



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

*“ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE DIFERENCIACIÓN Y CREACIÓN DE UN
MODELO PREDICTOR DE REFRACTARIEDAD AL TRATAMIENTO CON YODO
RADIOACTIVO EN CARCINOMAS PAPILARES DE TIROIDES”*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

JUAN DE DIOS BOLAÑOS DE LA TORRE

TUTOR PRINCIPAL:

ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ

ENTIDAD DE ADSCRIPCIÓN:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DAVID VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ

LESLY AMINTA PORTOCARRERO ORTIZ

ENTIDADES DE ADSCRIPCIÓN:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA MANUEL VELASCO
SUÁREZ

CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO DE 2023



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.

ÍNDICE

1. Antecedentes y marco teórico	3
2. Planteamiento del problema.....	19
3. Justificación.....	20
4. Pregunta de investigación.....	20
5. Objetivos.....	20
6. Materiales y métodos.....	22
7. Cronograma de actividades.....	28
8. Resultados.....	29
9. Discusión.....	52
10. Conclusiones.....	54
11. Referencias.....	54

ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de tiroides (CT) es la neoplasia maligna endocrina más frecuente a nivel mundial. En 2020, de acuerdo con los datos reportados por el Observatorio Global de Cáncer, ocupó el 10º lugar en incidencia con 586,202 casos nuevos, el 25º en mortalidad con 43,646 defunciones y mostró una prevalencia a 5 años de 25.46 casos por cada 100,000 personas. El CT es más frecuente en mujeres con una incidencia de 10.1 casos por cada 100,000 mujeres, mientras que en hombres presenta una incidencia de 3.1 casos por cada 100,000 hombres [1]. En México, en 2020 ocupó el 3º lugar de casos nuevos de cáncer con 11,227 casos y el 19º en mortalidad con 956 defunciones [2].

En las últimas décadas la incidencia de CT ha ido en aumento principalmente por nódulos tiroideos malignos de tamaño pequeño (e.g. <1 cm) detectados de manera incidental durante el estudio de enfermedades no tiroideas a través de estudios de imagen o durante el análisis histopatológico de un espécimen tiroideo resecado por otra razón diferente al nódulo maligno. Actualmente estos CT a los que se les ha denominado como “clínicamente ocultos” tienen una mayor incidencia en comparación con los “clínicamente reconocibles” (7.4 por cada 100,000 personas vs. 5.5 por cada 100,000 personas). Generalmente estos casos presentan un riesgo mínimo de recurrencia y, por lo tanto, su pronóstico es excelente [3].

El CT puede ocurrir prácticamente a cualquier edad, aunque es más frecuente en adultos que en niños y adolescentes. La edad varía fundamentalmente de acuerdo con tipo histopatológico siendo los carcinomas papilares de tiroides (CPT) más frecuentes

entre 25-64 años mientras que los carcinomas anaplásicos de tiroides (CAT) se presentan en >65 años. Los carcinomas foliculares (CFT) y medulares de tiroides (CMT) son más comunes a partir de 25 años e incrementan ligeramente su prevalencia conforme incrementa la edad [4].

Existen diversos factores de riesgo que se han asociado a la aparición de cáncer tiroideo entre los que destacan exposición a radiación ionizante, deficiencia/sobreingesta de yodo, obesidad, diabetes mellitus, enfermedad tiroidea preexistente, historia familiar de cáncer tiroideo (CPT/no CMT familiares) y la presencia de algunos padecimientos sindrómicos hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (FAP), complejo de Carney o los síndromes de Turcot, Gardner, Bannayan-Riley-Ruvalcaba, Werner y Cowden [5].

DIAGNÓSTICO DEL CARCINOMA BIEN DIFERENCIADO DE TIROIDES

En la actualidad existen diversas guías con recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de los carcinomas bien diferenciados de tiroides (CBDT). Las más reconocidas son la guía de la Asociación Americana de Tiroides (ATA) 2015, la Guía de Práctica Clínica en Oncología. Carcinoma de Tiroides (NCCN) 2021 y la Cáncer Tiroideo: Guía de práctica Clínica para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (ESMO) 2019 [12, 13, 14]. En México existen las guías de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología (SMNE) 2009, la Sociedad Mexicana de Oncología (SMEO) 2018 y la Guía de Práctica Clínica del Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud (CENETEC) 2009 que básicamente toman como modelo a la guía de la ATA [15, 16, 17].

Los nódulos tiroideos pueden detectarse mediante exploración clínica y confirmarse por ultrasonido. En la actualidad se ha vuelto más frecuente el hallazgo de nódulos tiroideos de manera incidental durante el abordaje de otra patología cervical/craneana [3]. Junto con la identificación del nódulo y sus características se solicitan niveles de TSH (hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina) y en caso de ser más bajos del rango normal se solicita un gammagrama tiroideo para establecer si el nódulo es hiperfuncional. Tradicionalmente se sabe que los nódulos hiperfuncionales llamados también “calientes” son con baja frecuencia malignos, mientras que los nódulos hipofuncionales o “fríos” poseen un mayor riesgo de malignidad; sin embargo, esta idea se ha cuestionado en los últimos años ya que existen reportes de porcentajes de malignidad más altos de lo esperado (10%-34%) asociado a nódulos hipercaptantes [18]. A pesar de lo anterior las guías recomiendan la biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) únicamente en nódulos hipocaptantes de acuerdo a las características clínicas y ultrasonográficas de los mismos.

Las propiedades ultrasonográficas de los nódulos se clasifican de acuerdo a dos sistemas: el Sistema TI-RADS (Thyroid Imaging Reporting & Data System) del Colegio Americano de Radiología y el propuesto por la ATA. Ambos utilizan diferentes parámetros como composición, ecogenicidad, forma, márgenes y focos ecogénicos para clasificar el nódulo en 5 categorías que van desde benigno hasta altamente sospechoso de malignidad (Figura 1) [12, 19]. La decisión de realizar una BAAF se apoya en el patrón de imagen (a partir de TIRADS 3 o características morfológicas que hagan sospechar de malignidad como microcalcificaciones o bordes irregulares) y el tamaño del nódulo.

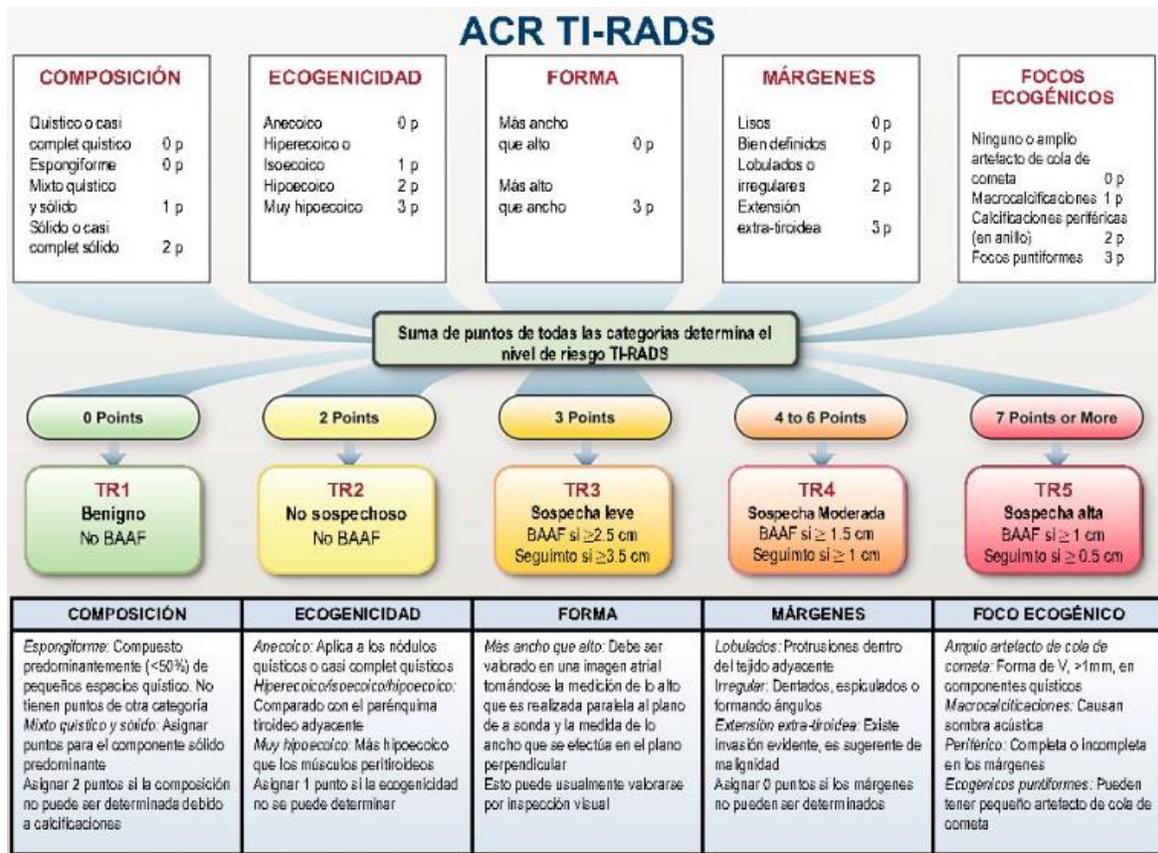


Figura 1. Sistema TI-RADS (Thyroid Imaging Reporting & Data System) del Colegio Americano de Radiología.

El sistema de Bethesda se utiliza para determinar un porcentaje de probabilidad de malignidad los nódulos tiroideos. De acuerdo con las características citológicas se conforman 6 categorías diagnósticas cada una de las cuales posee un riesgo de malignidad y una recomendación terapéutica (Tabla 1) [20].

TIPOS HISTOLÓGICOS DE CT

Los carcinomas derivados de células foliculares tiroideas pueden dividirse de manera general en 3 tipos: carcinomas bien diferenciados (CBDT), carcinomas poco diferenciados (CPDT) y CAT. Los CBDT a su vez se subdividen en: CPT, que es el tipo

más común (85%), carcinomas foliculares (CFT; 10%) y carcinomas oncocíticos (3%) [6].

De acuerdo con la clasificación de la OMS 2017 de tumores de los órganos endocrinos los CPT tienen diferentes variantes o patrones: patrón convencional o clásico, variante encapsulada, folicular, esclerosante difuso, células altas, columnar, morular y cribiforme, células en estoperol, oncocítica, sólido/trabecular, con estroma tipo fibromatosis/fascitis, fusocelular, células claras y tipo Whartin (Figuras 1, 2 y 3) [7]. De las anteriores algunas han sido identificadas como variantes agresivas por conferir una menor supervivencia comparado con el resto de las variantes. Las catalogadas como variantes agresivas son: células altas, células columnares, células en estoperol, esclerosante difuso y sólido/trabecular [8, 9, 10, 11].

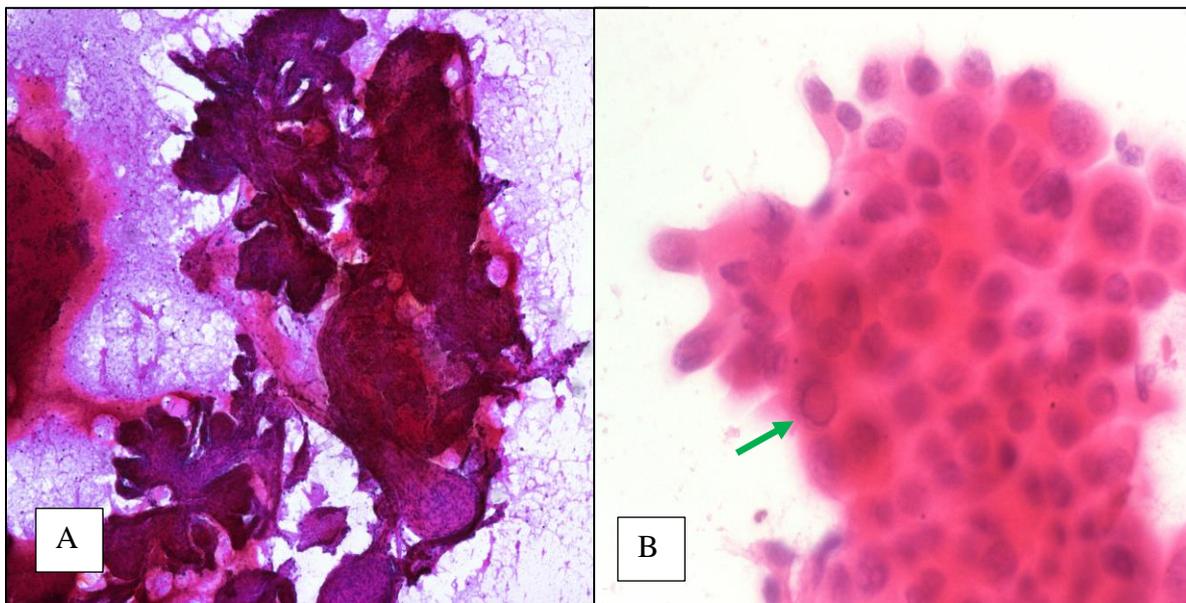


Figura 2. A. BAAF de CPT tiroides donde se aprecia la clara formación de papilas. B. BAAF de CPT donde se observan células con pseudoinclusiones (flecha).

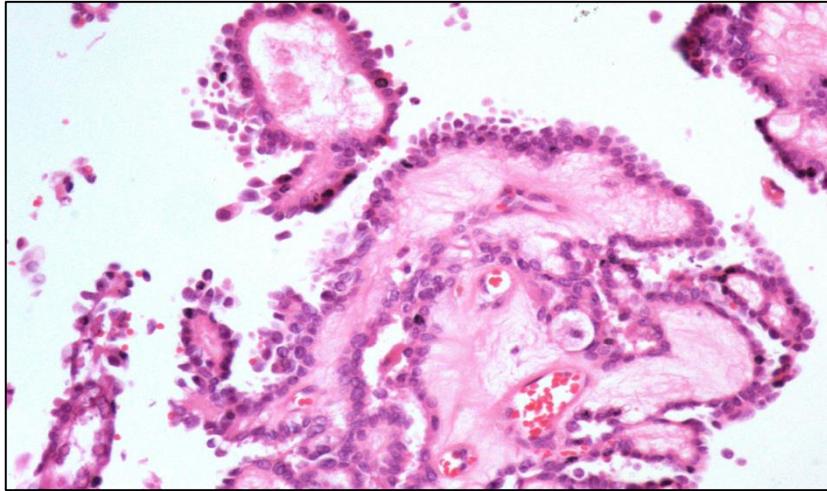


Figura 3. Carcinoma papilar de tiroides de tipo convencional

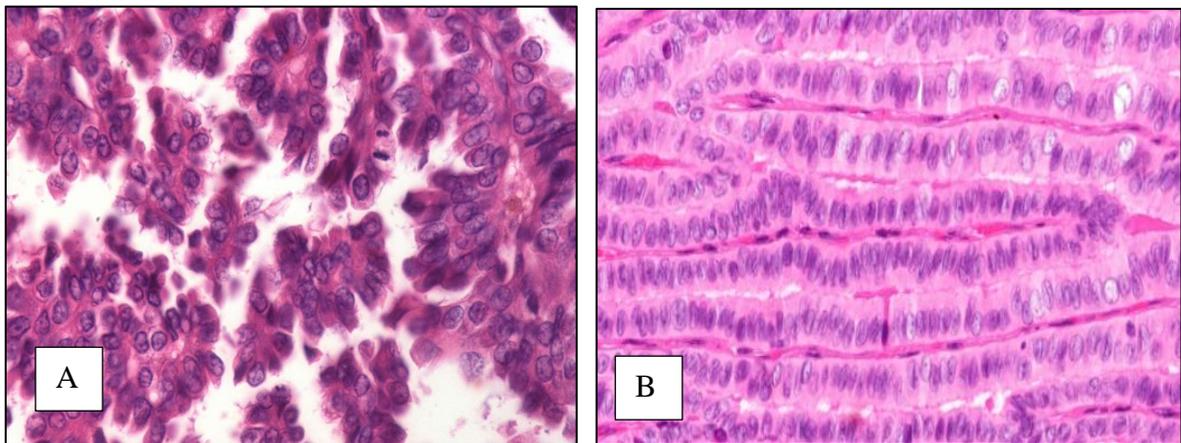


Figura 4. A. Carcinoma papilar de tiroides variante células en estoperol y B. células altas

TRATAMIENTO DEL CBDT

Tratamiento quirúrgico

El primer paso posterior al diagnóstico de malignidad o sospecha de malignidad del nódulo es la realización de Tiroidectomía total o subtotal con o sin disección ganglionar.

En pacientes de bajo riesgo, es decir, con carcinomas de <1 cm confinados a la tiroides

sin enfermedad ganglionar se puede considerar lobectomía, no obstante, existen estudios que han demostrado una supervivencia libre de recurrencia menor en pacientes a los que se les realiza lobectomía en comparación los que se realiza tiroidectomía total [21]. Lo anterior puede deberse a la alta frecuencia de multifocalidad de los carcinomas papilares y por esto en algunos centros se prefiere tiroidectomía total sobre lobectomía tanto en carcinomas papilares ≥ 1 cm como aquellos < 1 cm (Microcarcinomas papilares) [22].

Tratamiento con yodo radioactivo (I131)

Al yodo radioactivo en conjunto con el tratamiento quirúrgico y la terapia de supresión de TSH se les conoce como “terapia estándar del CBT”. La dosis de yodo radioactivo puede da **Figura 4. Sistema TI-RADS para clasificación de Nódulos Tiroideos** que en nuestro medio es mucho más frecuente el uso de dosis empíricas no haremos referencia al método de dosimetría. La aplicación de yodo radioactivo se basa

Tabla 1. Sistema de Bethesda para diagnóstico de citología tiroidea.

