



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica

Laboratorio de Mecanismos y Marcadores Moleculares

**Evaluación de moléculas de la vía de señalización Notch
y SEL1L en cáncer de tiroides**

T E S I S

Para obtener el título de:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Luis Gerardo González López

Jurado de Examen

Directora: Dra. Martha Leticia Santos Martínez

Asesor: Dr. Leonardo Trujillo Cirilo

Asesor: M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles

Sinodal: M. en C. Reynalda Roldan Pérez

Sinodal: Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández



**FES
ZARAGOZA**

Ciudad de México

Octubre 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



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.

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Mecanismos y Marcadores Moleculares de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Agradecimientos Institucionales

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por darme el privilegio de ser parte de la mejor universidad de Latinoamérica.

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** por darme todas las herramientas necesarias para mi futuro.

Al **Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica** por brindarme un espacio acogedor y apoyar para mi crecimiento académico.

A mi tutora la **Dra. Martha Leticia Santos Martínez** por guiarme y brindarme su apoyo para la elaboración de este trabajo.

A mis asesores el **Dr. Leonardo Trujillo Cirilo**, el **M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles**, la **M. en C. Reynalda Roldan Pérez** y el **Dr. Octavio Daniel Reyes Hernández** por sus consejos, sugerencias e ideas para este trabajo.

A la Técnica **Rosa Espinosa Luna** por los buenos momentos, su enseñanza y su gran apoyo.

Agradecimientos

Primeramente quiero agradecerles mucho a mis padres, Laura y Sergio quienes han hecho de mi vida y de mi formación lo mejor, les agradezco por todo su cariño, toda su comprensión, por darme las ganas de siempre superarme y por motivarme a ser una mejor persona. Gracias por sus palabras, por sus regaños y por siempre estar conmigo, los amo con mi vida. Gracias por cuidarme, por formar un gran ser humano, por enseñarnos lo que es el trabajo y por enseñarme lo que es la humildad, los amo, esto es por y para ustedes.

A mi hermosa familia, mi linda mamá Rafa, Leti, Vero, Gaby y Nancy, por siempre apoyarme en mí camino y creer en mí. A mis hermanos Erick y Gabriel por acompañarme en este largo camino, por siempre estar a mi lado y hacer que los momentos sean mejores. A mi querida Fani, quien siempre ha estado para mí, quien me ha apoyado en toda esta difícil etapa, nunca terminare por agradecerte por todo y hacer mi vida mucho más linda.

Quiero agradecerle mucho a mi asesora, la Dra. Leticia Santos por darme una gran oportunidad de crecer, superarme y darme las herramientas necesarias para concluir mi carrera, jamas terminare de agradecerle. A mi buen asesor Leonardo Trujillo por ser un buen guía, por todas tus enseñanzas y por tu apoyo, mi gran admiración y mis mejores deseos. A mi queridísima Rosi, que a pesar del mal tiempo siempre hubo buena cara, por enseñarme y por amenizar los días en el laboratorio, mil bendiciones para usted mi querida amiga. A mi compañero, el Maestro Alejandro Delgado Rey quien me ofreció su apoyo estando en España, le agradezco mucho por sus recomendaciones y por la ayuda que me ofrecio en todo momento.

A mis amigos Rosa, Edgar, Daniela y Paulina, por haber pasado con ustedes los mejores momentos de la carrera, a Fernando, Jorge, Mario, Paloma, Enrique, Alejandro, Regina, Airi y Gloria por hacer que la Universidad haya sido una de las mejores etapas de mi vida, saben que aquí siempre tendrán un buen amigo. Y a todas aquellas personas que me brindaron su compañía a lo largo de mi vida en la Universidad.

Dedicatoria

Este trabajo es dedicado especialmente a mis dos viejitos que están en el cielo, mis abuelos, Leopoldo González y Fortino Gabriel López, quienes son mis dos grandes mentores de vida.

“Nuestra mayor gloria no es no caer nunca, sino levantarnos cada vez que caemos”.

-Confucio

“No tengo talentos especiales. Solo soy apasionadamente curioso”.

-Albert Einstein

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| Resumen | VII |
| Abreviaturas | IX |
| 1. Marco Teórico | 1 |
| Generalidades | 1 |
| Clasificación de los tumores tiroideos | 2 |
| Descripción histológica de la glándula tiroidea | 5 |
| Descripción de las lesiones neoplásicas del cáncer tiroideo | 6 |
| Datos estadísticos | 8 |
| Factores de riesgo | 10 |
| Diagnóstico del cáncer de tiroides | 12 |
| Tratamientos | 13 |
| Mecanismos moleculares en el cáncer de tiroides | 14 |
| Métodos de detección | 17 |
| Vía de Señalización Notch y SEL1L | 18 |
| 2. Objetivos | 23 |
| 3. Planteamiento del problema | 24 |
| 4. Justificación | 25 |
| 5. Hipótesis | 26 |
| 6. Metodología | 27 |
| Cuantificación de tinción | 29 |
| Análisis estadístico | 29 |
| 7. Resultados | 30 |
| Expresión de proteínas de la vía de señalización NOTCH y tumorigénesis en el cáncer diferenciado de tiroides | 30 |
| Niveles de expresión de la vía de señalización Notch | 30 |
| 8. Discusión | 35 |
| 9. Conclusión | 41 |
| 10. Perspectivas | 42 |
| 11. Bibliografía | 43 |
| Anexos | 59 |

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud ha documentado que el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo. En el 2020 se registraron 19.2 millones de casos nuevos a nivel mundial, siendo el cáncer tiroideo uno de los 5 tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados en mujeres adultas. La vía de señalización de Notch está involucrada en diferentes procesos de la biología del cáncer. Se ha reportado que la vía de señalización Notch se encuentra desregulado en el cáncer de tiroides y, por lo tanto, su evaluación ofrece una nueva estrategia terapéutica y un objetivo de pronóstico potencial. El presente trabajo tubo como objetivo evaluar la expresión de los receptores de la vía de señalización Notch (1-4) y de la molécula SEL1L a nivel de proteína en muestras de tejidos de cáncer de tiroides por inmunohistoquímica en formato de microarreglo de tejidos, el cual ha resultado ser de mayor utilidad, asequible y de rápida evaluación para este tipo de cáncer. Los resultados de este trabajo demuestran que existe una alteración en la vía de señalización Notch y de la proteína SEL1L, lo que, puede influir en el potencial maligno del cáncer de tiroides. Por otro lado, se observó una expresión importante de cada proteína en tejidos de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides en comparación con los tejidos normales, mostrándose una expresión más alta en Notch 1 y SEL1L con respecto a los otros miembros Notch (2, 3 y 4). Además, en este estudio se analizó por primera vez la expresión de SEL1L en tejidos tumorales tiroideos. Por último, este estudio proporciona evidencia de que la familia de receptores Notch y la proteína SEL1L podrían convertirse en blancos potenciales para el tratamiento y/o como biomarcadores pronóstico del cáncer tiroideo, enfocado en los diferentes histotipos y variantes del cáncer diferenciado de tiroides.

Abreviaturas

CT = Cáncer de Tiroides

CAT= Cáncer Anaplásico Tiroideo

CDK= Quinasas Dependientes de Ciclinas

CDT= Cáncer Diferenciado de Tiroides

CFT= Cáncer Folicular Tiroideo

CFTNM= Carcinoma Familiar de Tiroides no Medular

CMT= Cáncer Medular Tiroideo

CPT= Cáncer Papilar Tiroideo

IHQ= Inmunohistoquímica

IMC= Índice de Masa Corporal

MAPK= Vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos

MAT= Microarreglo de Tejidos

MCPT= Microcarcinoma Papilar Tiroideo

NT= Nódulo Tiroideo

OMS= Organización Mundial de la Salud

PAAF= Punción Aspiración por Aguja Fina

PI3K/Akt= Vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa

RTK= Receptores de Tirosina Quinasas

TSH= Hormona Estimulante de la tiroides

UPR/ERAD= Respuesta a la Proteína Desplegada/Degradación Asociada al Retículo Endoplásmico

VFCPT= Variante Folicular del Cáncer Papilar Tiroideo

1. MARCO TEÓRICO

Generalidades

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha documentado que el cáncer es la segunda causa de muerte en todo el mundo (Banik, et. al., 2020; Baloch, et. al., 2022), y es responsable de un estimado de 9.9 millones de muertes y 19.2 millones de nuevos casos en 2020 por esta enfermedad (World Health Organization, 2020). El cáncer de tiroides (CT) se ha convertido en el quinto cáncer más comúnmente diagnosticado en mujeres adultas en el mundo y el segundo más frecuente en mujeres de 50 años (Vaccarella & Dal Maso, 2020; Haymart, 2021). De estas cifras, el 75% de los pacientes con CT son mujeres (Haymart, 2021) en etapas reproductivas (Troisi, et. al., 2018; Suteau, et. al., 2021). En 2020 se diagnosticaron 586,202 casos nuevos de CT a nivel mundial (Ferlay, et. al., 2020) y un estimado de 44, 280 nuevos casos en 2021 (Haymart, 2021). Los datos para México son: 11,227 nuevos casos y 956 muertes por esta neoplasia en el mismo año. La tasa de incidencia de CT por edad en mujeres es casi cuatro veces mayor que en hombres: 12.6 y 3.2 por cada 100,000 habitantes, respectivamente; es decir, un 5.7% de las neoplasias malignas y la cuarta más frecuente en la población de nuestro país (**Fig. 1**) (Ferlay, et. al., 2020).

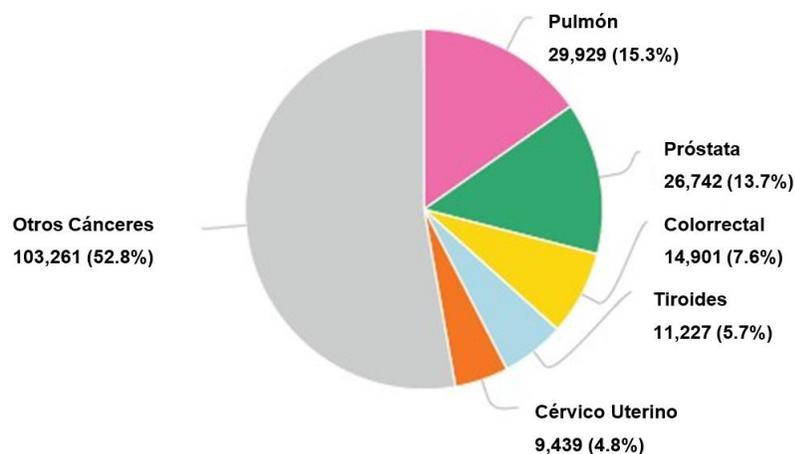


Figura 1. Número de casos nuevos de cáncer en México en 2020. Traducida de Ferlay, et. al., 2020. Gráfico de frecuencias de los tipos más comunes de cáncer en México, siendo el cáncer de tiroides la cuarta con más frecuencia con 11,227 casos.

El CT se describe como un tumor maligno de la glándula tiroides y aunque representa aproximadamente entre el 1 y 2% de los cánceres en humanos, es la neoplasia endocrina más común en el mundo (Lasserra-Sanchez, et. al., 2014; Pak, et. al., 2015; Mondragón-Terán, et. al., 2016; Da Silva, et. al., 2019; Zou, et. al., 2020).

El CT comprende a una amplia gama de subtipos malignos que pueden surgir diferencialmente de varios tipos de células dentro de la glándula tiroides. Cada subtipo difiere histopatológicamente y en grados de diferenciación celular, lo que puede deberse en parte a la señalización de la vía Notch (Guenter, et. al., 2021).

Clasificación de los tumores tiroideos

Los subtipos de CT se clasifican en: carcinoma diferenciado, carcinoma medular tiroideo (CMT), carcinoma poco diferenciado y carcinoma anaplásico tiroideo (CAT) (Gallardo, et. al., 2020). El cáncer diferenciado de tiroides (CDT) da lugar a dos formas principales: el cáncer papilar tiroideo (CPT) (corresponde el 80 - 90% de los casos) y el cáncer folicular tiroideo (CFT) (representa el 10 - 15% de los casos diagnosticados), ambos representan aproximadamente el 95% de las neoplasias tiroideas (Fagin, et. al., 2016; Da Silva, et. al., 2019; Gallardo, et. al., 2020). El CFT es el subtipo que tiende a ser más agresivo en comparación con el CPT (Guenter, et. al., 2021). La nueva clasificación de tumores endocrinos de la OMS del 2022 organizó a las neoplasias derivadas de células foliculares en tres categorías; neoplasias benignas, neoplasias de bajo riesgo y neoplasias malignas (**Tabla 1**) (Baloch, et. al., 2022). El CDT se desarrolla a partir de las células foliculares tiroideas, mientras que el CMT deriva de las células C parafoliculares y representa entre el 4 al 8% de los cánceres tiroideos. Finalmente, el CAT y los pobremente diferenciados (aproximadamente el 1% de los casos) (**Gráfico 1**), son tumores raros que surgen de las células foliculares o de la dediferenciación de cánceres diferenciados, se asocian con una enfermedad agresiva y rápidamente fatales (Fagin, et. al., 2016; Da Silva, et. al., 2019; Gallardo, et. al., 2020), además de que carecen de características específicas de las células tiroideas (Guenter, et. al., 2021).

Tabla 1. Clasificación de las neoplasias tiroideas de la OMS del 2022. Tomado y modificado Baloch, *et. al.*, 2022.

| Neoplasia | Clasificación | |
|---|-------------------------------|---|
| Neoplasias derivadas de células foliculares. | Tumores benignos. | A. Enfermedad nodular folicular tiroideo. B. adenoma folicular. C. Adenoma folicular con arquitectura papilar. D. Adenoma oncocítico de la tiroides. |
| | Neoplasias de bajo riesgo. | A. Neoplasia tiroidea folicular no invasiva con aspecto papilar con características nucleares. B. Tumores tiroideos de potencial maligno incierto. C. Tumor trabecular hialinizante. |
| | Neoplasias malignas. | A. Carcinoma folicular de tiroides. B. Carcinoma papilar variante folicular encapsulado invasivo. C. Carcinoma papilar de tiroides. D. Carcinoma oncocítico de tiroides. E. Carcinomas derivados de folículos de alto grado. <ul style="list-style-type: none"> I. Carcinoma diferenciado de tiroides de alto grado II. Carcinoma de tiroides pobremente diferenciado F. Carcinoma de tiroides derivado de células foliculares anaplásicas. |
| Carcinoma derivado de células C de tiroides. | Carcinoma medular de tiroides | |

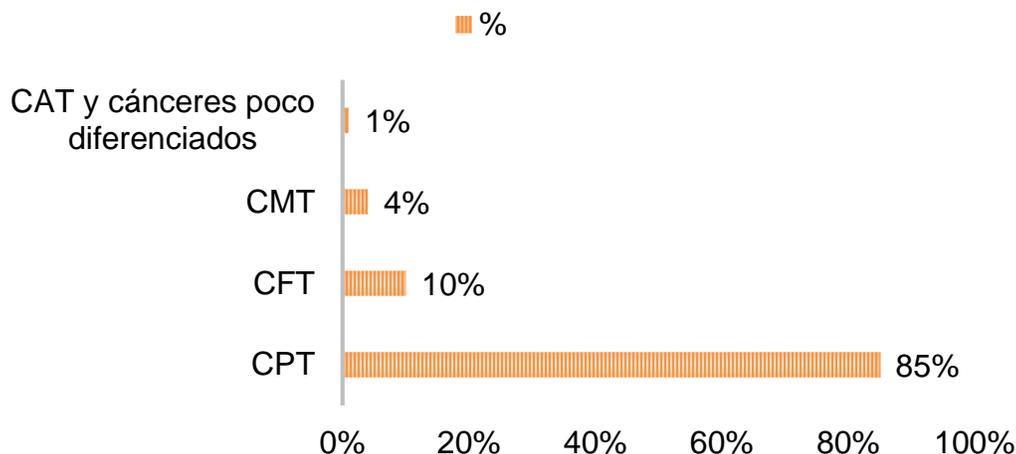


Gráfico 1. Porcentaje aproximado de cada carcinoma tiroideo. Carcinoma anaplásico tiroideo (CAT), carcinoma medular tiroideo (CMT), cáncer folicular tiroideo (CFT) y cáncer papilar tiroideo (CPT).

Considerando la arquitectura y el patrón histológico que adoptan las células neoplásicas tiroideas, se han descrito por lo menos 10 y hasta 17 variantes de CPT y otras pocas para CFT, descritas en la **Tabla 2** (Iribarren , et. al., 2010; Fuentes, 2014).

Tabla 2. Clasificación del cáncer papilar y folicular de tiroides. Tomado de Teijeiro & Sobrinho, 2003; Iribarren, et. al., 2010; Schneider & Chen, 2013; Schmidbauer, et. al., 2017.

| Histología | Variante Histológica |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Cáncer Papilar Tiroideo | Clásico |
| | Variante de células claras |
| | Variante de células columnares |
| | Variante con células en Estoperol |
| | Variante cribiforme-morular |
| | Variante esclerosante difusa |
| | Variante folicular |
| | Variante de células altas |
| | Variante oxifílica |
| | Variante sólida |

| | |
|----------------------------------|--|
| | Variante Warthin |
| | Variante folicular encapsulada |
| | Variante macrofolicular |
| | Microcarcinoma |
| Cáncer Folicular Tiroideo | Variante de células claras |
| | Variante oncocítica (células de Hürthle) |
| | Variante mucinosa |
| | Variante de células en anillo de sello |

Descripción histológica de la glándula tiroidea

La capsula de tejido conjuntivo que rodea a la glándula tiroidea está formada por lóbulos que a su vez se dividen en lobulillos, que a su vez están formados por los folículos tiroideos, los cuales la unidad estructural y funcional de la glándula tiroidea (Elizondo, 2014) **(Figura 2)**. El folículo tiroideo en su estado normal se puede observar cómo folículos regulares de tamaño variable que va de 0.2 a 1 mm, con forma esferoidal y contornos ondulantes, sin plegamientos u otros signos que denoten hiperfunción, las células con escaso citoplasma, un núcleo cromático y con escaso o inaparente estroma (López, 2009; Elizondo, 2014) **(Figura 3)**.

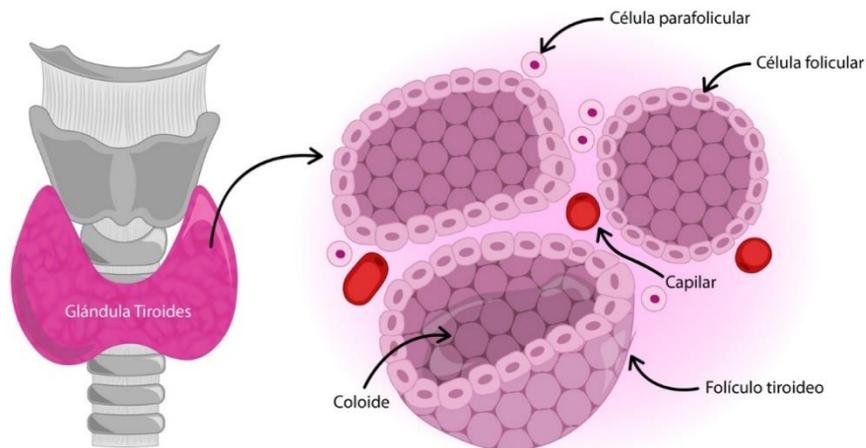


Figura 2. Estructura normal de la glándula tiroidea. Tomada de Lam de Calvo & Castellero de Santos, 2020.

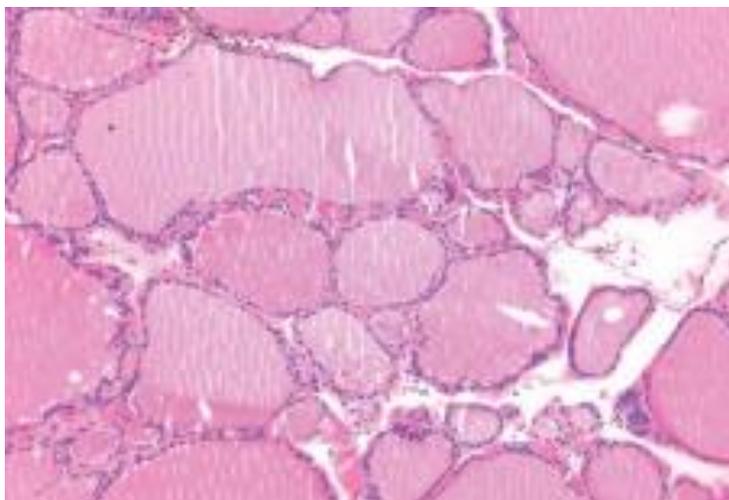


Figura 3. Tejido tiroideo normal. Folículos tiroideos de contornos ondulantes, las células con escaso citoplasma y núcleo cromático y el escaso estroma, edematoso. Tinción Hematoxilina-Eosina, visto a x250. Tomado de López, *et. al.*, 2009.

