

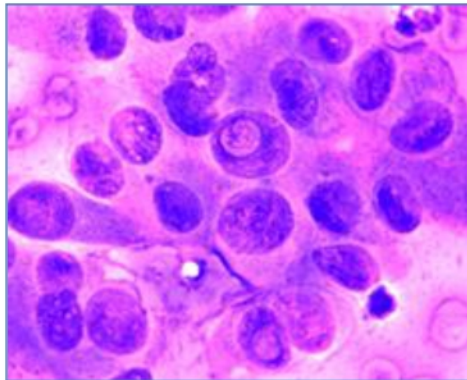
Facultad de Ciencias de la salud.

Escuela de doctorado de la ULPGC.

Programa de doctorado.

Investigación aplicada a las Ciencias Sanitarias.

TESIS DOCTORAL



EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CITOMORFOLÓGICOS DE LA PUNCIÓN-ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA (PAAF) DEL CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES PREDICTORES DE LA MUTACIÓN DEL GEN BRAF EN LA BIOPSIA.

MARIA EUGENIA GALAN GARCIA

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESCUELA DE DOCTORADO DE LA ULPGC

PROGRAMA DE DOCTORADO

INVESTIGACIÓN APLICADA A LAS CIENCIAS SANITARIAS POR LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, UNIVERSIDAD DE
LEÓN Y UNIVERSIDAD TRÁS OS MONTES E ALTO DOURO (PORTUGAL)

Título de la tesis

“Evaluación de los signos citomorfológicos de la punción-aspiración
con aguja fina (PAAF) del carcinoma papilar de tiroides predictores
de la mutación del gen BRAF en la biopsia.”

Tesis doctoral presentada por:
María Eugenia Galán García

Dirigida por:
Dr. D Juan José Cabrera Galván
Dr. D Juan Francisco Loro Ferrer

Directores

CABRERA
GALVAN
JUAN JOSE

Firmado
digitalmente por
CABRERA
GALVAN JUAN
JOSE -

LORO
FERRER
JUAN
FRANCISCO

Firmado
digitalmente por
LORO FERRER
JUAN FRANCISCO

Doctoranda

GALAN
GARCIA
MARIA
EUGENIA -

Firmado
digitalmente
por GALAN
GARCIA MARIA
EUGENIA -

D. Juan José Cabrera Galván
Profesor Emérito Honorífico
Departamento de Morfología

D. Juan Francisco Loro Ferrer
Profesor Titular
Departamento de Ciencias Clínicas

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación titulado “Evaluación de los signos de la PAAF del carcinoma papilar de tiroides predictores de la mutación del gen BRAF en la biopsia”, ha sido realizado por Doña María Eugenia Galán García, en el departamento de Morfología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisada la presente memoria, la encuentran apta para su defensa ante tribunal.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a 12 de diciembre de 2023

**CABRERA
GALVAN
JUAN JOSE** Firmado
digitalmente por
CABRERA
GALVAN JUAN
JOSE -

**LORO
FERRER
JUAN
FRANCISC
O -** Firmado
digitalmente por
LORO FERRER
JUAN
FRANCISCO -



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

ESCUELA DE DOCTORADO DE LA ULPGC
PROGRAMA DE DOCTORADO
INVESTIGACIÓN APLICADA A LAS CIENCIAS SANITARIAS POR LA
UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA, UNIVERSIDAD DE
LEÓN Y UNIVERSIDAD TRAS OS MONTES E ALTO DOURO (PORTUGAL)

Título de la tesis

**EVALUACIÓN DE LOS SIGNOS CITOMORFOLÓGICOS DE LA
PUNCIÓN-ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA (PAAF) DEL
CARCINOMA PAPILAR DE TIROIDES PREDICTORES DE LA
MUTACIÓN DEL GEN BRAF EN LA BIOPSIA.**

Tesis doctoral presentada por:

María Eugenia Galán García

Dirigida por:

Dr. D Juan José Cabrera Galván

Dr. D Juan Francisco Loro Ferrer

A mis padres, que lucharon por darme lo que ellos nunca tuvieron la
oportunidad de tener...

A mi marido que me dio su amor, serenidad y apoyo en todo momento...

En la era de la tecnología y en una constante búsqueda de una medicina cada vez más personalizada, el papel de las mutaciones diana es si cabe igual o más importante en ocasiones que la tipificación cito-histológica de los tumores.

En un futuro (ese futuro utópico en el que todos los centros sanitarios cuenten con la tecnología necesaria para ello) es muy probable que la patología molecular vaya progresivamente desplazando a la patología tradicional. No obstante, hasta que ese momento llegue, nos vemos en la obligación de buscar herramientas que en la práctica clínica nos permitan al menos sospechar que nos encontramos ante uno de esos casos candidatos a recibir terapia dirigida.

Los rasgos histológicos relacionados con la mutación BRAF en tiroides han sido ampliamente estudiados. Pese a las limitaciones de la muestra de citología obtenida por punción aspiración con aguja fina (PAAF), ésta por su bajo coste y mínimos riesgos sigue siendo un pilar a la hora tanto del diagnóstico como en la toma de decisiones terapéuticas. Es por ello, que ante la posibilidad de encontrar posibles marcadores citológicos predictivos de la presencia de la mutación BRAF (ampliamente conocida como diana terapéutica y como factor pronóstico) nos embarcamos hace ya unos años en esta búsqueda.

INDICE

Agradecimientos	1
GLOSARIO	3
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	13
1.- Epidemiología	17
2.- Carcinoma papilar de tiroides. Variantes histológicas.	23
3.- La PAAF en el diagnóstico del carcinoma papilar de tiroides.	33
4.- Clasificación BETHESDA.....	45
5.- Mutaciones en el carcinoma papilar de tiroides.....	49
5.1. La mutación BRAF y el carcinoma papilar de tiroides. Cronología de una relación.....	58
PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
Planteamiento.....	65
Hipótesis.....	67
Objetivos.	68
MATERIAL Y MÉTODOS.	71
Análisis de la mutación BRAF en el tejido.	76
Análisis estadístico.	78
RESULTADOS.	83
DISCUSIÓN.	93
CONCLUSIONES.....	109
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA	117

Agradecimientos

Lo que tenemos entre las manos no es producto de la individualidad, es producto de un trabajo que durante unos cuantos años nos ha llevado en ocasiones por el sendero de la desesperación. Dar las gracias sería poco, así que sobre todo querría mostrar mi reconocimiento y admiración a todos y cada uno de los que en algún momento del proceso de elaboración han aportado algo a esta tesis y han motivado que estemos viviendo el ahora.

Al Dr. D. Juan José Cabrera Galván, profesor honorífico, el mejor director que nadie nunca podría tener. Jamás cejó en su empeño y me arrastró sin piedad hasta el final. Ningún “becario” lo habría hecho mejor. ;)

Agradecimiento infinito al Dr. D. Pedro Saavedra. Sin su sabiduría y dominio estadístico esto no habría sido posible.

Gracias infinitas a los Eduardos. Al Dr. D. Eduardo Salido por darnos el “dónde”, por facilitarnos material, tiempo Y conocimiento de forma desinteresada. A D. Eduardo Araujo, por ser mis manos. Por darme su tiempo y su inestimable ayuda.

Muchísimas gracias a la Universidad de Las Palmas, presencia materializada en las personas de Dr. D. Juan Francisco Loro Ferrer, Tutor y codirector de mi tesis y en la profesora Dra. D^a María Soledad Martínez Martín, con la que he compartido alguna que otra inquietud con un café de por medio.

Mil gracias a todos.

GLOSARIO

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ALK: quinasa del linfoma anaplásico. De la familia de la tirosinquinasa. Gen codificante de proteína involucrada en la multiplicación celular.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATA: Asociación Americana de tiroides.

ATP: adenosin trifosfato.

BRAF: gen que codifica una proteína con función en la señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico implicado en la proliferación, la migración, adhesión y supervivencia celular, así como en la angiogénesis.

CPT: carcinoma papilar de tiroides.

E: especificidad.

I: yodo.

MEK/ERK: proteinquinasa mitogénica activada.

NGS: secuenciación de nueva generación.

NIFTP: neoplasia no invasiva de células foliculares de tiroides con patrón de crecimiento folicular y características nucleares de carcinoma papilar.

NTRK: receptor de la tirosinquinasa neurotrópico.

PAAF: punción aspiración con aguja fina.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RAS: familia de genes codificantes de proteínas que están involucradas en vías de señalización celular que controlan la apoptosis, maduración y proliferación celular.

RET: gen codificante de proteína involucrada en la multiplicación y diferenciación celular y en el desarrollo de células nerviosas.

S: sensibilidad.

TSH: hormona estimulante tiroidea.

USPSTF: Grupo de trabajo de servicios preventivos de EEUU.

VPP: valor predictivo positivo.

VPN: valor predictivo negativo.

WHO: Organización Mundial de la Salud.

RESUMEN

Las mutaciones BRAF V600E se han asociado a subtipos histológicos del carcinoma papilar de tiroides (CTP), tales como el clásico y el de células altas, a características como la infiltración peritumoral, así como a características citológicas, como las “plump cells” y los “sickle nuclei”.

Las mutaciones BRAF y RAS son mutaciones tempranas que intervienen en el desarrollo del carcinoma papilar de tiroides.

Nuestro objetivo fue evaluar la posible asociación entre los rasgos citológicos y su clasificación según el sistema Bethesda de muestras obtenidas por punción aspiración por aguja fina (PAAF) y su potencial valor predictivo para la mutación BRAF en pieza quirúrgica con diagnóstico de carcinoma papilar.