Categoría diagnóstica	Riesgo de malignidad si NIFTP se considera no maligno (%)	Riesgo de malignidad si NIFTP se considera maligno (%)	Manejo habitual
No diagnóstico o insatisfactorio	5-10%	5-10%	Repita FNA con guía de ultrasonido
Benigno	0-3%	0-3%	Clínica y ecográfica seguimiento
Atipia de significado indeterminado o lesión folicular de significado indeterminado importancia (AUS / FLUS)	6-18%	10-30%	Repita FNA, molecular prueba o lobectomía
Neoplasia folicular o sospechosa de una neoplasia folicular	10-40%	25-40%	Pruebas moleculares, lobectomía
Sospechoso de malignidad	45-60%	50-75%	Tiroidectomía casi total o lobectomía
Maligno	94-96%	97-99%	Tiroidectomía casi total o lobectomía

esencialmente en el riesgo de recurrencia/persistencia que tiene cada paciente. Para establecer el riesgo se utilizan diferentes parámetros relacionados con la extensión del cáncer, características histopatológicas y alteraciones moleculares. En la tabla 2 se muestran los criterios de las Guías de la ATA 2015, NCCN 2021 y SMNE 2009. A pesar de que existen algunas diferencias entre los criterios de las guías hay condiciones para las que de manera general se considera la terapia con yodo: tumor >4 cm, presencia de extensión extratiroidea macro y microscópica, presencia de metástasis a ganglios linfáticos cervicales y/o mediastinales y metástasis a distancia. Diferentes dosis se han propuesto como esquemas de ablación, adyuvancia o tratamiento. La dosis ablativa es de 30 mCi, con ésta se busca eliminar todas las células foliculares remanentes con el propósito de que la tiroglobulina (Tg) sea indetectable y facilite el seguimiento; este esquema se utiliza en pacientes de bajo riesgo aunque no se recomienda de manera rutinaria. La dosis adyuvante puede ir de 75 a 150 mCi y se administra cuando se tiene sospecha de cáncer residual microscópico en pacientes con riesgo intermedio o alto. La dosis de tratamiento va de >150 a 200 mCi y esta se brinda a pacientes que se conocen con enfermedad residual macroscópica locorregional que no pudo ser resecada o pacientes con metástasis a distancia, estos pacientes son clasificados por la mayoría de las guías como de alto riesgo para recurrencia.

Tabla 2. Grupos de riesgo según diferentes guías

ATA 2015	NCCN 2021	SMNE 2009
<p>Riesgo bajo</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sin metástasis locales o distantes; 2. Se ha resecado todo el tumor macroscópico 3. Sin invasión tumoral de tejidos o estructuras 	<p>RAI no típicamente recomendado</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Microcarcinomas papilares clásicos unifocales (<2 cm) o multifocales (todos los focos ≤ 1 cm) confinados a la tiroides; 2. Sin anticuerpos anti-Tg 	<p>Riesgo muy Bajo</p> <p>Paciente de cualquier edad, con neoplasia unifocal ≤1cm:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Sin microinvasión vascular o capsular ni a

locorreccionales

4. El tumor no tiene una histología agresiva (por ejemplo, de células altas, células en estoperol, células columnares)

5. Si se administra yodo 131I, no hay focos metastásicos ávidos de RAI fuera del lecho tiroideo en la primera exploración con RAI de cuerpo entero después del tratamiento

6. Sin invasión vascular

7. N0 clínico o ≤ 5 N1 patológica ($<0,2$ cm en la dimensión más grande)

Riesgo Intermedio

1. Invasión microscópica del tumor en los tejidos blandos peritiroideos

2. Focos metastásicos ávidos de RAI en el cuello en la primera exploración con RAI de cuerpo entero posterior al tratamiento

3. Histología agresiva (p. Ej., células altas, variante de células en estoperol, de células columnares)

4. Cáncer papilar de tiroides con invasión vascular

5. N1 clínico o > 5 N1 patológico con todos los ganglios linfáticos afectados <3 cm en la dimensión más grande

6. Microcarcinoma papilar multifocal con extensión extratiroidea y BRAFV600E mutado (si se conoce)

Riesgo Alto

1. Invasión macroscópica del tumor en los tejidos blandos peritiroideos

2. Resección tumoral incompleta

3. Metástasis a distancia

4. Tiroglobulina sérica postoperatoria sugestiva de metástasis a distancia

5. N1 patológico con cualquier ganglio linfático metastásico ≥ 3 cm en la dimensión más grande

detectables; y

3. Tg no estimulada postoperatoria menor de 1 ng / mL.

RAI selectivamente recomendado

1. Tumor primario de 2 a 4 cm,

2. Histología de alto riesgo (para carcinoma papilar),

3. Invasión linfática o vascular,

4. Metástasis en los ganglios linfáticos cervicales,

5. Multifocalidad macroscópica (un foco > 1 cm),

6. Tg sérica postoperatoria no estimulada ($<5-10$ ng / mL),

7. márgenes positivos microscópicos

RAI típicamente recomendado

1. Extensión extratiroidea macroscópica;

2. Tumor primario mayor de 4 cm;

3. Tg no estimulada postoperatoria mayor de 5 a 10 ng / mL.

4. Pacientes con metástasis a distancia conocidas / sospechadas en el momento de la presentación

tejidos peritiroideos o a ganglios y sin metástasis a distancia

2. Con resección quirúrgica completa

3. De estirpe histológica no agresiva

4. Sin historia familiar de cáncer papilar ni personal de radiación en cuello

Riesgo Bajo

Paciente de cualquier edad, con neoplasia > 1 cm y ≤ 4 cm o multifocal

1. Sin microinvasión capsular o vascular ni a tejidos peritiroideos o a ganglios y sin metástasis a distancia

2. Con resección quirúrgica completa

3. De estirpe histológica no agresiva

Riesgo Alto

Paciente de cualquier edad, con una o más de las siguientes características

1. Tumor > 4 cm

2. Invasión extratiroidea o vascular

3. Estirpe histológica agresiva

4. Metástasis ganglionares o a distancia

5. Resección quirúrgica incompleta (tiroidectomía menor a la total o casi total y/o tumor remanente)

Tratamiento de supresión de TSH

De manera similar al tratamiento con yodo la supresión de TSH se apoya en la estratificación de riesgo. De manera general para pacientes con alto riesgo se recomienda mantener la TSH <0.1 mU/L, con riesgo intermedio entre 0.1-0.5 mU/L y con riesgo bajo de 0.5 a 2.0 mU/L. Las dosis de LT4 para mantener suprimida la TSH pueden variar de 2.11 a 2.56 mcg/kg/día [23].

Tratamiento con terapia sistémica

El tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (ITC) está reservado para aquellos pacientes que desarrollan RTYR con enfermedad metastásica, rápidamente progresiva, sintomática y/o que amenaza la vida y que no es susceptible de control local utilizando otros enfoques. Hoy en día hay únicamente aprobados tres ITC para pacientes con CBDT RTYR: sorafenib, lenvatinib y cabozantinib [12,45].

SEGUIMIENTO DEL CBDT

Para establecer el nivel de respuesta al tratamiento, las guías recomiendan de manera colectiva realizar en distintos periodos de tiempo (cada 6-12 meses) medición de Tiroglobulina suprimida y/o estimulada, anticuerpos anti-tiroglobulina y ultrasonido cervical. La ATA divide el tipo de respuesta clínica en 4 clases: 1) Respuesta excelente, 2) Respuesta estructural incompleta, 3) Respuesta bioquímica incompleta y 4) Respuesta indeterminada. Dependiendo del tipo de respuesta se tomará la decisión de realizar alguna otra maniobra diagnóstica (p. ej., TAC de tórax, FDG PET/CT) y/o terapéutica (p. ej., cirugía, yodo radioactivo).

PRONÓSTICO DEL CDBT

Los pacientes con CDBT tienen una supervivencia global a 5 años de 98.3% [24] y a 10 años de 90% a 95% con terapia estándar [25]. Diferentes escalas pronósticas fueron desarrolladas con el fin de predecir supervivencia en CDBT de las que destacan la escala MACIS, AGES, AMES y el TNM [26]. Cabe destacar que las escalas de MACIS y AGES únicamente fueron diseñadas para pacientes con CPT. La clasificación TNM vigente es la 8ª edición que fue publicada en 2017 [27].

REFRACTARIEDAD AL TRATAMIENTO CON YODO RADIOACTIVO (RTYR)

A pesar de la excelente supervivencia que presentan los CTBD, hasta un 30% persisten/recurren y 5-15% desarrollan RTYR [27, 28]. Actualmente se establece que un CDBT es RTYR cuando cumple cualquiera de los siguientes criterios: (I) el tejido maligno / metastásico nunca concentra yodo radioactivo (no se capta fuera del lecho tiroideo en el primer escaneo terapéutico), (II) el tejido tumoral pierde la capacidad de concentrar el yodo radioactivo después de evidencia previa de enfermedad ávida de yodo radioactivo (en ausencia de contaminación por yodo) , (III) el yodo radioactivo se concentra en algunas lesiones pero no en otras; y (IV) la enfermedad metastásica progresa a pesar de una concentración significativa de yodo radioactivo [12]. Los carcinomas localmente avanzados (T4a) y los que presentan metástasis a distancia al momento del diagnóstico o durante el seguimiento conforman una parte importante de este grupo [29, 30].

ESTUDIO MOLECULAR DEL CBDT

En las últimas dos décadas los análisis moleculares han ocupado un papel central en el estudio del cáncer principalmente por su capacidad de predicción pronóstica y el impacto terapéutico que pueden tener. Con respecto al cáncer de tiroides, se describieron las alteraciones genéticas involucradas en la progresión de CBDT a CPDT y anáplastico. Dos de las alteraciones más importantes son las mutaciones de la proteína BRAFV600E y el promotor del gen *TERT* [31, 32, 33, 34]. Ambas han mostrado cierta asociación con la RTYR, sin embargo, ninguno con suficiente precisión para ser recomendado por las guías actuales.

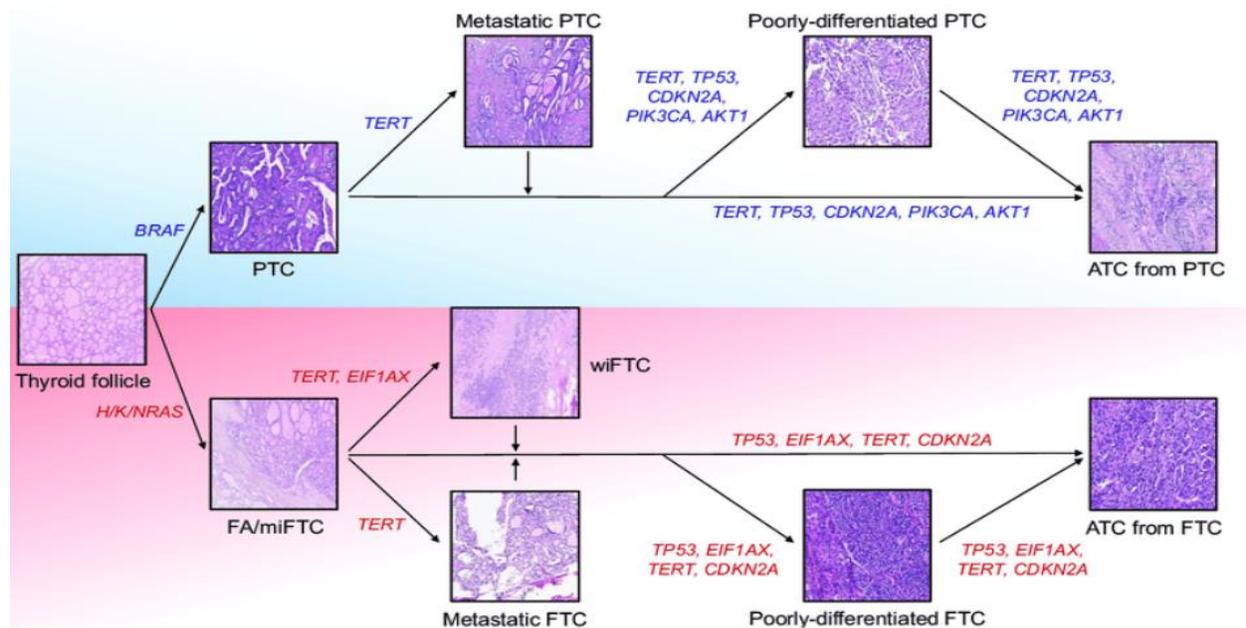


Figura 5. Esquema que muestra las vías de oncogénesis de tejido normal a carcinoma papilar y folicular, y las alteraciones genéticas involucradas en la desdiferenciación de los mismos.

DIFERENCIACIÓN TIROIDEA

En 2014 el programa El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) publicó los resultados del estudio molecular multiplataforma más grande realizado hasta hoy en cáncer papilar de tiroides [35]. Este estudio incluyó el análisis de arreglos de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), exoma completo, secuenciación de ARN, secuenciación de micro ARN, metilación de ADN y microarreglos de lisado de proteínas de fase inversa de 390 tumores. En la sección de expresión génica de esta investigación se creó el Puntaje de Diferenciación Tiroidea (PDT) que consiste en el promedio de expresión de 16 genes implicados en el metabolismo y funcionamiento de las células foliculares (Tabla 3, Figura 2). Este puntaje mostró correlación con la escala pronóstica MACIS y el riesgo ATA, además del patrón histológico lo que lo convierte en un marcador atractivo no solo de pronóstico sino también de RTYR.

Tabla 3. Genes relacionados a la diferenciación folicular tiroidea

Simbolo	Nombre	Función	Banda citogenética o locus
<i>DIO1</i>	Desyodinasas de yodotironina tipo 1	Codifica para una desyodinasas que convierte T4 (3,5,3',5'-tetrayodotironina) a la forma activa T3 (3,5,3'-triyodotironina) por una desyodinación en el sitio 5'.	1p32.3
<i>DIO2</i>	Desyodinasas de yodotironina tipo 2	Codifica para una desyodinasas que convierte T4 (3,5,3',5'-tetrayodotironina) a la forma activa T3 (3,5,3'-triyodotironina)	14q31.1

		por una desyodinación en el sitio 5'.	
<i>DUOX1</i>	Oxidasa dual 1 (Oxidasa tiroidea 1 tío NADPH ó THOX1)	Codifica para una glucoproteína miembro de la familia de las oxidasas tipo NADPH. Modula la función de la tiroperoxidasas y otras peroxidas en la membrana apical de la célula folicular tiroidea. Su denominación dual se refiere a que contiene un dominio de homología con la peroxidasa y otro dominio gp91phox.	15q21.1
<i>DUOX2</i>	Oxidasa dual 2, (Oxidasa tiroidea 1 P138-Tox NADH/NADOH ó THOX2)	Codifica para una glucoproteína miembro de la familia de las oxidasas tipo NADPH. Modula la función de la tiroperoxidasas y otras peroxidas en la membrana apical de la célula folicular tiroidea. Su denominación dual se refiere a que contiene un dominio de homología con la peroxidasa y otro dominio gp91phox.	15q21.1
<i>FOXE1</i> (<i>TTF-2</i>)	Caja de Forkhead E1 (Thyroid Transcription Factor 2)	Codifica para un factor de transcripción involucrado en la morfogénesis y diferenciación folicular tiroidea	9q22.33

<i>GLIS3</i>	GLI-similar Zinc Finger 3 (Gen relacionado a dedos de zinc <i>GLIS3</i>)	Codifica para un factor de transcripción mediado por activación TSH/TSHR involucrado en síntesis de hormonas tiroideas	9p24.2
<i>NKX2-1</i> (<i>TTF-1</i>)	NK2 homeobox 1 (Thyroid transcription factor 1)	Codifica para un factor de transcripción tiroideo involucrado en la organogénesis y morfogénesis tiroidea.	14q13.3
<i>PAX8</i>	Caja emparejada 8	Codifica para un factor de transcripción que asiste en la expresión de <i>TSHR</i> así como el desarrollo de la tiroides y expresión de genes tejido específicos.	2q14.1
<i>SLC26A4</i>	Familia transportadores de solutos 26 miembro 4	Codifica para un transportador de yodo apical independiente de sodio asociado a cloruro. Su mutación produce el síndrome de Pendred.	7q22.3
<i>SLC5A5</i>	Familia transportadores de solutos 5 miembro 5	Codifica para un cotransportador Na-yodo (Na-I ó NIS)	19p13.11
<i>SLC5A8</i>	Familia transportadores de solutos 5 miembro 8	Codifica para un transportador pasivo de yodo, monocarboxilatos y ácidos grasos de cadena corta por un	12q23.2

		transportador de lactato acoplado a sodio en la porción apical.	
<i>TG</i>	Tiroglobulina	Codifica para la glucoproteína del mismo nombre que sirve como sustrato para la síntesis de T3 y T4 así como su almacenamiento (al igual de otras formas inactivas de hormonas tiroideas).	8q24.22
<i>THRA</i>	Receptor alfa de hormona tiroidea	Codifica para la subunidad alfa del receptor nuclear para T3	17q21.1
<i>THRB</i>	Receptor beta de hormona tiroidea	Codifica para la subunidad beta del receptor nuclear para T3	3p24.2
<i>TPO</i>	Tiroperoxidasa	Codifica para una glucoproteína de membrana que cataliza la yodinación de los residuos de tirosina en tiroglobulina y la formación de fenoxi-ésteres entre pares de tirosinas yodinas para la síntesis de hormonas tiroideas, T4 y T3.	2p25.3
<i>TSHR</i>	Receptor de tirotropina	Codifica para el receptor de membrana de la TSH y principal controlador del metabolismo y crecimiento tiroideo.	14q31.1

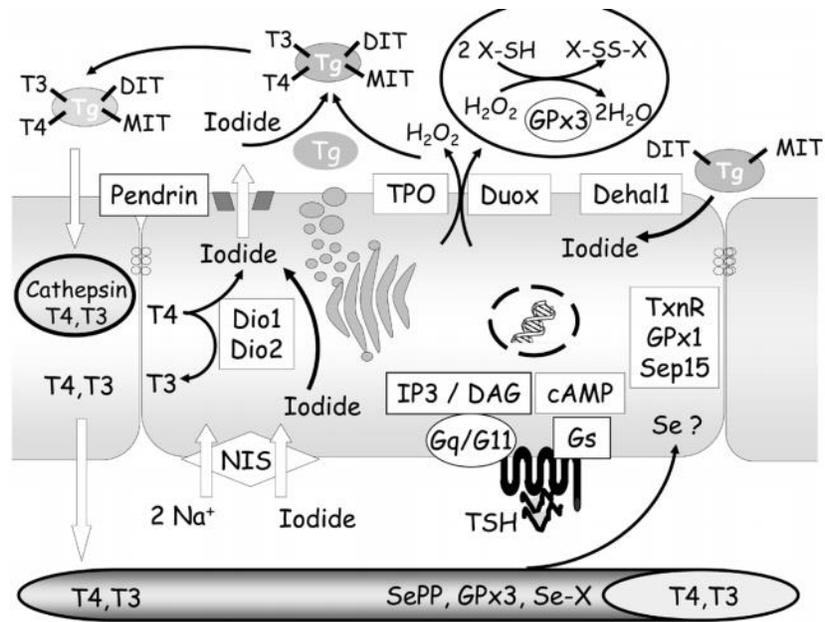


Figura 6. Esquema de la biosíntesis de hormonas tiroideas donde se observan las proteínas codificadas por algunos de los genes del PDT (*TSHR*, *DUOX*, *DIO*, *NIS* (*SLC5A5*), *Pendrina* (*SLC26A4*), *TPO* y *TG*).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de yodo radioactivo se basa en la estratificación de riesgo de la ATA 2015, sin embargo, es incierto qué carcinomas serán RTYR ya que actualmente no existe ninguna manera de predecirlo. A lo anterior se le suma que el yodo radioactivo no es del todo inocuo ya que existen múltiples complicaciones de aparición temprana y tardía [36], además de que su costo en México por una aplicación puede ir de los \$27,000 a los \$43,000 dependiendo la dosis (sin incluir rhTSH que tiene costo de \$ 32,104) y se requiere hospitalización por al menos 48 hrs en un cuarto aislado.