Descripción de las lesiones neoplásicas del cáncer tiroideo

El CT tiene un amplio espectro de morfologías y comportamientos que incluyen tumores más comunes que otros, algunos indolentes e incluso algunas más agresivas y con un mal pronóstico (Asa, 2019). Los tumores bien diferenciados se pueden subdividir por su agresividad, las menos agresivas incluyen las variantes folicular, oxifílico y cribiforme-morular (Schneider & Chen, 2013; Schmidbauer, *et. al.*, 2017). Las variantes más agresivas y algunas de ellas consideradas de mal pronóstico son las variantes de células altas, la variante esclerosante difusa, variante folicular, variante de células columnares, variante folicular encapsulada y la variante de células en estoperol (Teijeiro & Sobrinho, 2003; Iribarren, *et. al.*, 2010; Fuentes, 2014).

Dado que el CPT es la forma más frecuente del CDT, las características citológicas que presenta el CPT son muy marcadas, estas se encuentran en su núcleo, el cual presenta un agrandamiento con aspecto esmerilado claro, pálido y/o vacío, un contorno irregular, hendiduras profundas, perforaciones, nucléolos pequeños, además de que las papilas características están conformadas por un tallo fibrovascular de longitud y espesor variable cubierto de células neoplásicas en

donde también pueden observarse calcificaciones llamadas cuerpos de psamoma en un 40 a 60% de este tipo de CT (**Figura 4A**) (Teijeiro & Sobrinho, 2003; Cano, 2009; López, 2009; Elizondo, 2014; Asa, 2019).

La variante histológica más común del CPT es la variante folicular del cáncer papilar tiroideo (VFCPT) que comparte características tanto de CPT como de CFT, por tanto se clasifica como subtipo de CPT. La VFCPT consiste en estructuras foliculares con cambios nucleares que son característicos del CPT con morfología oval y no redonda, con folículos alargados, hipereosinofilia del coloide con apariencia oscura, con vacuolas periféricas, células gigantes multinucleadas, y cuerpos de psamoma CT (Teijeiro & Sobrinho, 2003; Cano, 2009).

El microcarcinoma papilar tiroideo (MCPT) es otra variante tanto para CPT como para el CFT, con importancia clínica, debido a su aumento en las últimas décadas (Casaril, et. al., 2020), y porque son verdaderamente malignos pero que no progresan a cánceres letales (Takano, 2017). El MCPT se caracteriza por ser carcinomas menores de 1 cm, se les suele encontrar de forma incidental y no trae consigo riesgo alguno (Schmidbauer, et. al., 2017; Oh, et. al., 2018; Ito & Miyauchi, 2020), además de que pueden presentar características de variantes clásicas, foliculares u oncocíticas (Cano, 2009).

En el carcinoma papilar de células oxifílicas las células neoplásicas presentan citoplasma granular abundante debido a la acumulación de mitocondrias y los núcleos pueden ser hipercromáticos con aparente nucléolo (Cano, 2009). La variante macrofolicular es definida como una neoplasia encapsulada cuyas células tiene características de CPT pero con un crecimiento macrofolicular que ocupa alrededor del 50% del área tumoral (Teijeiro & Sobrinho, 2003).

Por su parte, en cortes histológicos de CFT se puede observar una proliferación microfolicular sin cuerpos de psamoma y núcleos sin características nucleares típicas del CPT (**Figura 4B**) (López, 2009; Elizondo, 2014), además de mostrar invasión vascular (Schmidbauer, et. al., 2017). En el caso de las variantes oncocítica o de células de Hürthle, a menudo se clasifican como cánceres foliculares, ya que

se derivan de la célula folicular, más específicamente del epitelio folicular (Schneider & Chen, 2013). Sin embargo, nuevos datos sobre su clasificación emitidos por la OMS, indican que el carcinoma de células de Hürthle y el CFT son entidades separadas (Grani, et. al., 2018). Esta variante folicular representa aproximadamente el 2% de los casos de CT (Gallardo, et. al., 2020).

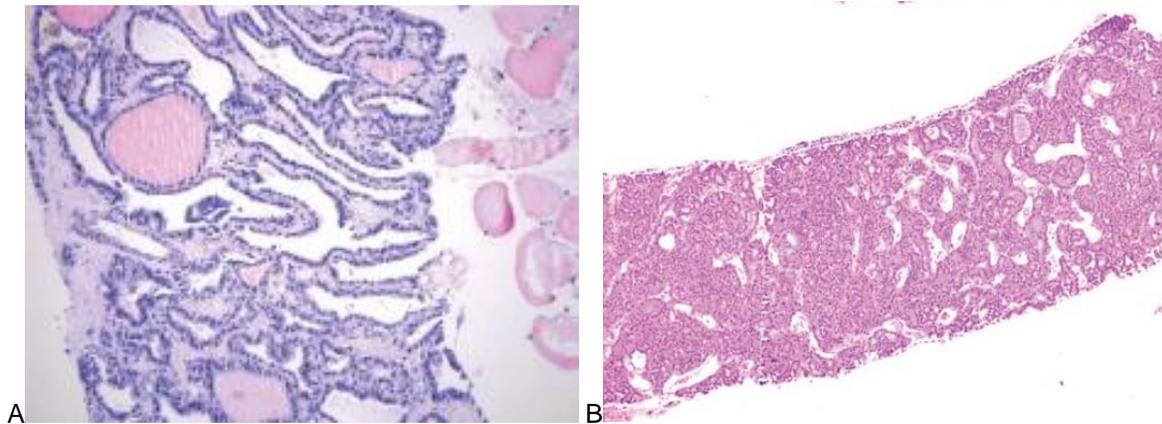


Figura 4. Subtipos principales del cancer tiroideo. **A.** Corte histológico de Carcinoma papilar tiroideo. Imagen con estructuras foliculares en un estroma esclerosado y aclaramiento de núcleos. Tinción Hematoxilina-Eosina, visto a x100. **B.** Corte histológico de Carcinoma Folicular tiroideo. Imagen con microfoliculos, cordones y nidos sólidos. Tinción Hematoxilina-Eosina, visto a x40.

Tomado de López, et. al., 2009.

Datos estadísticos

La tasa de supervivencia de los pacientes afectados con CT es muy variable, dependen de la edad, el sexo y del tipo histológico, así como el grado de diferenciación (Chiganer, et. al., 2011; Raue & Frank-Raue, 2016). El CPT se caracteriza por su excelente pronóstico con supervivencias arriba del 90%, después de 10, 25 y hasta 40 años (Zafón, et. al., 2010; LiVolsi, 2011; Lasserra-Sanchez, et. al., 2014; Raue & Frank-Raue, 2016). Los microcarcinomas tienen un pronóstico excelente con tasas de supervivencia específicas de la enfermedad a 10 e incluso 15 años que superan el 99% (Schneider & Chen, 2013). El CFT tiene un peor pronóstico en comparación con el CPT. Las tasas de mortalidad oscilan entre el 5 y el 15%, aunque el tiempo de supervivencia aún se extiende décadas como en el caso del CPT, su pronóstico depende especialmente del grado de invasión capsular

y vascular (Schneider & Chen, 2013). Las tasas de supervivencia relativa a 10 años para pacientes con CFT y de células de Hürthle fueron de 85% y 76% respectivamente (Tuttle, et. al., 2010).

Datos más específicos arrojan cifras con un pronóstico excelente, con una supervivencia global relativa a 5 años del 98.2% para todos los estadios, si es localizada 99.9%, regional 98.2% y cuando existe metástasis un 56.2%. Ciertos del CPT como la variante de células altas, variante de células columnares y la variante esclerosante difusa tienen un peor pronóstico al igual que otras variantes del CFT (Gallardo, et. al., 2020). Uno de los mayores factores de riesgo de mortalidad específica por enfermedad es la presencia de metástasis a distancia (Schneider & Chen, 2013).

La incidencia del CT ha aumentado rápidamente en muchos países desde la década de los 80's, mientras que la mortalidad se ha mantenido estable o se ha disminuido de manera constante (Bray, et. al., 2018; Li, et. al., 2020). Esto se ha producido principalmente por el diagnóstico cada vez mayor de cánceres de tiroides papilares subcentimétricos o microcarcinomas (menores de 1 cm de diámetro), en contraste con tumores más grandes y más avanzados (Kitahara, et. al., 2017; Kitahara & Sosa, 2020). La mayoría de estos microcarcinomas son de naturaleza indolente, el cual tiene poco potencial de causar morbilidad y mortalidad en los pacientes (Kuo, et. al., 2019). Sin embargo la incidencia de CPT grandes ha aumentado casi al mismo ritmo, lo que sugiere un aumento real de CT debido a una mayor exposición a factores de riesgo potenciales (Enewold, et. al., 2009; Kitahara, et. al., 2017). La incidencia de otros tipos de CT, incluido el CFT, el CMT y las variantes más agresivas del CT, no han aumentado (Raue & Frank-Raue, 2016).

El aumento masivo en la detección de pequeños carcinomas papilares (Vaccarella, et. al., 2016) se debe al mayor uso de sistemas, imágenes y técnicas de diagnóstico más avanzados (Morris, et. al., 2013; Mondragón-Terán, et. al., 2016; Schmidbauer, et. al., 2017; Li, et. al., 2020), aunado con una mayor vigilancia médica y acceso a mejores servicios de salud pública. Un gran número de estos cánceres subclínicos no habrían causado síntomas o la muerte sino se hubieran detectado (Morris, et.

al., 2013), acortándoles la esperanza de vida y sin beneficio alguno de las cirugías ni de los tratamientos adicionales (Udelsman & Zhang, 2014; Kitahara & Sosa, 2020). A este término le podemos denominar “sobrediagnóstico” (Morris, et. al., 2013).

El sobrediagnóstico es sin duda el factor más importante para demostrar el aumento en la incidencia del CT. Sin embargo, también se debe a algunos factores de riesgo ampliamente reconocidos o sospechosos como la radiación ionizante en la infancia, como radiación médica, radiación natural o por exposición a accidentes nucleares (Schlumberger, et. al., 2011; Udelsman & Zhang, 2014; Zimmermann & Galetti, 2015; Chang, et. al., 2017); un historial médico con antecedentes de bocio, nódulos tiroideos o con cualquier otra alteración tiroidea benigna (Kitahara, et. al., 2018; Handelsman, et. al., 2019; Schiffmann, et. al., 2020).

Factores de riesgo

Los factores de riesgo potenciales del CT como son la inactividad física, la obesidad y la diabetes, aunque hay evidencia de un riesgo reducido con el tabaquismo y el alcoholismo. Se ha observado una asociación positiva entre el índice de masa corporal (IMC) o la obesidad y el riesgo de CT, siendo más consistente en mujeres que en hombres. También se observó que la gente que fuma se asocia con un alto IMC asociado con el CT (Kitahara, et. al., 2011; Fussey, et. al., 2020). El peso al nacer también se ha vinculado positivamente a algunas variantes de CT como el CFT pero no el CPT (Aarestrup, et. al., 2019). La tendencia creciente del sobrepeso y de la obesidad desde hace décadas puede explicar este aumento en los casos de CT (Udelsman & Zhang, 2014; Handelsman et. al., 2019).

La Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) es un factor fisiológico de crecimiento de las células foliculares y se ha demostrado que niveles altos de TSH se asocian a un mayor riesgo de presentar CT (Fiore y Vitti, 2012; Handelsman et. al., 2019). También se ha observado niveles altos de TSH en pacientes obesos y proporciona un vínculo potencial entre la obesidad y la malignidad tiroidea (Handelsman et. al., 2019; Fussey, et. al., 2020).

Otros factores de riesgo potenciales en la carcinogénesis tiroidea y que han contribuido en el aumento en la incidencia del CT son los carcinógenos ambientales, como los hábitos alimenticios, la vida en áreas volcánicas y los elementos xenobióticos (Nettore, et. al., 2018). Entre los hábitos alimenticios destaca la ingesta de yodo, oligoelemento esencial para la síntesis de hormonas tiroideas. Tanto la deficiencia crónica del yodo como el exceso de yodo están asociados con enfermedades tiroideas de células foliculares. (Knobel & Medeiros-Neto, 2007; Nettore, et. al., 2018). Algunos otros estudios reportan la ingesta de nitratos y nitritos asociados a un riesgo alto de CT, se encuentran presentes en la dieta y pueden dar lugar a compuestos nitrogenados que son potentes carcinógenos en animales (Ward, et. al., 2010; Aschebrook-Kilfoy, et. al., 2013).

Se ha informado de un mayor riesgo de CDT en algunas áreas volcánicas del mundo, como Hawái, Islandia, Polinesia Francesa, Nueva Caledonia y Sicilia, por las concentraciones de metales pesados en el ambiente, consecuencia de la actividad volcánica, siendo tóxicas para las células vivas, promoviendo la transformación maligna (Ferrari, et. al., 2017; Vigneri, et. al., 2017; Nettore, et. al., 2018). Finalmente, los xenobióticos (retardantes de llama, pesticidas, repelentes o aislantes térmicos) también se han asociado con el riesgo de desarrollar CPT. La exposición a compuestos xenobióticos en el medio ambiente, en el hogar o absorbidos en la cadena alimenticia tiene efectos carcinogénicos (Ferrari, et. al., 2017; Nettore, et. al., 2018).

El CT puede tener una predisposición familiar y puede ocurrir como síndromes hereditarios o como tumores aislados (Letelier, 2017). La mayoría de estos carcinomas son esporádicos y al menos el 5% de estos pacientes tendrán una enfermedad familiar (Granados, et. al., 2009; Nosé, 2010). Los síndromes tiroideos familiares derivados de células foliculares o carcinoma familiar de tiroides no medular (CFTNM) se pueden dividir en 2 grupos clínico-patológicos.

El primer grupo incluye síndromes como la Poliposis Adenomatosa Familiar, Síndrome de Cowden, Complejo de Carney, Síndrome de Pendred y el Síndrome de Werner. El segundo caso se presenta como cánceres diferenciados, en donde dos o más familiares de primer grado presentan CDT. El CFTNM no síndromático da cuenta del 95% de los casos de CFTNM y la mayoría de ellos son papilares o VFCPT (Nosé, 2010; Letelier, 2017).

Diagnóstico del cáncer de tiroides

El CT se presenta como un nódulo tiroideo (NT) que se detecta por palpación o frecuentemente por el descubrimiento en el cuello (Pacini & Castagna, 2012). Aproximadamente un 10% de la población adulta en general desarrollara un NT palpable a lo largo de su vida, de los cuales solo el 5-10% serán malignos (Castelblanco, 2014; Marreno, et. al., 2015). Más del 90% de las lesiones pequeñas, no palpables y benignas nunca se convertirán en un problema o riesgo (Cabanillas, et. al., 2016). Los NT malignos representan un desafío, debido a la poca precisión de los métodos de diagnóstico para distinguir entre lesiones benignas y malignas, y el mal manejo de la toma de muestra (Pacini & Castagna, 2012; Castelblanco, 2014). La identificación de NT malignos en etapas tempranas es importante. Para hacer la distinción entre los subgrupos de bajo y alto riesgo se necesita realizar una exploración física y una historia completa, investigaciones de laboratorio, ecografía de cuello y para algunos pacientes seleccionados una biopsia o punción aspiración por aguja fina (PAAF) (Castelblanco, 2014; Cabanillas, et. al., 2016).

La ecografía es una técnica que permite la caracterización y valoración de lesiones de alto riesgo, y es el mejor método de diagnóstico por imágenes para evaluar NT (Fagin, et. al., 2016). La PAAF ha ayudado al manejo clínico de los NT, disminuyendo a la mitad el número de intervenciones quirúrgicas (Marreno, et. al., 2015), y es considerado el procedimiento diagnóstico de primera elección para diferenciar tumores benignos y malignos (Pacini & Castagna, 2012; Castelblanco, 2014; Marreno, et. al., 2015). No obstante las técnicas de diagnóstico convencionales, incluidas la ecografía de cuello y la PAAF no han podido

proporcionar un diagnóstico definitivo en muchos casos (Xing, et. al., 2013). A pesar de la gran utilidad de la PAAF y el avance en el diagnóstico preoperatorio, alrededor del 30% de los casos son clasificados como indeterminados. (Xing, 2008; Nikiforova & Nikiforov, 2009; Castelblanco, 2014; Marreno, et. al., 2015; Khan & Zeiger, 2020). Esto se debe a estrategias que todavía tienen limitaciones, son costosas, invasivas, lentas y dependientes de instrumentos precisos y de personal técnico. Por lo que, nuevos métodos de detección no invasivos tienen una gran demanda para el diagnóstico del CT (Zou, et. al., 2020).

Hoy en día, las pruebas moleculares han demostrado ser de gran provecho, son utilizadas con mayor frecuencia, estableciendo una mayor precisión en la diferenciación entre lesiones benignas y malignas (Ohuri, et. al., 2010; Marreno, et. al., 2015). La función de estos marcadores es complementar la PAAF, a fin de mejorar la sensibilidad diagnóstica, evitando así procedimientos quirúrgicos innecesarios en pacientes con lesiones benignas (Chiganer, et al., 2011; Marreno, et. al., 2015). Se ha demostrado que las mutaciones puntuales en la prueba de BRAF puede mejorar con mayor exactitud del diagnóstico de la citología PAAF indeterminada (Chung, et. al., 2006; Musholt, et. al., 2010; Xing, et. al., 2009; Cañadas-Garre, et. al., 2012). Además de BRAF se pueden considerar otros genes y reordenamientos genéticos como RET-CPT, RAS y PAX8/PPRgamma. Sin embargo BRAF se encuentra con más prevalencia en los CT hasta en un 80% de los casos (Nikiforova & Nikiforov, 2009; Nikiforov, et. al., 2009; Ohori, et. al., 2010).

Tratamientos

La cirugía sigue siendo la mejor opción de tratamiento para la mayoría de los casos de CDT (Castelblanco, 2014; Zou, et. al., 2020). La tiroidectomía se recomienda en pacientes con tumores mayores de 1 cm, que son la mayoría de los casos y para pacientes con CPT metastásica o invasiva. Pacientes con tumores de bajo riesgo son sometidos a cirugías diagnósticas como la lobectomía, de los cuales en la mayoría de los casos no es necesario (Castelblanco, 2014; Cabanillas, et. al., 2016; Schmidbauer, et. al., 2017).

La cirugía suele estar acompañada de la administración de yodo radiactivo (I^{131}). Se realiza para irradiar restos de tejido tiroideo remanente y posibles tumores residuales (Pacini & Castagna, 2012; Schmidbauer, et. al., 2017). La terapia con yodo radiactivo (I^{131}) se recomienda en pacientes con CT de alto riesgo pero no en pacientes de bajo riesgo, ya que las tasas de recurrencia y mortalidad son bajas (Pacini & Castagna, 2012; Fagin, et. al., 2016). Este procedimiento reduce el riesgo de recurrencia regional y facilita la vigilancia a largo plazo (Pacini & Castagna, 2012). Después de la tiroidectomía la terapia supresora de la hormona tiroidea es una parte esencial para el tratamiento del CT, generalmente como monoterapia con levotiroxina. Su objetivo es reemplazar la hormona tiroidea y suprimir el estímulo del crecimiento potencial de TSH en células tumorales (Pacini & Castagna, 2012; Schmidbauer, et. al., 2017).

Otras terapias recomendadas para pacientes con tumores persistentes, con cánceres más avanzados y con peor pronóstico son la quimioterapia, la radioterapia de haz externo y las nuevas terapias con inhibidores de la tirosina quinasa (lenvatinib, sorafenib, sunitinib, cabozantinib, pazopanib, vandetanib) (Pacini & Castagna, 2012; Castelblanco, 2014; Schmidbauer, et. al., 2017; Valerio, et. al., 2017, Ancker, et. al., 2019). Se ha propuesto al sistema de señalización Notch como un blanco modelo para el desarrollo de biofármacos en la erradicación de cáncer como inhibidores de la vía Notch, por ejemplo, se han desarrollado proteínas recombinantes y anticuerpos monoclonales dirigidos contra las repeticiones 11 y 12 de la región EC de Notch (rh11-12) (Santos, et. al., 2006).

Mecanismos moleculares en el cáncer de tiroides

En el CT el inicio y la progresión tumoral ocurren a través de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a la activación de las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/Akt) (Xing, 2010; Nikiforov & Nikiforova, 2011; Brehar, et. al., 2013; Song & Park, 2019). La activación de ésta vía transmite señales desde la membrana plasmática al núcleo y juegan un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular (Nikiforov & Nikiforova, 2011; Brehar, et. al.,

2013; Cabanillas, et. al., 2016), la diferenciación, adhesión, migración, apoptosis y supervivencia celular, cuando se activa de forma aberrante, en la tumorigénesis tiroidea (Xing, 2008; Xing, 2010; Song & Park, 2019). Los genes mutados que afectan a estas 2 vías codifican receptores de tirosina quinasa (RTK) en la membrana celular (RET, NTRK1, VEGFR y ALK) capaces de activar varias moléculas de la cascada de señalización como BRAF, RAS, MEK, ERK, AKT y mTOR (**Figura 5**) (Nikiforov & Nikiforova, 2011; Haroon & Xu, 2019). Otras vías de señalización que también se encuentran afectadas son NF- κ B, RASSF1-MST1-FOXO3, WNT- β -Catenina, HIF1 α y la TSHR (Castelblanco, 2014).