En nuestro estudio fueron analizados 63 casos operados en un período de cinco años, que previamente fueron estudiados

por citología y clasificados según Bethesda. La mutación BRAF fue estudiada mediante pirosecuenciación.

Se estudiaron rasgos como “no folicular”, “no núcleo redondo” y “no cromatina clara” para discriminar signos propios de la presencia de mutación BRAF frente a signos foliculares como hipotéticos predictores de la mutación RAS.

La mutación BRAF fue detectada en 43 de los 63 casos. Los tipos histológicos fueron estadísticamente significativos, encontrando que el subtipo más prevalente e independiente por el análisis multivariante con un Odds ratio de 10.58 fue el clásico.

Los signos citológicos foliculares presentaron asociación negativa con BRAF V600E: estructuras foliculares ($p < 0.001$), núcleo redondo ($p = 0.015$), y cromatina clara ($p = 0.049$). Por otro lado los factores: “no-folicular” (valor predictivo positivo [VPP] 82.9, sensibilidad 79.1, valor predictivo negativo [VPN] 59.1, especificidad 65.0), “no núcleo redondo” (VPP 76.6,

sensibilidad 83.7, VPN 56.3, especificidad 45.0), y “no cromatina clara” (VPP 75.6, sensibilidad 79.1, VPN 50.0, especificidad 45.0) tienen valor predictivo para la mutación.

No hay significación para ningún rasgo citológico de forma individual.

Nuestro estudio no encontró asociación entre signos citológicos de la PAAF de tiroides y la mutación BRAF. Teniendo en cuenta la clasificación de Bethesda encontramos asociación ($p = 0.045$) entre la mutación y los casos clasificados como categoría V y VI. La presencia de rasgos citológicos catalogados como “no folicular”, “no núcleo redondo” y “no cromatina clara” del carcinoma papilar de tiroides es predictiva de la mutación BRAF en la biopsia, mientras que los signos foliculares indican que nos encontramos ante subtipos foliculares del carcinoma papilar nativos para la mutación de acuerdo a lo publicado en la literatura.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En líneas generales la mayoría de los tumores que podemos encontrar en el tiroides son primarios, siendo de éstos los más frecuentes los de origen epitelial [1].

El Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT) es dentro de los tumores endocrinos el más frecuente y la PAAF la técnica princeps en combinación con la ecografía para el manejo de los nódulos tiroideos y el estudio de los tumores de tiroides [1-5].

Para el diagnóstico histológico del mismo es necesaria la presencia de ciertos rasgos morfológicos como los nucleares con características propias del papilar, tales como el vidrio esmerilado (núcleos ópticamente transparentes, a menudo de gran tamaño), las pseudoinclusiones nucleares (invaginaciones del citoplasma que aparecen como vacuolas acidófilas), los

“grooves” (“surcos nucleares”, suelen estar presentes en núcleos alargados o fusiformes a lo largo del eje mayor del mismo, representación de un pliegue de membrana), los microfilamentos (que pueden condicionar el aclaramiento nuclear), la presencia de papilas verdaderas (a las que debe su nombre) dispuestas al azar y con un eje fibrovascular en torno al que se disponen células epiteliales cúbicas en monocapa o estratificadas (aunque también puede presentar patrón sólido o trabecular) o la invasión de tejido sano anexo.

El carcinoma papilar presenta una vascularización marcada y, en cerca de la mitad de los casos, cuerpos de psamoma (estructuras basófilas que muestran laminación concéntrica, en probable relación a necrosis celular y un indicio bastante claro de que nos encontramos ante un carcinoma papilar) [6].

En el manejo clínico de dichos tumores, la clasificación de Bethesda con sus seis categorías ha demostrado ser predictiva y pronóstica tanto para el manejo clínico como quirúrgico de dicha patología [7-9].

El cáncer de tiroides y en concreto el carcinoma papilar, aunque puede estar presente en cualquier edad, tiene una mayor incidencia en población joven y de sexo femenino. Históricamente relacionado con la exposición a radiación, el carcinoma papilar ha visto como su incidencia ha ido aumentando en los últimos años. Propiciado en gran medida por la mejora de las técnicas diagnósticas y un pronto diagnóstico de esta patología en estadios tempranos de la enfermedad, esto no se ve acompañado de un aumento de la mortalidad ocasionada por el mismo [12].

Fue en este contexto en el que la Asociación Americana de Tiroides (ATA) junto al Grupo de trabajo de servicios preventivos de EEUU (USPSTF) lanzó una recomendación desaconsejando biopsiar aquellos nódulos de pequeño tamaño o sin características sospechosas, así como el screening de cáncer tiroides en la población general [10].

El carcinoma papilar de tiroides se asocia una alta tasa de recurrencia en contrapartida a un buen pronóstico, encontrando desde pacientes que tienen un curso indolente de la enfermedad hasta otros que por su rápida progresión necesitarán tratamiento más agresivo desde el comienzo.

1.- Epidemiología.

El carcinoma papilar de tiroides puede estar presente prácticamente en cualquier rango etario, siendo el género femenino el más afectado, hasta tres veces más que el masculino [10-11].

Los factores clásicamente relacionados con la aparición del carcinoma papilar son los ambientales, dentro de los que encontraríamos las radiaciones ionizantes, los químicos como los pesticidas, algunos de ellos disruptores hormonales, procesos médicos que implican enfermedades autoinmunes con afectación tiroidea y otros factores como la obesidad [11].

Es de sobra conocida la relación entre las radiaciones ionizantes y el cáncer de tiroides, motivada en gran medida por la localización anatómica del tiroides y su sensibilidad a las

radiaciones especialmente en edades tempranas. Existen estudios que demuestran la relación entre la exposición a radiaciones por técnicas diagnósticas/terapéuticas y el cáncer del SNC, hematológico y tiroideo en base a la acumulación de dosis de exposición [6,11].

La exposición a radiación en EEUU en los últimos 25 años se ha duplicado debido en gran medida al uso de diversas técnicas diagnósticas, como por ejemplo el TAC en el que al menos un tercio de ellos se realiza en la zona de la cabeza y el cuello afectando la exposición a la glándula tiroides.

La sensibilidad a la radiación es mayor en pacientes jóvenes, aunque no puede ser excluida como agente etiopatogénico en pacientes de mayor edad [11].

Actualmente técnicas como la secuenciación de nueva generación (NGS) han puesto de manifiesto la asociación de la exposición a radiación de Chernobyl con la aparición de

inversiones y traslocaciones, síntoma de la ruptura del DNA, y con la presencia de fusiones driver en el análisis del RNA. En pacientes jóvenes se ha visto baja tasa de mutaciones somáticas [11].

En cuanto a la influencia de los productos químicos sobre la aparición del carcinoma papilar, hay estudios que han demostrado la presencia de trazas de metales pesados como el cadmio (Cd) y el uranio (U) en tejido tumoral frente a tejido sano. El cadmio acumulado en las células foliculares altera el normal funcionamiento mitocondrial, pudiéndose utilizar derivados del selenio como protectores y quimiopreventivos frente a la muerte celular y el estrés oxidativo. La exposición a metales pesados en el contexto de un tiroides hipofuncionante contribuye a la malignización celular [11]. Esto llevaría a pensar que puede existir una relación entre la exposición a los

mismos y la aparición en el tiroides de un carcinoma papilar. No obstante, los estudios precisan ampliar el tamaño de las cohortes estudiadas y la homogeneidad de las mismas para llegar a resultados más concluyentes [11].

La obesidad considerada como un síndrome multifactorial y, más concretamente, el índice de masa corporal ha presentado históricamente un valor importante como factor de riesgo tanto cardiovascular como de cáncer, incluido el de tiroides, asociándose en este caso con un peor pronóstico asociado a factores tales como el tamaño tumoral o la multifocalidad. La presencia de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia parece tener relación como factor de riesgo en el desarrollo del cáncer de tiroides [11].

Los niveles elevados de TSH secundaria a niveles bajos de yodo constituyen un estimulante en la proliferación de las células foliculares describiéndose su relación con el incremento del cáncer en estudios realizados con animales, aunque no ha sido posible demostrar la misma en humanos [11].

Clásicamente se ha relacionado la presencia de tiroiditis autoinmune como factor protector frente al carcinoma asociándose con tumores de menor tamaño y menor tasa de metástasis. Estudios de la relación entre procesos autoinmunes y el carcinoma papilar de tiroides han demostrado su relación en cuanto a la prevalencia de multifocalidad, si bien no ha podido demostrarse su asociación con variantes histológicas concretas.

En cuanto a la relación con la presencia de lesiones tipo nódulo solitario o bien patología multinodular, se ha visto mayor relación con la presencia de lesiones únicas en relación a niveles de consumo bajo de yodo (I) [11].

Factores como la exposición a la contaminación y otros como la dieta o el estilo de vida no han sido adecuadamente estudiados. Ciertos factores de la dieta, así como contaminantes ambientales pueden alterar la metabolización del yodo y la normal producción de la hormona tiroidea.

2.- Carcinoma papilar de tiroides. Variantes histológicas.

El carcinoma papilar de tiroides es un tumor de estirpe epitelial cuyos rasgos distintivos son la arquitectura papilar y los rasgos característicos nucleares, así como su comportamiento invasivo [6,13].