JUSTIFICACIÓN

Crear un modelo que incluya un análisis molecular para predecir que carcinomas papilares desarrollarán refractariedad al radioyodo para evitar su administración en casos donde no existirá beneficio aminorando la carga económica, así como los efectos adversos que pudiera generar a los pacientes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los genes que conforman el PDT en conjunto o de manera aislada son predictores de refractariedad al tratamiento con yodo radioactivo en pacientes con CPT?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Crear un modelo que ayude a predecir qué carcinomas papilares (CPT) tienen mayor probabilidad de desarrollar RTYR.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinación y análisis de expresión de 16 genes de diferenciación en CPT RTYR y no RTYR
- Determinación y análisis de mutación del gen *BRAF 1799T>A*.
- Recolección y análisis de variables clinico-patológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio clínico primario observacional piloto de casos y controles anidado en una cohorte.

Población de estudio

Casos de carcinoma papilar de tiroides que hayan sido diagnosticados y tratados en el INCMNSZ.

Desenlace

El desenlace de interés es el desarrollo de RTYR y el perfil genómico resultante que pueda pronosticar el desarrollo de este fenotipo.

Criterios de Selección

-Criterios de inclusión. Casos de carcinoma papilar de tiroides con riesgo ATA intermedio o alto que hayan recibido tratamiento o terapia adyuvante con yodo radioactivo.

-Criterios de exclusión. Casos de carcinoma papilar de tiroides que no hayan recibido yodo radioactivo.

-Criterios de eliminación. Casos de carcinoma papilar de tiroides con riesgo ATA intermedio o alto que hayan recibido tratamiento o terapia adyuvante con yodo radioactivo que no cuenten con suficiente información clínica, que no exista material en el archivo de patología o que sea muy escaso y no permita realizar las pruebas moleculares.

Definiciones operacionales

-Casos. Aquellos CPT que cumplan criterios de RTYR en cualquier momento durante el seguimiento.

-Controles. Aquellos CPT que nunca cumplieron criterios de RTYR y se mantuvieron con respuesta excelente durante al menos 5 años posterior al último tratamiento con yodo.

Criterios de RTYR [12]:

1.-El tejido maligno / metastásico nunca concentra yodo radioactivo (no se capta fuera del lecho tiroideo en el primer escaneo terapéutico).

2.-El tejido tumoral pierde la capacidad de concentrar el yodo radioactivo después de evidencia previa de enfermedad ávida de yodo radioactivo (en ausencia de contaminación por yodo).

3.-El yodo radioactivo se concentra en algunas lesiones, pero no en otras; y

4.-La enfermedad metastásica progresa a pesar de una concentración significativa de yodo radioactivo.

Tamaño de muestra

Debido a que no existe ningún estudio donde se haya estudiado la expresión de los 16 genes que conforman el PDT en casos RTYR y no RTYR, desconocemos si existe diferencia de la misma por lo que se plantea la necesidad de realizar un estudio piloto que incluya de 10 a 30 casos con sus respectivos controles [38, 39].

Obtención de datos clínicos y revisión histopatológica

Realizaremos la búsqueda de los datos demográficos, clínicos e histopatológicos en los archivos electrónicos y físicos del INCMNSZ para su posterior registro. Las laminillas de los casos se revisarán por dos patólogos y se corroborará el diagnóstico emitido

previamente. Se hará énfasis en determinar de manera adecuada las variantes histológicas.

Tabla 4. Tabla de variables clínico-patológicas

Variables	Unidad de medición y/o categorías	Tipo de variables
Edad	Años	Cuantitativa continua
Sexo	Mujer/Hombre	Cualitativa binaria
Enfermedad tiroidea autoimmune (tiroiditis de Hashimoto, Graves)	Si, No	Cualitativa binaria
Estadio AJCC 8	I, II,III, IV	Cualitativa ordinal
T	T1a, T1b, T2, T3a, T3b, T4a, T4b	Cualitativa ordinal
N	N0, N1	Cualitativa ordinal
M	M0, M1	Cualitativa ordinal
Resección del tumor	R0, R1, R2	Cualitativa ordinal
Tiroglobulina postoperatoria	Concentración de tiroglobulina en ng/ml	Cuantitativa continua
Captación de foco metastásico cervical en scan postyodo	Si, No	Cualitativa binaria

Riesgo ATA	Bajo, Intermedio, Alto	Cualitativa ordinal
Tipo histológico	Convencional, Variantes agresivas (células altas, hobnail, células columnares)	Cualitativa nominal
Focalidad	Unifocal, Multifocal	Cualitativa binaria
Número de ganglios con metástasis	Número de ganglios reportados con metástasis en la disección ganglionar	Cuantitativa discreta
Expresión génica	Fold Change (log2)	Cuantitativa continua
Extensión a tejidos blandos peritiroideos	Si, No	Cualitativa binaria
Dosis inicial de yodo	Milicurios (mCi)	Cuantitativa discreta
Dosis acumulada de yodo	Milicurios (mCi)	Cuantitativa discreta
Seguimiento	Meses	Cuantitativa discreta
Metástasis durante el seguimiento	Si, No	Cualitativa binaria
Estatus al final del seguimiento	Vivo, Muerto	Cualitativa binaria

Análisis de mutación *BRAF 1799T>A*

1.-Extracción de ADN: Se realizarán dos cortes de 10 micras de tejido embebido en parafina y se montarán en un portaobjetos. Posteriormente se realizará la macrodissección del tumor. El ADN será extraído empleando los kits QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración así como la calidad del ADN de cada muestra se determinará por espectrofotometría (Nanodrop-Termofisher®).

2.-Amplificación mediante PCR: Empleando primers específicos se realizará la amplificación del exón 15 de BRAF.

3.-Purificación de productos de PCR: Se purificarán 10 µl de producto de PCR empleando 1 µl de Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) etanol al 70%, solución desnaturalizante PyroMark y buffer de lavado Pyromark (Qiagen, USA) (Qiagen, USA).

4.-Pirosecuenciación: Los productos de PCR serán hibridados a 80°C en una microplaca con una mezcla de 24.2 µl de buffer de alineamiento Pyromark (Qiagen, USA) y 0.8 µl de primer de secuenciación específico (Qiagen, USA). La reacción de pirosecuenciación se realizará usando el kit PyroMark Gold Q24 Reagents (Qiagen, USA) en el equipo PyroMark Q24. Las secuencias obtenidas serán interpretadas con el software PyroMark Q24 V 2.0 (Qiagen, USA).

Análisis de la expresión génica

El análisis de expresión génica se dividirá en 4 pasos:

1.-Extracción de ARN: Para este paso utilizaremos el Kit de extracción RNeasy FFPE (Qiagen). De manera breve se identifica el área de tumor en la laminilla y se raspa con

un bisturí para después introducirlo en tubos de 1.5 ml. Se realiza la lisis del tejido con proteinasa K, posteriormente se une el ARN a una membrana de sílice en fase sólida, se realizan varios pasos de lavado para finalmente eluirlo. Posterior a la elusión se cuantificará la concentración y calidad del ARN en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 y se almacena de -30°C a -15°C .

2.-Retrotranscripción: En este paso se realizará la síntesis de ADNc con el kit RT2 First Strand (Qiagen). Para esto se elimina el ADN genómico y posteriormente se preparan los componentes de retrotranscripción en un Mix que incluye nuestro ARN y se incuba a 42°C por 15 minutos.

3.-PCR en tiempo real: Una vez que tenemos el ADNc se continúa con la amplificación. Utilizaremos el arreglo RT2 Profiler PCR Array Format R (Qiagen) que consiste en un arreglo circular de 100 tubos en el que se pueden analizar 4 muestras de la que cada una ocupa 24 tubos: 16 para genes de diferenciación, 4 para genes constitutivos, 1 para control de PCR, 1 para control de retrotranscripción, 2 para controles de contaminación con DNA genómico. La PCR se llevará a cabo en un Rotor Gene Q con el kit RT2 SYBR Green Mastermix.

4.-Cálculo de expresión: En esta fase ocuparemos el método de Vandesompele para el cálculo de la expresión relativa [40]. Finalmente, el resultado será convertido a logaritmo en base 2 y se procederá con el cálculo de PDT.

Análisis estadístico

Se utilizaron estadísticos descriptivos para el resumen de todas las variables analizadas como el promedio y la mediana así como el rango intercuartilar o DE dependiendo de la forma de la distribución de cada variable y su escalamiento original.

Para la estadística inferencia se utilizaron pruebas estadísticas de contraste de la hipótesis principal de acuerdo al escalamiento original de las variables incluidas en nuestro estudio. Para la comparación de variables dimensionales entre grupos se utilizará prueba T de Student o U de Mann-Whitney según distribución de acuerdo a los parámetros de normalidad (sesgado y curtosis) y Chi cuadrada o exacta de Fischer para variables categóricas. Construiremos curvas de Kaplan-Meier para aquellas variables significativas en el modelo de regresión de Cox.

-Análisis de supervivencia y regresión logística

Se realizarán análisis de regresión logística binaria y modelo de regresión de Cox uni y multivariados para determinar los factores predictores independientes de RTYR y de supervivencia.

-Curvas ROC

Se realizarán curvas ROC para estimar el área bajo la curva de los genes que muestren diferencias entre CPT RTYR y no RTYR. Cualquier valor de p obtenido para la prueba de hipótesis de dos colas igual o inferior al 0.05 o 5% (error alfa) se considero como estadísticamente significativo. Los análisis y las representaciones gráficas de resultados se realizaron mediante los programas IBM SPSS statistics v.25.0 y RStudio v1.3.1093.

Cronograma de actividades

Actividades	Trimestre							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Clasificación de casos y obtención de datos clínico-patológicos de los archivos electrónicos								
Búsqueda y obtención de los bloques de parafina del archivo de patología								
Extracción de ARN y retrotranscripción a ADNc								
Determinación de la expresión mediante RT-qPCR								
Análisis de los resultados y escritura de tesis								
Presentación de los resultados								

RESULTADOS

En el periodo comprendido entre 2002-2012 hubo 583 casos de carcinoma de tiroides en el INCMNSZ de los que 488 (83.7%) fueron CPT. De acuerdo a los criterios de la guía ATA 2015 de los 488 casos de CPT, 223 (45.6%) casos correspondieron a bajo riesgo, 199 (40.7%) a riesgo intermedio y 66 (13.5%) a alto riesgo.

Durante la selección de casos identificamos 27 (10.1%) casos de CPT RTYR de los que se eliminaron 4 (14.8%) por no contar con material en archivo y 2 (7.4%) por no tener información clínica/histopatológica suficiente. En total se incluyeron 21 casos (CPT RTYR) y 21 controles (CPT no RTYR), cada grupo integrado por 7 CPT de alto riesgo (30%) y 14 CPT (70%) de riesgo intermedio de recurrencia. Respecto a los criterios de RTYR, el criterio que se cumplió con mayor frecuencia fue el IV (47.6%) y el que se cumplió con menor frecuencia fue el I (9.5%). Las figuras 7, 8 y 9 muestran el diagrama de flujo de la selección de casos, los criterios de riesgo ATA y los criterios de RTYR cumplidos por los casos de CPT respectivamente.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

En la tabla 5 se encuentran resumidas las características clínico-patológicas de CPT RTYR y no RTYR. Los pacientes con CPT RTYR tuvieron una mayor edad (media 52 ± 16.6 vs 41 ± 11.9 años, $p=0.019$), tumores más grandes (mediana 3.2 ($2-5.1$) vs 2.1 ($1.7-3.2$) cm, $p=0.048$), se encontraron en estadios más avanzados ($p=0.005$), presentaron con mayor frecuencia metástasis a distancia durante el seguimiento ($p<0.001$) y tuvieron mayores dosis acumuladas de yodo (539.28 ± 132.8 vs 278.57 ± 141 mCi, $p<0.001$). En total 16 casos, 15 CPT RTYR y 1 CPT no RTYR presentaron

metástasis a distancia; los sitios de metástasis fueron pulmón (88%), piel (5.5%) y cerebro (5.5%). Únicamente un paciente con CPT RTYR fue tratado con ITC (sunitinib), el resto de pacientes con metástasis continúa con vida y se encuentran en vigilancia.