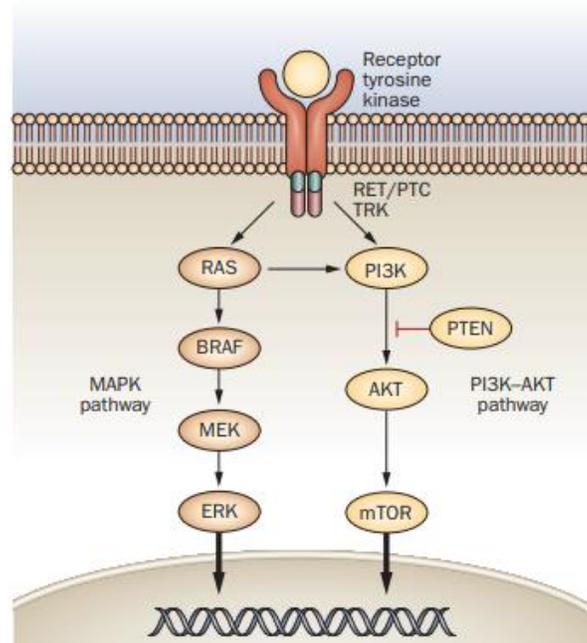


Figura 5. Ilustración de las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt, involucradas en la carcinogénesis tiroidea. Tomada de Nikiforov & Nikiforova, 2011.

Cuatro tipos de mutaciones constituyen la mayoría de las mutaciones que ocurren en cánceres derivados de células foliculares y tienen el mayor impacto en el diagnóstico y pronóstico de tumores; son mutaciones puntuales en BRAF y RAS así como en los reordenamientos RET-CPT y PAX8/PPAR γ (Nikiforova & Nikiforov, 2009; Nikiforov & Nikiforova, 2011; Valerio, et. al., 2017). Estas mutaciones podrían estar presentes en aproximadamente 90% de todas las neoplasias tiroideas de origen folicular (Shibru, et. al., 2008).

La mutación BRAF es una de las principales causas de activación aberrante de la vía MAPK en cánceres humanos (Xing, 2008). La mutación más común es una mutación puntual en la posición c.1799 del gen BRAF, que da como resultado BRAFV600E y representa más del 90% de todas las mutaciones de BRAF (Xing, 2008; Brehar, et. al., 2013; Cho, et. al., 2014; Acquaviva, et. al., 2020) de las más de 40 mutaciones identificadas en el gen *BRAF* (Xing, 2008). Existe una baja frecuencia de la mutación BRAFV600E en CFT (Haroon & Xu, 2019). Por otra parte, RAS es una pequeña proteína G que al unirse a factores de crecimiento RTK, activa a las vías posteriores que conducen a la activación de BRAF y a una cascada de eventos que desencadenan la tumorigénesis tiroidea (Zafón & Obiols, 2009; Haroon & Xu, 2019). Se han descrito mutaciones en los 3 genes RAS (HRAS, KRAS y NRAS) asociados al CT y encontrados en algunas variantes histológicas del CT (Shibru, et. al., 2008; Brehar, et. al., 2013; Zafón & Obiols, 2009; Liu, et. al., 2020). El gen RAS se encuentra mutado en CPT en muy pequeña porción con menos del 15% junto con los dominios quinasa de BRAF o de RTK como RET, NTRK y ALK, y en CFT y VFCPT se encuentra en un 30 y un 50% de los casos (Fagin, et. al., 2016; Haroon & Xu, 2019).

La segunda alteración genética más frecuente descrita en el CPT es el rearreglo conocido como RET-CPT. RET es un protooncogén localizado en el cromosoma 10q11.2, implicado en la carcinogénesis tiroidea del CPT (Chiganer, et al., 2011). El protooncogén RET en el CPT se activa constitutivamente mediante la fusión de su dominio de tirosina quinasa con la región 5' de otro gen generando así productos quiméricos denominados colectivamente RET-CPT (Khan, et. al., 2020). Se han informado al menos 15 tipos distintos de RET-CPT, siendo RET-CPT1 la forma más común, seguida de la RET-CPT3. La familia de translocaciones RET que se dirigen al oncogén RET ocurre en aproximadamente el 7% de los casos y es exclusivo del CPT (Shibru, et. al., 2008; Zafón & Obiols, 2009; Cabanillas, et. al., 2016; Zhou, et. al., 2017; Haroon & Xu, 2019; Khan, et. al., 2020).

El gen RAS se encuentra mutado en CPT en muy pequeña porción con menos del 15% junto con los dominios quinasa de BRAF o de RTK como RET, NTRK y ALK, y en CFT y VFCPT se encuentra en un 30 y un 50% de los casos (Fagin, et. al., 2016; Haroon & Xu, 2019). En el caso del reordenamiento PAX8/PPRgamma se encuentra mutado en un 30 y 50% de los casos halla dos en CFT y en la VFCPT (Shibru, et. al., 2008; Pacini & Castagna, 2012; Brehar, et. al., 2013; Cabanillas, et. al., 2016; Haroon & Xu, 2019).

Métodos de detección

En la actualidad, sólo 2 a 4% de los casos con cáncer en el mundo responden a la quimioterapia. Por otra parte, estos agentes farmacológicos producen graves efectos secundarios, además de tener una efectividad limitada (Santos, et al., 2006). En el caso del CT, no es diferente, recientemente se han aprobado tratamientos para pacientes con CDT que no responden a los tratamientos marcados en las guías actuales, y esto ha traído consigo una serie de efectos secundarios graves sin beneficios de supervivencia para los pacientes y del que la quimioterapia no juega un papel significativo en esta neoplasia (Schmidbauer, et. al., 2017). Por lo que, la combinación entre los métodos citológicos tradicionales y las técnicas de biología molecular empleadas para el diagnóstico y el manejo clínico del CT, aún cuenta con ciertas limitantes, siendo costosas, lentas, invasivas y técnicamente demandantes (Paja, et. al., 2017; Oh, et. al., 2018).

La investigación de ciertos biomarcadores, como proteínas o perfiles de expresión proteica, han resultado de gran ayuda para esclarecer niveles de expresión de estas moléculas, el cual son indicativos, ya sea, de un proceso biológico normal o un proceso patológico, por lo que, tienen un gran potencial en el diagnóstico de enfermedades, mejorando la detección y ofreciendo criterios de pronóstico, para la búsqueda de blancos terapéuticos en el tratamiento temprano y oportuno de enfermedades, así como su respuesta a estos tratamientos. En los últimos años estos biomarcadores han ganado gran reconocimiento en la detección de

enfermedades basadas en el mal funcionamiento de la actividad biológica celular, y encontrar niveles anormales (ausencia o presencia) de estas proteínas nos puede dar un indicio de alteración celular debido a un proceso patológico que se debe esclarecer (Pedroza, et. al., 2012; Razo-Romero, et. al., 2021). La identificación de dichas proteínas que participan en las diversas etapas de una enfermedad ayudaría a la comprensión de las bases moleculares y la naturaleza de enfermedades como el cáncer o enfermedades autoinmunes. Las ventajas de los biomarcadores proteicos radica en que son fáciles de medir, técnicamente no complejo y de bajo coste económico (Razo-Romero, et. al., 2021).

El método de evaluación por inmunohistoquímica (IHQ) y la técnica de microarreglos de tejidos (MAT) han resultado ser de mayor utilidad, al ser sencilla, asequible, rápido de evaluar, fáciles de aplicar y por hacer experimentos mas reproducibles (Torhorst, et. al., 2001; Sun, et. al., 2015; Paja, et. al., 2017; Oh, et. al., 2018). Mediante la técnica MAT se puede tener un gran número de muestras de tejido de distintos tumores embebidos en un mismo bloque (Simon, et. al., 2003) para evaluar simultáneamente un gran número de proteínas o dianas moleculares con valor diagnóstico, predictivo o pronóstico en oncología clínica (Torhorst, et. al., 2001; Hernández, et. al., 2009). Se ha visto en diferentes estudios que la IHQ puede ser una alternativa para la detección de rutina en pacientes con CPT (Ilie, et. al., 2014; Sun, et. al., 2015).

La IHQ es una herramienta utilizada en la investigación, que proporciona información complementaria sobre los tejidos (Castelblanco, 2014), basándose en el uso de anticuerpos para identificar un antígeno específico (Furukawa, et. al., 2017). Esta técnica permite la detección, la localización y la cuantificación de proteínas celulares a través de anticuerpos monoclonales y/o policlonales, contribuyendo en el diagnóstico específico de enfermedades, particularmente neoplásicas, como carcinomas, brindando información relacionada al diagnóstico maligno, grado de agresividad o identificación de variantes histológicas (Duraiyan, et. al., 2012; Castelblanco, 2014; Bibiano, 2016; De Dios & Acosta, 2018).

Por lo tanto, la IHQ se ha convertido en una técnica crucial y de gran uso en muchos laboratorios de investigación médica, así como en diagnósticos clínicos (Duraiyan, et. al., 2012). Hemos propuesto una serie de marcadores inmunohistoquímicos utilizando diferentes anticuerpos, para mejorar la exactitud en el diagnóstico e intentar dar pronóstico sobre el carcinoma tiroideo. Uno de los marcadores inmunohistoquímicos con mayor uso en el diagnóstico y pronóstico del CDT derivado de células foliculares es en anticuerpo Notch1.

Vía de Señalización Notch y SEL1L

La señalización Notch es una vía de señalización altamente conservada que regula las interacciones célula-célula. Dependiendo de los contactos célula-célula, los receptores que pertenecen a esta familia, detectan señales del microambiente circundante que inducen respuestas intracelulares (Piana, et. al., 2019; Moore, et. al., 2020). Se considera que la señalización Notch juega un papel importante en las decisiones del destino celular en diversos tejidos y en distintos tiempos de la diferenciación, a lo que, la desregulación en esta vía puede estar involucrada con el desarrollo del cáncer (Santos, et. al., 2006). Cuando se encuentra desregulada la vía de señalización Notch puede conducir a la alteración de varios mecanismos como la regulación epigenética, las modificaciones postraduccionales, la sobreexpresión génica, las mutaciones (Hu, et. al., 2020), y a la transformación de células madre, a la tumorigénesis (Morgan, et. al., 2013). Se demostrado que se encuentra desregulado en muchos tipos de cáncer, como es el cáncer cervicouterino (Santos, et. al., 2006; Song, et. al., 2008; Santos, et. al., 2011), cáncer de páncreas, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de células renales, cáncer prostático, gliomas, linfomas, melanomas y tumores hematopoyéticos (Santos, et. al., 2006; Cook, et. al., 2010; Yamashita, et. al., 2013; Ntziachristos, et. al., 2014; Majumder, et. al., 2021; Guenter, et. al., 2021).

Notch es un receptor transmembranal que consta de 3 dominios en donde la activación de los receptores Notch se produce a través de los contactos entre ligandos unidos en la membrana y el dominio extracelular del receptor de la célula vecina. La translocación del dominio del receptor intracelular en el núcleo genera la transcripción de genes que regulan una variedad de procesos (**Figura 6**) (Geers, et. al., 2011; Kim, et. al., 2017), como el desarrollo celular, proliferación, crecimiento, migración, diferenciación, angiogénesis y apoptosis celular (Santos, et. al., 2006, Kim, et. al., 2017; Venkatesh, et. al., 2018; Moore, et. al., 2020). También se ha observado que la señalización Notch podría desempeñar un papel clave en la regulación de la transición epitelio-mesénquima y el fenotipo de células madre cancerosas durante el desarrollo y progresión de los tumores (Kim, et. al., 2017; Venkatesh, et. al., 2018; Piana, et. al., 2019). La vía Notch se considera un objetivo potencial y complejo de entender en diferentes neoplasias malignas, ya que se asocia claramente en funciones oncogénicas y supresoras de tumores dependiendo del contexto celular y el tipo de cáncer (Park, et. al., 2012; Galic, et. al., 2013; Ntziachristos, et. al., 2014; Piana, et. al., 2019; Hu, et. al., 2020; Guenter, et. al., 2021).

La señalización de Notch se compone de cuatro receptores, Notch 1, 2, 3 y 4, y de cinco ligandos, Delta 1, 3, 4 (DLL1, DLL3, y DLL4), Jagged 1 y 2 (JAGG 1 y JAGG2), tanto en humanos como en mamíferos (**Figura 6**) (Santos, et. al., 2006; Jaskula-Sztul, et. al., 2015; Kim, et. al., 2017; Moore, et. al., 2020), siendo Notch 1 el miembro más importante y estudiado de esta familia de receptores (Santos, et. al., 2006; Piana, et. al., 2019). Tanto Notch 1 como otros miembros de esta familia, están involucrados en el desarrollo del CT y juegan un rol muy importante en la tumorigénesis tiroidea. La expresión de este receptor parece estar relacionada con la invasividad tumoral en el CPT, lo que lo lleva a ser propuesto como un marcador de mal pronóstico en tumores diferenciados (Fu, et. al., 2016; Piana, et. al., 2019), y en algunos casos se ha reportado que la expresión de este miembro conduce a la supresión del crecimiento tumoral en el CPT y CFT (Xiao, et. al., 2009; Somnay, et.

al., 2017). El avance en la comprensión de Notch en el CT es muy prometedor en el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento (Guenter, et. al., 2021).

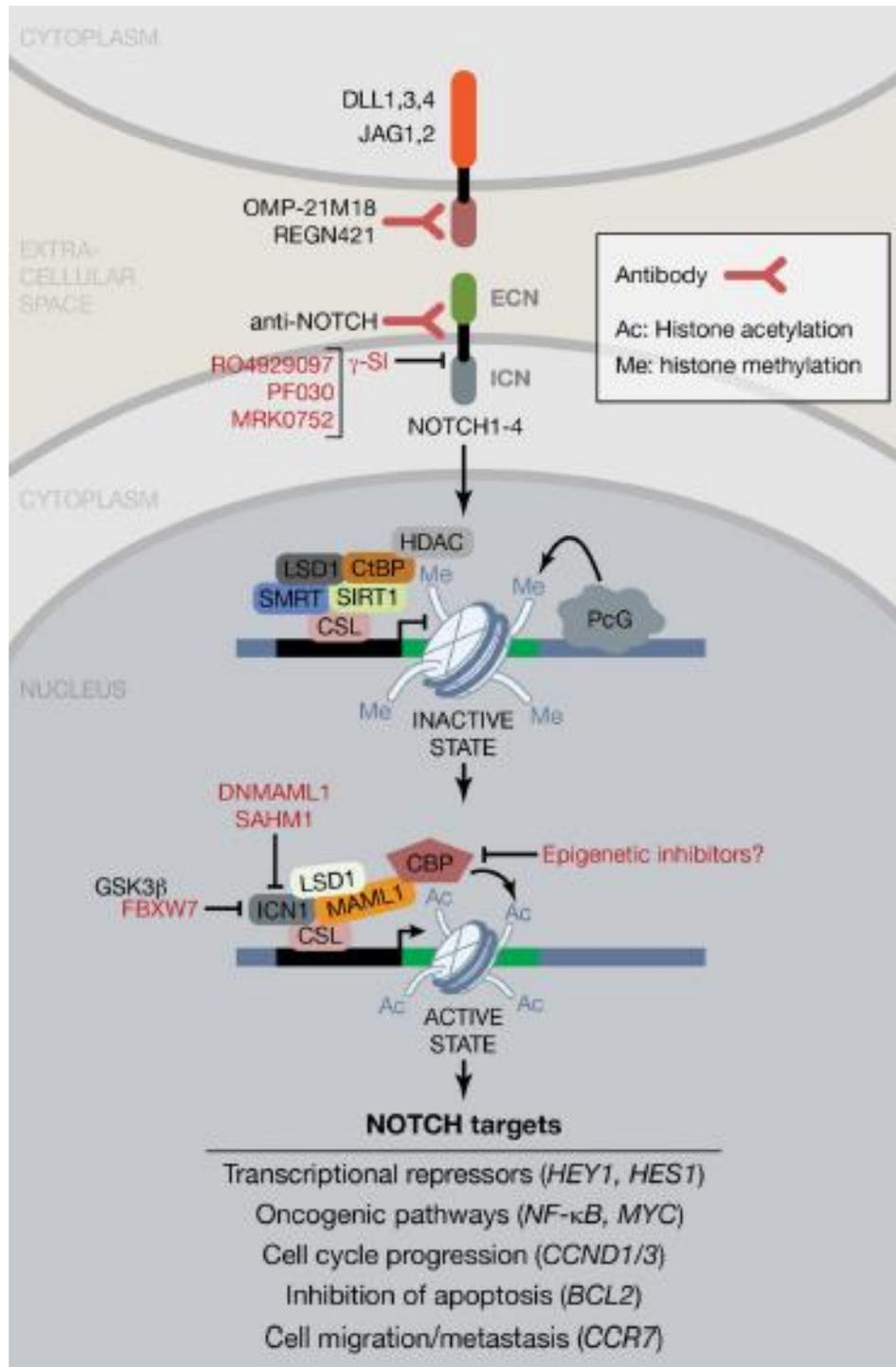


Figura 6. Vista general de la cascada de señalización Notch. Tomada de Ntziachristos, et. al., 2014.

SEL1L es una proteína adaptadora transmembranal que reside en el retículo endoplásmico, es altamente conservada, es un componente de la vía de respuesta a la proteína desplegada/degradación asociada al retículo endoplásmico (UPR/ERAD), el cual tiene como función llevar a cabo un control de las proteínas conservadas del retículo endoplásmico (Mellai, et. al., 2020), actuando como un guardián para garantizar que se produzca el plegamiento adecuado de proteínas antes de ser transportadas a su destino funcional (Ashktorab, et. al., 2012). Además la vía UPR/ERAD se desencadena debido a estrés celular, hipoxia, especies reactivas de oxígeno y privación de nutrientes, comúnmente presentes en el microambiente tumoral (Mellai, et. al., 2020). Existe una asociación entre la proteína SEL1L con la señalización Notch al contribuir como un regulador negativo de la familia de proteínas Notch (Biunno, et. al., 2006; Blancas, et. al., 2019).

SEL1L se encuentra involucrada en la progresión tumoral en varias neoplasias malignas (Biunno, et. al., 2006; Cattaneo, et. al., 2011; Kim, et. al., 2015; Mellai, et. al., 2015; Mellai, et. al., 2020), desempeñando un papel oncogénico o supresor tumoral según el contexto celular (Mellai, et. al., 2020). La función de SEL1L aún no está del todo clara, pero lo que sí se sabe es que se encuentra desregulada a la baja en el cáncer de mama, de páncreas (Ashktorab, et. al., 2012; Kim, et. al., 2015; Mellai, et. al., 2020) y adenocarcinoma ductal pancreático (Biunno, et. al., 2006; Liu, et. al., 2012; Mellai, et. al., 2015), y al alza en los cánceres de próstata, pulmón, cérvix, esófago (Ashktorab, et. al., 2012; Mellai, et. al., 2020), colorrectal y gliomas (Mellai, et. al., 2015; Blancas, et. al., 2019; Mellai, et. al., 2020). Sin embargo, aún no se han informado ningún dato sobre el papel de la proteína SEL1L en CT. Por lo que, se abre una nueva línea de investigación destinada a describir el papel de la proteína SEL1L en el proceso tumorigénico del CT. Actualmente, no hay mucha literatura sobre este gen, lo que resulta en la dificultad de generar una teoría precisa sobre la función de la proteína (Biunno, et. al., 2006), pero, a pesar de ello, se ha propuesto a SEL1L como un marcador de diagnóstico y pronóstico (Mellai, et. al., 2015).

La vía de señalización Notch ha demostrado estar íntimamente involucrada en la tumorigénesis de distintos tipos de neoplasias como el CT, por lo que se ha ganado interés como diana terapéutica (Guenter, et. al., 2021). Existe poca evidencia de los cuatro receptores Notch y en el caso de la proteína SEL1L, se describirá por primera vez su valor pronóstico en pacientes con CDT. Se ha considerado el uso de paneles de proteínas, proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos anti sentido y terapia génica, en el desarrollo de agentes antineoplásicos, con prometedores resultados (Santos, et. al., 2006).

En la **Tabla 3** se muestran las proteínas con las que se ha trabajado actualmente en el CDT y que se sugieren como biomarcadores de positividad, de pronóstico y/o con objetivo terapéutico.