La WHO establece en 2017 la siguiente clasificación del carcinoma papilar de tiroides (CPT) [43]:

- Variante clásica (Imagen 1): las características morfológicas que definen al subtipo clásico son las formaciones papilares y los cambios nucleares. En cuanto a la arquitectura, si bien las papilas no tienen por qué ser el patrón único en el carcinoma papilar de tiroides, sí que es uno de los rasgos que definen a este tumor y en concreto a este subtipo.

Estas formaciones presentan ejes fibrovasculares de grosor variable, ocasionalmente ramificados recubiertos por la celularidad neoplásica epitelial. Los cambios nucleares suelen ser esencialmente la variabilidad en tamaño, irregularidades de la membrana con presencia de pseudoinclusiones o los “grooves”, así como la disposición de la cromatina característica.

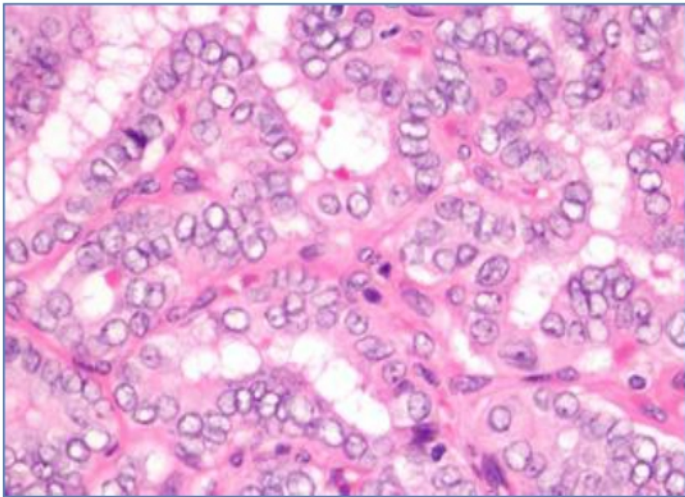


Imagen 1. Presencia de núcleos de tamaño variable, con pseudoinclusiones o “grooves”.

- Variante folicular (Imagen 2): compuesto enteramente o casi por estructuras foliculares que conservan los rasgos citológicos del carcinoma papilar. En los casos no encapsulados o infiltrativos el comportamiento es similar a papilar clásico.

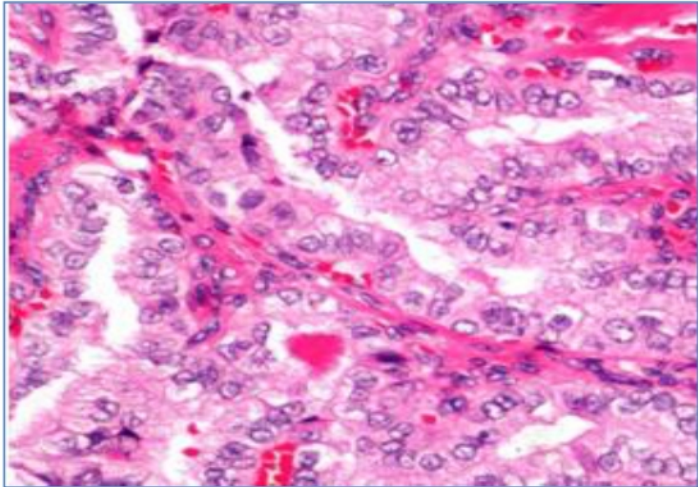


Imagen 2. Presencia de rasgos citológicos propios del carcinoma papilar con arquitectura típicamente folicular.

- Variante encapsulada: carcinoma totalmente rodeado de cápsula. Supone hasta un 10% de los casos de carcinoma papilar y aunque puede metastatizar, es relativamente raro que lo haga.
- Microcarcinoma papilar: carcinoma papilar de 1 cm o menos con o sin cápsula. Frecuentemente como hallazgo incidental. Más frecuente en varones.
- Variante de células columnares: rara variante caracterizada por delgadas papilas o espacios glandulares cubiertos por epitelio estratificado y citoplasma claro, careciendo de muchos de los rasgos citológicos del carcinoma papilar, por lo que ha llegado a cuestionarse que se trate de un subtipo del mismo.

- Variante oncocítica (Imagen 3): la arquitectura sigue siendo papilar o folicular, pero el citoplasma celular adquiere mayor volumen con aspecto granular. Puede simular un Tumor de Warthin de glándula salival, asociando intensa inflamación crónica. Variante extremadamente rara en su forma pura, si bien pueden estar presente los rasgos oncocíticos en otras variantes histológicas. Pronóstico generalmente bueno.

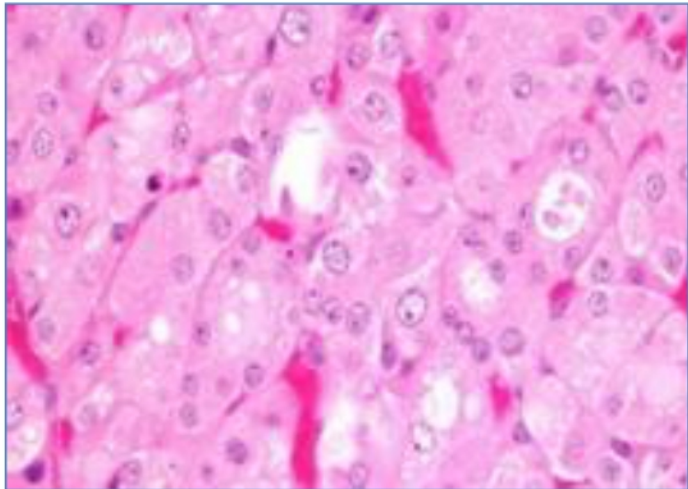


Imagen 3. Esta variante presenta características que recuerdan a un tumor de Warthin, con cambios oncocíticos (citoplasma eosinófilo, con núcleo con marcado nucléolo).

- Otras variantes:
 - Esclerosante difusa: variante muy poco común con diagnóstico diferencial con Tiroiditis de Hashimoto en el que podemos encontrar afectación de ambos lóbulos por una esclerosis densa, cuerpos de psamoma, intenso infiltrado linfocítico y metaplasia escamosa.
 - Células altas o “tall cells” (Imagen 4): variante relativamente frecuente, que asocia la arquitectura papilar a la presencia de un recubrimiento epitelial de células altas en las que encontramos unas prominentes pseudoinclusiones nucleares y pueden tener intenso infiltrado inflamatorio asociado. Subtipo agresivo con alta tasa de recurrencia y mortalidad comparado con el carcinoma papilar clásico [23].

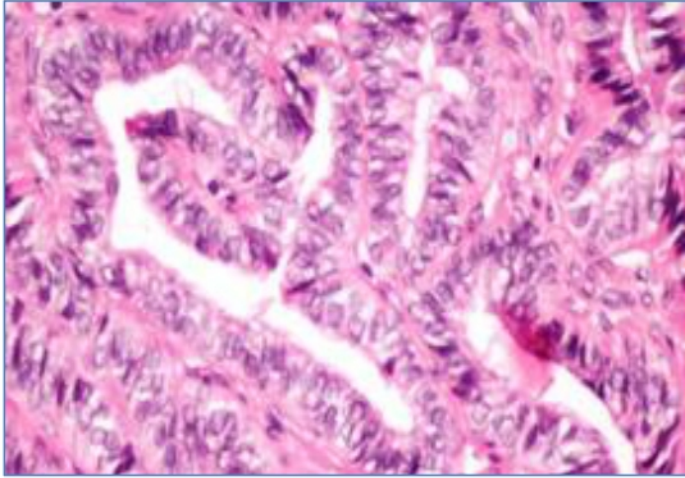


Imagen 4. Las células en este subtipo presentan morfología alta, conservando los rasgos papilares, con presencia de prominentes pseudoinclusiones.

- Morular-cribiforme: subtipo muy raro con patrón de crecimiento cribiforme o formando mórulas y generalmente encapsulado. Su morfología puede estar constituida por mezcla de distintos patrones (cribiforme, folicular, papilar, trabecular y sólido). Podemos encontrar grooves y pseudoinclusiones,

aunque los núcleos no suelen ser especialmente claros. Frecuente invasión vascular o capsular.

- Tachuela o "Hobnail": variante rara en la que podemos encontrar células con citoplasma eosinófilo, núcleo de disposición apical y nucléolo prominente, dispuestas en arquitectura papilar, micropapilar o folicular. Son frecuentes las figuras mitóticas y los focos de necrosis.
- PTC con fibromatosis/estroma fascitis like: prominente reacción estromal que supone la necesidad de hacer un diagnóstico diferencial entre este tumor y entidades como la fascitis nodular, la fibromatosis y otras enfermedades proliferativas estromales.
- Trabecular/sólida: variante muy infrecuente dentro del carcinoma papilar de tiroides. Presenta

característicamente un patrón de crecimiento ya sea sólido o trabecular, manteniendo las características citológicas del carcinoma papilar clásico, pero sin focos de necrosis.

- Células fusiformes: la metaplasia de células fusiformes puede aparecer en el carcinoma papilar de tiroides, pudiendo estas áreas estar presentes en un rango variable de frecuencia. Rasgos distintivos de la variante fusiforme con respecto al carcinoma anaplásico son los núcleos de aspecto blando y la ausencia de necrosis y mitosis.
- Células claras: a nivel arquitectural puede presentar un patrón de crecimiento bien papilar con ejes fibrovasculares o bien en patrón sólido. Los cambios de células claras pueden coexistir con cambios eosinófilos u oncocíticos [14] y podríamos encontrar

cuerpos de psamoma, así como cambios de células columnares. Su comportamiento es similar al carcinoma papilar clásico.