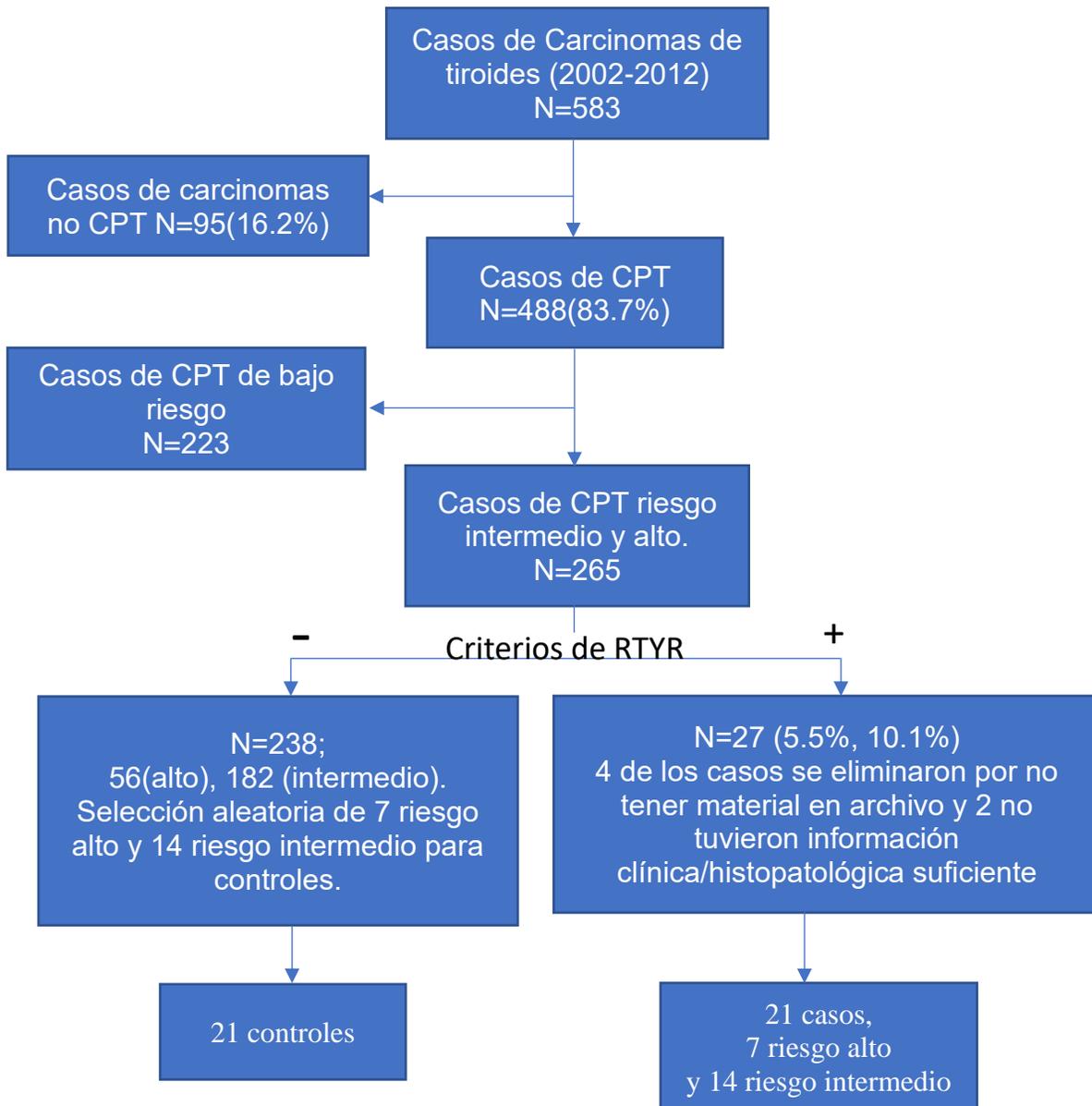


Figura 7. Diagrama de flujo que muestra el proceso de selección de casos

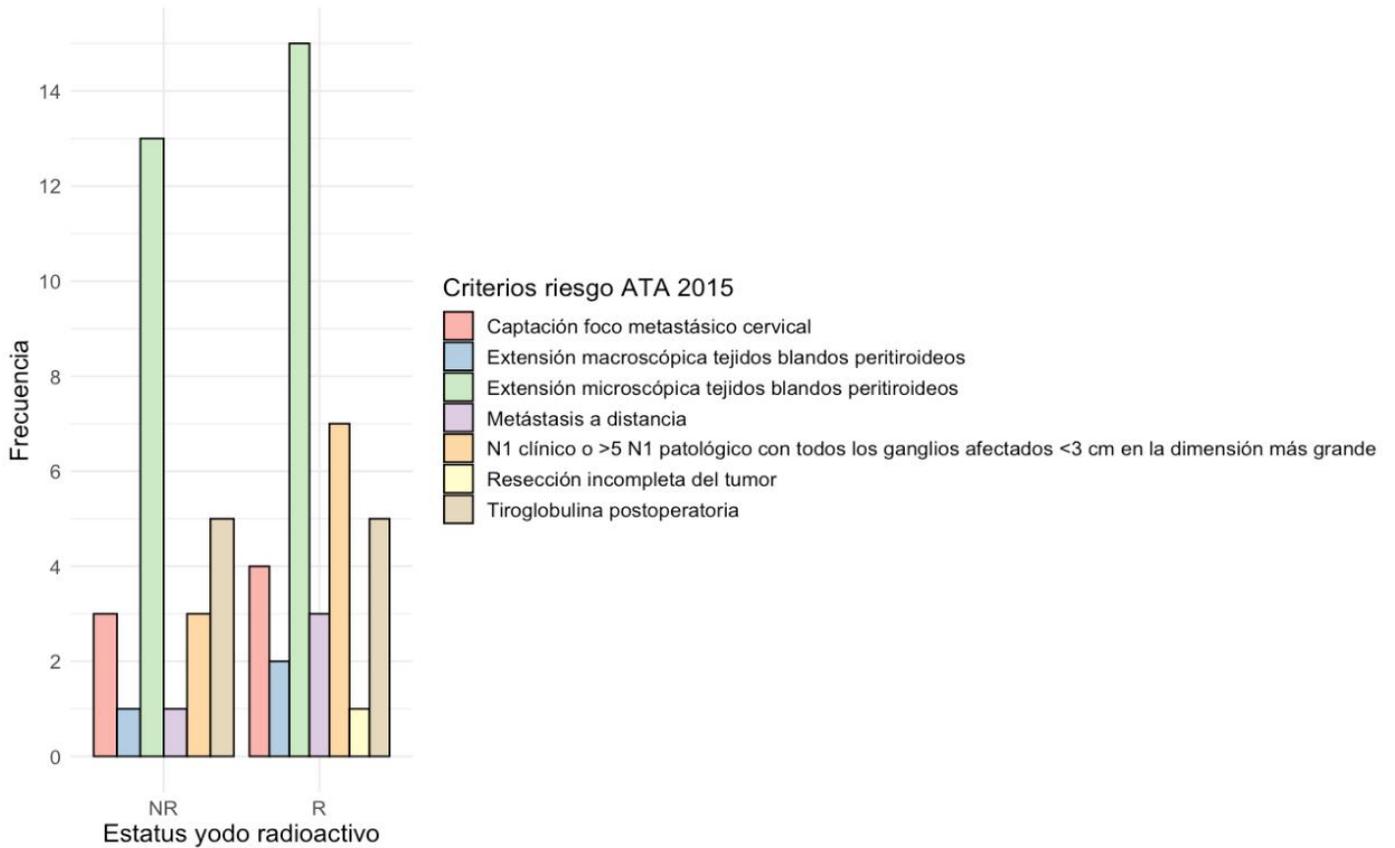


Figura 8. Gráfica de barras que muestra la frecuencia de los criterios de riesgo ATA 2015 cumplidos por los casos de CPT RTYR y no RTYR.

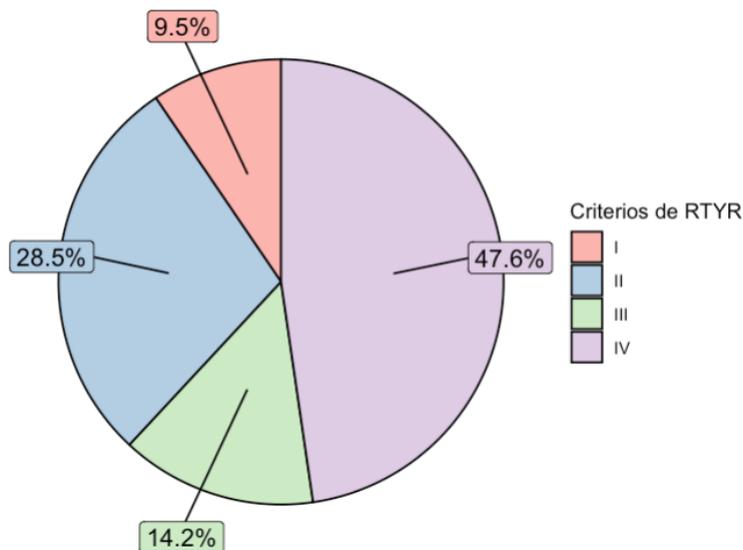


Figura 9. Gráfica de sectores que muestra el porcentaje de casos que cumplieron cada uno de los criterios de RTYR.

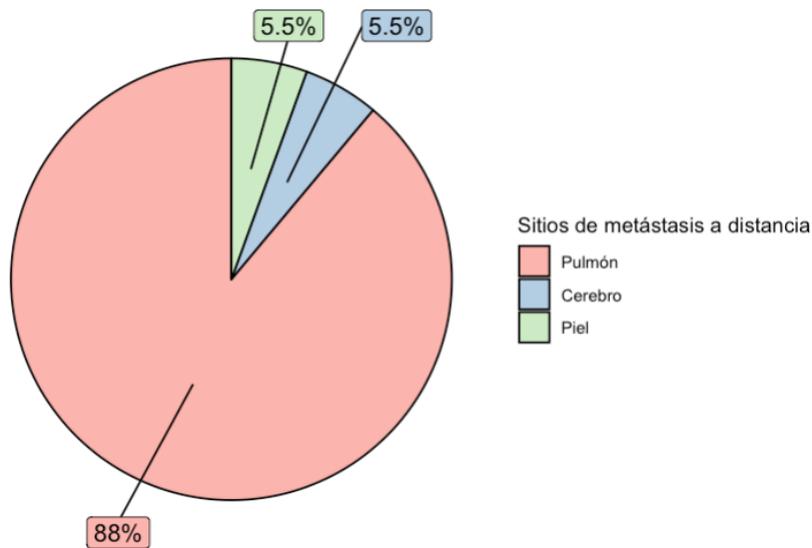


Figura 10. Gráfica de sectores que muestra los distintos sitios de metástasis a distancia y el porcentaje de casos respectivamente.

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los paciente con CPT no RTYR y CPT RTYR

	Pacientes con CPT no RTYR (n=21)	Pacientes con CPT RTYR (n=21)	<i>p</i>
Edad (media, DE)	41.67±11.9	52.62±16.6	0.019**
Edad mujeres (media, DE)	43.06±11.15	52.67±17.04	0.073*
Sexo, n(%)			0.454
Mujeres	18 (85.7)	15 (71.4)	
Hombres	3 (14.3)	6 (28.6)	
Enfermedad autoinmune, n(%)	3 (14.3)	1 (4.8)	0.606
Tamaño del tumor (mediana, RIC)	2.1 (2)	3.2 (2.9)	0.048**
Focalidad			0.116
Unifocal, n(%)	10 (47.6)	15 (71.4)	
Multifocal, n(%)	11 (52.3)	6 (28.6)	
Márgen quirúrgico			0.757
Positivo, n(%)	9 (42.8)	10 (47.6)	
Negativo, n(%)	12 (57.1)	11 (52.3)	

Extensión a tejidos blandos peritiroideos, n(%)	20 (95.2)	19 (90.5)	1.0
Resección del tumor, n(%)			1.0
R0/R1	21 (100)	20 (95.2)	
R2	0	1 (4.7)	
Ganglios con metástasis (mediana, RIC)	4.5 (9.2)	6 (8)	0.822
Proporción de ganglios disecados con metástasis (% , DE)	49±31	53±33	0.625
Tg postoperatoria, ng/mL (mediana, RIC)	1 (2.7)	2 (9.1)	0.070*
Metástasis a distancia al momento del dx, n(%)	1 (4.7)	3 (14.3)	0.606
Metástasis a distancia durante el seguimiento, n(%)	1 (4.8)	12 (66.7)	<0.001**
Estadio AJCC 8, n(%)			0.005**
Estadio I	18 (85.7)	8 (38.1)	
Estadio II	3 (14.3)	11 (52.4))	
Estadio III	0 (0)	0 (0)	
Estadio IV	0 (0)	2 (9.5)	
Dosis inicial de yodo, mCi (mediana, RIC)	150 (50)	200 (25)	0.175
Dosis acumulada de yodo, mCi (media, DE)	278.57±141	539.28±132.8	<0.001**
Captación de foco metastásico en cuello en primer scan post tx con yodo , n(%)	3 (14.3)	4 (19)	1.0
Estatus al final del seguimiento, n(%)			0.232
Vivos	21 (100)	18 (85.7)	
Muertos	0	3 (14.2)	
Meses de seguimiento (mediana, RIC)	120 (96)	120 (54)	0.269
BRAF 1799T>A , n(%)	17 (85)	20 (90.4)	0.343
Código de significancia: <0.05 (**), ≥0.05-<0.1 (*).			

ANÁLISIS DE MUTACIÓN *BRAFV600E*

La mutación de *BRAFV600E* se presentó en el 88% del total de CPT, no encontramos diferencia significativa entre los CPT no RTYR y los CPT RTYR (85% vs 90.4%, $p=0.343$).

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Comparamos la expresión de los 16 genes de diferenciación entre los CPT RTYR y no RTYR y encontramos mayor expresión de los genes *TSHR*, *NKX2.1*, *DUOX1* y *FOXE1* en los CPT RTYR en comparación con los CPT no RTYR (Wilcoxon Rank-Sum test, $p=0.04$, $p<0.01$ y $p=0.01$ y $p=0.01$ respectivamente) y de manera contraria *SLC5A5* (simporter Na^+/I^-) se encontró con disminución de su expresión (Wilcoxon Rank-Sum test, $p=0.01$). El gen de *TG* mostró una clara sobreexpresión en los CPT RTYR (expresión media 4.4 ± 1.5 vs 1.75 ± 4 log₂), sin embargo, no hubo diferencia significativa (Wilcoxon Rank-Sum test, $p=0.06$). Calculamos el PDT y encontramos diferencia significativa entre CPT RTYR y no RTYR (Wilcoxon Rank-Sum test, $p=0.04$). La figura 11 muestra la expresión de cada gen en CPT no RTYR y RTYR, la figura 12 muestra un mapa de calor con agrupación no supervisada del total de CPT, las figuras 13 a 15 muestran esquemas hipotéticos de señalización de la vía TSHR en una célula normal, una célula de CPT no RTYR y una célula de CPT RTYR respectivamente, basados en los resultados de la expresión génica.

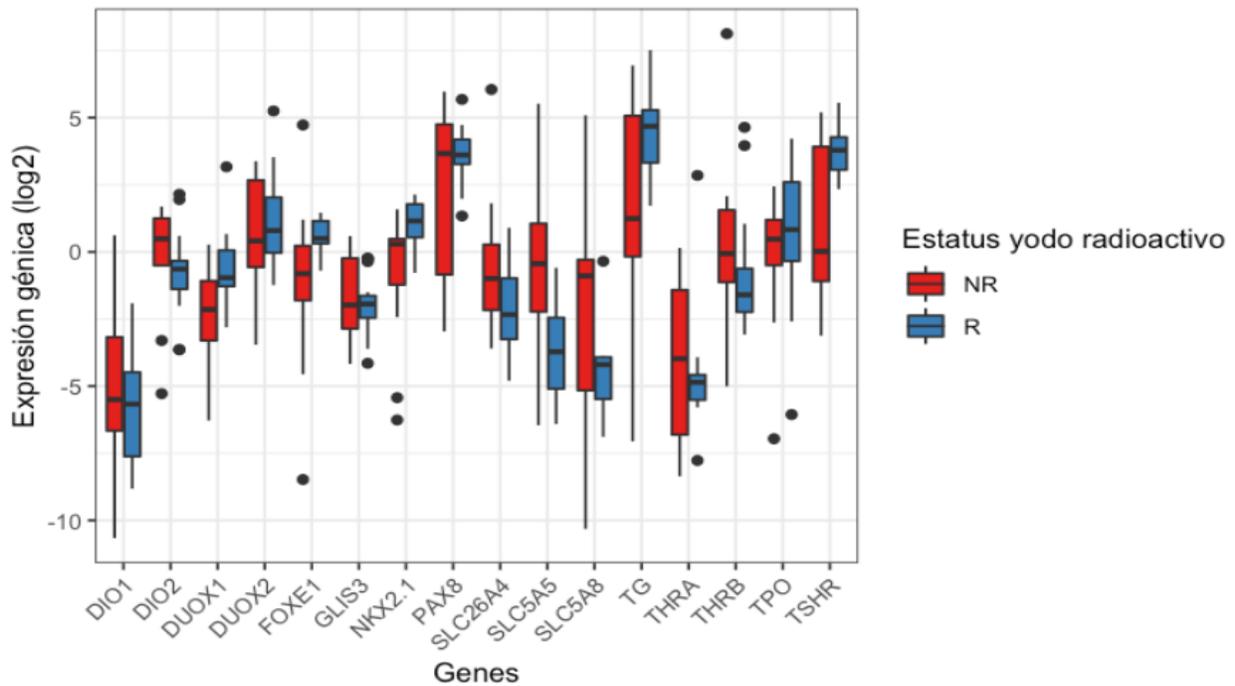


Figura 11. Gráfica de cajas agrupadas que muestra la expresión de CPT no RTYR (NR) y CPT RTYR (R) por cada gen.

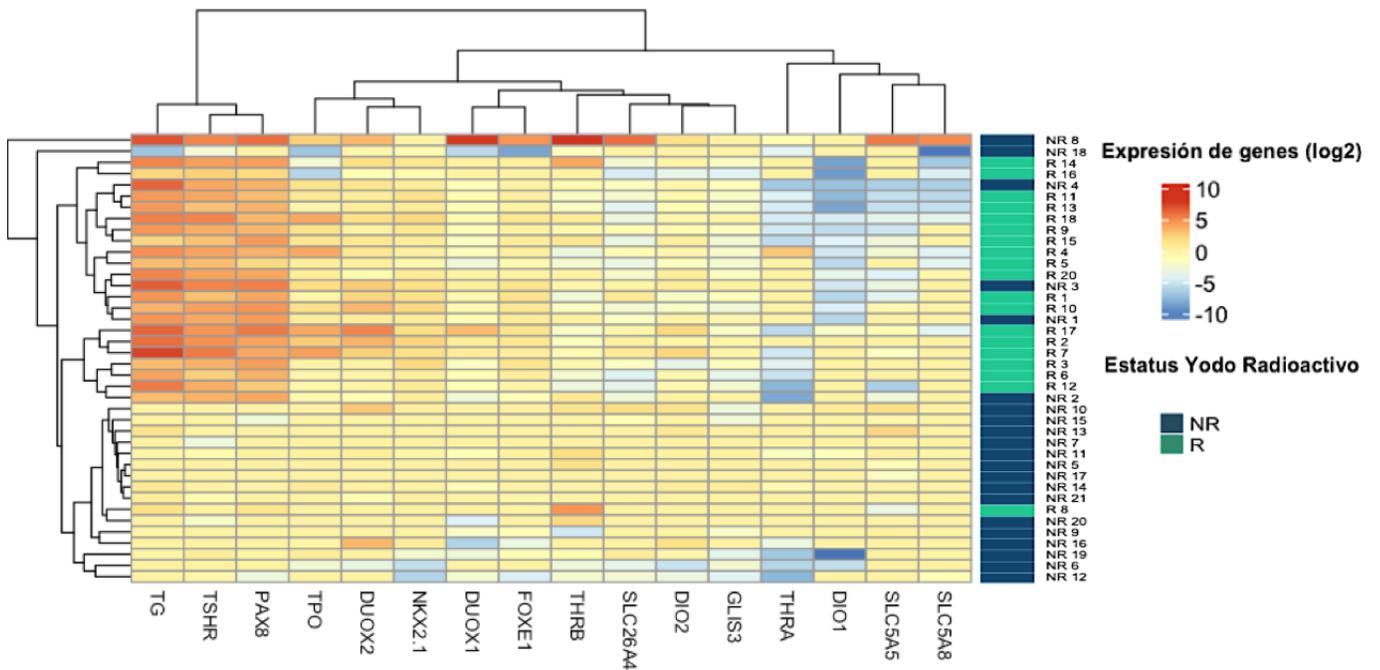


Figura 12. Agrupación no supervisada con mapa de calor de la expresión de los 16 genes de cada caso de CPT.

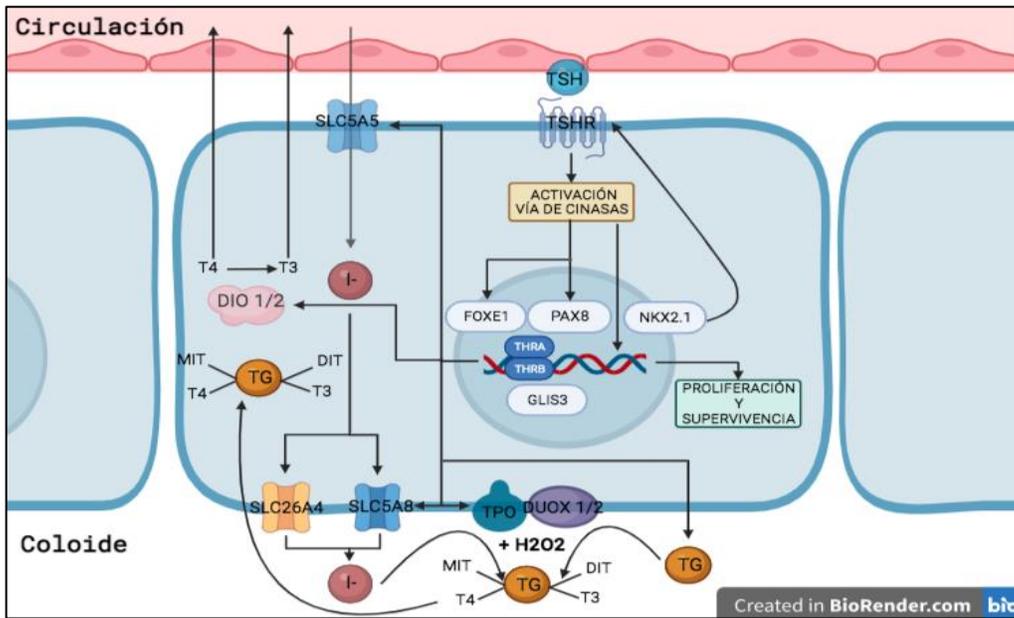


Figura 13. Esquema de la vía de TSHR en una célula folicular tiroidea normal. La vía tiene dos funciones principales: la síntesis de hormonas tiroideas y la proliferación y supervivencia celular.