Tabla 3. Proteínas utilizadas actualmente que desempeñan un papel en el CDT como biomarcadores de positividad, de pronóstico y/o con objetivo terapéutico.

| Molécula | Función | Referencia |
|-----------------|--|-----------------------|
| NOTCH1 | Regulación del comportamiento y destino celular. | Piana, et. al., 2019 |
| NOTCH2 | Regulación del comportamiento y destino celular. | En este estudio |
| NOTCH3 | Regulación del comportamiento y destino celular. | Somnay, et. al., 2017 |
| NOTCH4 | Regulación del comportamiento y destino celular. | Geers, et. al., 2011 |
| SEL1L | Participa en la homeostasis de la vía UPR/ERAD y el destino celular. | En este estudio |

2. OBJETIVOS

General

1. Evaluar la expresión proteínica de las moléculas de la familia de receptores Notch 1-4 y de la proteína SEL1L en muestras de tejidos de cáncer de tiroides por la técnica de inmunohistoquímica.

Particular

1. Estandarizar las condiciones de inmunohistoquímica para cada anticuerpo vs Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4 y SEL1L para el estudio de los tejidos con cáncer de tiroides en formato de microarreglo de tejidos (MAT).
2. Evaluar el nivel de expresión de las proteínas Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4 en una serie de neoplasias tiroideas de distintas variables histológicas del cáncer tiroideo.
3. Describir por primera vez la expresión de la proteína SEL1L en muestras neoplásicas de tejido tiroideo.
4. Analizar el nivel de expresión proteínica semicuantitativa de los MAT a través del software FIJI Image J.
5. Analizar los datos a través de la prueba estadística paramétrica T de Welch.
6. Describir las proteínas estudiadas como posibles marcadores de pronóstico o dianas terapéuticas para el Cáncer Diferenciado de Tiroides con el propósito de dilucidar el papel de cada molécula en el cáncer de tiroides.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad los nódulos tiroideos son muy comunes en la población general y su diagnóstico sigue teniendo controversias para distinguir entre nódulos benignos y malignos, siendo en su mayoría, benignos. Por lo tanto, se necesita de la búsqueda de ciertos marcadores que caractericen mejor las lesiones indeterminadas de lo que ya se ha hecho con los métodos citológicos y con estudios de biología molecular. La búsqueda de estos marcadores de malignidad es de gran importancia y confiabilidad, resultando muy útiles para el pronóstico, diagnóstico diferencial y el posterior tratamiento del paciente. La Inmunohistoquímica es una técnica confiable que puede servir como una herramienta en el pronóstico y en la detección de rutina en pacientes con cáncer diferenciado de tiroides.

4. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, dentro de los diferentes tipos de neoplasias que afectan a mujeres, destaca el cáncer de mama, el cervicouterino y el de tiroides. El carcinoma de tiroides es la tercera causa de muerte, incidencia y prevalencia por cáncer en México, ocupando el primero y el segundo lugar el cáncer de pulmón y el de próstata, respectivamente.

Lamentablemente el diagnóstico del cáncer de tiroides ha sido controversial debido al porcentaje tan variable para distinguir entre nódulos benignos y malignos, por lo que es adecuado buscar ciertas proteínas o paneles de proteínas para brindar un buen pronóstico/diagnóstico y dar un mejor tratamiento a pacientes con cáncer. Además de proponerlos como marcadores de pronóstico, blanco terapéutico o como nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de tiroides. Un marcador fiable para el cáncer diferenciado de tiroides en muestras de biopsias embebidas en parafina fijadas con formalina analizadas por Inmunohistoquímica son los receptores Notch, por su importancia en los mecanismos moleculares descritos en la sección “Vía de Señalización Notch y SEL1L” del apartado de marco teórico.

5. HIPÓTESIS

La vía de señalización Notch participa en diferentes mecanismos claves de la célula, como son la proliferación, diferenciación y apoptosis. También se ha reportado que tiene un papel relevante en diferentes carcinomas humanos. Se ha demostrado que en el cáncer de tiroides la familia de receptores Notch están íntimamente involucrados en la tumorigénesis. Por tanto, al analizar la expresión de estos receptores y la proteína SEL1L en diferentes tejidos de cáncer de tiroides, específicamente del cáncer diferenciado de tiroides y de tejidos normales mediante la técnica de inmunohistoquímica, se observará una sobreexpresión de los receptores Notch y de la proteína SEL1L en los tejidos tumorales, lo cual nos llevara a proponerlos como biomarcadores potenciales para el pronóstico y el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de tiroides.

6. METODOLOGÍA

Para este proyecto se utilizaron bloques de parafina donadas por el archivo del Departamento de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” en San Luis Potosí, México. Todos los casos fueron muestras quirúrgicas de diagnóstico de rutina, incluidas biopsias y todas con diagnóstico confirmado.

Los moldes de parafina para los MAT se elaboraron con el equipo de centro de inclusión de tejidos (Biomedical Embedding Center KD-BMII, China Jinhua kedi, Co., LTD). La construcción de los bloques de MAT se realizó a partir de cortes cilíndricos de 1.5 mm con el microarrayer de tejidos manual Quick-Ray (IHC WORLD, LLC) de cada bloque que contiene las biopsias embebidas en parafina tejido normal y de tejido con CT (**Anexo 1**). En el MAT se incluyeron biopsias de tiroides de 45 pacientes de los cuales se tomaron 4 biopsias de tejido normal tiroideo y 21 de tumores malignos (incluyen biopsias de Macropapilar, Micropapilar, CPT clásico, VFCPT, CPT variante oxifílica y CPT con variante células en estoperol. Cabe señalar, que las muestras fueron seleccionadas en base al diagnóstico patológico a partir de la tinción por Hematoxilina y Eosina (H&E), para seleccionar el área de interés en cada bloque.

Después de la construcción de los bloques de MAT con las biopsias embebidas, fueron invertidas y calentadas a 50 °C durante 2 horas (**Anexo 1**). Posteriormente se realizaron cortes con un micrótopo semiautomático (modelo KD 3368, Keede), ajustados a un grosor de 8 µm. Los cortes se colocaron en portaobjetos limpios y secos. Finalmente fueron secados en el horno de hibridación y teñidos con H&E para evaluar la integridad del tejido (**Anexo 2**). La inmunotinción se realizó utilizando anticuerpos de conejo, el cual se explica en la **tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones de la inmunohistoquímica.

| | Anticuerpo y compañía | Fuente | Desenmascaramiento antigénico | Concentración del Ac |
|----------|--|-----------------------|--|-----------------------------|
| 1 | Notch1 (Abcam ab52627) | Conejo- monoclonal | 80°C, Buffer de citratos pH6, 2 minutos | 1:200 |
| 2 | Notch2 (Novus Biologicals NB600–879) | Conejo- policlonal | Sin Desenmascaramiento | 1:800 |
| 3 | Notch3 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. sc-5593) | Conejo- policlonal | Sin Desenmascaramiento | 1:100 |
| 4 | Notch4 (Abcam ab33163) | Conejo- policlonal | Sin Desenmascaramiento | 1:100 |
| 5 | SEL1L (Abcam ab78298) | Conejo- policlonal | Sin Desenmascaramiento | 1:200 |

Previo a la IHQ, los cortes son desparafinados y rehidratados en concentraciones decrecientes de etanol y agua destilada. Para el caso de Notch1 se requirió de la recuperación del antígeno, que se realiza mediante calor por horno de microondas siguiendo la técnica descrita por Corominas de 1997, modificada, durante 2 minutos a una temperatura de entre los 80 y 100°C en tampón de citrato de sodio (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0) (**Anexo 3**). Seguidamente las laminillas de tejido fueron sumergidas en PBS 1X durante 10 minutos, previo al procedimiento de tinción.

El procedimiento de inmunotinción se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones de los kits Superpicture 3rd Gen IHQ Detection (Invitrogen, Life Technologies) y SuperPicture Polymer Detection, para anticuerpos primarios de ratón, conejo o cabra, respectivamente (Invitrogen, Life Technologies). La inhibición de la Peroxidasa endógena se realizó con una solución QUENCHING Peroxidasa 3%.

Posteriormente se bloquearon los sitios de unión no específicos, utilizando 20 mg/mL de albumina de suero bovino (BSA). Las laminillas se incubaron 12 horas durante la noche a 4°C en una cámara humificadora con los anticuerpos primarios. Pasada la noche se incubó con HRP Polymer Conjugate (MACH 4 Universal HRP-Polymer), seguido de un cromógeno DAB (Betazoid DAB Chromogen Kit, Biocare Medical, Lot. 081519). Una vez realizado esto, las muestras se deshidrataron en etanol, se aclararon en Xileno, seguido de una contratinción con Hematoxilina y finalmente fueron fijadas las muestras con resina sintética (**Anexo 4**). Los MAT se observaron con un microscopio Leica DSM750, y de cada núcleo se obtuvieron fotografías en formato TIFF con el software LAS EZ v2.0.0 para Windows (Leica Microsistema).

Cuantificación de tinción

El análisis IHQ de las imágenes de MAT obtenidas fue realizado con el software gratuito de código abierto FIJI de Image-J2 (<https://fiji.sc/>). Los análisis de tinción de las imágenes tomadas en formato TIFF se realizaron utilizando el plug-in Colour deconvolution para el conteo de células y la medición del área mediante un ajuste en el umbral. El procedimiento se llevó a cabo como se indica en el manual de “Análisis Inmunohistoquímico de imágenes en Image-J” (**Anexo 5**).

Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm el error estándar (SEM por sus siglas en inglés). Los valores obtenidos de la cuantificación de tinción se evaluaron estadísticamente por medio de la prueba t de Student con corrección de Welch utilizando el software GraphPad Prism versión 9.3.1 para Windows (software GraphPad Prism, San Diego, CA) con un nivel de confianza del 95%. Los valores de $P \leq 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

7. RESULTADOS

Expresión de proteínas de la vía de señalización NOTCH y tumorigénesis en el cáncer diferenciado de tiroides.

Basándonos en la tinción por la técnica de IHQ por MAT descrita en el apartado de Metodología, el cual se llevó a cabo en un total de 25 muestras procedentes del archivo del Departamento de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” en San Luis Potosí, los cuales estuvieron representadas por 4 casos de tejido tiroideo no tumoral (16 %) y 21 casos de neoplasias tiroideas malignas (84 %), siendo 2 de Micropapilar (8 %), 8 de VFCPT (32 %), 3 de papilar clásico con variante células en estoperol (12 %), 1 Macrofolicular (4%), 1 de CPT variante oxifílica (4 %) y 6 de CPT (24%).

Se realizó un análisis comparativo entre los niveles medios de expresión de las proteínas de la vía Notch en un MAT que contenía muestras de tejido normal y tejido canceroso, donde, Notch 1 se incluyó como biomarcador o molécula clave, y Notch 2, Notch 3, Notch 4 y SEL1L como moléculas a analizar. La expresión del panel de proteínas presentadas, muestra una mayor expresión diferencial en los tejidos tumorales que en los tejidos normales, como se presenta en la **Figura 4**. Los tejidos normales tiroideos exhiben niveles basales de proteína contra una fuerte inmunoreactividad positiva observada en los tejidos tumorales. Sin embargo, Notch 1 mostró una inmunotinción alta tanto en tejido tiroideo normal como en tejido tumoral, pero no mayor que en tejidos tumorales, observándose patrones similares de reactividad entre tejidos, esto también descrito por Kim, *et. al.*, en el 2017. Ver **gráfico 2**.

Niveles de expresión de la vía de señalización Notch.

El análisis comparativo se llevó a cabo entre la expresión media de los tejidos normales y de los tejidos con CDT en función de los datos arrojados por el análisis inmunohistoquímicos con el software FIJI de Image-J2. Según nuestros hallazgos obtenidos, los 5 conjuntos de datos obtuvieron una regulación positiva. Con relación a los niveles medios de expresión en el CDT, Notch 1 y SEL1L mostraron una

sobreexpresión en sus muestras respecto a las demás proteínas presentadas. Por otro lado, Notch 2 y Notch 3 mostraron una clara baja expresión en comparación con las otras moléculas, ver **gráfico 2 y figura 5**.

Figura 4. Tinción Inmunohistoquímica de los MAT. Imágenes representativas de los MAT en tejido normal y en tejido tumoral. Muestras con tinción DAB/Hematoxilina de pacientes mexicanas, en las que se observa la diferencia de expresión entre tejidos y proteínas.

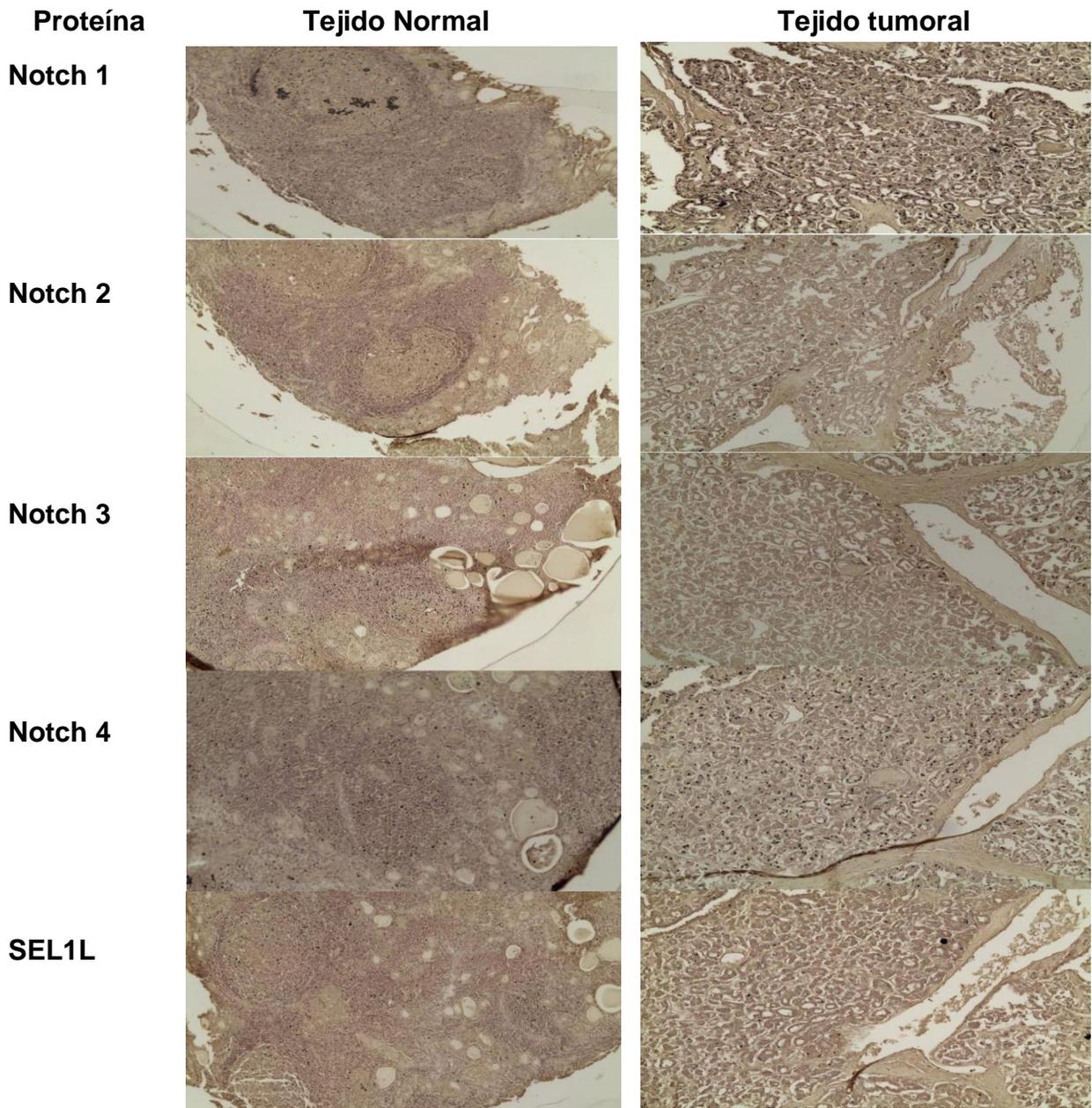
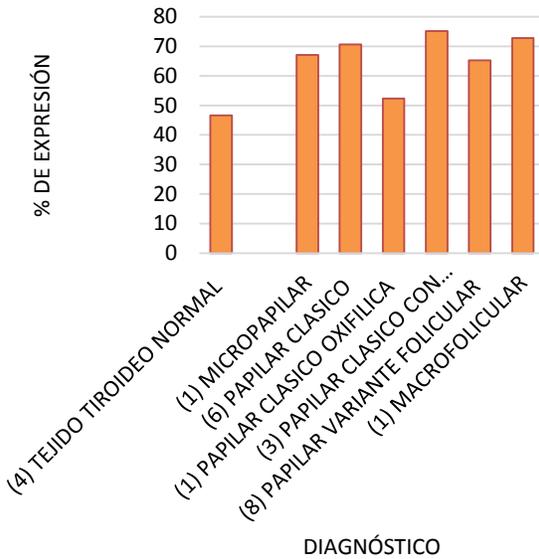
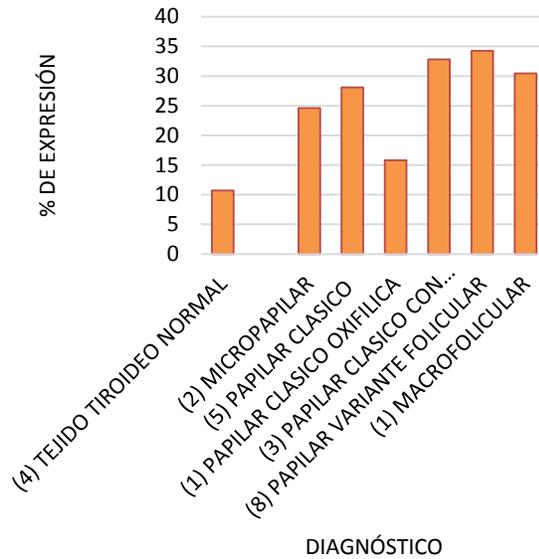


Gráfico 2. Porcentajes de expresión de cada área y por proteína en tejidos tumorales de cada histotipo del CDT y de tejidos normales.