- Variantes Warthin-like (Imagen 5): es característica la presencia de un prominente infiltrado inflamatorio crónico en el que encontraríamos celularidad de hábito oncocítico con características nucleares típicas del papilar. Subtipo histológico más frecuente en mujeres en torno a la quinta década [15].

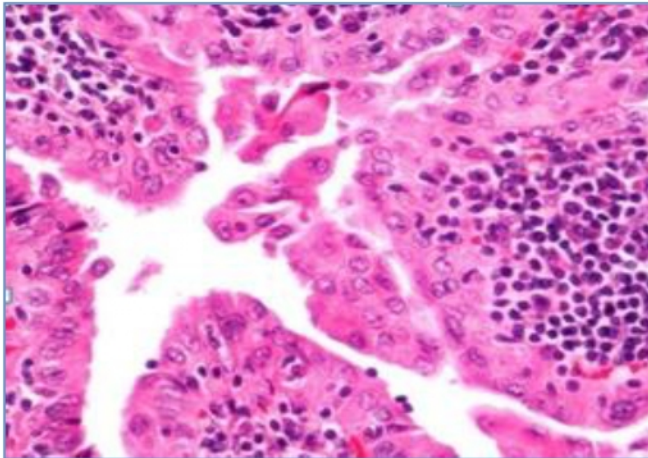


Imagen 5. Celularidad de hábito oncocítico con presencia de infiltrado inflamatorio crónico prominente.

3.- La PAAF en el diagnóstico del carcinoma papilar de tiroides.

La punción aspiración por aguja fina (PAAF) en el diagnóstico, tanto de lesiones quísticas como sólidas, se considera una técnica de bajo coste y morbilidad, que precisa en el caso del tiroides, en algunos casos, del uso combinado con la ecografía para su ejecución. En la secuencia del estudio de la patología tiroidea se considera como primer paso en la toma de decisiones tanto diagnósticas como terapéuticas.

A continuación se describen de forma somera los principales rasgos citológicos con los que nos podemos encontrar en el diagnóstico del carcinoma papilar de tiroides mediante técnica PAAF.

Rasgos citológicos del carcinoma papilar de tiroides en el diagnóstico mediante PAAF [16,17]:

- Rasgo cuantitativo:
 - Hiper celularidad (Imagen 6).

- Rasgos arquitecturales:
 - Papilas (Imágenes 7 y 8).
 - Nidos monocapa.
 - Grupos tridimensionales

- Rasgos nucleares:
 - Núcleo oval.
 - Aumento de tamaño nuclear (Imagen 9).
 - Apiñamiento nuclear y moldeamiento.
 - Cromatina pálida, “pulverizada” o en vidrio esmerilado.

- Nucléolo (pequeño o grande) excéntrico (Imagen 10).
 - Pseudoinclusiones nucleares y hendiduras o “grooves” (Imágenes 11 y 12).
 - Membrana nuclear irregular.
- Otros rasgos:
 - Citoplasma variable (escaso, acantótico, esca-moide, parecido a Hurthle, vacuolado, “waxy” (Imagen 13).
 - Histiocitos (células gigantes multinucleadas) (Imagen 14).
 - Cuerpos de psammoma (Imagen 16).

Hiper celularidad, papilas y otros. Uno de los rasgos comunes en las citologías obtenidas mediante técnica de punción aspiración por aguja fina es que son marcadamente celulares, si bien de forma aislada éste no es un requisito suficiente ni imprescindible para llegar al diagnóstico de carcinoma papilar.

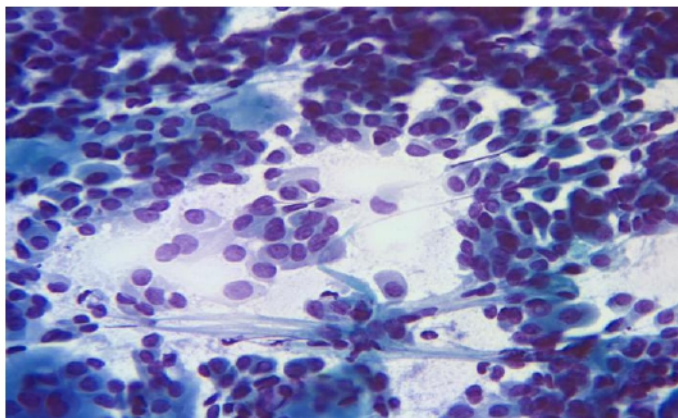


Imagen 6. Característicamente son extendidos hiper celulares, si bien un extendido hipocelular no es excluyente.

Las papilas pueden ser de gran tamaño y en la PAAF en ocasiones solo se aspiran fragmentos de epitelio en monocapa de contornos irregulares. Pueden verse grupos tridimensionales que se asemejan a las estructuras papilares, pero sin eje fibrovascular.

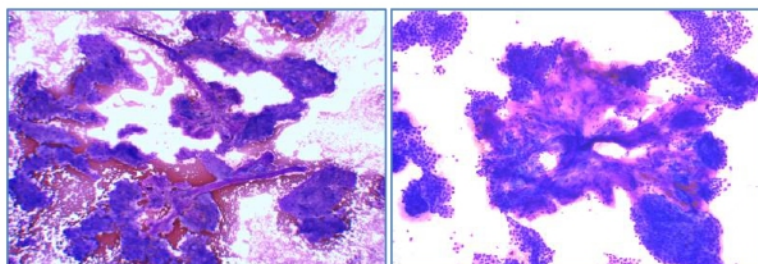


Imagen 7.

Imagen 8.

Imágenes 7 y 8. Los extendidos hiper celulares característicamente están constituidos por formaciones papilares con ejes fibroconectivos finos, ocasionalmente en forma de racimos.

Cambios nucleares. Los núcleos del carcinoma papilar están agrandados (Imagen 9) y tienen morfología ovalada, en comparación a los núcleos del tejido tiroideo sano. Este criterio no se cumple en el subtipo folicular donde este es menor.

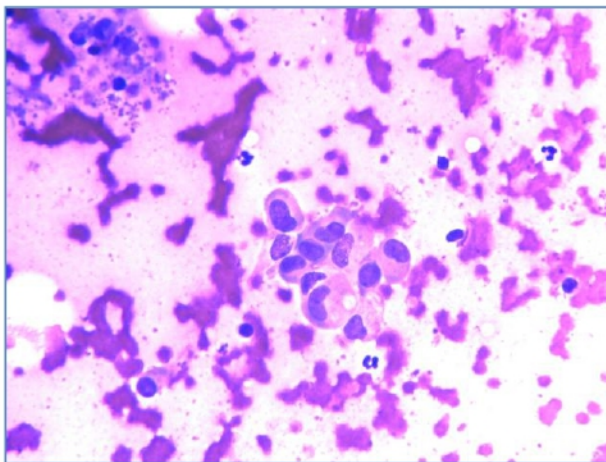


Imagen 9. Es característica la presencia de núcleos agrandados, irregulares en forma y con amoldamiento nuclear.

Presenta un patrón de cromatina único, siendo una importante característica en su diagnóstico. Tiene cromatina finamente granular, dando al núcleo un aspecto claro y uniforme, con presencia de un pequeño nucléolo excéntrico. Estas características son más evidentes con tinción de Papanicolau.

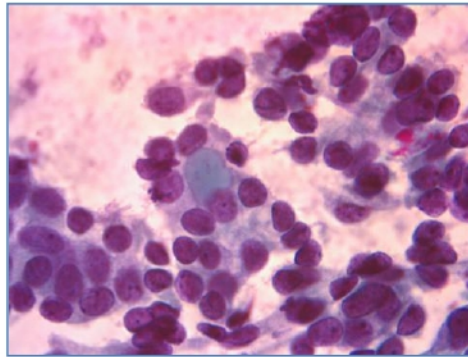


Imagen 10. Nucléolo excéntrico e inclusiones nucleares (grooves).

Las pseudo inclusiones y hendiduras corresponden a pliegues de la membrana nuclear. Cuando aparecen afectan al eje mayor del núcleo dándole a este un aspecto en grano de café. Si bien suelen ser frecuentes, no constituyen un rasgo específico

del carcinoma papilar de forma aislada, pudiendo aparecer en otras entidades. Es en combinación con rasgos como el de núcleo ovalado cuando adquieren relevancia en el diagnóstico. Ciertos artefactos de las preparaciones citológicas pueden simular dichas pseudoinclusiones, por lo que hay que tenerlos en cuenta llegado el caso.

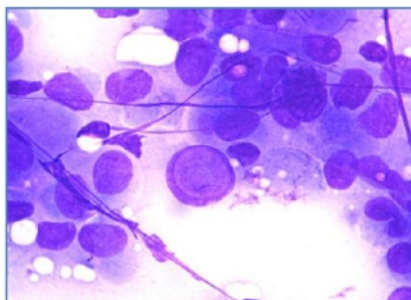


Imagen 11. Pseudoinclusiones.

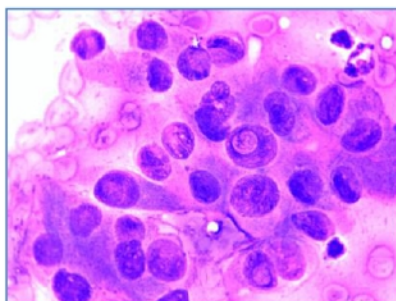


Imagen 12. Pseudoinclusiones y grooves.

Citoplasma. El citoplasma de las células del carcinoma papilar de tiroides es abundante, en ocasiones escamoide, rasgo que tampoco es específico, pero que debe ser tenido en cuenta como signo de alarma (Imagen 13).