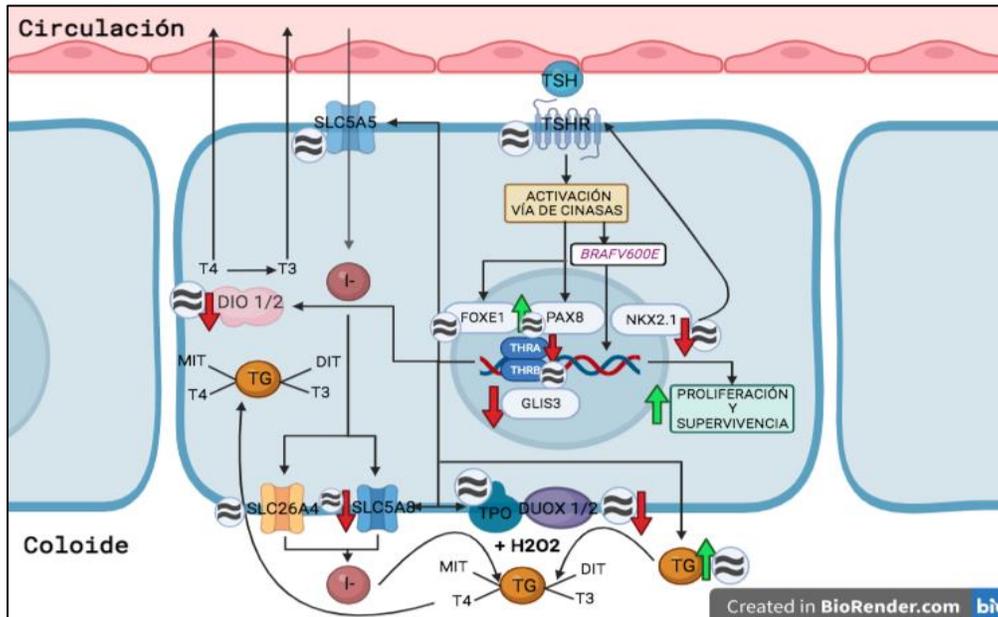


Figura 14. Esquema de una célula folicular tiroidea de CPT no RTYR. MAPK es la principal vía de activación oncogénica. La activación de la vía TSHR es similar a la de una célula folicular normal.

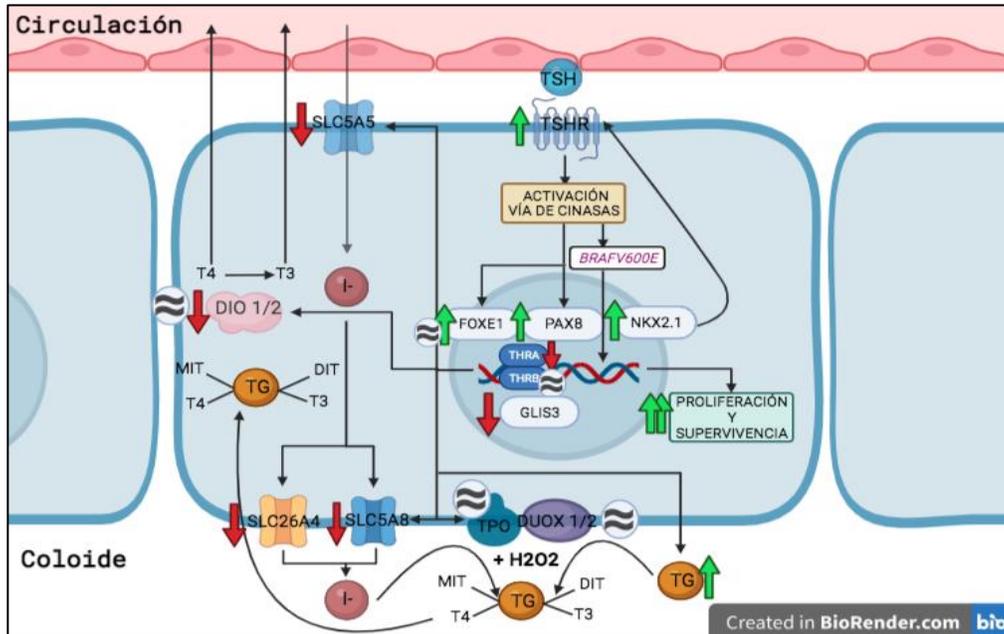


Figura 15. Esquema de una célula folicular tiroidea de CPT RTYR. Existe sobre activación de la vía TSHR que junto con MAPK fungen como vías oncogénicas mientras que la expresión de SLC5A5 se encuentra disminuida.

ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA Y MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Encontramos que los CPT RTYR tienen peor supervivencia libre de recurrencia (SLR) (media 29.7 (IC95% 21.3-38.2) vs 134.4 (IC95% 94.6-174.1) meses, log-Rank $p < 0.001$), libre de metástasis a distancia (SLM) (media 106 (68.7-143.2) vs 207.6 (IC95% 191.5-223.6) meses, log-Rank $p < 0.001$) y posiblemente global (SG) (log-Rank $p = 0.065$) en comparación con los CPT no RTYR (Figuras 16, 17 y 18). En el análisis multivariado de SLR encontramos que tanto la Tg postoperatoria (HR 1.01, IC 95% (1.00-1.03)) como el tamaño del tumor (HR 1.28, IC 95% (1.01-1.62)) son predictores independientes de recurrencia (Tabla 6, Figuras 19 y 20). En el análisis multivariado de SLM ningún parámetro fue predictor independiente (Tabla 7, Figura 21). En cuanto a la

SG no encontramos ningún predictor independiente, sin embargo, el estadio mostró una clara tendencia (HR 3.75, IC 95% (0.97-14.48) (Tabla 8, Figura 22).

Construimos un puntaje constituido por el promedio de expresión de los genes que mostraron diferencia significativa en cuanto a expresión entre CPT RTYR y RTYR y por ende mayor área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) (*SLC5A5*, *TSHR*, *NKX2.1*, *DUOX1* y *FOXE1*) que nombramos PDT simplificado (PDTS). Realizamos un modelo de regresión logística univariado en el que los factores predictores fueron edad, estadio, *SLC5A5*, *TG*, *TSHR*, *NKX2.1*, *DUOX1* y *PDTS*. Para el análisis multivariado realizamos exclusión de aquellas variables que mostraban colinearidad mediante el cálculo del Factor de Inflación de Varianza e incluimos en el modelo final aquellas sin colinearidad. El PDTS fue el único predictor independiente de RTYR (OR 6.61, IC 95% (1.57-27.88)) (Tabla 9). El modelo de regresión mostró un porcentaje de predicción correcta del 92.5%. Finalmente, construimos curvas ROC del PTDS y los genes que lo integraron. (Figura

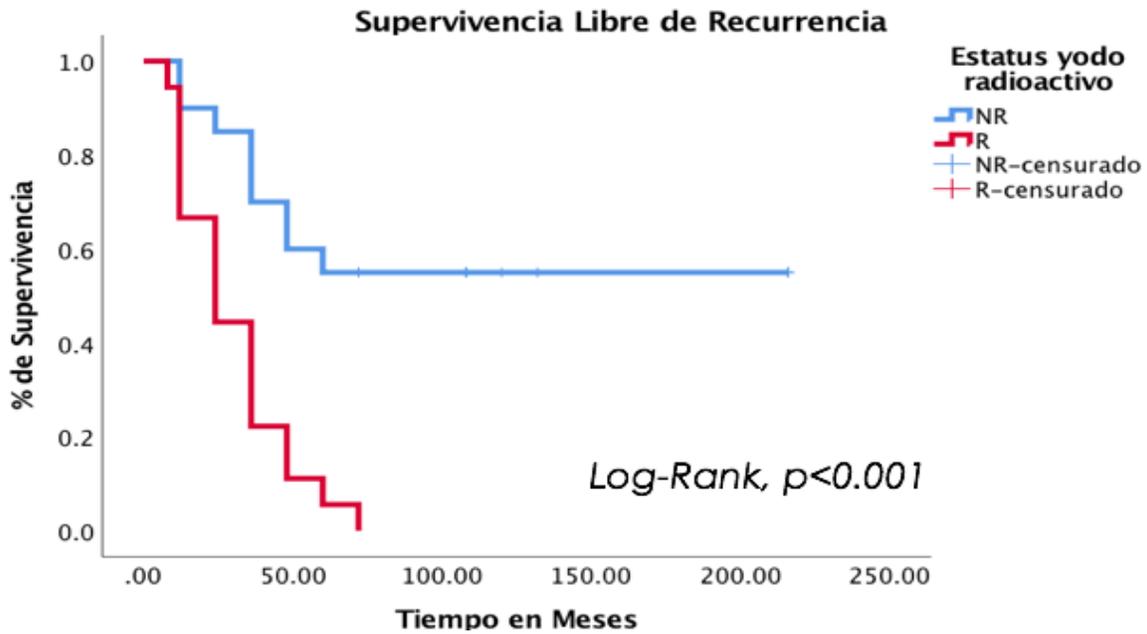


Figura 16. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de recurrencia en función del estatus de yodo radioactivo (log-rank, $p < 0.001$).

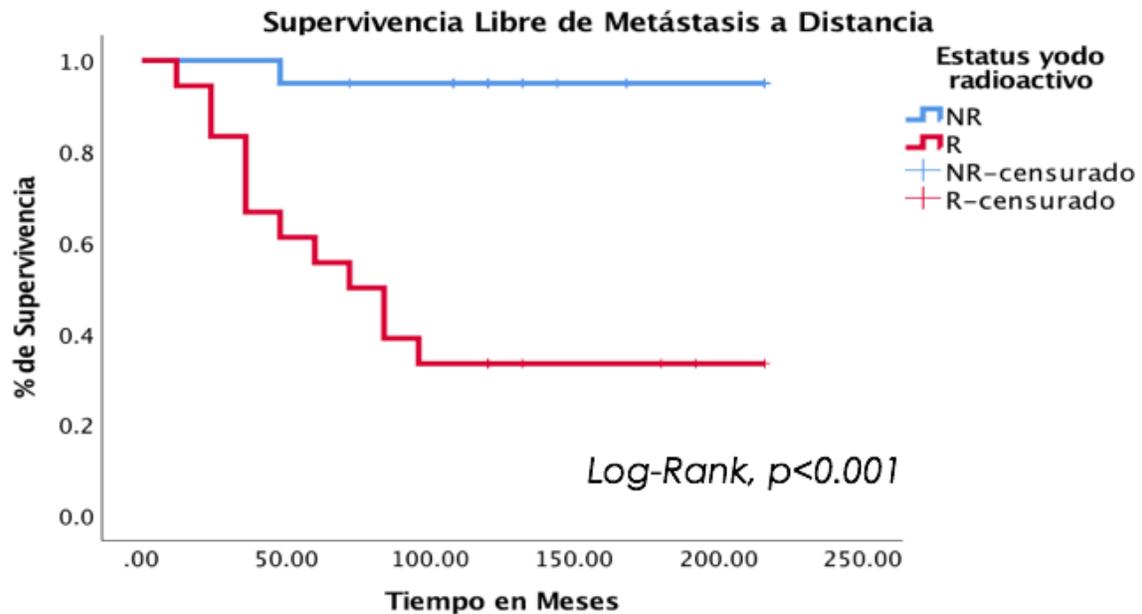


Figura 17. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de metástasis a distancia en función del estatus de yodo radioactivo (log-rank, $p < 0.001$).

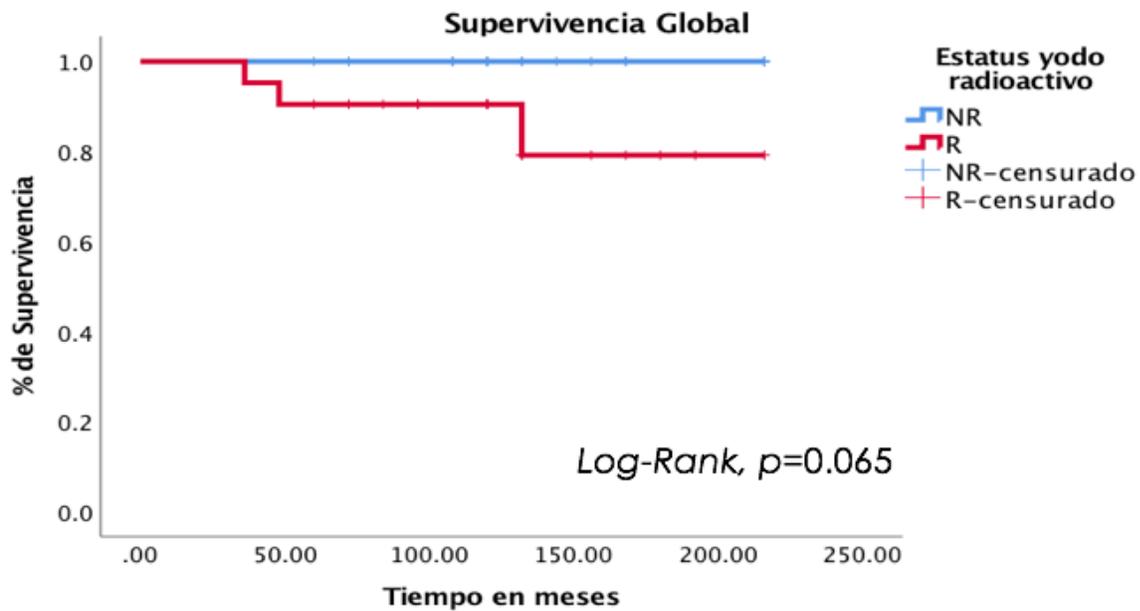


Figura 18. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global en función del estatus de yodo radioactivo (log-rank, $p=0.065$)

Tabla 6. Supervivencia libre de recurrencia				
	Análisis univariado, HR (IC 95%)	p	Análisis multivariado, HR (IC 95%)	p
Edad	1.01(0.98-1.04)	0.28		
Sexo				
Hombre	1			
Mujer	0.51(0.21-1.21)	0.12		
Enfermedad tiroidea autoinmune	0.72(0.17-3.07)	0.66		
Estadio	1.49(0.84-2.64)	0.16		
Tamaño del tumor	1.47(1.17-1.85)	<0.01**	1.28(1.01-1.62)	0.04**
Márgenes quirúrgicos				
Negativo	1			
Positivo	1.71(0.79-3.68)	0.16		
Focalidad				
Unifocal	1			
Multifocal	0.53(0.23-1.19)	0.12		

Número de ganglios con metástasis	1.16(1.07-1.26)	<0.01**	1.06(0.94-1.19)	0.29
Extensión a tejidos blandos peritiroideos	1.12(0.26-4.75)	0.87		
Resección del tumor				
R0/R1	1			
R2	5.16(0.63-41.94)	0.12		
Captación foco metastásico cervical	1.15(0.43-3.04)	0.77		
Tg postoperatoria	1.01(1.00-1.02)	<0.01**	1.01(1.00-1.03)	<0.01**
Dosis inicial de yodo	1.01(0.99-1.02)	0.06*		
BRAFV600E	4.43(0.59-32.83)	0.14		
SLC5A5	0.85(0.70-1.04)	0.12		
SLC5A8	0.94(0.81-1.09)	0.44		
TSHR	1.07(0.89-1.29)	0.43		
TG	1.10(0.95-1.28)	0.17		
TPO	1.12(0.92-1.36)	0.24		
PAX8	1.17(0.93-1.46)	0.17		
SLC26A4	0.90(0.72-1.13)	0.37		
DIO1	1.14(0.94-1.38)	0.17		
DUOX2	1.18(0.94-1.48)	0.14		
NKX2.1	1.55(1.04-2.32)	0.03**	1.64(0.99-2.70)	0.05*
DIO2	1.05(0.83-1.34)	0.65		
GLIS3	1.08(0.76-1.52)	0.65		
THRA	1.14(0.92-1.39)	0.21		
THRB	0.97(0.85-1.13)	0.72		
DUOX1	1.19(0.91-1.54)	0.18		
FOXE1	1.15(0.94-1.41)	0.15		
Código de significancia: <0.05 (**), ≥0.05-<0.1 (*).				