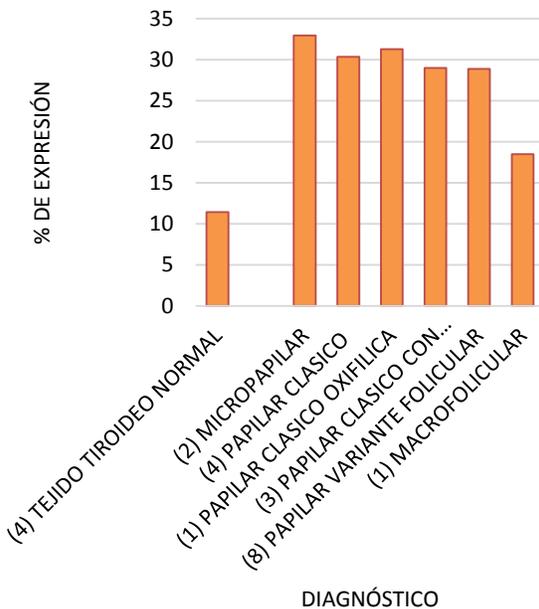
NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIA POR VARIANTE DE NOTCH 1, EXPRESADO EN % DE ÁREA



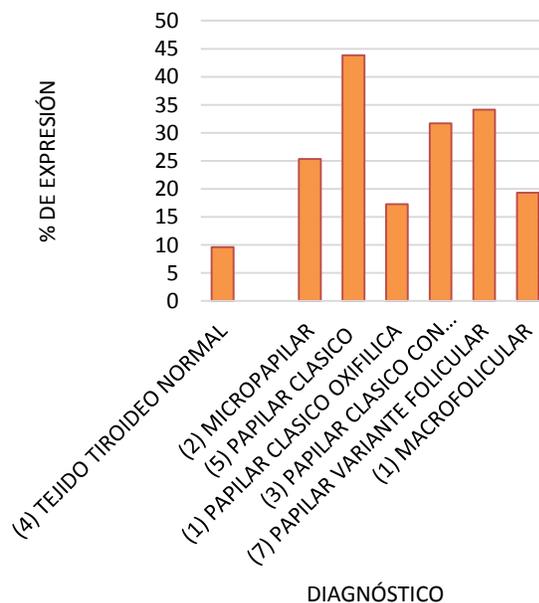
NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIA POR VARIANTE DE NOTCH 2, EXPRESADO EN % DE ÁREA



NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIA POR VARIANTE DE NOTCH 3, EXPRESADO EN % DE ÁREA



NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIA POR VARIANTE DE NOTCH 4, EXPRESADO EN % DE ÁREA



NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIA POR VARIANTE DE SEL1L, EXPRESADO EN % DE ÁREA

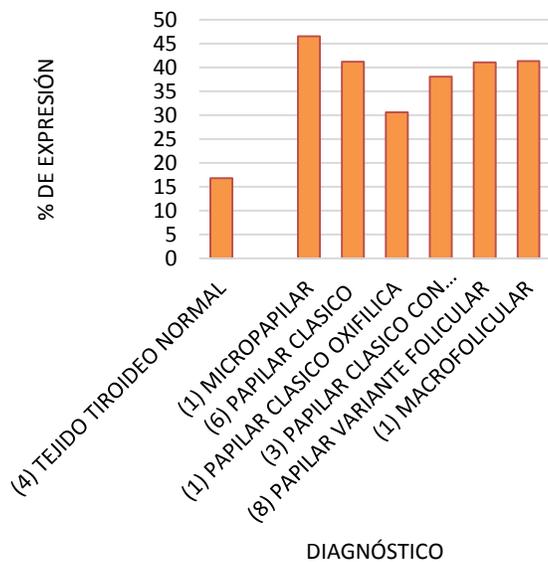
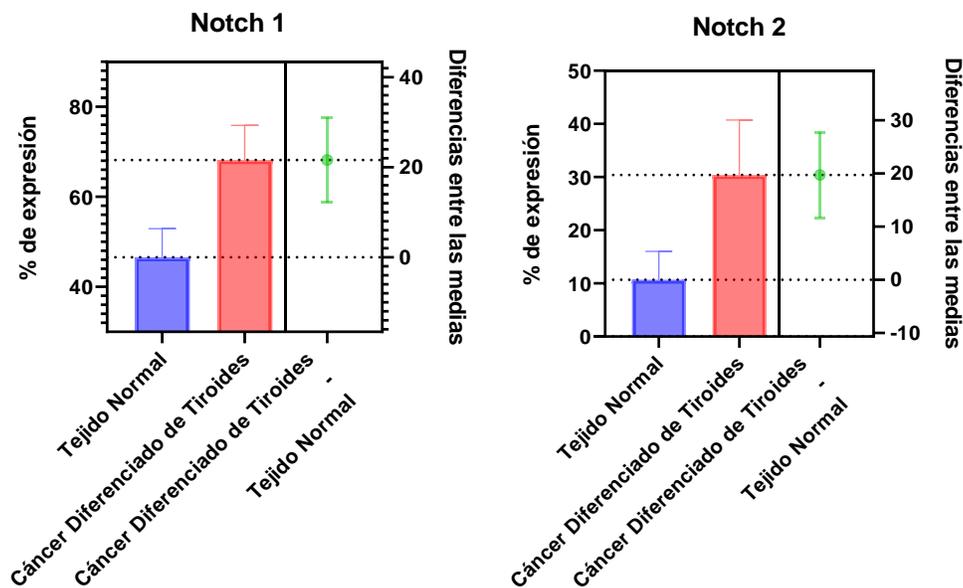
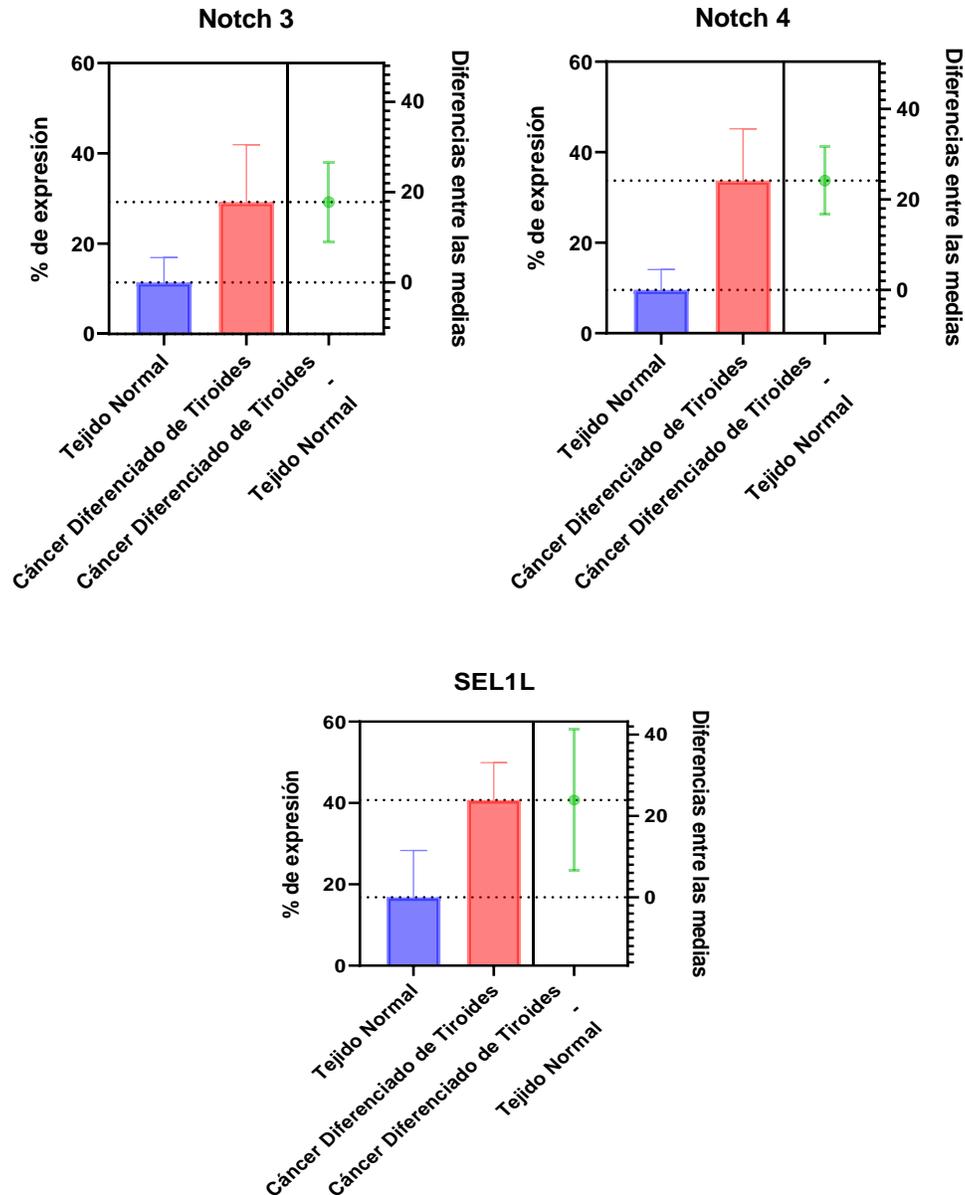


Figura 5. Niveles de expresión de los receptores de la vía de señalización Notch en CDT.





Usando los datos arrojados de la prueba t en el software GraphPad Prism, se realizó un análisis diferencial en la expresión media, acerca de los niveles de expresión de los receptores de la familia Notch y de la proteína SEL1L en tejidos cancerosos y en tejidos normales, este se puede ver resumido en la **Tabla 4**. De acuerdo a la información del conjunto completo de proteínas, se analizaron y el R^2 ajustado (0.6363 - 0.8780) mostró una alta positividad en la expresión de Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4 y SEL1L en pacientes con CDT, entre los que destaca NOTCH1 y SEL1L.

Tabla 4. Resumen de los resultados del análisis estadístico arrojado por el software GraphPad Prism por proteínas en el MAT.

| Proteína | Tipos celulares analizados | Valor F | Valor P | AdjR² | t Student | Diferencia entre medias ± SEM |
|-----------------|---|----------------|----------------|-------------------------|------------------|--------------------------------------|
| Notch 1 | Tejido tiroideo normal VS. Cáncer diferenciado tiroideo | 1.453 | 0.8595 | 0.8780 | t=5.957 | 21.63 ± 3.631 |
| Notch 2 | Tejido tiroideo normal VS. Cáncer diferenciado tiroideo | 3.770 | 0.3008 | 0.7874 | t=5.601 | 19.72 ± 3.521 |
| Notch 3 | Tejido tiroideo normal VS. Cáncer diferenciado tiroideo | 5.430 | 0.1885 | 0.6363 | t=4.449 | 17.78 ± 3.995 |
| Notch 4 | Tejido tiroideo normal VS. Cáncer diferenciado tiroideo | 6.572 | 0.1461 | 0.7915 | t=7.003 | 24.12 ± 3.444 |
| SEL1L | Tejido tiroideo normal VS. Cáncer diferenciado tiroideo | 1.575 | 0.4535 | 0.8037 | t=3.924 | 23.90 ± 6.090 |

8. DISCUSIÓN

El potencial clínico de los perfiles moleculares en el tratamiento del CT cada vez se reconoce más, aunque para el desarrollo personalizado sigue estando limitado por la escasez de marcadores biológicos adecuados con valor pronóstico y terapéutico, a lo que lleva, a la búsqueda en la capacidad de controlar y describir la señalización de Notch que contenga una gran relevancia para pacientes con CT (Inder, et. al., 2017).

La señalización de Notch es una vía fundamental involucrada en muchos aspectos de la biología del cáncer (Majumder, et. al., 2021), está íntimamente involucrada en la regulación de muchos procesos del destino celular durante el desarrollo y la homeostasis de una amplia gama de tejidos (Piana, et. al., 2019; Mahumder, et. al., 2020). Por lo que, su desregulación se relaciona con múltiples enfermedades en humanos (Wang, et. al., 2016). La vía Notch se le ha visto implicada en la patogénesis de distintos tipos de cáncer (Yamashita, et. al., 2013), en el CT se le ha asociado con funciones oncogénicas o supresoras tumorales y han sido ampliamente reconocidas (Piana, et. al., 2019; Hu, et. al., 2020). En total, los humanos expresan cuatro receptores Notch: Notch 1, Notch 2, Notch 3 y Notch 4, sí bien, el papel de Notch 1 en cánceres humanos ha sido muy bien estudiado (Jaskula-Sztul, et. al., 2015), existen muchos menos datos sobre los 3 miembros restantes de la familia de receptores Notch y hasta donde sabemos, este informe proporcionaría la primera investigación y descripción de la expresión de la proteína SEL1L en el CT, específicamente en CDT por la técnica de inmunohistoquímica.

Notch 1 es el prototipo y, por mucho, el miembro más estudiado de esta familia de receptores. Notch 1, como otros miembros de esta familia, ha estado involucrado en el desarrollo del CT (Piana, et. al., 2019). Hay distintos artículos que sugieren que Notch 1 tiene un papel contradictorio, porque se encuentra asociado tanto con la tumorigénesis como en la supresión tumoral (Park, et. al., 2012; Piana, et. al., 2019).

Por ejemplo, Ferreti *et. al.*, informó sobre la expresión a la baja de la proteína Notch 1 en los tejidos con cáncer de tiroides, incluido el CPT, comparado con los tejidos tiroideos normales, lo que sugiere, que podría estar relacionado con la supresión tumoral en algunos histotipos de CT. De igual forma Xiao, *et. al.*, mostro el papel de Notch 1 como un potencial supresor de tumores en líneas celulares de CFT y de la línea DRO de CPT con inhibidores de HDAC. Por su parte, Yu, *et. al.*, describe que los niveles de expresión de Notch 1 se encuentran a la baja en muestras de CDT en comparación con los tejidos tiroideos normales y, que la disminución de la expresión de Notch 1 en CDT se asocia con factores clínico-patológicos y una tasa de recurrencia mayor.

Paralelamente, Park, *et. al.*, y Yuan, *et. al.*, observaron que la sobreexpresión de Notch 1 puede desempeñar un papel oncogénico en el CPT y se correlaciona con una mayor presencia de metástasis ganglionares, extensión extratiroidea y un mayor tamaño tumoral. De igual forma se ha documentado que la sobreexpresión de Notch 1 juega un papel en la invasión metastásica en otros tipos de células cancerosas (Wang, *et. al.*, 2006; Zhang, *et. al.*, 2010; Chen, *et. al.*, 2015). Yamashita, *et al.*, observó una regulación positiva de la expresión de Notch 1 en muestras de tejido humano de CPT y en un modelo de ratón. Finalmente en 2019, Piana, *et. al.*, demuestra que la expresión de Notch 1 está restringida a las células tumorales y se asocia significativamente con el fenotipo maligno en los tumores derivados de folículos, además de que la expresión de Notch 1 se asocia en gran medida con el CPT, mientras que su expresión en tumores pobremente diferenciados es menos consistente.

Es importante destacar que los autores concluyeron que una mayor señalización de Notch 1 en CPT podría contribuir a un mal pronóstico para los pacientes, enfatizando un papel oncogénico de la señalización de Notch en CPT. (Guenter, *et. al.*, 2021). Con base en el presente estudio, demostramos mediante el análisis inmunohistoquímico, la inmunoreactividad positiva de la proteína Notch 1, el cual tiene un patrón de expresión general y que además, por lo descrito en nuestros

resultados y en varios estudios anteriores, la sobreexpresión de Notch 1 juega dos papeles importantes; un papel oncogénico en muestras de CDT y un papel pronóstico maligno. Posiblemente, como se ha observado en cáncer de páncreas, cáncer de colon y en el carcinoma quístico adenoide salival, la eliminación y la regulación a la baja de Notch1 ha llevado a ser propuesto objetivo candidato en la terapia contra el cáncer, por lo que, su modulación podría servir como una objetivo diana también para los cánceres de tiroides en humanos, específicamente en los CDT, todo dependiendo en gran medida del contexto celular. Sin embargo, aún se necesita de más investigaciones a largo plazo.

Se ha demostrado que Notch 2 induce muchos de los mismos efectos biológicos que Notch1 en tumores de origen neuroendocrino (Truong, et. al., 2011). La sobreexpresión y el papel oncogénico de Notch 2 se han observado en numerosos tipos de cáncer humano y tiene el potencial de servir como biomarcador predictivo en una variedad de cánceres. (Wang, et. al., 2016). En el CT y en tumores carcinoides, Notch 2 tiene efectos supresores de crecimiento y proapoptóticos (Galic, et. al., 2013).

Se hayaron niveles bajos pero relevantes de inmunoreactividad en Notch 2 en tejidos tumorales de CT por esta técnica en nuestro estudio, de manera similar a lo reportado por Gallo, *et. al.*, en el 2018, donde reporta una regulación ligeramente baja en tres líneas celulares de cáncer analizadas en comparación con tirocitos normales. La expresión de Notch 2 es variable y pueden estar relacionados con factores de enfermedad más agresivos. Sin embargo, aunque los datos no son tan expresivos como las demás proteínas analizadas, estos hallazgos sugieren un papel de oncogén para Notch 2 en el CDT. Por otro lado, en un estudio en CMT, se demostró que el Reservatrol suprime el crecimiento celular e induce la apoptosis, por el cual, Notch 2 se encuentra al alta en el CMT (Truong, et. al., 2011). Considerando lo dicho por la literatura y nuestros datos, se sugiere a Notch 2 como un biomarcador predictivo de enfermedad agresiva en el CT, se sugiere realizar más investigaciones sobre esta proteína.

La mayoría de la literatura que describe la señalización Notch en el CT se centra principalmente en la isoforma 1 (Notch 1), seguida de Notch 3 (Guenter, et. al., 2021). Notch 3 parece estar directamente implicado en la proliferación e invasión de células cancerosas, destacando como un receptor clave en la tumorigénesis tiroidea (Inder, et. al., 2017). La activación de Notch 3 en el CT ejerce un efecto antiproliferativo induciendo la apoptosis restaurando elementos de un fenotipo diferenciado y prediciendo el pronóstico de la enfermedad. En los especímenes de tiroides con fenotipos menos diferenciados y más malignos del CT los niveles de expresión de Notch 3 fueron bajos (Somnay, et. al., 2017). Sin embargo, la sobreexpresión de Notch 3 se ha correlacionado con la recurrencia del tumor, metástasis, diferenciación anormal y a un mal pronóstico (Morgan, et. al., 2013; Inder, et. al., 2017).

Somnay, *et. al.*, demostró que las características clínicas asociadas con peores resultados se correlacionan fuertemente con niveles bajos de Notch 3, por lo que esta proteína podría ser capaz de restaurar un fenotipo más diferenciado y desempeñar un papel en la terapia de rediferenciación del cáncer de tiroides. Park, *et. al.*, por su parte, describió la isoforma de Notch 3 por IHQ correlacionándolo con parámetros clínico-patológicos en pacientes con CPT, arrojando una expresión significativa pero no vinculadas a variables de pronóstico.

Nuestros datos nos dan como resultado una baja pero relevante expresión en Notch 3, que asociado con lo descrito por Somnay, *et. al.* Inferimos que Notch 3 se correlaciona definitivamente con la malignidad del CT y la baja expresión puede indicar el fenotipo desdiferenciado que tiene las muestras usadas en el estudio. Demostrando que la expresión de este receptor disminuye en muestras de tumores menos diferenciadas y malignas como son los CPT y los CFT, así como sus variantes. Lo que sugiere, que una modulación baja en la expresión de Notch 3 podría servir como diana terapéutica para el desarrollo personalizado de terapias contra el CT. De nuevo se menciona que se necesita realizar más estudios *in vivo* e *in vitro* para describir la relación entre la expresión de Notch 3 y el CT.

Existe una investigación mínima sobre el receptor Notch 4 y el CT (Santos, et. al., 2011; Guenter, et. al., 2021). En 2011, Geers, *et al.*, nos reporta sobre la sobreexpresión de Notch 1, Notch 4 y DLL4 especialmente en CPT, y sugiere que esta vía puede desempeñar un papel en la carcinogénesis y angiogénesis tiroidea. Al contrario, Gallo, *et. al.*, informa sobre niveles de expresión bajos y variables en las líneas celulares de CPT. En un estudio de expresión en cáncer gástrico, Notch 4 mostro altos niveles de transcripción asociada con una baja supervivencia (Hu, et. al., 2020). Como se puede ver en el apartado de Resultados, nosotros encontramos una inmunopositividad de la proteína Notch 4 en el CDT y al compararlos con los datos de Geers, *et al.*, podemos ver una relación similar en la sobreexpresión de la molécula en CPT.

Las funciones individuales y sinérgicas de cada receptor NOTCH aún no se conocen del todo en el CT. Al existir una mayor comprensión de cómo funciona la señalización de NOTCH en el CT, se podría llevar al avance en la búsqueda de mejores estudios y ensayos clínicos centrados en este receptor que produzcan mejores resultados para los pacientes (Guenter, et. al., 2021), ya que esta vía es esencial en las características del cáncer y se considera como un objetivo potencial en varias neoplasias malignas, tanto hematológicas como tumorales (Piana, et. al., 2019).

En conclusión, en nuestros ensayos y los datos reportados en la bibliografía, se reafirma que cualquier desequilibrio en los receptores de la vía de señalización de Notch influye en el potencial maligno en el cáncer de tiroides, especialmente en las variantes histológicas del CDT. En general, este estudio proporciona evidencia de que la familia Notch podría convertirse en blancos potenciales para el tratamiento y como biomarcadores en el pronóstico del cáncer tiroideo, dirigido en el CDT, del cual, más del 80% son de este subtipo neoplásico. Para darle veracidad a esta hipótesis, se realizó una tinción inmunohistoquímica mediante MAT para cada miembro de receptores Notch: de Notch1 a Notch 4, observando una importante expresión de cada proteína en tejidos de pacientes con CDT en comparación con tejidos normales tiroideos. Notch 1 muestra una mayor expresión que los otros

receptores Notch, lo que concluye a que la señalización de Notch 1 está involucrada en el desarrollo de enfermedad Vs. Notch 2, Notch 3 y Notch 4.

Respecto a SEL1L en cáncer, la expresión de esta proteína se ha observado en adenocarcinoma ductal pancreático y se propuso como un marcador de diagnóstico (Liu, et. al., 2012), de igual forma en cáncer de colon (Ashktorab, et. al., 2012). Por lo que, nuestro grupo de trabajo reporta esta proteína como un posible marcador en el pronóstico del CT. Sin embargo, se necesita estudiar más a fondo para conocer sobre su papel en la tumorigénesis tiroidea.

Esta es la primera descripción de la expresión de SEL1L en células de origen folicular de la tiroides y su papel de expresión que desempeña tanto en tejidos normales tiroideos, como en tejidos tumorales de CDT por la técnica de IHQ. Los resultados evidencian un nivel de expresión alto, como el receptor Notch 1. Así, es posible confirmar que la sobreexpresión de SEL1L está asociado con la tumorigénesis tiroidea y progresión tumoral no solo en cánceres de próstata, pulmón, cérvix, esófago y colorrectal, sino ahora también en el CT, específicamente en muestras de CDT, desempeñando un papel oncogénico en esta neoplasia. Se propone por lo tanto a SEL1L, como un marcador potencial en carcinomas tiroideos.

9. CONCLUSIÓN

En este estudio llevamos a cabo investigaciones para dar a conocer cómo la señalización Notch se ve afectada y alterada en pacientes con CT, además de que se identificaron factores clave en la carcinogénesis tiroidea que deben evaluarse mas a profundidad para el desarrollo de terapias contra el CT. Se presentaron las condiciones estándar de cada anticuerpo presentado para la realización de la inmunohistoquímica por microarreglos de tejido.