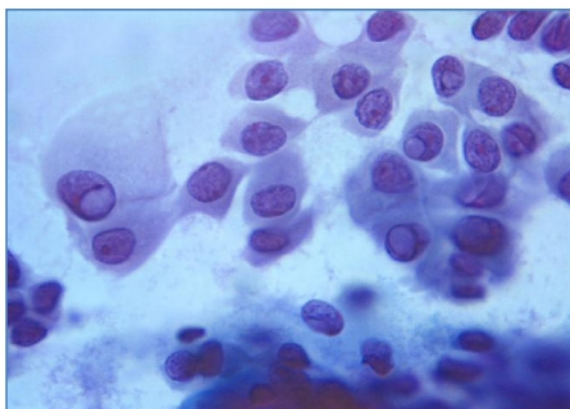


Imagen 13. Citoplasma escamoide (waxy). Núcleos redondos y alargados con pseudoinclusiones.

Células gigantes. Pueden estar presentes en esta y otras patologías no tumorales constituyendo, por tanto, un rasgo no específico (Imagen 14).

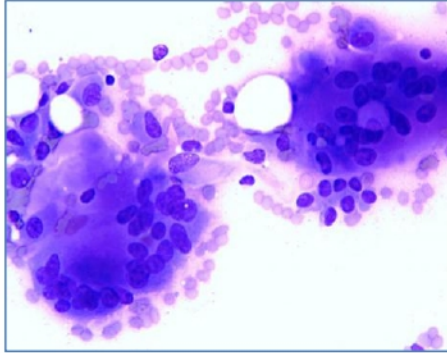


Imagen 14. Células gigantes multinucleadas.

Coloide en “goma de mascar”. Otro rasgo que de forma aislada no es específico, pero que unido a otros debe hacernos sospechar que estemos ante un caso de carcinoma papilar (Imagen 15).

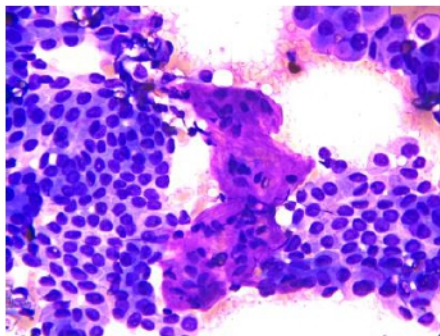


Imagen 15. Coloide denso, escaso, en goma de mascar.

Cuerpos de psamoma. En probable relación a calcificación de las puntas de las papilas. Tampoco es específico. Ante la presencia de estas calcificaciones concéntricas, se debe estudiar la presencia de otros rasgos citomorfológicos típicos del carcinoma papilar, considerándose en una lesión quística como un rasgo atípico.

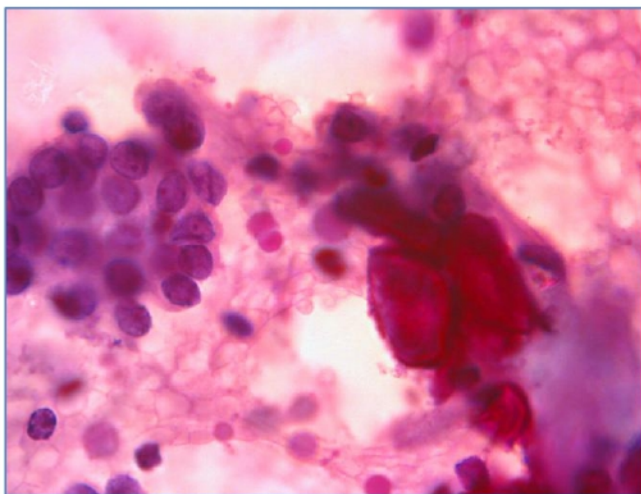


Imagen 16. Calcificaciones concéntricas (cuerpo de psamoma).

4.- Clasificación BETHESDA

El sistema de Bethesda constituye un sistema estandarizado que mediante un número limitado de categorías pretende clasificar los hallazgos citológicos en la PAAF de tiroides [18].

La versión utilizada en nuestro estudio es la del año 2017 y establece seis categorías, producto de la revisión de las guías de manejo de los nódulos tiroideos, así como la introducción de técnicas moleculares y de nuevas entidades como el NIFTP.

Las seis categorías son las siguientes:

I. NO DIAGNÓSTICA O INSATISFACTORIA.

Contenido quístico o material acelular (por ejemplo, material hemático, artefacto de coagulación)

II. BENIGNO

Hallazgos citológicos compatibles con nódulo folicular benigno, como nódulo coloide o

adenomatoide por ejemplo, con tiroiditis linfocítica (Hashimoto) dentro de un adecuado contexto clínico, con tiroiditis granulomatosa (subaguda).

III. ATIPIA DE SIGNIFICADO INCIERTO O LESION FOLICULAR DE SIGNIFICADO INDETERMINADO.

IV. NEOPLASIA FOLICULAR O SOSPECHOSO PARA NEOPLASIA FOLICULAR. Específicamente si hay células oncocíticas (células de Hurthle).

V. SOSPECHOSO PARA MALIGNIDAD.

Sospechoso para carcinoma papilar.

Sospechoso para carcinoma medular.

Sospechoso para carcinoma metastásico.

Sospechoso para linfoma.

Otros.

VI. MALIGNO.

Carcinoma papilar de tiroides.

Carcinoma pobremente diferenciado.

Carcinoma medular de tiroides.

Carcinoma indiferenciado (anaplásico).

Carcinoma de células escamosas.

Carcinoma mixto.

Carcinoma metastásico.

Linfoma No-Hodgkin.

Otros.

Cada una de las categorías conlleva un riesgo determinado de malignidad que condicionan las consiguientes medidas a tomar a la hora del seguimiento y manejo clínico del mismo.

Por ejemplo: las dos primeras conllevan un riesgo inferior al 10% y si bien en la categoría I sería conveniente repetir la toma de

muestra, en la categoría II el paso a seguir sería el estudio mediante ecografía. En las dos últimas categorías el riesgo supera el 50% y estaría indicada en ambos casos la cirugía. En los dos grupos intermedios las guías recomiendan el estudio de alteraciones moleculares.

5.- Mutaciones en el carcinoma papilar de tiroides (Generalidades).

Aunque actualmente el uso de dianas terapéuticas en el carcinoma papilar de tiroides es limitado, las mutaciones o alteraciones genéticas asociadas al mismo son ampliamente conocidas [19].

Los eventos oncogénicos en la vía MAPK pueden identificarse en hasta el 90% de estos carcinomas, estando activada en mutaciones BRAF o RAS, así como reordenamientos (RET, NTRK y ALK).

Las distintas alteraciones han sido clásicamente relacionadas con rasgos concretos dentro de la enfermedad. Así vemos que tumores con mutaciones BRAF V600E, presentan altos niveles de vías de activación MAPK, un score bajo de diferenciación tiroidea y alta heterogeneidad en cuanto al perfil molecular,

representando en su mayoría al carcinoma papilar convencional.

En contrapartida, los tumores con presencia de mutaciones RAS, tienen bajo nivel de señalización en vías MAPK, con alta diferenciación tiroidea, siendo más homogéneos en cuanto al perfil molecular y representan sobre todo al subtipo folicular dentro de los carcinomas papilares de tiroides [20,21].

El protooncogen RET codifica un receptor con actividad tirosinquinasa expresado por ejemplo en las neuronas sensoriales [22] y conlleva una cascada intracelular con actividad incontrolada de la vía MAPK. A lo largo de la historia se han descrito varios reordenamientos RET, aunque su prevalencia es variable en los distintos estudios en probable relación a condicionantes geográficos o étnicos. Tras el

accidente de Chernóbil fueron descritos, además de las anteriores, otras fusiones como las de NTRK y BRAF [19]. Asociada a formas mejor diferenciadas del carcinoma papilar de tiroides, se cree que esta participa en el inicio del proceso, pero no en los eventos posteriores [22].

El gen BRAF pertenece a la familia de las serina/treonina tirosinquinasa, siendo la V600E la mutación más frecuente. Está presente en hasta el 80% de algunas de las variantes como la clásica. La presencia de mutaciones BRAF se asocia con rasgos distintivos arquitecturales o citológicos como las “plump cells”, el citoplasma eosinófilo y los núcleos en forma de hoz (“sickle-shaped nuclei”).

Según el estudio de Virk, Prasad y otros (2014) [25], la mutación BRAF se asocia en histología con ciertos rasgos

morfológicos propios del carcinoma papilar (rasgos nucleares, bordes infiltrativos, reacción estromal y “plump pink cells” entre otros) [24-26]. Salvo los cuerpos de psamoma, todos demostraron sensibilidad, aunque poca especificidad a la hora de predecir la presencia o no de la mutación. Según este mismo estudio, la presencia de mutación era significativamente inferior en aquellos casos con rasgos foliculares.

Filkestein y cols, en su estudio publicado en 2012 [23], vieron que los rasgos eosinófilos asociados a variantes como la de células altas y la oncocítica, se asociaban con mayor frecuencia a la presencia de mutación. Dichos rasgos citoplasmáticos se asociaban con otros característicos del papilar, como los rasgos nucleares, los grooves, las pseudoinclusiones o las membranas irregulares.

Se trata de una alteración temprana y está presente en la mayoría de los casos de forma clonal. Otras mutaciones BRAF suelen presentarse en otros subtipos. En el caso de los reordenamientos, estos suelen estar relacionados con la exposición a la radiación.