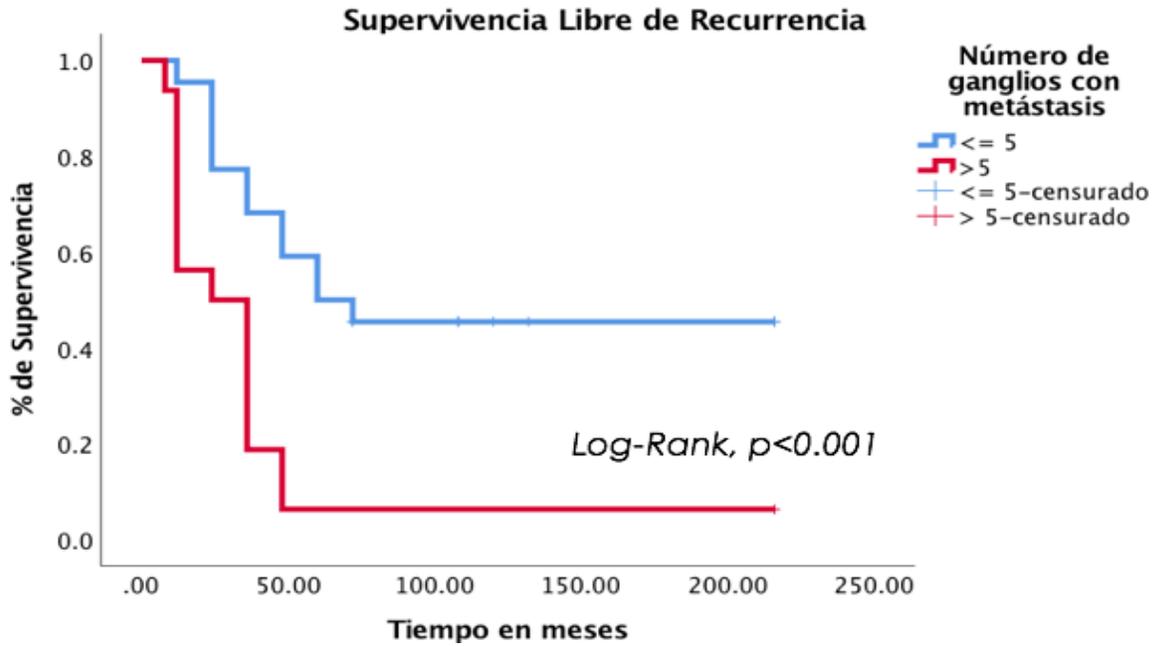


Figura 19. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de recurrencia en función de número de ganglios con metástasis (log-rank, $p < 0.001$)

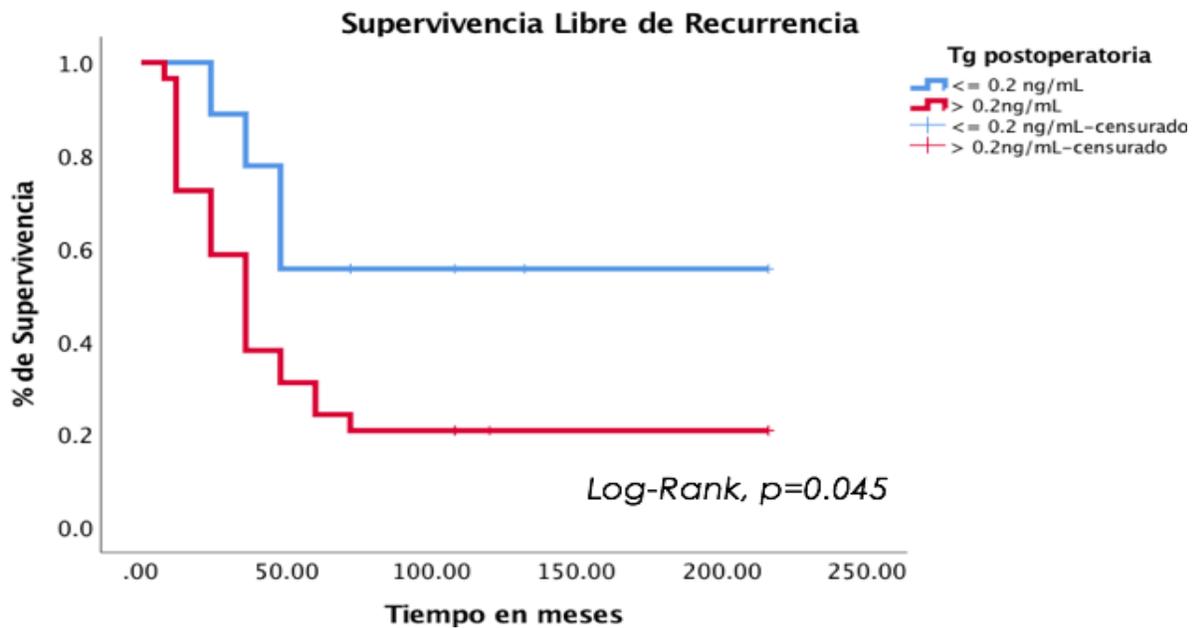


Figura 20. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de recurrencia en función de Tg postoperatoria (log-rank, $p = 0.045$)

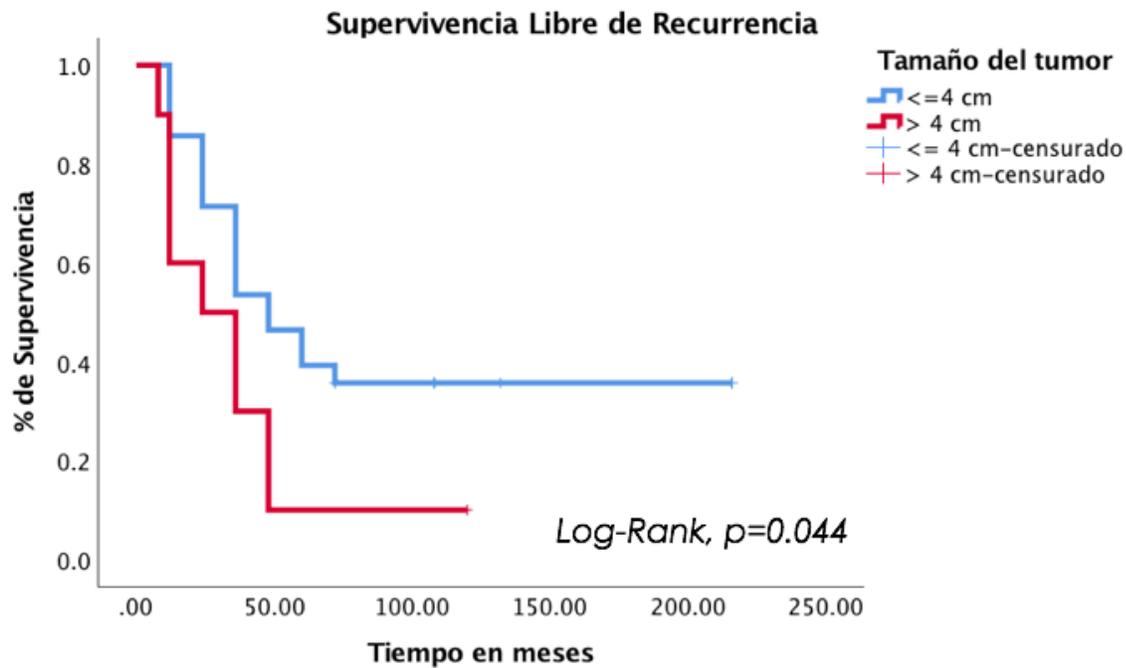


Figura 21. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de recurrencia en función del tamaño del tumor (log-rank, $p=0.044$)

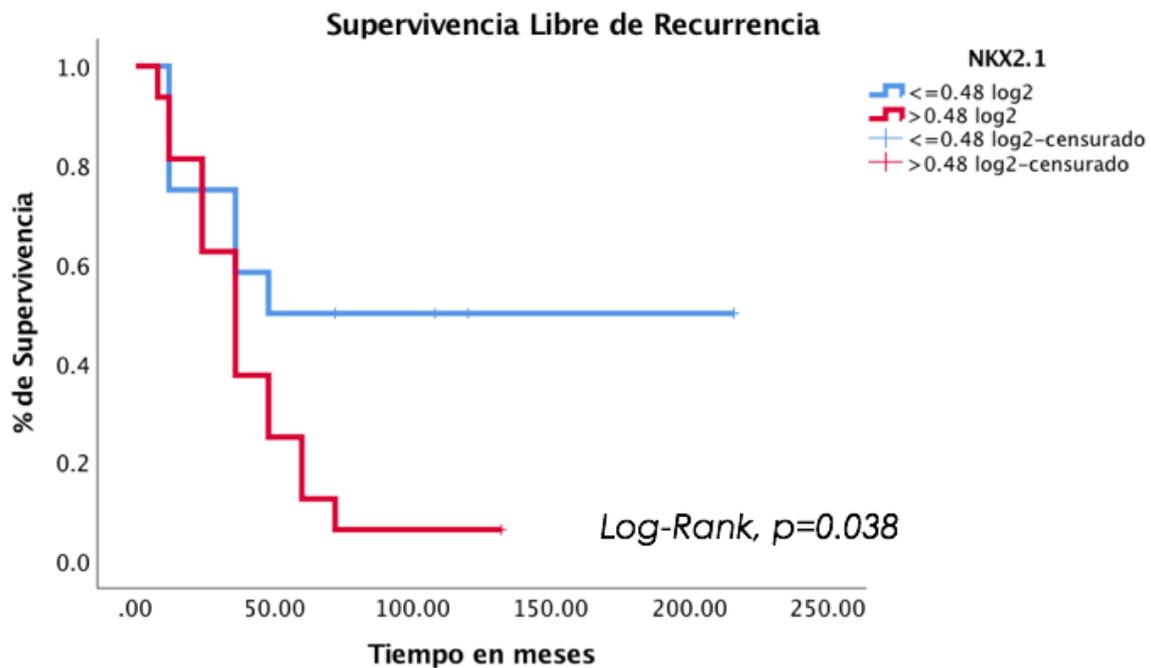


Figura 22. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de recurrencia en función de la expresión en Log2 de NKX2.1 (log-rank, $p=0.038$)

Tabla 7. Supervivencia libre de metástasis a distancia

	Análisis univariado, HR (IC 95%)	p	Análisis multivariado, HR (IC 95%)	p
Edad	1.06(1.02-1.10)	<0.01*	1.06(0.98-1.16)	0.13
Sexo				
Hombre	1			
Mujer	0.46(0.14-1.50)	0.19		
Enfermedad tiroidea autoinmune	1.02(0.13-7.85)	0.98		
Estadio	5.08(2.34-11.02)	<0.01**	1.39(0.29-6.60)	0.67
Tamaño del tumor	1.15(0.90-1.47)	0.24		
Márgenes quirúrgicos				
Negativo	1			
Positivo	0.99(0.37-2.61)	0.99		
Focalidad				
Unifocal	1			
Multifocal	0.82(0.27-2.45)	0.73		
Número de ganglios con metástasis	1.04(0.93-1.17)	0.43		
Extensión a tejidos blandos peritiroideos	1.06(0.13-8.18)	0.95		
Resección del tumor				
R0/R1	1			
R2	0.47(0-11702)	0.63		
Captación foco metastásico cervical	1.49(0.48-4.58)	0.48		
Tg postoperatoria	0.99(0.97-1.01)	0.80		
Dosis inicial de yodo	1.0(0.98-1.02)	0.51		
BRAFV600E	1.82(0.23-14.09)	0.56		
SLC5A5	0.82(0.60-1.12)	0.22		
SLC5A8	0.99(0.77-1.28)	0.97		
TSHR	1.38(0.85-1.51)	0.37		
TG	1.24(0.94-1.65)	0.12		
TPO	1.18(0.86-1.62)	0.29		
PAX8	1.22(0.84-1.78)	0.28		
SLC26A4	0.88(0.64-1.22)	0.45		
DIO1	1.09(0.83-1.45)	0.50		
DUOX2	1.21(0.84-1.74)	0.29		

NKX2.1	2.75(1.17-6.41)	0.01**	1.54(0.50-4.71)	0.44
DIO2	1.03(0.71-1.49)	0.86		
GLIS3	1.11(0.67-1.86)	0.66		
THRA	0.85(0.60-1.20)	0.36		
THRB	1.02(0.82-1.26)	0.84		
DUOX1	2.20(1.20-3.38)	<0.01**	1.20(0.56-2.54)	0.63
FOXE1	1.30(0.94-1.80)	0.10		

Código de significancia: <0.05 (**), ≥0.05-<0.1 (*).

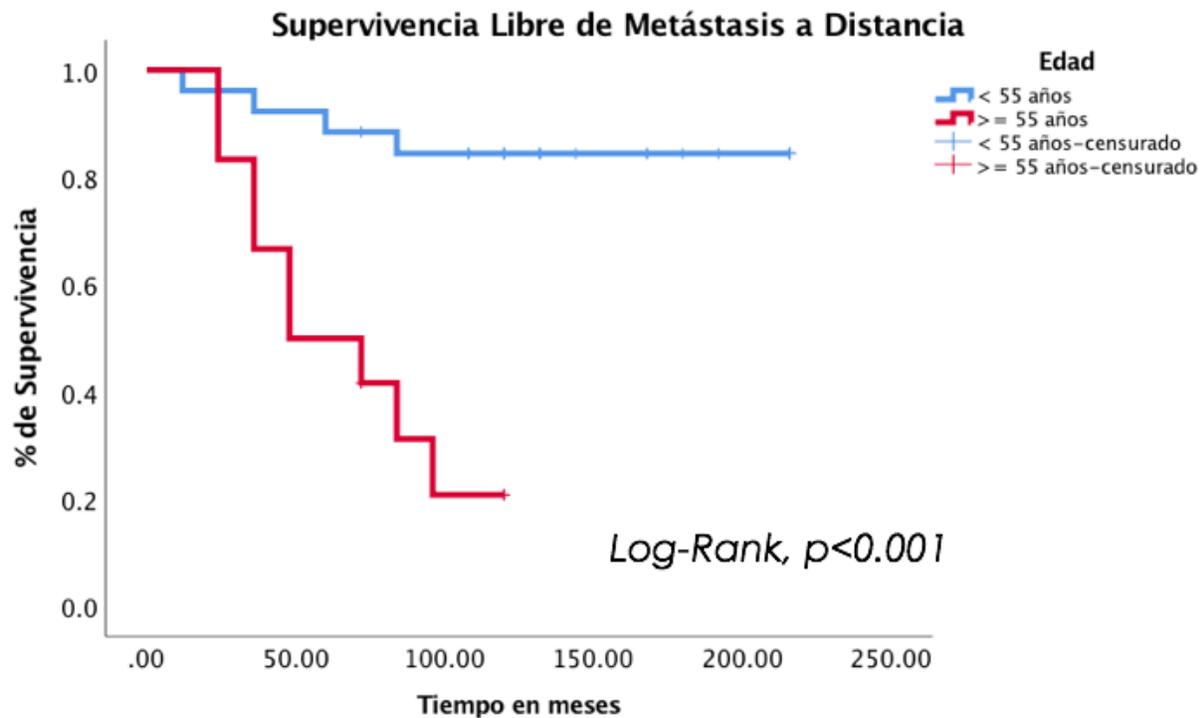


Figura 23. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la edad (log-rank, $p < 0.001$)

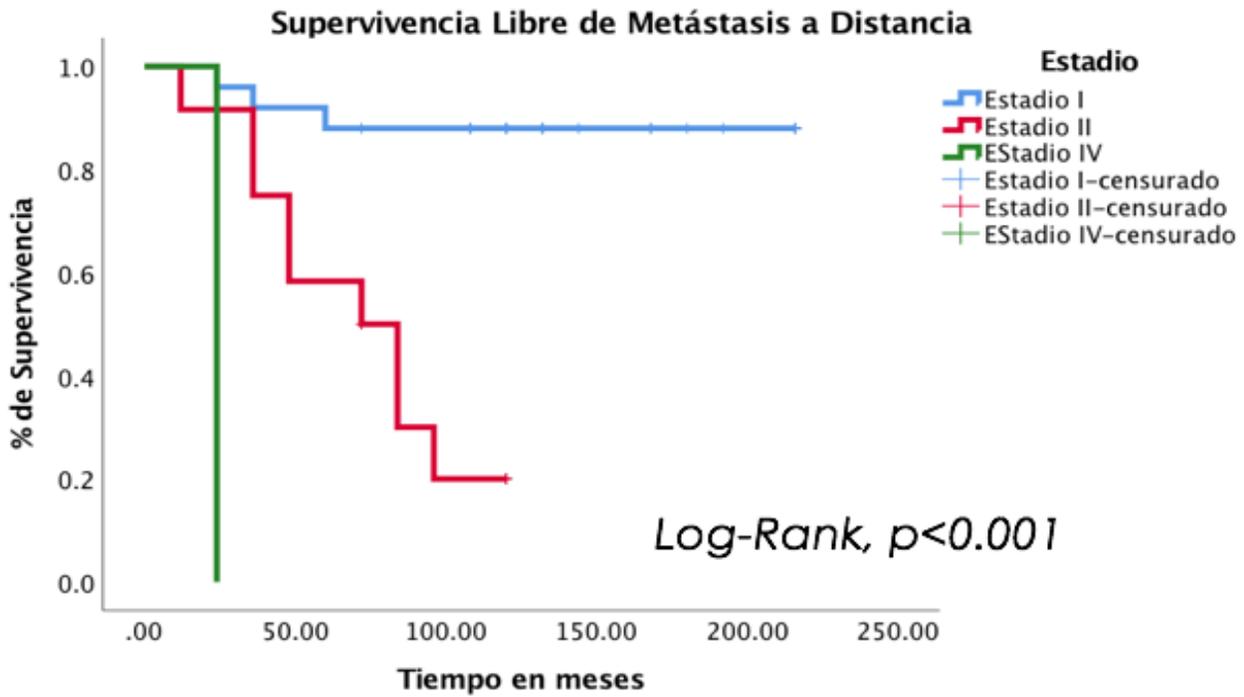


Figura 24. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de metástasis a distancia en función del estadio (log-rank, $p < 0.001$)

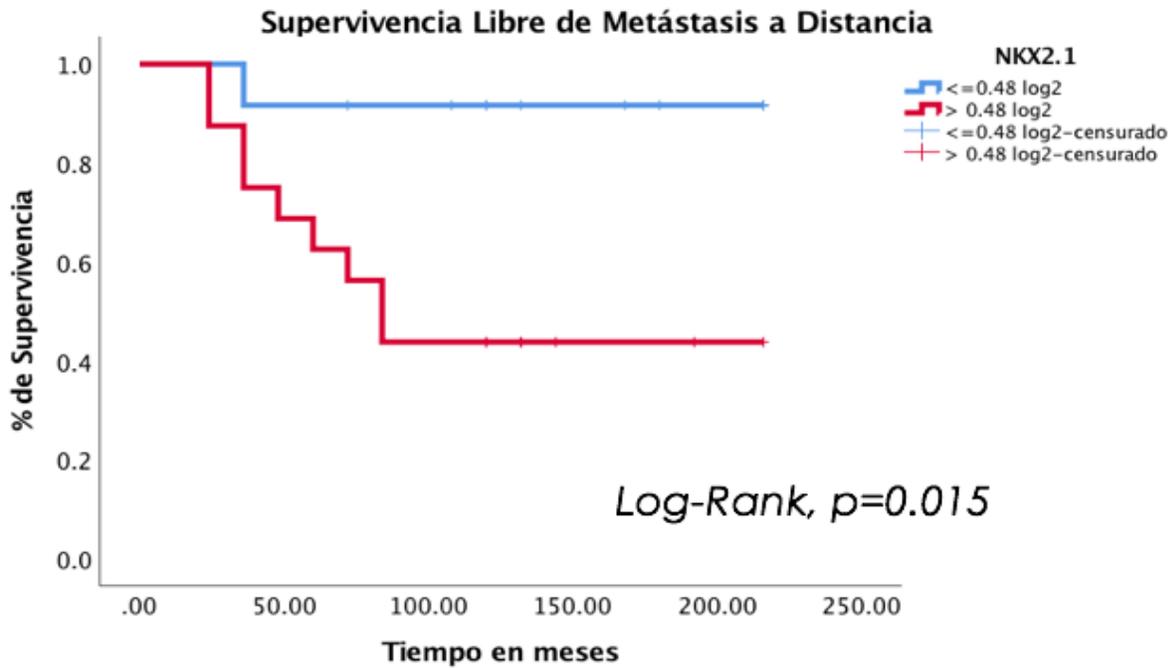


Figura 25. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión en Log2 de NKX2.1 (log-rank, $p = 0.015$)