Se analizaron los niveles de expresión de los 4 receptores Notch y de la proteína SEL1L entre muestras de tejidos tiroideos normales vs la de pacientes con CDT, y de acuerdo con los resultados del análisis, las muestras con CT tuvieron una expresión positiva frente a las muestras normales, habiendo una mayor expresión en las proteínas Notch 1 y SEL1L. Las evidencias que se presentan, junto con los antecedentes bibliográficos indican que el sistema de señalización Notch es un gran candidato en la terapia contra el CT, por lo tanto, su modulación ofrece una nueva estrategia para el tratamiento de los canceres tiroideos y sus variantes. La sobreexpresión de la familia Notch es prometedora y refuerza la propuesta de usarlos como biomarcadores de pronóstico y posiblemente en el diagnóstico del cáncer tiroideo, dado los resultados diferenciales con respecto al tejido normal. Estudios similares han reportado que los receptores Notch pueden utilizarse como marcadores de pronóstico y/o diagnóstico tanto para el CT como para otras neoplasias malignas. Además, se debe avanzar en el entendimiento de las bases moleculares de esta neoplasia, y de igual forma, seguir buscando mejores ensayos clínicos centrados en la familia Notch que proporcionen nuevos blancos terapéuticos para llevarlos a la práctica clínica en beneficio de los pacientes con CT.

Finalmente, se reporta la primera semicuantificación en los niveles de expresión proteica en los cuatro miembros de la familia Notch y la primera descripción en la expresión de SEL1L en tejidos tumorales tiroideos mediante el uso de microarreglos de tejidos por la técnica de inmunohistoquímica, así como el papel que desempeña la señalización de Notch en la tumorigénesis tiroidea.

10. PERSPECTIVAS

Se sabe que los miembros de la vía Notch se encuentran desregulados en el cáncer de tiroides y su posible modulación con algún agente o molécula puede brindar una diana terapéutica para el tratamiento del cáncer tiroideo, sin embargo, se requieren más estudios para confirmar y validar esta propuesta, así como, se necesita de más estudios para validar el panel presentado como biomarcadores en el pronóstico y/o diagnóstico del cáncer tiroideo. Por tanto, se proponen las siguientes perspectivas para futuras investigaciones:

1. Estudiar más los miembros poco estudiados de la familia Notch (Notch 2 y 4) para probar su utilidad como biomarcadores del cáncer tiroideo.
2. Estudiar más a fondo la proteína SEL1L para conocer más sobre su papel en la tumorigénesis tiroidea.
3. Ampliar la cantidad de muestras a analizar y realizar un estudio comparativo por variantes con el panel de proteínas que se presenta.
4. Analizar el panel de proteínas en muestras de carcinoma de tiroides pobremente diferenciado y de carcinoma de tiroides derivado de células C parafoliculares.
5. Agrandar el panel de proteínas presentado, con el fin de conocer más moléculas involucradas en la tumorigénesis tiroidea.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Aarestrup, J., Kitahara, C. M., & Baker, J. L. (2019). Birthweight and risk of thyroid cancer and its histological types: A large cohort study. *Cancer epidemiology*, 62, 101564.
2. Acquaviva, G., de Biase, D., Diquigiovanni, C., Argento, CM, De Leo, A., Bonora, E., Rhoden, KJ, Pession, A. y Tallini, G. (2020). Mutaciones del exón 15 de BRAF en el carcinoma papilar y el parénquima tiroideo adyacente: una búsqueda de los eventos moleculares tempranos asociados con el desarrollo de tumores. *Cánceres*, 12 (2), 430.
3. Asa S. L. (2019). The Current Histologic classification of Thyroid Cancer. *Endocrinol. Metab. Clin. A. M.* 48. 1-22.
4. Aschebrook-Kilfoy, B., Shu, X. O., Gao, Y. T., Ji, B. T., Yang, G., Li, H. L., Rothman, N., Chow, W. H., Zheng, W., & Ward, M. H. (2013). Thyroid cancer risk and dietary nitrate and nitrite intake in the Shanghai women's health study. *International journal of cancer*, 132(4), 897–904.
5. Ashktorab, H., Green, W., Finzi, G., Sessa, F., Nouraie, M., Lee, EL, Morgano, A., Moschetta, A., Cattaneo, M., Mariani-Costantini, R., Brim, H. y Biunno, I. (2012). SEL1L, una proteína de respuesta UPR, un marcador potencial de transformación de células colónicas. *Enfermedades y ciencias digestivas*, 57 (4), 905–912.
6. Ancker, O. V., Krüger, M., Wehland, M., Infanger, M., & Grimm, D. (2019). Multikinase Inhibitor Treatment in Thyroid Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(1), 10.
7. Baloch, Z. W., Asa, S. L., Barletta, J. A., Ghossein, R. A., Juhlin, C. C., Jung, C. K., LiVolsi, V. A., Papotti, M. G., Sobrinho-Simões, M., Tallini, G., & Mete, O. (2022). Overview of the 2022 WHO Classification of Thyroid Neoplasms. *Endocrine pathology*, 33(1), 27–63.
8. Banik, K., Ranaware, A. M., Harsha, C., Nitesh, T., Girisa, S., Deshpande, V., Fan, L., Nalawade, S. P., Sethi, G., & Kunnumakkara, A. B. (2020). Piceatannol: A natural stilbene for the prevention and treatment of cancer. *Pharmacological research*, 153, 104635.

9. Bibiano, P. M. (2016). Comparación de dos métodos para cuantificar la expresión del receptor de IFN γ detectado por Inmunohistoquímica. *Tlamati Sabiduría*, Volumen 7 Número Especial 2.
10. Biunno I, Cattaneo M, Orlandi R, Canton C, Biagiotti L, Ferreo S, Barberis M, Pupa SM, Scarpa A, Ménard S. (2006). SEL1L una proteína multifacética que juega un papel en la progression tumoral. *J Cell Physiol*. 208: 23-38.
11. Blancas, S., Medina-Berlanga, R., Ortíz-García, L. et al. (2019). Protein Expression Analysis in Uterine Cervical Cancer for Potential Targets in Treatment. *Pathol. Oncol. Res*. 25, 493–501.
12. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424.
13. Brehar, A. C., Brehar, F. M., Bulgar, A. C., & Dumitrache, C. (2013). Genetic and epigenetic alterations in differentiated thyroid carcinoma. *Journal of medicine and life*, 6(4), 403–408.
14. Cabanillas, M. E., McFadden, D. G., & Durante, C. (2016). Thyroid cancer. *The Lancet*, 388(10061), 2783–2795.
15. Cano V. A. (2009). Aspectos histológicos del cáncer diferenciado de tiroides. *Cancerología*, Vol. 9. 73-83.
16. Cañadas-Garre, M., Becerra-Massare, P., López de la Torre-Casares, M., Villar-del Moral, J., Céspedes-Mas, S., Vílchez-Joya, R., Muros-de Fuentes, T., García-Calvente, C., Piédrola-Maroto, G., López-Nevot, M. A., Montes-Ramírez, R., & Llamas-Elvira, J. M. (2012). Reduction of false-negative papillary thyroid carcinomas by the routine analysis of BRAF (T1799A) mutation on fine-needle aspiration biopsy specimens: a prospective study of 814 thyroid FNAB patients. *Annals of surgery*, 255(5), 986–992.
17. Casaril, A., Inama, M., Impellizzeri, H., Bacchion, M., Creciun, M., & Moretto, G. (2020). Thyroid follicular microcarcinoma. *Gland. Surgery*, 9 (Suppl 1), 54 – 60.
18. Castelblanco, E. E. (2014). Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo. (Tesis Doctoral). Universidad de

Lleida, España.

19. Cattaneo, M., Lotti, LV, Martino, S., Alessio, M., Conti, A., Bachi, A., Mariani-Costantini, R. y Biunno, I. (2011). La secreción de nuevas variantes endógenas de SEL1L es promovida por estrés ER/UPR a través de endosomas y vesículas desprendidas en células cancerosas humanas. *PloS uno*, 6 (2), e17206.
20. Chang, L. A., Miller, D. L., Lee, C., Melo, D. R., Villoing, D., Drozdovitch, V., Thierry-Chef, I., Winters, S. J., Labrake, M., Myers, C. F., Lim, H., Kitahara, C. M., Linet, M. S., & Simon, S. L. (2017). Thyroid Radiation Dose to Patients from Diagnostic Radiology Procedures over Eight Decades: 1930-2010. *Health physics*, 113(6), 458–473.
21. Chen, W., Cao, G., Yuan, X., Zhang, X., Zhang, Q., Zhu, Y., Dong, Z., & Zhang, S. (2015). Notch-1 knockdown suppresses proliferation, migration and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma cells. *Journal of translational medicine*, 13, 167.
22. Cho, U., Oh, WJ, Bae, JS, Lee, S., Lee, YS, Park, GS, Lee, YS y Jung, CK (2014). Características clínico-patológicas de mutaciones raras de BRAF en pacientes coreanos con cáncer de tiroides. *Revista de ciencia médica coreana*, 29 (8), 1054–1060.
23. Chiganer, G., Ghersevich, S., Sánchez, A. & Novelli, J. L. (2011). Biología molecular en el cáncer de tiroides. *Rev. Méd. Rosario*, 77: 147-156.
24. Chung, K., Yang, S. K., Lee, G. K., Kim, E. Y., Kwon, S., Lee, S. H., Kim, S. W. (2006). Detection of BRAFV600Emutation on fine needle aspiration specimens of thyroid nodule refines cyto-pathology diagnosis, especially in BRAFV600Emutation-prevalent area. *Clinical Endocrinology*, 65(5), 660–666.
25. Cook, M., Yu, X. M., & Chen, H. (2010). Notch in the development of thyroid C-cells and the treatment of medullary thyroid cancer. *American journal of translational research*, 2(1), 119–125.
26. Corominas, J. M. (1997). Desenmascaramiento y recuperación de antígenos en inmunohistoquímica. Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad del Mar, Facultad de Medicina, UAB, Barcelona. (30)1.

27. Da Silva, J. G., de Moraes, R. M., da Silva, I., & de Arruda Mancera, P. F. (2019). Mathematical models applied to thyroid cancer. *Biophysical reviews*, 11(2), 183–189.
28. De Dios, S. M. & Acosta, H. G. (2018). Guía de inmunohistoquímica para técnicos. 1era edición. Ciudad autónoma de Buenos Aires; Instituto Nacional del Cáncer.
29. Duraiyan, J., Govindarajan, R., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4 (Suppl 2), S307–S309.
30. Elizondo C. A. (2014). Histopatología del cáncer de tiroides. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXX1. VOL. 610. 253-258.*
31. Enewold, L., Zhu, K., Ron, E., Marrogi, A. J., Stojadinovic, A., Peoples, G. E., & Devesa, S. S. (2009). Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(3), 784–791.
32. Fagin, J. A., & Wells, S. A., Jr (2016). Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *The New England journal of medicine*, 375(11), 1054–1067
33. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Observatorio Global del Cáncer: Cancer Today. Lyon, Francia: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today>, consultado el día 28 de enero del 2021.
34. Ferrari, SM, Fallahi, P., Antonelli, A. y Benvenga, S. (2017). Problemas ambientales en las enfermedades de la tiroides. *Frontiers in endocrinology*, 8, 50.
35. Ferretti, E., Tosi, E., Po, A., Scipioni, A., Morisi, R., Espinola, M. S., Russo, D., Durante, C., Schlumberger, M., Screpanti, I., Filetti, S., & Gulino, A. (2008). Notch signaling is involved in expression of thyrocyte differentiation markers and is down-regulated in thyroid tumors. *The Journal of clinical endocrinology and*

- metabolism, 93(10), 4080–4087.
36. Fiore, E., & Vitti, P. (2012). Serum TSH and risk of papillary thyroid cancer in nodular thyroid disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(4), 1134–1145.
 37. Fu, H., Ma, C., Guan, W., Cheng, W., Feng, F., & Wang, H. (2016). Expression of Notch 1 receptor associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid carcinoma. *OncoTargets and therapy*, 9, 1519–1523.
 38. Fuentes, S. E. (2014). Características citológicas de las variantes de mal pronóstico de carcinoma papilar de tiroides diagnosticado en un año en el Instituto Nacional de Cancerología. [Curso de alta especialidad en citopatología]. Universidad Nacional Autónoma de México.
 39. Furukawa, S., Nagaike, M., & Ozaki, K. (2017). Databases for technical aspects of immunohistochemistry. *Journal of toxicologic pathology*, 30 (1), 79–107.
 40. Fussey, JM, Beaumont, RN, Wood, AR, Vaidya, B., Smith, J. y Tyrrell, J. (2020). ¿La obesidad causa cáncer de tiroides? Un estudio de aleatorización mendeliana. *Revista de endocrinología clínica y metabolismo*, 105 (7).
 41. Galic, V., Shawber, C. J., Reeves, C., Shah, M., Murtomaki, A., Wright, J., Herzog, T., Tong, G. X., & Kitajewski, J. (2013). NOTCH2 expression is decreased in epithelial ovarian cancer and is related to the tumor histological subtype. *Pathology discovery*, 1, 4.
 42. Gallardo, E., Medina, J., Sánchez, J. C., Viúdez, A., Grande, E., Porras, I., Ramón Y Cajal, T., Trigo, J., Iglesias, L., & Capdevila, J. (2020). SEOM clinical guideline thyroid cancer 2019. *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 22(2).
 43. Gallo, C., Fragiasso, V., Donati, B., Torricelli, F., Tameni, A., Piana, S. y Ciarrocchi, A. (2018). El factor de transcripción bHLH DEC1 promueve la agresividad del cáncer de tiroides mediante la interacción con NOTCH1. *Muerte celular y enfermedad*, 9 (9), 871.
 44. Geers, C., Colin, I. M., & Gérard, A. C. (2011). Delta-like 4/Notch pathway is differentially regulated in benign and malignant thyroid tissues. *Thyroid: official*

- journal of the American Thyroid Association, 21(12), 1323–1330.
45. Granados G. M., Estrada L. E. & Apodaca, C. Á. (2009). Cáncer Diferenciado de la Tiroides: Aspectos Generales. *Cancerología* 4: 65-71.
 46. Grani, G., Lamartina, L., Durante, C., Filetti, S., & Cooper, D. S. (2018). Follicular thyroid cancer and Hürthle cell carcinoma: challenges in diagnosis, treatment, and clinical management. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 6(6), 500–514.
 47. Guenter, R., Patel, Z., & Chen, H. (2021). Notch Signaling in Thyroid Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 1287, 155–168.
 48. Handelsman, R. S., Alvarez, A. L., Picado, O., Farrá, J. C., & Lew, J. I. (2019). Inverse Relationship of BMI to TSH and Risk of Papillary Thyroid Cancer in Surgical Patients. *The Journal of surgical research*, 244, 96–101.
 49. Haroon Al Rasheed, MR y Xu, B. (2019). Alteraciones moleculares en el carcinoma de tiroides. *Clínicas de patología quirúrgica*, 12 (4), 921–930.
 50. Haymart, M. D. (2021). Progress and Challenges in Thyroid Cancer Management. *Endocrine Practice* 27, 1260 – 1263.
 51. Hernández, Ángel & Martin-Gil, Francisco Javier & Armentia, Alicia. (2009). Metodología y aplicaciones en proteómica clínica. *Diálisis y Trasplante*. 30. 139-143.
 52. Hu, J., Yu, J., Gan, J., Song, N., Shi, L., Liu, J., Zhang, Z., & Du, J. (2020). Notch1/2/3/4 are prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer. *Aging*, 12(3), 2595–2609.
 53. Ilie, M. I., Lassalle, S., Long-Mira, E., Bonnetaud, C., Bordone, O., Lespinet, V., Lamy, A., Sabourin, J. C., Haudebourg, J., Butori, C., Guevara, N., Peyrottes, I., Sadoul, J. L., Bozec, A., Santini, J., Capper, D., von Deimling, A., Emile, J. F., Hofman, V., & Hofman, P. (2014). Diagnostic value of immunohistochemistry for the detection of the BRAF (V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma: comparative analysis with three DNA-based assays. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 24(5), 858–866.
 54. Iribarren, B. O., Madariaga, G., Zaffiri, J. M. Vittorio H. M., Martens P. P & Iribarren, G. R. (2010). Factores pronóstico de las variantes de cáncer papilar de tiroides. *Rev. Chilena de cirugía*, 62 (3), 228-233.

55. Inder, S., O'Rourke, S., McDermott, N., Manecksha, R., Finn, S., Lynch, T., Marignol, L. (2017). The Notch-3 receptor: a molecular switch to tumorigenesis? *Cancer Treatment Reviews* *Cancer Treatment Reviews*.
56. Ito, Y., & Miyauchi, A. (2020). Active surveillance of low-risk papillary thyroid microcarcinomas. *Gland surgery*, 9(5), 1663–1673.
57. Jaskula-Sztul, R., Eide, J., Tesfazghi, S., Dammalapati, A., Harrison, A. D., Yu, X. M., Scheinebeck, C., Winston-McPherson, G., Kupcho, K. R., Robers, M. B., Hundal, A. K., Tang, W., & Chen, H. (2015). Tumor-suppressor role of Notch3 in medullary thyroid carcinoma revealed by genetic and pharmacological induction. *Molecular cancer therapeutics*, 14(2), 499–512.
58. Khan, M. S., Qadri, Q., Makhdoomi, M. J., Wani, M. A., Malik, A. A., Niyaz, M., Masoodi, S. R., Andrabi, K. I., Ahmad, R., & Mudassar, S. (2020). RET/PTC Gene Rearrangements in Thyroid Carcinogenesis: Assessment and Clinico-Pathological Correlations. *Pathology oncology research: POR*, 26(1), 507–513.
59. Khan, T. M., & Zeiger, M. A. (2020). Thyroid Nodule Molecular Testing: Is It Ready for Prime Time? *Frontiers in endocrinology*, 11, 590128.
60. Kitahara, C. M., & Sosa, J. A. (2020). Understanding the ever-changing incidence of thyroid cancer. *Nature reviews. Endocrinology*, 16(11), 617–618.
61. Kitahara, C. M., Platz, E. A., Freeman, L. E., Hsing, A. W., Linet, M. S., Park, Y., Schairer, C., Schatzkin, A., Shikany, J. M., & Berrington de González, A. (2011). Obesity and thyroid cancer risk among U.S. men and women: a pooled analysis of five prospective studies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(3), 464–472.
62. Kitahara, C. M., K Rmendingé Farkas, D., Jørgensen, J., Cronin-Fenton, D., & Sørensen, H. T. (2018). Benign Thyroid Diseases and Risk of Thyroid Cancer: A Nationwide Cohort Study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 103(6), 2216–2224.
63. Kitahara, C. M., Yanik, E. L., Ladenson, P. W., Hernandez, B. Y., Lynch, C. F., Pawlish, K. S., & Engels, E. A. (2017). Risk of Thyroid Cancer among Solid Organ Transplant Recipients. *American journal of transplantation: official journal*

- of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 17(11), 2911–2921.
64. Kim, H., Bhattacharya, A. y Qi, L. (2015). Control de calidad del retículo endoplásmico en el cáncer: amigo o enemigo. *Seminars in cancer biology*, 33. 25–33.
65. Kim, H. J., Kim, M. J., Kim, A., Jung, C. W., Park, S., Koh, J. S., & Myung, J. K. (2017). The Role of Notch1 Signaling in Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Cancer research and treatment*, 49(2), 509–517.
66. Knobel, M., & Medeiros-Neto, G. (2007). Relevance of iodine intake as a reputed predisposing factor for thyroid cancer. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 51(5), 701–712.
67. Kuo, J. H., McManus, C., Graves, C. E., Madani, A., Khokhar, M. T., Huang, B., & Lee, J. A. (2019). Updates in the management of thyroid nodules. *Current problems in surgery*, 56(3), 103–127.
68. Lam de Calvo, O. & Castillero de Santos, L. (2020). expertos en fisiología: resumen de lo que debes saber de las hormonas tiroideas. *Rev. Méd. Cient.* 33(2):31-45.
69. Lasserra-Sanchez, Ó., Álvarez, M. I. & Martínez, H. B. (2014). Comportamiento epidemiológico del cáncer de tiroides en pacientes con supervivencia de 20 años y más. *Rev. Latinoam. Patol. Clin. Med. Lab.*; 61 (3): 175-184.
70. Letelier, C. (2017). Cáncer hereditario de tiroides, síndromes asociados y estudios genéticos. *Rev. Med. Clin. Condes.* 28 (4) 610-616.
71. Li, M., Brito, J. P., & Vaccarella, S. (2020). Long-Term Declines of Thyroid Cancer Mortality: An International Age-Period-Cohort Analysis. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 30(6), 838–846.
72. Li M, Dal Maso L, Vaccarella S. (2020). Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 8(6):468-470.
73. Liu, Q., Chen, J., Mai, B., Amos, C., Killary, A. M., Sen, S., Wei, C., & Frazier, M. L. (2012). A single-nucleotide polymorphism in tumor suppressor gene SEL1L as a predictive and prognostic marker for pancreatic ductal adenocarcinoma in Caucasians. *Molecular carcinogenesis*, 51(5), 433–438.