En los distintos estudios la frecuencia de las mutaciones de BRAF es variable, si bien la presencia de las mismas parece condicionar un peor pronóstico, estar asociado a presencia de metástasis, a riesgo de invasión y recurrencia, si bien esto no queda del todo claro.

En cuanto a las dianas terapéuticas, se ha visto respuesta clínica a los inhibidores de la tirosinquinasa en estadios avanzados de la enfermedad.

Las mutaciones y consiguiente activación de la señalización de RAS puede estar presente en hasta el 30% de los tumores,

incluyendo tanto lesiones benignas como malignas, presentándose en una mayor frecuencia en el carcinoma folicular de tiroides que en el papilar [20,21].

Dentro de los reordenamientos, las fusiones RET son las más prototípicas en el carcinoma papilar de tiroides. Si bien se han llegado a describir hasta dieciséis fusiones, presentes en hasta el 30% de los carcinomas papilares, la más frecuente con hasta el 60% de los casos es la CCDC6/RET, seguida de la NCOA4/RET con un 30%. Relacionados con la exposición a radiación en niños o jóvenes e identificados en hasta el 62,3% de los casos tras el accidente nuclear de Chernóbil [6].

Predominan los casos con histología clásica, cuerpos de psamoma y alteraciones nucleares concretas, considerándose una alteración molecular temprana.

Con los avances en la biopsia líquida, ha sido posible la detección de esta alteración en sangre periférica de pacientes afectos. Generalmente esta alteración se ha asociado a un aumento de la morbimortalidad, aunque generalmente en casos con historia de exposición a radiación, pudiendo encontrar casos de curso indolente.

En el caso de NTRK, podemos encontrar fusiones con TPM3, TPR y TFG en el caso de NTRK1 o con ETV6 en el caso de NTRK3. Estas fusiones han sido descritas hasta en un 10% de los carcinomas papilares, presentando características tanto clínicas como patológicas similares a las encontradas relacionadas con RET, siendo más frecuentes en jóvenes y en relación a exposición a radiación [6].

Sólo entre un 1-5% de los carcinoma papilares de tiroides presentarán fusiones ALK. Los principales rasgos asociados con esta fusión son la variante folicular y el patrón sólido e infiltrativo. Las técnicas para su detección incluyen la inmunohistoquímica y la hibridación in situ. Se ha descrito respuesta a inhibidores ALK en ciertos pacientes [6].

Las mutaciones del promotor TERT, asociados clásicamente a peor pronóstico, pueden llegar a estar presentes hasta en un 15% de los casos y su asociación con otras mutaciones como la BRAF V600E conlleva un pronóstico y comportamiento agresivo [6, 27-29].

Las sustituciones MED12-G44C consistentes en ganancias o pérdidas de función y mutaciones RBM10 fueron descritas en formas fatales de la enfermedad [6].

Existen casos descritos asociados a mutaciones en la línea germinal en relación a síndromes que predisponen a la aparición del carcinoma papilar de tiroides (Síndrome DICER1) motivados por una expresión disregulada de microRNAs.

5.1. La mutación BRAF y el carcinoma papilar de tiroides. Cronología de una relación.

La mutación BRAF es la más común entre el más común de los carcinomas de tiroides [2,30-33].

Esta es probablemente la que más atención ha atraído desde que la patología molecular y el uso de biomarcadores han pasado a ser parte del día a día de la patología, siendo innumerables los artículos publicados.

La mutación BRAF en tiroides fue descrita hace ya 20 años y si bien clásicamente ha sido relacionada con peores resultados tanto clínica como patológicamente [2,34-36], se ha seguido buscando a lo largo de su historia su utilidad como diana terapéutica, más allá del valor meramente pronóstico, como ya de hecho sucede en patología tumoral de otras localizaciones [37-39].

El BRAF, como subtipo de RAF quinasa, forma parte del proceso de tumorigénesis, siendo parte constitutiva de la activación de la vía MAPK, contribuyendo tanto a la proliferación, como al crecimiento y a la división celular.

La vía MAPK (proteína quinasa de mitogénesis activada) engloba a tres proteínas quinasas que son la llave en vías de señalización que regulan procesos como la proliferación, la diferenciación celular y su muerte.

Cada una de las cascadas consta de una señal extracelular que tras su activación mediante una molécula de GTPasa provocaría el paso de MAPKK a MAPK. Los integrantes de esta vía con gran implicación en el proceso de tumorigénesis del carcinoma papilar de tiroides son, en concreto, el receptor tirosinquinasa RET, la proteína Ras o la quinasa RAF [22]. Dichas alteraciones (excluyentes entre sí) propiciarán la aparición de hasta un 70% de estos tumores.

Centrándonos en el RAF podemos destacar de sus inicios el que este fue estudiado en roedores y aves, identificándose hasta tres genes de dicha familia, el A, B y C-RAF.

A través de la activación de RAS situado en la membrana celular, se induce la fosforilación de B-RAF activando constitutivamente ERK e iniciando el proceso de tumorigénesis.

Estas mutaciones pueden ser encontradas en relación a tumores de colon, melanoma, ovario y el carcinoma papilar de tiroides entre otros, siendo la más frecuente en este último caso la V600E, mutación que convierte al B-RAF en una estructura activada [22].

En el caso del tiroides y en concreto en el carcinoma papilar, la mutación BRAF se presenta en solitario en hasta un 40% de los casos, siendo rara su asociación a otras mutaciones.

Presente en pacientes de edad más avanzada que otras mutaciones y sin relación con la exposición a radiación, como si que se ha visto en otras mutaciones como el RET.

El B-RAF como detonante de la génesis del carcinoma papilar parece estar presente en los estadios iniciales del proceso [22] en relación principalmente a variantes del carcinoma papilar con peor comportamiento.

Clásicamente relacionada con un peor pronóstico por encontrarse en casos con extensión extratiroidea en el momento del diagnóstico, presencia de metástasis y riesgo de recurrencia, es ahora cuando empieza a medirse su peso como biomarcador con posible enfoque terapéutico, como de hecho ocurre en otros tumores [37-39].

Las vistas se han posado en los inhibidores de la tirosinquinasa con la finalidad de bloquear el punto de unión del ATP que promueve la activación de la vía, si bien estos inhibidores no suelen ser específicos. Otra opción en estudio es el uso de inhibidores específicos de B-RAF, que no han demostrado ni potencia ni especificidad, y los bloqueadores de MEK [22].

**PLANTEAMIENTO,
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Planteamiento.

Ampliamente estudiada en tumores de otras localizaciones, el BRAF, y en concreto el V600E, es diana terapéutica en melanoma y ciertos tumores de pulmón, siendo considerado en carcinoma papilar de tiroides un factor pronóstico a considerar en el seguimiento de los pacientes afectos.

Como vimos en la introducción, podemos encontrar la existencia de correlación entre algunos patrones histomorfológicos (tipos histológicos, infiltración peritumoral, plump pink cells y reacción desmoplásica desmoide) y la presencia de las alteraciones moleculares descritas en el carcinoma papilar de tiroides [24-26].

Ciertos signos citológicos en la PAAF tales como las “plump cells”, con citoplasma poligonal y eosinófilo, junto a la presencia de núcleos en forma de hoz pueden predecir la presencia de la mutación BRAF [16, 40-42].

Es por ello que hemos querido estudiar la existencia de relación entre las características citológicas del carcinoma papilar (que no dejan de ser una traducción de los rasgos histomorfológicos ampliamente conocidos), su clasificación según los criterios de Bethesda y la mutación BRAF, determinando sus frecuencias, para estudiar su asociación con la misma y poder determinar así su potencial valor predictivo.

La mutación BRAF, ampliamente estudiada y conocida en el carcinoma papilar de tiroides, ha sido relacionada con rasgos histológicos del mismo. Estos rasgos tienen traducción a nivel citológico con lo que el planteamiento inicial es si estos pueden tener capacidad predictiva de la mutación BRAF.

Hipótesis.

1. Los signos citológicos de las muestras obtenidas por PAAF tiroidea y su clasificación dentro de Bethesda se relacionan con la mutación BRAF.
2. Los rasgos citológicos de una PAAF pueden ser predictivos de la mutación BRAF en las biopsias diagnósticas.

Para ello nos planteamos como objetivos:

Objetivos.

- I. Estudiar las características citomorfológicas de las citologías obtenidas por PAAF previas a la intervención en pacientes con diagnóstico definitivo histológico de carcinoma papilar de tiroides.
- II. Determinar la presencia de la mutación de BRAF en la muestra histológica de dichos casos.
- III. Establecer la presencia o no de relación estadística entre dichos rasgos citomorfológicos y la presencia de mutación BRAF, así como su posible valor predictivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS.

Con esta finalidad se escogió un período de alrededor de 5 años, dentro del que fueron seleccionadas muestras citológicas provenientes de PAAF de tiroides de pacientes a los que tras tratamiento quirúrgico, se les diagnosticó de carcinoma papilar sobre pieza quirúrgica.

Las citologías finalmente estudiadas fueron 63, siendo descartadas para ello aquellas cuyo material resultó insuficiente o pertenecían a entidades como el NIFPT. Dichas citologías fueron clasificadas según las categorías de Bethesda [18]. Como ya se mencionó anteriormente, dichos pacientes fueron tratados quirúrgicamente y el resultado de su estudio histológico fue de carcinoma papilar de tiroides.

Las muestras provenían de técnica de punción aspiración con aguja fina, tomadas de pacientes previo consentimiento

informado de la misma y fueron teñidas a posteriori con Diff-Quick o bien con Papanicolau.