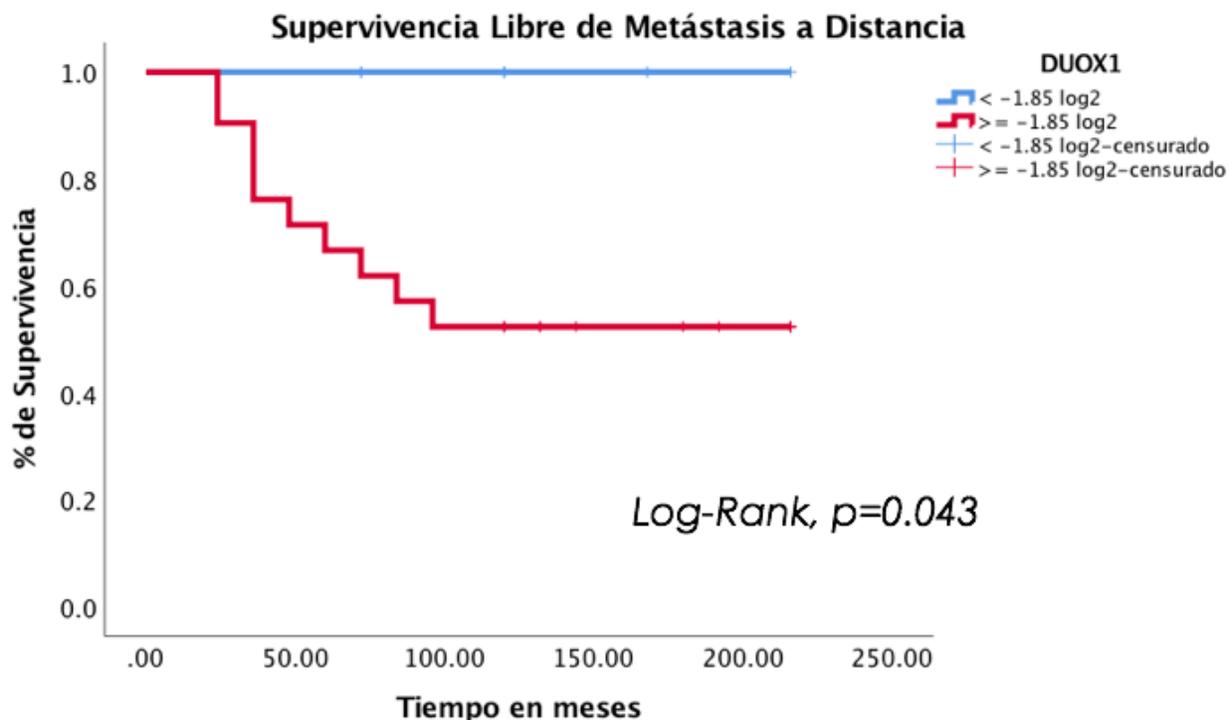


Figura 26. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia libre de metástasis a distancia en función de la expresión en Log2 de DUOX1 (log-rank, p=0.043)

Tabla 8. Supervivencia global				
	Análisis univariado, HR (IC 95%)	p	Análisis multivariado, HR (IC 95%)	p
Edad	1.11(1.00-1.23)	0.03**	1.11(0.96-1.28)	0.14
Sexo				
Hombre	1			
Mujer	2.04(0.18-22.7)	0.56		
Enfermedad tiroidea autoinmune	5.01(0.45-55.69)	0.18		
Estadio	4.39(1.35-14.33)	0.01**	3.75(0.97-14.48)	0.05*
Tamaño del tumor	1.08(0.66-1.78)	0.74		
Márgenes quirúrgicos				
Negativo	1			
Positivo	0.02(0-286.91)	0.42		
Focalidad				
Unifocal	1			
Multifocal	0.82(0.07-9.13)	0.87		

Número de ganglios con metástasis	0.83(0.57-1.21)	0.34		
Extensión a tejidos blandos peritiroideos	24.33(0-3.910E8)	0.70		
Resección del tumor				
R0/R1	1			
R2	0.04(0-6.766E10)	0.83		
Captación foco metastásico cervical	2.52(0.22-27.90)	0.44		
Tg postoperatoria	1.00(0.98-1.02)	0.47		
Dosis inicial de yodo	1.01-(0.98-1.05)	0.36		
RTYR	75.20(0-8.44E5)	0.36		
BRAFV600E	24.88(0-9.86E7)	0.67		
SLC5A5	1.04(0.64-1.68)	0.85		
SLC5A8	0.96(0.54-1.71)	0.91		
TSHR	1.10(0.62-1.95)	0.74		
TG	1.10(0.69-1.77)	0.67		
TPO	1.23(0.69-2.18)	0.47		
PAX8	1.94(0.66-5.64)	0.22		
SLC26A4	0.75(0.35-1.46)	0.37		
DIO1	1.36(0.83-2.21)	0.21		
DUOX2	1.44(0.75-2.79)	0.26		
NKX2.1	1.29(0.46-3.60)	0.62		
DIO2	1.64(0.67-4.03)	0.27		
GLIS3	0.59(0.21-1.62)	0.30		
THRA	0.81(0.49-1.34)	0.42		
THRB	0.91(0.58-1.44)	0.71		
DUOX1	1.89(0.95-3.75)	0.68		
FOXE1	1.25(0.69-2.30)	0.47		
Código de significancia: <0.05 (**), ≥0.05-<0.1 (*).				

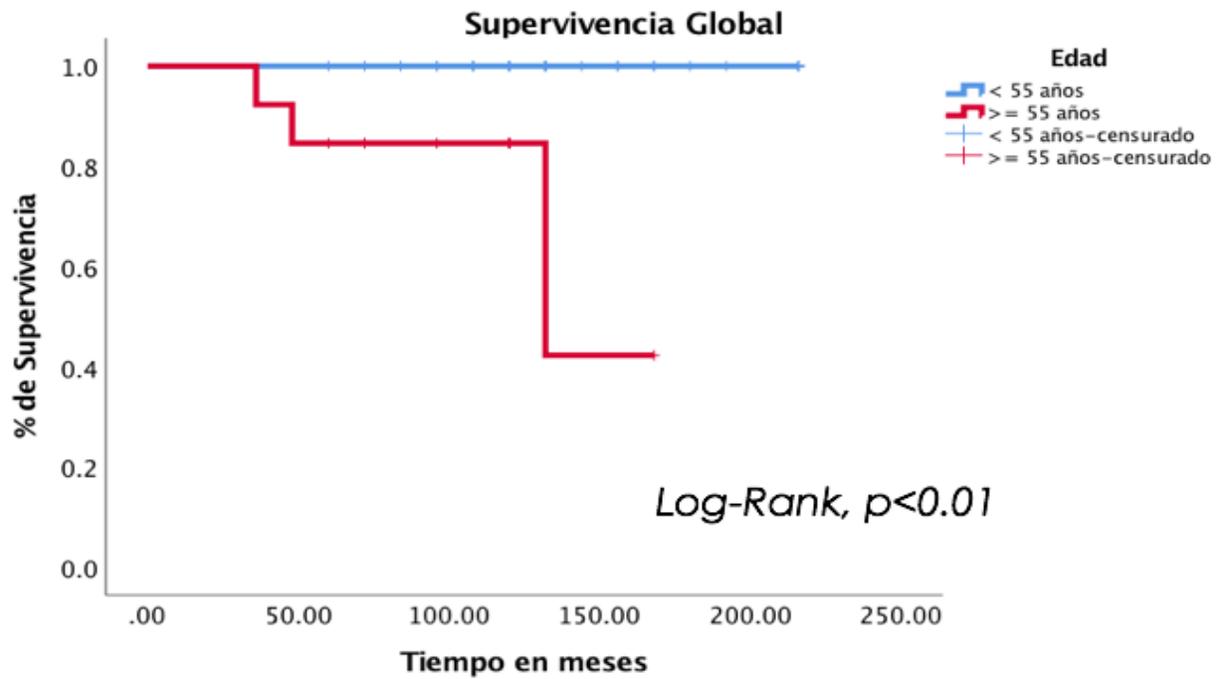


Figura 27. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global en función del estado (log-rank, $p < 0.01$)

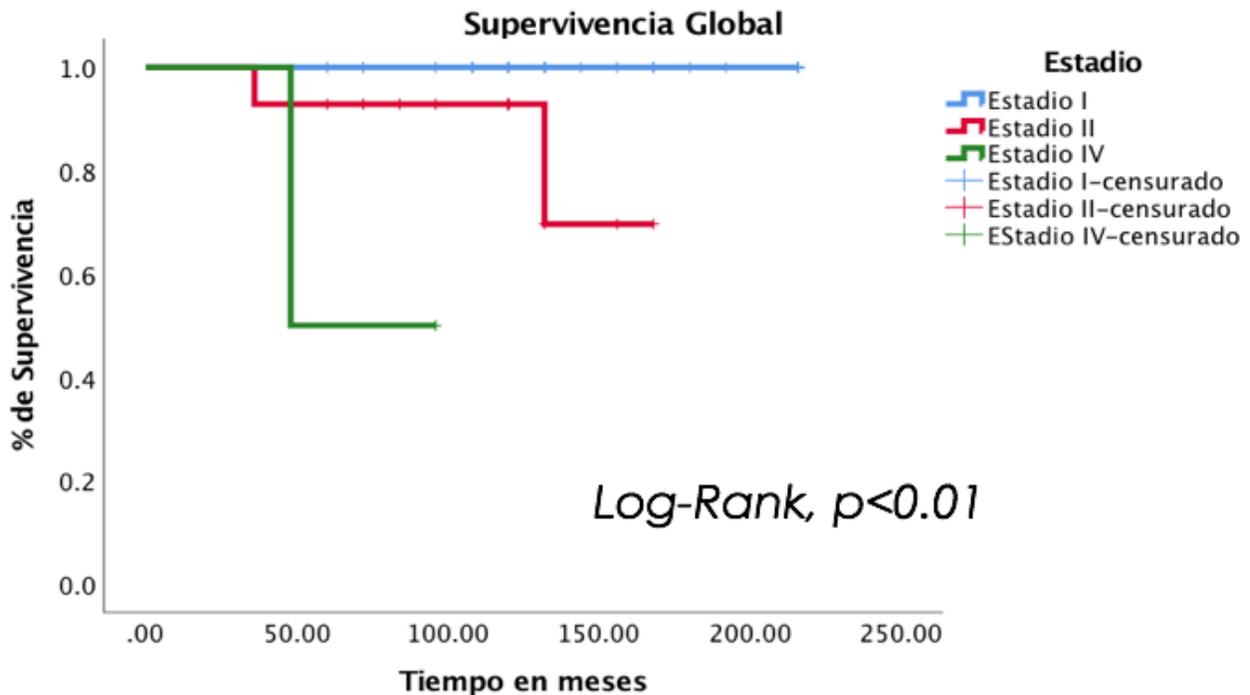


Figura 28. Curvas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia global en función del estado (log-rank, $p < 0.01$)

Tabla 9. Análisis de regresión logística para RTYR

	Análisis univariado, OR (IC 95%)	p	Análisis multivariado, OR (IC 95%)	p
Edad	1.06(1.00-1.11)	0.01**	1.10(0.99-1.22)	0.07*
Sexo				
Hombre	1			
Mujer	0.41(0.08-2.05)	0.26		
Enfermedad tiroidea autoinmune	0.29(0.02-3.38)	0.31		
Estadio	8.35(1.77-39.32)	<0.01**	13.56(0.29-627.61)	0.18
Tamaño del tumor	1.35(0.93-1.95)	0.10		
Márgenes quirúrgicos				
Negativo	1			
Positivo	1.21(0.34-4.25)	0.75		
Localidad				
Multifocal	1			
Unifocal	2.75(0.73-10.25)	0.12		
Número de ganglios con metástasis	1.04(0.93-1.17)	0.43		
Extensión a tejidos blandos peritiroideos	0.47(0.03-6.13)	0.55		
Resección del tumor				
R0/R1	1			
R2	1.4e+07(0-∞)	1.00		
Captación foco metastásico cervical	2.23(0.34-14.58)	0.38		
Tg postoperatoria	1.00(0.99-1.02)	0.26		
Dosis inicial de yodo	1.01(0.98-1.03)	0.27		
Metástasis al diagnóstico	1.31(0.76-2.27)	0.30		
BRAF V600E	3.52(0.33-37.14)	0.29		
SLC5A5	0.58(0.36-0.94)	0.02**		
SLC5A8	0.83(0.60-1.16)	0.29		
TSHR	1.85(1.13-3.03)	0.01**		
TG	1.47(1.03-2.10)	0.03**		
TPO	1.19(0.87-1.62)	0.27		
PAX8	1.34(0.90-2.01)	0.14		
SLC26A4	0.68(0.44-1.05)	0.08		
DIO1	0.87(0.63-1.27)	0.54		

DUOX2	1.16(0.76-1.77)	0.46		
NKX2.1	3.15(1.10-9.01)	0.03**		
DIO2	0.88(0.55-1.38)	0.58		
GLIS3	0.99(0.52-1.86)	0.98		
THRA	1.02(0.73-1.41)	0.89		
THRB	0.90(0.69-1.18)	0.47		
DUOX1	2.63(1.08-6.39)	0.03**		
FOXE1	1.77(0.92-3.38)	0.08		
PDT	1.40(0.92-2.13)	0.11		
PDT simplificado	3.48(1.50-8.06)	<0.01**	6.61(1.57-27.88)	0.01**

Código de significancia: <0.05 (**), ≥0.05-<0.1 (*).

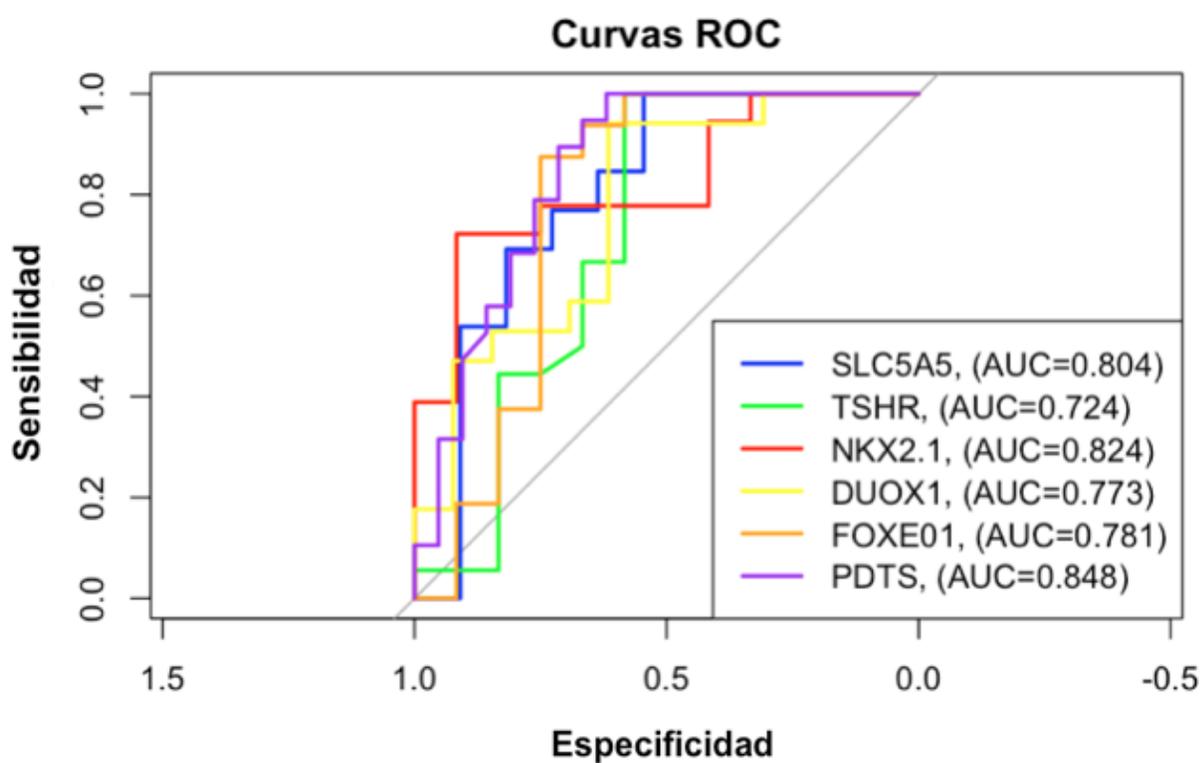


Figura 29. Curvas ROC y AUC para PTDS y cada uno de los genes que lo integran.

DISCUSIÓN

Los CPT son tumores que actualmente presentan un excelente pronóstico, en nuestro estudio los pacientes tuvieron una supervivencia a 5 años de 95.2% y a 10 años de 93.1%, ligeramente menor comparado con otros estudios, posiblemente porque nuestro calculo incluye el 50% de pacientes RTYR [41]. Por otra parte, los CPT no RTYR mostraron supervivencias a 5 y 10 años de 100% mientras que los CPT RTYR tuvieron una supervivencia a 5 años de 90.5% y a 10 años de 86.7% En la literatura reportan supervivencias de 65% a 5 años y 10% a 10 años en CBDT RTYR, bastante menores en comparación con los CPT RTYR de nuestro estudio probablemente porque nosotros no incluimos otros tumores bien diferenciados como carcinoma folicular o carcinoma de células de Hurthle tumores que pueden tener peor pronóstico, especialmente el último [42, 43]. Anteriormente se reconoció la agresividad que confería la activación de la vía TSHR a los CPT asociada a mutación de *BRAFV600E*, caracterizada sobretodo por la presencia de inestabilidad genómica [47] y evasión del sistema inmune [48].