74. Liu, L. P., Hao, J. Y., Pan, H., Wang, C., & Yue, P. (2020). Zhonghua Bing li xue za zhi = Chinese journal of pathology, 49(3), 256–261.
75. LiVolsi V. A. (2011). Papillary thyroid carcinoma: an update. Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc, 24 Suppl 2, S1–S9.
76. López I. J. 2009. El diagnóstico histológico de la patología tiroidea en biopsias guiadas por control ecográfico. Revista Española de Patología. Vol. 42. Núm. 2. 97-106.
77. Majumder, S., Crabtree, J. S., Golde, T. E., Minter, L. M., Osborne, B. A., & Miele, L. (2021). Targeting Notch in oncology: the path forward. Nature reviews. Drug discovery, 20(2), 125–144.
78. Marreno, R. M., Sinconegui G. B. & Cruz, C. A. (2015). Marcadores moleculares en el cáncer de tiroides. Revista Cubana de Endocrinología; 26(1):93-104.
79. Mellai, M., Annovazzi, L., Boldorini, R., Bertero, L., Cassoni, P., De Blasio, P., Biunno, I. y Schiffer, D. (2020). SEL1L juega un papel importante en los gliomas malignos humanos. El diario de patología. Investigación clínica, 6 (1), 17–29.
80. Mellai, M., Cattaneo, M., Storaci, AM, Annovazzi, L., Cassoni, P., Melcarne, A., De Blasio, P., Schiffer, D. y Biunno, I. (2015). SEL1L SNP rs12435998, predictor de supervivencia de glioblastoma y respuesta a radioquimioterapia. Oncotarget, 6 (14), 12452–12467.
81. Mondragón-Terán, P., López-Hernández, L. B., Gutiérrez-Salinas, J., Suárez-Cuenca, J. A., Luna-Ceballos, R. I., & Erazo Valle-Solís, A. (2016). Mecanismos de señalización intracelular en cáncer de tiroides [Intracellular signaling mechanisms in thyroid cancer]. Cirugia y cirujanos, 84(5), 434–443.
82. Moore, G., Annett, S., McClements, L., & Robson, T. (2020). Top Notch Targeting Strategies in Cancer: A Detailed Overview of Recent Insights and Current Perspectives. Cells, 9(6), 1503.
83. Morgan, S. L., Wyant, G. A., & Dinulescu, D. M. (2013). "Take it up a NOTCH": novel strategies for cancer therapy. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 12(2), 191–192.

84. Morris, L. G., Sikora, A. G., Tosteson, T. D., & Davies, L. (2013). The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 23(7), 885–891.
85. Musholt, T. J., Fottner, C., Weber, M. M., Eichhorn, W., Pohlenz, J., Musholt, P. B. Schad, A. (2010). Detection of Papillary Thyroid Carcinoma by Analysis of BRAF and RET/PTC1 Mutations in Fine-needle Aspiration Biopsies of Thyroid Nodules. *World Journal of Surgery*, 34(11), 2595–2603.
86. Nettore, I. C., Colao, A., & Macchia, P. E. (2018). Nutritional and Environmental Factors in Thyroid Carcinogenesis. *International journal of environmental research and public health*, 15(8), 1735.
87. Nikiforov, Y. E., Steward, D. L., Robinson-Smith, T. M., Haugen, B. R., Klopper, J. P., Zhu, Z., Fagin, J. A., Falciglia, M., Weber, K., & Nikiforova, M. N. (2009). Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(6), 2092–2098.
88. Nikiforov, Y. E., & Nikiforova, M. N. (2011). Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(10), 569–580.
89. Nikiforova, M. N., & Nikiforov, Y. E. (2009). Molecular Diagnostics and Predictors in Thyroid Cancer. *Thyroid*, 19(12), 1351–1361.
90. Nosé V. (2010). Familial follicular cell tumors: classification and morphological characteristics. *Endocrine pathology*, 21(4), 219–226.
91. Ntziachristos, P., Lim, J. S., Sage, J., & Aifantis, I. (2014). From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling. *Cancer cell*, 25(3), 318–334.
92. Oh, H. S., Ha, J., Kim, H. I., Kim, T. H., Kim, W. G., Lim, D. J., Kim, T. Y., Kim, S. W., Kim, W. B., Shong, Y. K., Chung, J. H., & Baek, J. H. (2018). Active Surveillance of Low-Risk Papillary Thyroid Microcarcinoma: A Multi-Center Cohort Study in Korea. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 28(12), 1587–1594.
93. Oh, H. S., Kwon, H., Park, S., Kim, M., Jeon, M. J., Kim, T. Y., Shong, Y. K., Kim, W. B., Choi, J., Kim, W. G., & Song, D. E. (2018). Comparison of

- Immunohistochemistry and Direct Sanger Sequencing for Detection of the BRAF(V600E) Mutation in Thyroid Neoplasm. *Endocrinology and metabolism* (Seoul, Korea), 33(1), 62–69.
94. Ohori, N. P., Nikiforova, M. N., Schoedel, K. E., LeBeau, S. O., Hodak, S. P., Seethala, R. R., Carty, S. E., Ogilvie, J. B., Yip, L., & Nikiforov, Y. E. (2010). Contribution of molecular testing to thyroid fine-needle aspiration cytology of "follicular lesion of undetermined significance/atypia of undetermined significance". *Cancer cytopathology*, 118(1), 17–23.
95. Pacini, F., & Castagna, M. G. (2012). Approach to and treatment of differentiated thyroid carcinoma. *The Medical clinics of North America*, 96(2), 369–383.
96. Pak, K., Suh, S., Kim, S. J., & Kim, I. J. (2015). Prognostic value of genetic mutations in thyroid cancer: a meta-analysis. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 25(1), 63–70.
97. Park, H. S., Jung, C. K., Lee, S. H., Chae, B. J., Lim, D. J., Park, W. C., Song, B. J., Kim, J. S., Jung, S. S., & Bae, J. S. (2012). Notch1 receptor as a marker of lymph node metastases in papillary thyroid cancer. *Cancer science*, 103(2), 305–309.
98. Pedroza, D. J., Ortiz, R. B. & Vazquez, D. G. (2012). Biomarcadores proteicos en Lupus neuropsiquiátrico. *Revista Colombiana de Reumatología*, 19 (3).158-171.
99. Piana, S., Zanetti, E., Bisagni, A., Ciarrocchi, A., Giordano, D., Torricelli, F., Rossi, T., & Ragazzi, M. (2019). Expression of NOTCH1 in thyroid cancer is mostly restricted to papillary carcinoma. *Endocrine connections*, 8(8), 1089–1096.
100. Razo-Romero, M. P., Mesias-Molina, L., Razo-Romero, M. F. & Fiallos-Cazar, L. P. (2021). Biomarcadores proteicos e infección: ¿Pronostico de severidad? *Revisión Sistemica Kasmera*. 49 (2).
101. Raue, F., & Frank-Raue, K. (2016). Thyroid Cancer: Risk-Stratified Management and Individualized Therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(20).
102. Santos, Leticia, León-Galván, María Fabiola, & Marino-Marmolejo, Erika

- Nahomy. (2006). Vía de señalización Notch y nuevas estrategias para el tratamiento de cáncer. *Salud Pública de México*, 48(2), 155-165.
103. Santos, L., León-Galván, M. F., Marino-Marmolejo, E. N., Barba de la Rosa, A. P., De León Rodríguez, A., González-Amaro, R., & Guevara-González, R. G. (2011). Identification of differential expressed transcripts in cervical cancer of Mexican patients. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 32(3), 561–568.
104. Shibru, D., Chung, K.-W., & Kebebew, E. (2008). Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Current Opinion in Oncology*, 20(1), 13–18.
105. Schiffmann, L., Kostev, K., & Kalder, M. (2020). Association between various thyroid gland diseases, TSH values and thyroid cancer: a case-control study. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 146(11), 2989–2994.
106. Schlumberger, M., Chevillard, S., Ory, K., Dupuy, C., Le Guen, B., & de Vathaire, F. (2011). Cancer de la thyroïde après exposition aux rayonnements ionisants. *Cancer/Radiothérapie*, 15(5), 394–399.
107. Simon, R., Mirlacher, M., & Sauter, G. (2003). Tissue microarrays in cancer diagnosis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3(4), 421–430.
108. Schmidbauer, B., Menhart, K., Hellwig, D., & Grosse, J. (2017). Differentiated Thyroid Cancer-Treatment: State of the Art. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1292.
109. Schneider, D. F., & Chen, H. (2013). New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(6), 374–394.
110. Song, L., Peng, Y., Yun, J. et al. (2008). Notch-1 se asocia con IKK α y regula la actividad de IKK en células de cáncer de cuello uterino. *Oncogen* 27, 5833–5844.
111. Song, YS & Park, YJ (2019). Caracterización genómica del carcinoma de tiroides diferenciado. *Endocrinología y metabolismo (Seúl, Corea)*, 34 (1), 1–10.
112. Somnay, Y. R., Yu, X. M., Lloyd, R. V., Levenson, G., Aburjania, Z., Jang, S., Jaskula-Sztul, R., & Chen, H. (2017). Notch3 expression correlates with

- thyroid cancer differentiation, induces apoptosis, and predicts disease prognosis. *Cancer*, 123(5), 769–782.
113. Sun, J., Zhang, J., Lu, J., GAO, J., Lu, T., Ren, X., Duan, H., & Liang, Z. (2015). Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for detecting the BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), 15072–15078.
114. Suteau, V., Munier, M., Briet, C., & Rodien, P. (2021). Sex Bias in Differentiated Thyroid Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12992.
115. Takano, T. (2017). Natural history of thyroid cancer [Review]. *Endocrine journal*, 64 (3), 237 – 244.
116. Teijeiro C. J & Sobrinho S. M. (2003). Carcinoma papilar de la glándula tiroides. *Revista Española de Patología*. Vol. 36. Núm. 4. 373-382.
117. Torhorst, J., Bucher, C., Kononen, J., Haas, P., Zuber, M., Köchli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Moch, H., Mihatsch, M., Kallioniemi, O. P., & Sauter, G. (2001). Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical end points. *The American journal of pathology*, 159(6), 2249–2256.
118. Troisi, R., Bjørge, T., Gissler, M., Grotmol, T., Kitahara, C. M., Myrteit Saether, S. M., Ording, A. G., Sköld, C., Sørensen, H. T., Trabert, B., & Glimelius, I. (2018). The role of pregnancy, perinatal factors and hormones in maternal cancer risk: a review of the evidence. *Journal of internal medicine*, 283(5), 430–445.
119. Truong, M., Cook, MR, Pinchot, SN, Kunnimalaiyaan, M. y Chen, H. (2011). El resveratrol induce la apoptosis mediada por Notch2 y la supresión de marcadores neuroendocrinos en el cáncer medular de tiroides. *Anales de oncología quirúrgica*, 18 (5), 1506-1511.
120. Tuttle, R. M., Ball, D. W., Byrd, D., Dilawari, R. A., Doherty, G. M., Duh, Q. Y., Ehya, H., Farrar, W. B., Haddad, R. I., Kandeel, F., Kloos, R. T., Kopp, P., Lamonica, D. M., Loree, T. R., Lydiatt, W. M., McCaffrey, J. C., Olson, J. A., Jr, Parks, L., Ridge, J. A., Shah, J. P., ... National Comprehensive Cancer Network (2010). Thyroid carcinoma. *Journal of the National Comprehensive Cancer*

Network: JNCCN, 8(11), 1228–1274.

121. Udelsman, R., & Zhang, Y. (2014). The epidemic of thyroid cancer in the United States: the role of endocrinologists and ultrasounds. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 24(3), 472–479.
122. Vaccarella, S., & Dal Maso, L. (2021). Challenges in investigating risk factors for thyroid cancer. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 9(2), 57–59.
123. Vaccarella, S., Franceschi, S., Bray, F., Wild, C. P., Plummer, M., & Dal Maso, L. (2016). Worldwide Thyroid-Cancer Epidemic? The Increasing Impact of Overdiagnosis. *The New England journal of medicine*, 375(7), 614–617.
124. Valerio, L., Pieruzzi, L., Giani, C., Agate, L., Bottici, V., Lorusso, L., Cappagli, V., Puleo, L., Matrone, A., Viola, D., Romei, C., Ciampi, R., Molinaro, E., & Elisei, R. (2017). Targeted Therapy in Thyroid Cancer: State of the Art. *Clinical oncol (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 29(5), 316–324.
125. Venkatesh, V., Nataraj, R., Thangaraj, G. S., Karthikeyan, M., Gnanasekaran, A., Kaginelli, S. B., Kuppanna, G., Kallappa, C. G., & Basalingappa, K. M. (2018). Targeting Notch signalling pathway of cancer stem cells. *Stem cell investigation*, 5, 5.
126. Vigneri, R., Malandrino, P., Giani, F., Russo, M., & Vigneri, P. (2017). Heavy metals in the volcanic environment and thyroid cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 457, 73–80.
127. Wang, Z., Banerjee, S., Li, Y., Rahman, K. M., Zhang, Y., & Sarkar, F. H. (2006). Down-regulation of notch-1 inhibits invasion by inactivation of nuclear factor-kappaB, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 66(5), 2778–2784.
128. Wang, C., Li, Q., Liu, F. et al. (2016). Notch2 como biomarcador de pronóstico prometedor para el carcinoma de células escamosas de esófago. *Informe científico* 6, 25722.
129. Ward, M. H., Kilfoy, B. A., Weyer, P. J., Anderson, K. E., Folsom, A. R., & Cerhan, J. R. (2010). Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 21(3), 389–395.
130. World Health Organization (2020). WHO report on cancer: setting

priorities, investing wisely and providing care for all Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

131. Xiao, X., Ning, L., & Chen, H. (2009). Notch1 mediates growth suppression of papillary and follicular thyroid cancer cells by histone deacetylase inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*, 8(2), 350–356.
132. Xing M. (2008). Avances recientes en biología molecular del cáncer de tiroides y sus implicaciones clínicas. *Clínicas de otorrinolaringología de América del Norte*, 41 (6), 1135 – ix.
133. Xing M. (2010). Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*, 20(7), 697–706.
134. Xing, M., Clark, D., Guan, H., Ji, M., Dackiw, A., Carson, K. A., Kim, M., Tufaro, A., Ladenson, P., Zeiger, M., & Tufano, R. (2009). BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(18), 2977–2982.
135. Xing, M., Haugen, B. R., & Schlumberger, M. (2013). Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet (London, England)*, 381(9871), 1058–1069.
136. Yamashita, A. S., Geraldo, M. V., Fuziwara, C. S., Kulcsar, M. A., Friguglietti, C. U., da Costa, R. B., Baia, G. S., & Kimura, E. T. (2013). Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation. *Translational oncology*, 6(2), 197–205.
137. Yu, X. M., Jaskula-Sztul, R., Georgen, M. R., Aburjania, Z., Somnay, Y. R., Levenson, G., Sippel, R. S., Lloyd, R. V., Johnson, B. P., & Chen, H. (2016). Notch1 Signaling Regulates the Aggressiveness of Differentiated Thyroid Cancer and Inhibits SERPINE1 Expression. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(14), 3582–3592.
138. Yuan, L., Ma, L., Xue, H., & Song, S. (2019). Relationship between the upregulation of Notch1 signaling and the clinical characteristics of patients with papillary thyroid carcinoma in East Asia: a systematic review and meta-

- analysis. *Cancer cell international*, 19, 5.
139. Zafón, C., Castellvi, J & Obiolsa, G. (2010) Utilidad del análisis inmunohistoquímico de diversos marcadores moleculares en la caracterización del carcinoma papilar de tiroides con metástasis linfáticas iniciales. *Endocrinol. Nutr.* 57(4):165–169.
140. Zafón, C., & Obiols, G. (2009). Vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 56(4), 176–186.
141. Zhang, Y., Li, B., Ji, Z. Z., & Zheng, P. S. (2010). Notch1 regulates the growth of human colon cancers. *Cancer*, 116(22), 5207–5218.
142. Zhou, D., Li, Z., & Bai, X. (2017). BRAFV600E and RET/PTC Promote Proliferation and Migration of Papillary Thyroid Carcinoma Cells in Vitro by Regulating Nuclear Factor- κ B. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 23, 5321–5329.
143. Zimmermann, M. B., & Galetti, V. (2015). Iodine intake as a risk factor for thyroid cancer: a comprehensive review of animal and human studies. *Thyroid research*, 8, 8.
144. Zou, X., Gao, F., Wang, Z. Y., Zhang, H., Liu, Q. X., Jiang, L., Zhou, X., & Zhu, W. (2020). A three-microRNA panel in serum as novel biomarker for papillary thyroid carcinoma diagnosis. *Chinese medical journal*, 133(21), 2543–2551.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de bloques de parafina.

1. Encender el equipo y colocar la parafina en el equipo hasta que caliente de 70 – 80 °C por 30 minutos.
2. Colocar el molde por unos minutos en el congelador (para evitar la formación de burbujas alrededor de las barras).
3. Verter la parafina líquida al molde en un solo paso hasta cubrir las barras. Golpear despacio el molde para remover las pequeñas burbujas formadas.
4. Poner sobre el molde un casete para embeber.
5. Solidificar la parafina en el molde y el casete a temperatura ambiente.
6. Separar lenta y delicadamente el molde del casete.
7. Quitar exceso de parafina de la periferia del casete del bloque.
8. Extraer el tejido marcado del bloque donador, colocando el bloque donador en una superficie plana y horizontal. Colocar perpendicularmente la punta del microarrayer de tejidos, insertándola lentamente a una profundidad de 5 mm.
9. Liberar lentamente el tejido extraído en el hoyo correspondiente del bloque receptor. Presionar ligeramente todos los núcleos de tejido para que cada uno queden al mismo nivel.
10. Poner el bloque bocabajo sobre un portaobjetos y meter a horno a 50°C por 2 horas, con la finalidad de que los núcleos de tejido se adhieran a los hoyos del bloque.
11. Dejar que el bloque de MAT se enfríe y solidifique para posteriormente realizar los cortes correspondientes.

Anexo 2. Corte con micrótopo, procesamiento de laminillas, procedimiento de desparafinización, procedimiento de rehidratación, tinción con Hematoxilina y Eosina y fijación de muestra.

Corte con micrótopo

1. Colocar el molde del MAT con la muestra en el micrótopo.
2. Ajustar las micras de espesor del corte en la pantalla LSD, las muestras deberán tener un grosor de 8 micras.
3. Verificar que la navaja se encuentra en posición, fijada correctamente y con filo; si se ha terminado el filo de un lado de la navaja, moverla hacia el otro lado no usado, teniendo cuidado de no rozar el filo.
4. Antes de iniciar el corte, cerciorarse siempre de que todos los mecanismos de sujeción están apretados con seguridad.
5. Pulir la cara del bloque cortando suavemente unas pocas secciones finas. Ayudado de una gasa húmeda con etanol al 50% colocar y dar un masaje a la muestra (evitar empujar la muestra), para ayudar a que la parafina se endurezca.
6. Iniciar con una carrera de corte uniforme y lenta; no pare ni reinicie durante una carrera de corte ya que esto produciría franjas de diferentes grosores a lo largo de la sección (3 o 4 cortes por carrera).
7. En cuanto se haya terminado la carrera si hay residuos, elimínelos, volver a enfriar el bloque masajeando con etanol 50% y comenzar de nuevo.
8. Los cortes realizados se colocan en un portaobjetos con etanol al 50% para expandirlos ligeramente. Se separarán las diferentes muestras de los cortes con una navaja.
9. Con un movimiento de barrido suave, coloque las secciones con el lado liso (brillante) hacia abajo para eliminar arrugas. Las secciones se pueden dañar con mucha facilidad al quitar las arrugas o burbujas con un cepillo o pinzas.
10. Dejar flotando las muestras seleccionadas en baño María a una temperatura que oscila entre los 45°C el tiempo suficiente para que se alisen las muestras.

Deje flotar las secciones con cuidado en agua limpia que no tenga burbujas ni residuos de la sección (para evitar una contaminación entre sí).

11. Con un porta objetos limpio, sin grasa ni polvo introducir de forma vertical y con la inercia del agua la muestra de tejido con la mejor orientación que se requiera, teniendo cuidado de tratar de no cortar la muestra en el agua porque esta puede dañarse.
12. Escurrir los portaobjetos con los cortes verticalmente hacia abajo para eliminar el exceso de agua. Dejar secar las secciones durante un tiempo de entre 10 y 30 minutos.

*Realizar el procedimiento para desparafinar

*Realizar la tinción Requerida

Procedimiento de desparafinación y rehidratación

Sumergir las laminillas preparadas en las siguientes soluciones: 15x Xileno (15x = 15 veces).

*Dejar escurrir entre cada paso.

