933–942 (2016).
 59. Chen, Y. *et al.* *BRAF*^{V600E} Is Correlated with Recurrence of Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Systematic Review, Multi-Institutional Primary Data Analysis, and Meta-Analysis. *Thyroid* **26**, 248–255 (2016).
 60. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).