La técnica D-Q consiste en sumergir durante 10 a 15 segundos los portaobjetos en distintas soluciones (metanol verde rápido, Eosina G y tiazina, seguido de enjuague con agua, secado y montaje DPX).

La tinción de Papanicolaou consiste en fijar las muestras en alcoholes desde 96º a 70º, tinción con hematoxilina de Harris 2 min, enjuague con agua, alcoholes nuevamente en esta ocasión de manera creciente hasta 96º, Naranja G por 6 min, dos inmersiones en alcohol 95º, EA50 durante 2 minutos, tres alcoholes hasta 100º, 20 inmersiones rápidas en cada uno, y tres xiloles, 20 inmersiones en cada uno y montaje final en DPX.

La técnica D-Q es una modificación de la tinción de Wright-Giemsa que se usa como tinción rápida en anatomía patológica y permite una tinción selectiva de compuestos eosinófilos o bien basófilos en función del tiempo que se invierta en cada uno de los pasos de la tinción. Permite teñir muestras secadas al aire. Es junto al Papanicolau una de las dos técnicas de tinción más utilizadas en citopatología.

Para el estudio citológico de las muestras seguimos las directrices de la Clasificación de la OMS y su revisión de 2017 [43]. Según Douglas P. Clark and William C. Faquin [17], pueden identificarse hasta 21 rasgos citológicos en relación al carcinoma papilar de tiroides, entre ellos la hiper celularidad, las estructuras papilares, las láminas tridimensionales, las monocapa, la forma acantótica o de “cera”, láminas en forma de panal, los núcleos redondos y uniformes, los núcleos

ovalados, los núcleos agrandados y nucléolos redondos excéntricos, la cromatina pálida y cromatina de textura, los “grooves” o ranuras y las pseudoinclusiones, las células gigantes multinucleadas, el coloide denso o en goma de mascar, los cuerpos de psammoma, y las características foliculares como estructuras foliculares, los núcleos redondos, cromatina clara y pseudoinclusiones. Estas fueron valoradas por dos observadores, siendo clasificadas según Bethesda. Posteriormente se realizó el estudio de mutación mediante técnica de pirosecuenciación de la muestra tisular obtenida de la cirugía del tumor.

Ya en 2014, Rossi y cols [40] se plantearon estudiar el potencial predictivo de la presencia de la mutación BRAF en el carcinoma papilar de tiroides de ciertos rasgos citomorfológicos (“plump cells”, rasgos nucleares del papilar

clásico, núcleo en forma de hoz “sickle nuclei”, cuerpos de psamoma y cambios quísticos) [16, 40-42]. Las conclusiones del estudio fueron que solo la presencia de los núcleos en forma de hoz (“sickle nuclei”) demostró tener una especificidad y sensibilidad del 100% en cuanto a potencial predictor de la mutación BRAF en el carcinoma papilar de tiroides.

Análisis de la mutación BRAF en el tejido.

Se seleccionó el bloque de tejido parafinado más representativo para la purificación de ADN. Tres secciones de parafina de 10 μm fueron desparafinizados e hidratados haciendo microdissección del área tumoral colocándolo en tampón TENS (Tris-EDTA-NaCl-SDS).

A continuación se realizó la digestión con proteinasa K, extracción con fenol-cloroformo y posterior purificación del DNA [44].

La secuencia BRAF fue amplificada en reacciones de 25 μL que contenían 20 ng de ADN, 4 μL de dH_2O , 12,5 μL GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega, Madison, WI) y 1 μL de los siguientes cebadores a 25 μM cada uno:

BRAF-F2 5'-TGATTTTGGTCTAGCTACA-3'

BRAF-R bio 5'-TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGAT-3'

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el termociclador Bio-Rad MyCyCler™ (Bio-Rad, Hercules, CA) con la siguiente programación: 2 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 20 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C. El producto de 170 pb se confirmó por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Los productos de PCR se pirosecuenciaron con reactivos y equipos PyroMark Q24 (Qiagen, Chatsworth, CA). Se usó estreptavidina-agarosa en 70 µL de tampón de unión por 10 µL de producto de PCR para capturar la hebra inversa, que luego se aplicó como plantilla para la pirosecuenciación con el cebador BRAF-seq.

El porcentaje de alelos mutados (% T>A) se evaluó con el software PyroMark, considerándose muestras con ≥ 10 % de alelos como positivas.

Análisis estadístico.

Las variables categóricas fueron expresadas como frecuencias y porcentajes, y las continuas como media y desviación estándar, cuando los datos siguieron una distribución normal, o como medianas y rangos intercuartílicos (percentil 25 - 75) cuando las distribuciones se desviaron de la normalidad. Los porcentajes se compararon utilizando el test χ^2 , las medias usando el test t, y las medianas usando el test de Wilcoxon. La significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

El análisis de regresión logística multivariante fue utilizado para identificar factores que mantuvieran una asociación independiente con la mutación.

Posteriormente se realizó la selección de variables con base en el mejor subconjunto de regresión y el criterio de

información bayesiano (BIC). El modelo se resumió en valores de p (test de razón de verosimilitud) y razones de probabilidad, que se estimaron utilizando intervalos de confianza del 95%. Para evaluar las variables “no folicular,” “núcleos no redondos,” y “cromatina no clara” como factores diagnósticos de BRAF $\geq 10\%$, sensibilidades, especificidades, valores predictivos negativos (VPN) y valores positivos fueron estimados utilizando intervalos de confianza del 95%. Los datos se analizaron utilizando el paquete R, versión 3.6.1 (R Development Equipo central, 2019) [45].

RESULTADOS

RESULTADOS.

De los 63 casos incluidos en el estudio, 43 de ellos presentaron la mutación BRAF V600E, lo que supone un 68,3% del total. Los pacientes eran predominantemente mujeres, con edades comprendidas entre los 39 y los 69 años aproximadamente (TABLA 1).

Histológicamente hablando, el subtipo clásico del carcinoma papilar de tiroides fue el que mayor asociación presentó con la presencia de la mutación (28/31 casos). En el análisis logístico multivariante fue el único factor que demostró una asociación independiente (odds ratio = 10.58; 95% CI = 2.67–41.91) (TABLA 2).

Los restantes tipos histológicos fueron por orden de frecuencia: la variante folicular con 10, el microcarcinoma con

7, el de células altas con 6, el oncocítico con 4, el macrofolicular con 3 y el pobremente diferenciado con 2 casos.

De los rasgos citomorfológicos los más frecuentes fueron la hipercelularidad (82,5%), que como bien se ha dicho anteriormente, es frecuente pero no exclusiva de esta patología, los núcleos ovals y agrandados (81% y 74%), cromatina pálida (76,2%), el citoplasma con rasgos “waxy”, escamoide y acantótico (77,8%), nucléolo excéntrico (71,4%), nidos tridimensionales (69,8%) y los grooves (61,9%). Dichas variables a pesar de mostrar elevado número de casos mutados no mostraron asociación con la mutación (TABLA 1).

Los rasgos citomorfológicos que menos se encontraron en nuestro estudio fueron la presencia de estructuras papilares (50,8%), coloide denso o en “goma de mascar” (46%), nidos monocapas con contornos irregulares (46%),

pseudoinclusiones (41,3%), células gigantes multinucleadas (38,1%) y los cuerpos de psamoma (9,5%). Si bien presentaron un número elevado de casos mutados, estos rasgos tampoco mostraron asociación con la presencia de la mutación V600E.

Los rasgos eminentemente foliculares como las estructuras foliculares (34,9%), núcleo redondo folicular (25,4%) y cromatina clara (28,6%) mostraron una significación negativa para la presencia de BRAF.

Otro parámetro tenido en cuenta en nuestro estudio fue la clasificación de las citologías según el sistema de Bethesda. Dicho sistema mostró en los estudios estadísticos asociación con la mutación (TABLA 1) ($p = 0.045$). Los casos clasificados inicialmente con categoría de la I a la III fueron reevaluados y se constató que las muestras eran adecuadas y valorables.

De los casos clasificados como categoría III, hubo dos casos uno de subtipo clásico y otro macrofolicular.

En el caso de los clasificados como IV (19), los subtipos encontrados fueron 8 de subtipo folicular, 5 del clásico, 2 de subtipo oncocítico, 2 microcarcinomas y uno de los subtipos células altas y con áreas pobremente diferenciadas. En 16 de los casos se diagnosticó citológicamente de proliferación folicular.

Entre los clasificados como Bethesda V (25) encontramos 17 casos de subtipo clásico, 4 de células altas, 2 microcarcinomas, 1 oncocítico y 1 macrofolicular. Seis de los casos estudiados fueron clasificados como Bethesda VI, 5 de ellos de subtipo clásico y uno de células altas con áreas pobremente diferenciadas.

Tabla 1. Signos citomorfológicos y valores de BRAFV600E en biopsia de CPT.