1. Sumergir la laminilla durante 10 minutos en Xileno.
2. Sumergir en otra cubeta de Xileno 15x.
3. 3 cubetas con alcohol absoluto (15x en cada uno).
4. 3 cubetas con alcohol 96% (15x en cada uno).
5. Dejar escurrir el alcohol unos segundos.
6. Enjuagar en 1 cubeta de agua destilada (15x).
7. Dejar secar los portaobjetos con los cortes verticalmente hacia abajo para eliminar el exceso de agua.

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Los tiempos de tinción que se llevó a cabo fueron los utilizados por la Dra. Angélica del Hospital de la salud de San Luis Potosí.

* Dejar escurrir entre cada paso.

1. Sumergir la laminilla en Hematoxilina por 11 minutos
2. Enjuagar en 2 cubetas de agua (15x en cada uno).
3. 5x inmersiones en alcohol de 96°
4. Sumergir la laminilla en Eosina por 5 minutos
5. 3 cubetas con alcohol 96% (15x en cada uno).
6. 3 cubetas con alcohol absoluto (15x en cada uno).
7. 2 cubetas de Xileno (15x en cada uno).
8. Dejar secar unos minutos verticalmente hacia abajo

Fijación de la muestra

1. Después del secado en el horno y la tinción, colocar sobre el tejido una gota de resina sintética.
2. Colocar el cubreobjetos en un ángulo de 45 grados para evitar la formación de burbujas, presione ligeramente la laminilla hasta que la resina se disperse a lo largo del cubreobjetos y porta objetos, asegurando de que cubra el residuo.
*Si es necesario el aire de las orillas se puede quitar, esto rodeando los bordes con un aplicador de madera mojado previamente en xileno.
3. Limpie y rotule correcta y precisamente las laminillas para observar al microscopio.

Anexo 3. Recuperación del antígeno mediante calor por horno de microondas, Corominas, 1997 modificado.

*Se realiza antes de comenzar la IHQ y del bloqueo con las peroxidasas.

*No dejar que las preparaciones se sequen, si es así colocar más solución de desenmascaramiento.

1. Se colocan las preparaciones en el horno de microondas.
2. Cubrir las preparaciones con el tampón de citrato de sodio (Citrato de sodio 10mM, Tween 20 al 0.05%, pH 6.0) (Reactivo 1).
3. Colocar 1.45 minutos en el horno de microondas. Se observará el hervor.
4. Retirar las preparaciones del microondas y dejar atemperar por 15 minutos a temperatura ambiente con vapor de la solución de desenmascaramiento.
5. Repetir la operación de 2 a 3 veces.
6. Lavar 2 veces con solución PBS las laminillas por dos minutos para eliminar la solución y neutralizar la acidez.

Anexo 4. Técnica de inmunohistoquímica.

*Evitar que las muestras se sequen, utilizando cámara de humedad.

*Realizar los lavados correspondientes entre cada paso.

Superpicture 3rd Gen y SuperPicture Polymer Detection

Reactivo A Peroxidase Quenching Solution

Reactivo B1 HRP Polymer Conjugate

Reactivo B2 HRP Polymer Conjugate

Reactivo C1 DAB Substrate Buffer

Reactivo C2 DAB Chromogen

Portaobjetos de control y muestra

*Son necesarios tres portas de control para la interpretación de los resultados.

1. **Control Tisular Positivo:** un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, contiene el antígeno que debe teñirse.

*Para obtener la muestra control se utiliza el anticuerpo primario sobre el tejido normal 100 µl por cada corte

2. **Control Negativo:** Un espécimen, procesado de la misma manera que el desconocido, no contiene el antígeno que se debe teñir.

*Se añade solución PBS 1X, 100 µl o lo suficiente para cubrir completamente la muestra

Protocolo de tinción.

A. Solución QUENCHING peroxidasa 3%

1. Para tejidos en parafina, añadir 2 gotas (100 µl) a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
2. Incubar durante 5 minutos.
3. Enjuagar con agua destilada.

4. Enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 2 veces).

B. Bloqueo de peroxidasa endógena.

1. añadir 2 gotas (100 μ l) a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
2. Incubar durante 10 minutos.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 2 veces).

C. Anticuerpo primario.

1. Añadir 2 gotas (100 μ l) de ANTICUERPO PRIMARIO a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
2. Incubar en una cámara de humedad durante toda la noche a 4°C.
3. Enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 3 veces).

D. HRP POLYMER CONJUGATE

1. Añadir 2 gotas (100 μ l) de la dilución 1:100 de **MACH 4 UNIVERSAL 1 HRP** a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
2. Incubar durante 20 minutos.
3. Enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 3 veces).
4. Añadir 2 gotas (100 μ l) de la dilución 1:100 de **MACH Polymer** a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
5. Incubar durante 30 minutos.
6. Enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 3 veces).

E. DAB CHROMOGEN

1. Añadir 2 gotas (100 μ l) de la mezcla del reactivo C1 y C2 a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido.
2. Incubar durante 30 minutos.
3. Enjuagar bien con agua destilada 2 minutos.
4. Enjuagar con PBS 1X 3 veces de golpecito.

5. Realizar contratinción con Hematoxilina y realizar la fijación de la muestra.

Contratinción con Hematoxilina

1. Sumergir la laminilla en Hematoxilina por 5 minutos
2. Sumergir en agua destilada 15x (15 veces) o hasta que desaparezca el colorante
3. 15x inmersiones en alcohol de 96°
4. 15x inmersiones en alcohol de 96°
5. 15x inmersiones en alcohol absoluto
6. 15x inmersiones en alcohol absoluto
7. 15x inmersiones en Xileno
8. 15x inmersiones en Xileno
9. Dejar secar unos minutos verticalmente hacia abajo

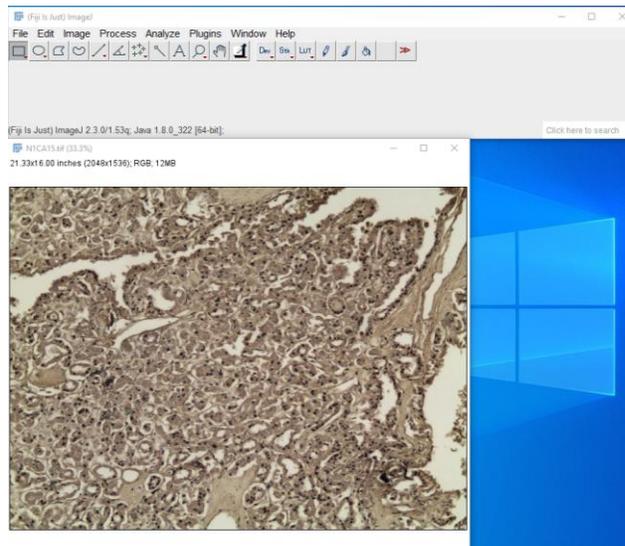
Fijación de la muestra

1. Después de la tinción, colocar sobre el tejido una gota de resina sintética.
2. Colocar el cubreobjetos en un ángulo de 45 grados para evitar la formación de burbujas, presione ligeramente la laminilla hasta que la resina se disperse a lo largo del cubreobjetos y porta objetos, asegurando de que cubra el residuo.

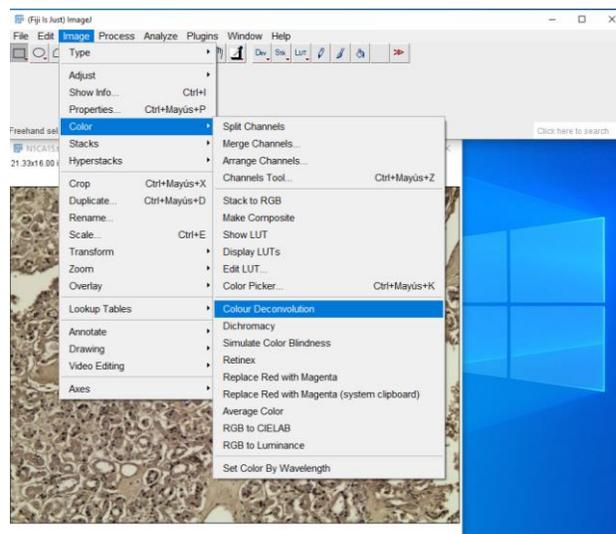
*Si es necesario el aire de las orillas se puede quitar, esto rodeando los bordes con un aplicador de madera mojado previamente en xileno.
3. Limpie y rotule correcta y precisamente las laminillas para observar al microscopio.

Anexo 5. Análisis inmunohistoquímico de imágenes en FUJI ImageJ.

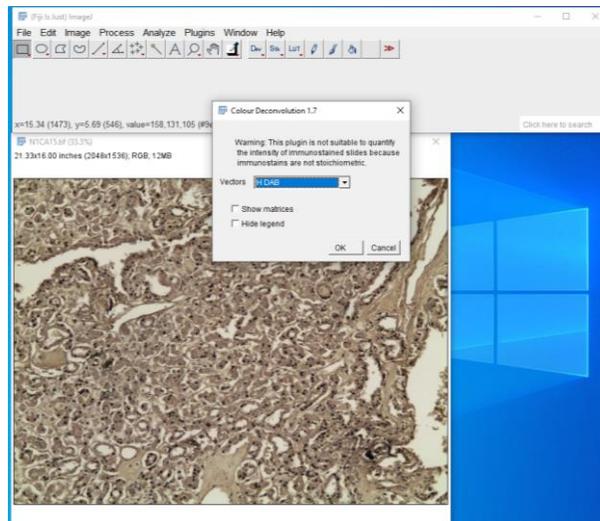
1. Abrir Imagen teñida por IHQ. File→Open.



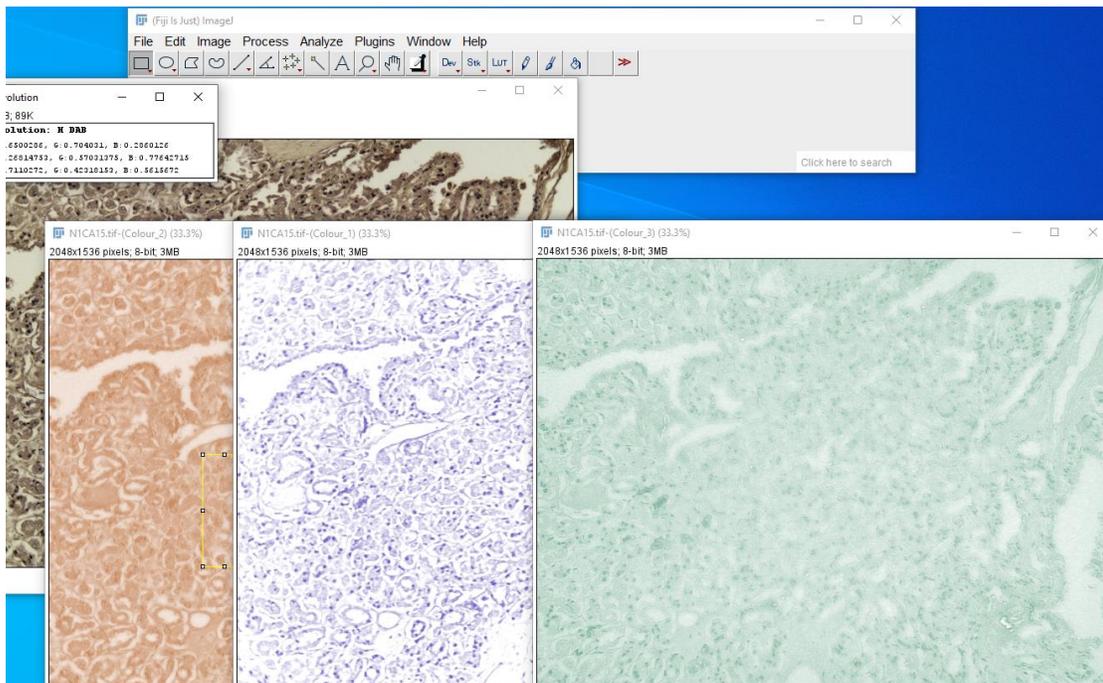
2. Dar click en Image→Color→Color Deconvolution.



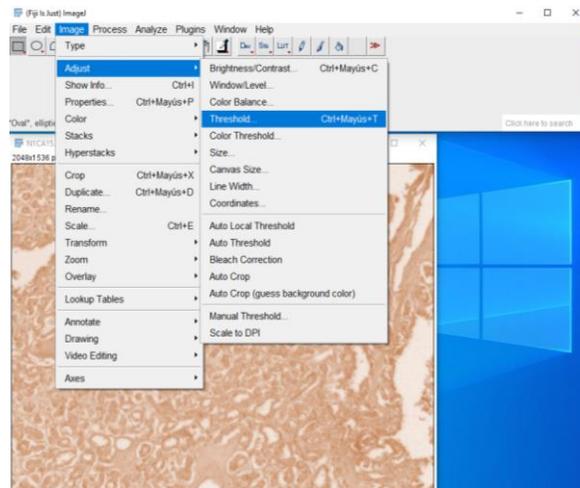
3. En la ventana de Color Deconvolution seleccionar el tipo de tinción de la imagen (H DAB).



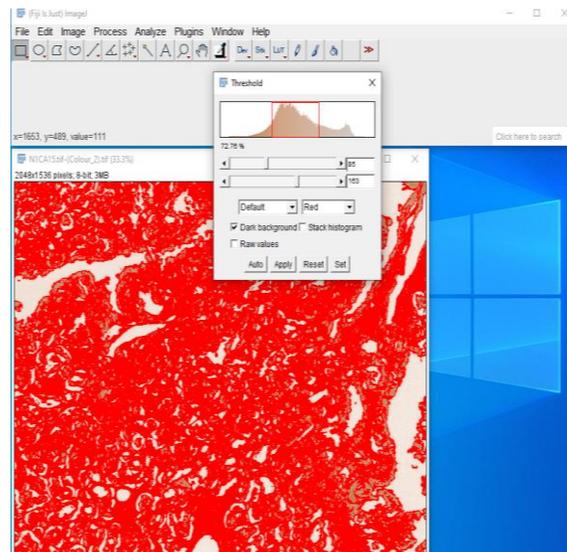
4. La imagen original se dividirá en 3 imágenes de un solo color. Cerrar la imagen no deseada y guardar únicamente la imagen con coloración Marrón como archivo TIFF (File→Save). Las imágenes guardadas son de 8 bits por defecto.



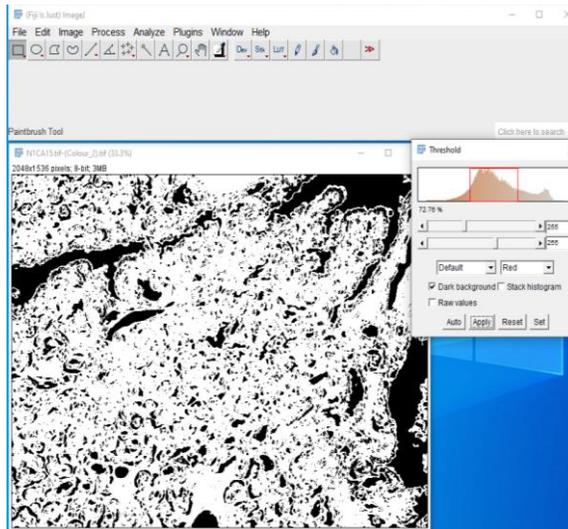
5. De la imagen deseada, dar click en Image→Adjust→Threshold.



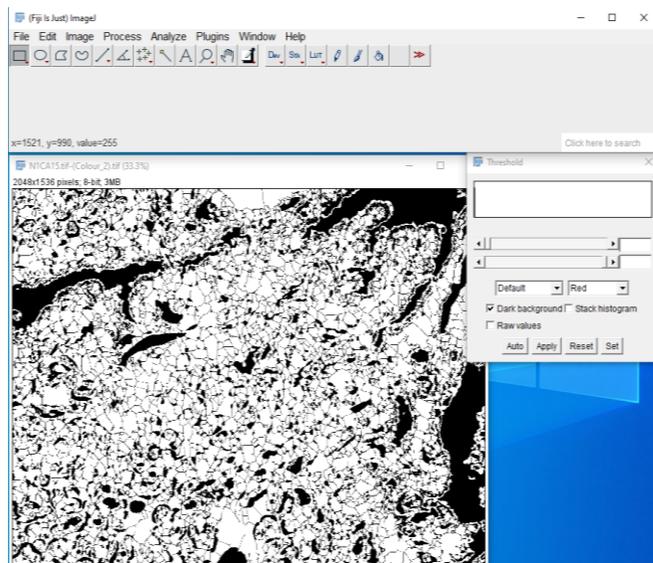
6. En la ventana Threshold, se seleccionan los píxeles que se encuentran dentro del cuadro rojo. El color rojo indica el área seleccionada a analizar. Arrastrar las barras (0-225) para modificar el área seleccionada.



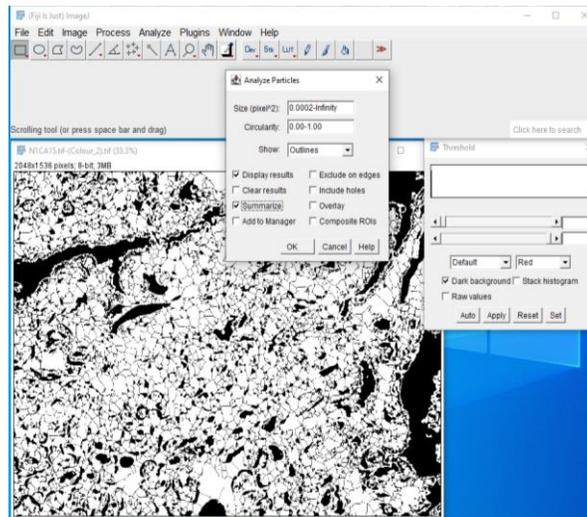
7. Luego, dar click en Apply. Se creará una imagen Binaria.



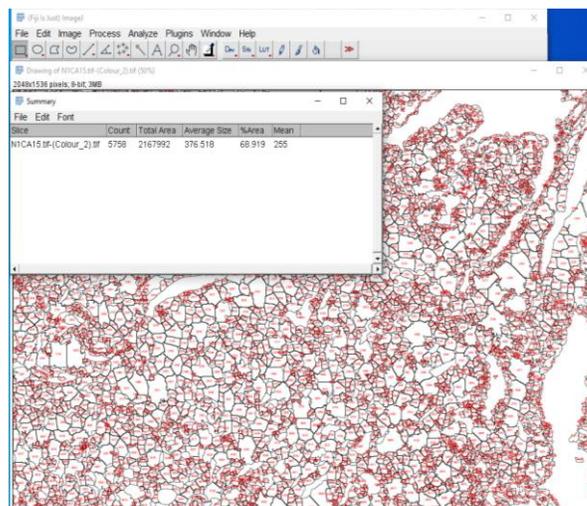
8. Dar click en Process→Binary→Watershed. Aparecerán líneas de separación imaginarias entre las células. La función de Watershed es menos precisa si sus celdas están demasiado llenas.



9. Después haga click en Analyze→Analyze Particles. En la ventana Analyze Particles, el tamaño de las partículas es importante si tiene pequeños puntos dentro del umbral, pero no son celdas. Establezca el tamaño mínimo de las partículas para excluirlas colocando de 0.0002 pulg² hasta infinito. En Mostrar, colocar Outlines, Display Results y Summarize.



10. Se desplegarán 3 ventanas como se muestra donde se arrojarán los **resultados**. Los puntos no deseados se eliminan.



REACTIVOS

Reactivo 1

Tampón de citrato de sodio (10 mM sodium citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0).

*Siguiendo el procedimiento de abcam.

1. Citrato trisódico (dihidratado) 2.94 gramos.
2. Agua destilada (1 L).
3. Mezclar para disolver. Ajuste el pH a 6.0 con HCl 1N.
4. Agregue 0.5 mL de Tween 20 y mezcle bien. Almacenar correctamente.

Reactivo A

*Se debe preparar al instante

1. Para tejidos en parafina, añadir una parte de peróxido de hidrógeno al 30% a nueve partes de metanol puro (o sin diluir). Mezclar bien.
2. Bañar los portaobjetos de la solución para la eliminación de la Peroxidasa durante 10 minutos.
3. Lavar con PBS (2 minutos, 3 veces).

Reactivo B

Reactivo B1

1. Mezclar en una dilución 1:100 con PBS 1X la solución MACH 4 UNIVERSAL 1 HRP.
2. Anadir 100 µl a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido por 20 minutos y después enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 3 veces).

Reactivo B2

1. Mezclar en una dilución 1:100 con PBS 1X la solución MACH Polymer.

2. Anadir 100 μ l a cada corte, o lo suficiente como para cubrir completamente el tejido por 30 minutos y después enjuagar con PBS 1X (2 minutos, 3 veces).

Reactivo C (C1 y C2)

* Proteger de la luz y usar durante las siguientes dos horas tras preparación.

1. Añadir 1 gota o aproximadamente 26.5 μ l del **DAB Chromogen** (Reactivo C2) a 1 mL de **DAB Substrate** (Reactivo C1). Mezclar bien.