En nuestro análisis de expresión encontramos sobre activación de la vía de señalización de tirotropina en CPT RTYR, lo que indica que probablemente al ser tumores aún fenotípicamente diferenciados utilizan esta vía como recurso para proliferar y sobrevivir siendo complementaria a la vía *MAPK*. Por otra parte, el silenciamiento selectivo de *SLC5A5* (simporter Na⁺/I⁻) podría corresponder a un fenómeno adaptativo en el que las células pueden prescindir de esta parte de la vía de TSHR enfocada esencialmente en la síntesis de hormonas tiroideas y así promover el ahorro de recursos energéticos. Otros autores han explorado fenómenos como la metilación del ADN o deacetilación de histonas que explicarían el silenciamiento

epigenético del gen *SLC5A5* [51,52]. El modelo de regresión logística binaria que llevamos a cabo mostró un porcentaje de predicción correcta de 92.5% lo que indica que el PDTS es un potencial marcador para identificar CPT que tienen mayor posibilidad de volverse RTYR. En nuestra revisión identificamos algunos estudios que intentan predecir RTYR con variables clínicas y de imagen [46, 49], sin embargo, ninguno evaluó marcadores de alteración genómica tumoral (e.g. expresión génica). Respecto a supervivencia (SG, SLR, SLM) no encontramos que el PDTS fuera predictor independiente.

Un hallazgo interesante es que ninguno de nuestros casos de CPT RTYR mostró algún componente de variante agresiva, todos correspondieron al tipo clásico. Es reconocido que variantes agresivas como células altas o células en estoperol tienen comportamiento agresivo y con más frecuencia se vuelven RTYR [44]. De manera similar a otros estudios nuestros casos de pacientes con CPT RTYT se presentaron en individuos más longevos, los tumores fueron más grandes, tuvieron estadios más avanzados y tuvieron peor SLR [46]. Respecto a la presencia de mutación de *BRAF^{V600E}*, la frecuencia que encontramos fue similar a la reportada en estudios del continente asiático [53]. Previamente se ha debatido intensamente la asociación de *BRAF^{V600E}* con la agresividad del CPT, nosotros no encontramos diferencias en cuanto al porcentaje de mutación entre CPT RTYR y no RTYR por lo que podría no tener un papel relevante en este contexto [54].

Algunas limitaciones de nuestro estudio son por supuesto su carácter retrospectivo y los sesgos inherentes al mismo, además calculamos los cocientes de riesgo sin incluir

la cohorte completa de CPT que recibieron yodo radioactivo y como consecuencia podría existir un aumento en la probabilidad de encontrar falsos positivos.

CONCLUSIONES

Los CPT RTYR representan un reto diagnóstico y terapéutico, sumado a esto debemos agregar que en nuestro centro el 47.6% de los CPT RTYR recibieron dosis tope de yodo radioactivo (≥ 600 mCi) por lo que reconocerlos de manera temprana evitaría la exposición a dosis altas y sus respectivos efectos secundarios. En el presente trabajo identificamos sobreactivación de la vía TSHR y mediante un modelo de regresión logística encontramos que un PDTS podría ayudar en la identificación de CPT (OR 3.48 (IC95% 1.50-8.06)) que tienen mayor probabilidad de volverse RTYR, lo que lo convierte en un marcador candidato para validarse en estudios prospectivos.

Referencias

- 1.- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249.
- 2.- <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
- 3.- Brito JP, Al Nofal A, Montori VM, Hay ID, Morris JC. The Impact of Subclinical Disease and Mechanism of Detection on the Rise in Thyroid Cancer Incidence: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota During 1935 Through 2012. *Thyroid.* 2015 Sep;25(9):999-1007.
- 4.- Girardi FM. Thyroid Carcinoma Pattern Presentation According to Age. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2017 Jan;21(1):38-41. doi: 10.1055/s-0036-1585095. Epub 2016 Jul 12.
- 5.-Nikiforov YE, Fagin JA. Risk factors for thyroid cancer. *Trends Endocrinol Metab.* 1997 Jan-Feb;8(1):20-5. doi: 10.1016/s1043-2760(96)00204-4. PMID: 18406782.

- 6.- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*. 1998 Dec 15;83(12):2638-48.
- 7.-Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J (2017) WHO classification of tumours of endocrine organs, 4th edn. IARC Press, Lyon
- 8.- Kazaure HS, Roman SA, Sosa JA. Aggressive variants of papillary thyroid cancer: incidence, characteristics and predictors of survival among 43,738 patients. *Ann Surg Oncol*. 2012 Jun;19(6):1874-80. doi: 10.1245/s10434-011-2129-x. Epub 2011 Nov 8.
- 9.-Jiang C, Cheng T, Zheng X, Hong S, Liu S, Liu J, Wang J, Wang S. Clinical behaviors of rare variants of papillary thyroid carcinoma are associated with survival: a population-level analysis. *Cancer Manag Res*. 2018 Mar 9;10:465-472
- 10.- Asioli S, Erickson LA, Righi A, Lloyd RV. Papillary thyroid carcinoma with hobnail features: histopathologic criteria to predict aggressive behavior. *Hum Pathol*. 2013 Mar;44(3):320-8.
- 11.-Jiang C, Cheng T, Zheng X, Hong S, Liu S, Liu J, Wang J, Wang S. Clinical behaviors of rare variants of papillary thyroid carcinoma are associated with survival: a population-level analysis. *Cancer Manag Res*. 2018 Mar 9;10:465-472.
- 12.- Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1-133.
- 13.- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Thyroid Carcinoma Version 2.2019 — September 16, 2019; National Comprehensive Cancer Network. Abstract available at https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/thyroid.pdf
- 14.- Filetti S, Durante C, Hartl D, Leboulleux S, Locati LD, Newbold K, Papotti MG, Berruti A; ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019 Dec 1;30(12):1856-1883.
- 15.- Pérez, Bernardo & Paloma, Enríquez & Valdés, Almeda & Mancillas, Leonardo & María, Adame & Arechavaleta, Rosario & Elisa, Granell & Meguro, Nishimura & Bolaños, Fernando & De, Gil & Raúl, Montes & Rivera-Moscoso, Raul & Cuevas, Daniel & María, Ramos & Luz, La & Reyes, Ruiz & Gamboa-Dominguez, Armando & Sosa, Alejandro & Roberto, Caballero & Alcántara, Lorena. Guía Clínica para el Diagnóstico y

Tratamiento del Cáncer Diferenciado de Tiroides Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 2009. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Alejandro-Sosa-4/publication/268265701_Guia_Clinica_para_el_Diagnostico_y_Tratamiento_del_Cancer_Diferenciado_de_Tiroides_Sociedad_Mexicana_de_Nutricion_y_Endocrinologia_Grupo_de_Consenso_en_Tiroides/links/563e8b6c08ae34e98c4d97f3/Guia-Clinica-para-el-Diagnostico-y-Tratamiento-del-Cancer-Diferenciado-de-Tiroides-Sociedad-Mexicana-de-Nutricion-y-Endocrinologia-Grupo-de-Consenso-en-Tiroides.pdf

16.- Martín Granados-García, Francisco Gallegos-Hernández, Carlos Eduardo Quintero-Rodríguez, Héctor Gurrola-Machuca, Manuel Acuña-Tovar, Irlanda Pacheco-Bravo, Lorena Flores-Hernández, Ana María Cano-Valdez, Federico Maldonado-Magos, Michelle Aline Villavicencio-Queijeiro, Francisco Osvaldo García- Pérez, Sebastián Salvador Medina-Ornelas, Juan Carlos Cruz-López, Mónica Lizzette Serrano-Arévalo, Lidia Faridi-Villegas González, Antonio Gómez-Pedraza, José Alberto Abrego-Vásquez, Jorge Alberto Guadarrama-Orozco, Samuel Rivera Rivera y José Luis Mayorga-Butrón, Francisco Javier Ochoa Carrillo, integrantes del Grupo de Desarrollo de Guías de la Sociedad Mexicana de Oncología. Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento del nódulo tiroideo y el carcinoma diferenciado de tiroides. *Gac Mex Oncol.* 2019;18:53-101.

17.- Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento del Tumor Maligno de Tiroides. (Cáncer de Tiroides Bien Diferenciado), México, Secretaría de Salud; 2009.

18.- Lau, L.W., Ghaznavi, S., Frolkis, A.D. et al. Malignancy risk of hyperfunctioning thyroid nodules compared with non-toxic nodules: systematic review and a meta-analysis. *Thyroid Res* 14, 3 (2021).

19.-Tessler FN, Middleton WD, Grant EG, Hoang JK, Berland LL, Teefey SA, Cronan JJ, Beland MD, Desser TS, Frates MC, Hammers LW, Hamper UM, Langer JE, Reading CC, Scoutt LM, Stavros AT. ACR Thyroid Imaging, Reporting and Data System (TI-RADS): White Paper of the ACR TI-RADS Committee. *J Am Coll Radiol.* 2017 May;14(5):587-595.

20.-Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *Thyroid.* 2017 Nov;27(11):1341-1346.

21.-Zhang C, Li Y, Li J, Chen X. Total thyroidectomy versus lobectomy for papillary thyroid cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2020 Feb;99(6):e19073.

- 22.-Gur EO, Karaisli S, Hacıyanli S, Kamer E, Genc H, Atahan K, Hacıyanli M. Multifocality related factors in papillary thyroid carcinoma. *Asian J Surg*. 2019 Jan;42(1):297-302. doi: 10.1016/j.asjsur.2018.05.004. Epub 2018 Jul 4. PMID: 30585170.
- 23.-Burmeister LA, Goumaz MO, Mariash CN, Oppenheimer JH. Levothyroxine dose requirements for thyrotropin suppression in the treatment of differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Aug;75(2):344-50. doi: 10.1210/jcem.75.2.1639933. PMID: 1639933.
- 24.-SEER Cancer Stat Facts: Thyroid Cancer. National Cancer Institute. Bethesda, MD, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/thyro.html>
- 25.-Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, et al. (Eds.). *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition). Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017
- 26.- Dean DS, Hay ID. Prognostic indicators in differentiated thyroid carcinoma. *Cancer Control*. 2000 May-Jun;7(3):229-39. doi: 10.1177/107327480000700302. PMID: 10832109.
- 27.-Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*. 1994 Nov;97(5):418-28. doi: 10.1016/0002-9343(94)90321-2. Erratum in: *Am J Med* 1995 Feb;98(2):215. PMID: 7977430.
- 28.-Worden F. Treatment strategies for radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2014 Nov;6(6):267-79. doi: 10.1177/1758834014548188. PMID: 25364392; PMCID: PMC4206652.
- 29.-Tam S, Amit M, Boonsripitayanon M, Cabanillas ME, Busaidy NL, Gunn GB, Lai SY, Gross ND, Sturgis EM, Zafereo ME. Adjuvant External Beam Radiotherapy in Locally Advanced Differentiated Thyroid Cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2017 Dec 1;143(12):1244-1251. doi: 10.1001/jamaoto.2017.2077. PMID: 29098272; PMCID: PMC5824297.
- 30.-Tuttle RM, Brose MS, Grande E, Kim SW, Tahara M, Sabra MM. Novel concepts for initiating multitargeted kinase inhibitors in radioactive iodine refractory differentiated thyroid cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2017 Jun;31(3):295-305. doi: 10.1016/j.beem.2017.04.014. Epub 2017 May 12. PMID: 28911726.

- 31.-Yang K, Wang H, Liang Z, Liang J, Li F, Lin Y. BRAFV600E mutation associated with non-radioiodine-avid status in distant metastatic papillary thyroid carcinoma. *Clin Nucl Med*. 2014 Aug;39(8):675-9.
- 32.-Yang X, Li J, Li X, Liang Z, Gao W, Liang J, Cheng S, Lin Y. TERT Promoter Mutation Predicts Radioiodine-Refractory Character in Distant Metastatic Differentiated Thyroid Cancer. *J Nucl Med*. 2017 Feb;58(2):258-265.
- 33.-Liu J, Liu R, Shen X, Zhu G, Li B, Xing M. The Genetic Duet of BRAF V600E and TERT Promoter Mutations Robustly Predicts Loss of Radioiodine Avidity in Recurrent Papillary Thyroid Cancer. *J Nucl Med*. 2020 Feb;61(2):177-182.
- 34.-Luo Y, Jiang H, Xu W, Wang X, Ma B, Liao T, Wang Y. Clinical, Pathological, and Molecular Characteristics Correlating to the Occurrence of Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2020 Sep 30;10:549882
- 35.- Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014 Oct 23;159(3):676-90.
- 36.- Clement SC, Peeters RP, Ronckers CM, Links TP, van den Heuvel-Eibrink MM, Nieveen van Dijkum EJ, van Rijn RR, van der Pal HJ, Neggers SJ, Kremer LC, van Eck-Smit BL, van Santen HM. Intermediate and long-term adverse effects of radioiodine therapy for differentiated thyroid carcinoma--a systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2015 Dec;41(10):925-34.
- 37.-Kelsey J.L., Whittemore A.S., Evans A.S., and Thompson W.D. *Methods in Observational Epidemiology*. Oxford University Press, 1996. Print.
- 38.-Isaac, S., & Michael, W. B. (1995). *Handbook in research and evaluation*. San Diego, CA: Educational and Industrial Testing Services.
- 39.-Julious, S. A. (2005). Sample size of 12 per group rule of thumb for a pilot study. *Pharmaceutical Statistics*, 4, 287-291.
- 40.-Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002 Jun
- 41.-Cao YM, Zhang TT, Li BY, Qu N, Zhu YX. Prognostic evaluation model for papillary thyroid cancer: a retrospective study of 660 cases. *Gland Surg*. 2021 Jul;10(7):2170-2179. doi: 10.21037/gs-21-100. PMID: 34422588; PMCID: PMC8340348.

42.-Pitoia F, Jerkovich F, Trimboli P, Smulever A. New approaches for patients with advanced radioiodine-refractory thyroid cancer. *World J Clin Oncol*. 2022 Jan 24;13(1):9-27. doi: 10.5306/wjco.v13.i1.9. PMID: 35116229; PMCID: PMC8790300.

Z

43.-Nixon IJ, Witcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, Patel SG, Ganly I. The impact of distant metastases at presentation on prognosis in patients with differentiated carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid*. 2012 Sep;22(9):884-9. doi: 10.1089/thy.2011.0535. Epub 2012 Jul 24. PMID: 22827579; PMCID: PMC3714454.

44.-Coca-Pelaz A, Shah JP, Hernandez-Prera JC, Ghossein RA, Rodrigo JP, Hartl DM, Olsen KD, Shaha AR, Zafereo M, Suarez C, Nixon IJ, Randolph GW, Mäkitie AA, Kowalski LP, Vander Poorten V, Sanabria A, Guntinas-Lichius O, Simo R, Zbären P, Angelos P, Khafif A, Rinaldo A, Ferlito A. Papillary Thyroid Cancer-Aggressive Variants and Impact on Management: A Narrative Review. *Adv Ther*. 2020 Jul;37(7):3112-3128. doi: 10.1007/s12325-020-01391-1. Epub 2020 Jun 1. PMID: 32488657; PMCID: PMC7467416.

45.-Brose MS, Robinson B, Sherman SI, et al. Cabozantinib for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (COSMIC-311): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021;22(8):1126-1138. doi:10.1016/S1470-2045(21)00332-6

46.-Liu Y, Wang Y, Zhang W. Scoring system and a simple nomogram for predicting radioiodine refractory differentiated thyroid cancer: a retrospective study. *EJNMMI Res*. 2022 Jul 29;12(1):45. doi: 10.1186/s13550-022-00917-8. PMID: 35904608; PMCID: PMC9338217.

47.-Orim F, Bychkov A, Shimamura M, Nakashima M, Ito M, Matsuse M, Kurashige T, Suzuki K, Saenko V, Nagayama Y, Yamashita S, Mitsutake N. Thyrotropin signaling confers more aggressive features with higher genomic instability on BRAF(V600E)-induced thyroid tumors in a mouse model. *Thyroid*. 2014 Mar;24(3):502-10. doi: 10.1089/thy.2013.0038. Epub 2014 Jan 15. PMID: 23924149; PMCID: PMC3949501.

48.- Wu Z, Xi Z, Xiao Y, Zhao X, Li J, Feng N, Hu L, Zheng R, Zhang N, Wang S, Huang T. TSH-TSHR axis promotes tumor immune evasion. *J Immunother Cancer*. 2022 Jan;10(1):e004049. doi: 10.1136/jitc-2021-004049. PMID: 35101946; PMCID: PMC8804696.

49.-Li G, Lei J, Song L, Jiang K, Wei T, Li Z, Gong R, Zhu J. Radioiodine refractoriness score: A multivariable prediction model for postoperative radioiodine-refractory differentiated thyroid carcinomas. *Cancer Med*. 2018 Nov;7(11):5448-5456. doi: 10.1002/cam4.1794. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30264548; PMCID: PMC6246937.

51.-Zhang Z, Liu D, Murugan AK, Liu Z, Xing M. Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2014 Jan 30;21(2):161-73. doi: 10.1530/ERC-13-0399. PMID: 24243688; PMCID: PMC3920838.

52.-Choi YW, Kim HJ, Kim YH, Park SH, Chwae YJ, Lee J, Soh EY, Kim JH, Park TJ. B-RafV600E inhibits sodium iodide symporter expression via regulation of DNA methyltransferase 1. *Exp Mol Med*. 2014 Nov 7;46(11):e120. doi: 10.1038/emm.2014.68. PMID: 25378232; PMCID: PMC4261912.

53.-Rashid FA, Munkhdelger J, Fukuoka J, Bychkov A. Prevalence of BRAFV600E mutation in Asian series of papillary thyroid carcinoma-a contemporary systematic review. *Gland Surg*. 2020 Oct;9(5):1878-1900. doi: 10.21037/gs-20-430. PMID: 33224863; PMCID: PMC7667088.

54.-Li X, Kwon H. The Impact of BRAF Mutation on the Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma: A Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 25;12(8):2056. doi: 10.3390/cancers12082056. PMID: 32722429; PMCID: PMC7463825.