	Total N = 63	BRAF Biopsia <10% N = 20	BRAF Biopsia ≥10% N = 43	p- value
Edad (años)	54.0 ± 14.9	57.0 ± 18.1	52.6 ± 13.1	0.286
Sexo:				0.961
Masculino	16 (25.4)	5 (25.0)	11 (25.6)	
Femenino	47 (74.6)	15 (75.0)	32 (74.4)	
Estructuras papilares	32 (50.8)	11 (55.0)	21 (48.8)	0.649
Hiper celularidad	52 (82.5)	18 (90.0)	34 (79.1)	0.478
Tridimensionalidad	44 (69.8)	14 (70.0)	30 (69.8)	0.985
Nidos monocapa	29 (46.0)	9 (45.0)	20 (46.5)	0.911
Nidos en panal de abeja	14 (22.2)	3 (15.0)	11 (25.6)	0.518
Núcleo redondeo	19 (30.2)	7 (35.0)	12 (27.9)	0.568
Citoplasma "waxy"	49 (77.8)	15 (75.0)	34 (79.1)	0.752
Núcleo oval	51 (81.0)	18 (90.0)	33 (76.7)	0.309
Núcleo alargado	47 (74.6)	15 (75.0)	32 (74.4)	0.961
Cromatina pálida	48 (76.2)	14 (70.0)	34 (79.1)	0.528
Cromatina textura fina	39 (61.9)	15 (75.0)	24 (55.8)	0.144
Núcleo excéntrico	45 (71.4)	15 (75.0)	30 (69.8)	0.669
Grooves	39 (61.9)	13 (65.0)	26 (60.5)	0.730
Pseudoinclusiones	26 (41.3)	7 (35.0)	19 (44.2)	0.491
Células gigantes multinucleadas	24 (38.1)	5 (25.0)	19 (44.2)	0.144
Coloide denso	29 (46.0)	9 (45.0)	20 (46.5)	0.911
Cuerpos de psammoma	6 (9.5)	2 (10.0)	4 (9.3)	1
Signos foliculares				
Pseudoinclusiones	6 (9.5)	4 (20.0)	2 (4.7)	0.075
Estructura folicular	22 (34.9)	13 (65.0)	9 (20.9)	< 0.001
Núcleo redondo	16 (25.4)	9 (45.0)	7 (16.3)	0.015
Cromatina clara	18 (28.6)	9 (45.0)	9 (20.9)	0.049
Tipos histológicos de CPT				< 0.001
Áreas pobremente diferenciadas	2 (3.2)	1 (5.0)	1 (2.3)	
Clásico	31 (49.2)	3 (15.0)	28 (65.1)	
Células altas	6 (9.5)	2 (10.0)	4 (9.3)	
Oncocítico	4 (6.3)	4 (20.0)	0	
Folicular (FVPTC)	10 (15.9)	4 (20.0)	6 (14.0)	
Macrofolicular	3 (4.8)	3 (15.0)	0	
Microcarcinoma	7 (11.1)	3 (15.0)	4 (9.3)	
Sistema Bethesda				0.045
BI No diagnóstico o	1 (1.6)	1 (5.0)	0	
BII Benigno	10 (15.9)	1 (5.0)	9 (20.9)	
BIII AUS/FLUS	2 (3.2)	1 (5.0)	1 (2.3)	
BIV FN/SFN	19 (30.2)	10 (50.0)	9 (20.9)	
BV Sospechoso de malignidad	25 (39.7)	5 (25.0)	20 (46.5)	
BVI Maligno	6 (9.5)	2 (10.0)	4 (9.3)	

Los datos son medias SD, frecuencias (%) y medianas (IQR)

Tabla 2. Análisis multivariante con regresión logística para la mutación (BRAF Biopsia $\geq 10\%$).

	P-value	Odd-Ratio (95% CI)
Tipo clásico histológico de CPT	< 0.001	10.58 (2.67 ; 41.97)

En el estudio predictivo se tuvieron en cuenta datos como la presencia de valores de mutación superiores o iguales al 10%, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) y lo que pasaremos a denominar como Test (+) que es la presencia de rasgos citomorfológicos que excluyan los propios de entidades foliculares, englobándolos en “No foliculares”, “No núcleo redondo” y “No cromatina clara” y el llamado Test (-), que supondría la presencia de rasgos propios de lesiones foliculares, como son los grupos foliculares, el núcleo redondo y la presencia de cromatina clara. El VPP en el rasgo “No

folicular” del estudio fue del 82.9% y su VPN del 59.1%, con una sensibilidad del 79.1%. En el caso del rasgo “No núcleo redondeo” el VPP fue del 76.6% y su sensibilidad del 83.7%. Finalmente el VPP del rasgo “No cromatina clara” fue del 75.6% y su sensibilidad del 79.1% (TABLA 3)

Tabla 3. Evaluación de los valores diagnósticos de los marcadores para BRAF biopsia $\geq 10\%$.

	<i>No estructuras foliculares</i>	<i>No núcleo redondo</i>	<i>No cromatina clara</i>
Sensibilidad	79.1 (64.0 - 90.0)	83.7 (69.3 - 93.2)	79.1 (64.0 - 90.0)
Especificidad	65.0 (40.8 - 84.6)	45.0 (23.1 - 68.5)	45.0 (23.1 - 68.5)
Valor predictivo negativo	59.1 (42.6 - 73.7)	56.3 (35.9 - 74.7)	50.0 (31.9 - 68.1)
Valor predictivo positivo	82.9 (72.4 - 90.0)	76.6 (68.3 - 83.2)	75.6 (66.9 - 82.5)

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.

La relación entre determinados rasgos histológicos presentes en el carcinoma papilar de tiroides y la presencia de la mutación BRAF ha sido ampliamente estudiada. Es por ello, que en este estudio nos hemos propuesto determinar si existe la misma capacidad predictiva de la mutación en relación a características en este caso citológicas de muestras obtenidas por PAAF.

La heterogeneidad morfológica del carcinoma papilar, más aún cuando su estudio es mediante muestra citológica, pone de relieve la dificultad a la hora de establecer los parámetros que puedan tener correlación con la presencia o no de la mutación BRAF [46,47].

En el 68,2% de nuestros casos, la mutación BRAF estuvo presente, siendo el subtipo clásico ($p < 0.001$), el más frecuente

tal y como podemos encontrar en la literatura relativa a estudios en histología [24-26].

En cuanto a la clasificación Bethesda ($p < 0.045$), los grados V y VI fueron los más relacionados con la presencia de mutación BRAF, algo lógico por otro lado puesto que estos subtipos de la clasificación suelen relacionarse con mayor frecuencia con un diagnóstico de confirmación de carcinoma papilar de tiroides.

Si bien fueron detectados 10 casos falsos negativo y aunque solo un 10% de estos casos suelen terminar en cirugía, el hecho de que estos presentaran o bien aumento notable de tamaño o rasgos tanto ecográficos como clínicos sugestivos de malignidad conllevaron que finalmente dichos casos fueron reconducidos hacia un tratamiento quirúrgico con un posterior diagnóstico histológico definitivo positivo [18, 48,49].

Durante nuestro periodo de estudio, 7.837 punciones de tiroides fueron realizadas, encontrando una tasa de falso negativo de solo 0,13%, muy por debajo de los rangos habituales que suelen estar en torno al 0-3% [50]. Los falsos negativos suelen estar relacionados con rasgos foliculares presentes en algunos subtipos de carcinoma papilar, o bien la presencia de microcarcinomas diagnosticados incidentalmente en cirugía.

Así mismo, el uso de técnicas como el Diff-Quick, dificultan la apreciación de ciertos rasgos citológicos como los “grooves”, las pseudoinclusiones y el “waxy”, y por tanto su adecuada clasificación dentro de Bethesda resultando en falsos negativos.

La citología por punción tiroidea en el carcinoma papilar suele presentar característicamente un aspecto acantótico, escamoide o waxy, con células densamente empaquetadas o

patrón en empedrado [17, 18]. Todo ello, nosotros lo interpretamos como rasgos eosinofílicos ligados al concepto “plump-cells” [16, 33, 41].

En estudios ya publicados por Rossi y cols. en citología líquida [41], estos fueron cuantificados, y si bien nosotros no hemos podido hacerlo, si que se ha determinado la presencia o ausencia de los mismos, no encontrando relación estadísticamente significativa.

Estos rasgos morfológicos se han relacionado con mecanismos metabólicos en relación a una función alterada de la vía de fosforilación oxidativa, que estimula la glicólisis, incrementando la actividad mitocondrial en las células neoplásicas, como ya ha sido descrito en otras patologías como el melanoma [16, 51].

En cuanto a rasgos nucleares, el conocido como núcleo en hoz o “sickle nuclei”, típico del carcinoma papilar, ha sido descrito como valor predictivo en citología líquida, si bien dado que nosotros hemos utilizado citología convencional, este rasgo no ha sido evaluado [33, 42].

En el caso de los “grooves” es preferible el uso de Papanicolau frente al Diff-Quick [18].

Otros rasgos menos frecuentes, pero también necesarios a la hora de clasificar los hallazgos citológicos dentro del Bethesda, son la presencia de pseudoinclusiones, el coloide en goma de mascar y los cuerpos de psamoma, así como las papilas y las células gigantes multinucleadas, todos ellos necesarios para determinar una categoría VI del sistema Bethesda.

En nuestro estudio estadístico no ha sido posible encontrar una asociación individual entre estos rasgos citológicos y la presencia de la mutación BRAF, si bien esta es muy frecuente

en prácticamente todos ellos. No obstante, no existe una diferencia notable en ciertos rasgos como la hiper celularidad, las estructuras papilares, los grupos tridimensionales o el citoplasma tipo waxy por ejemplo.

En el caso de las publicaciones sobre estudios histológicos, se vio mayor asociación con rasgos tales como infiltración peritumoral, las “plump-cells” y la esclerosis tumoral [24, 26]. Estos rasgos no son identificables mediante citología, excepto las “plump-cells” y el citoplasma “waxy” que no fueron en este caso estadísticamente significativos.

Los rasgos vinculados con los subtipos de rasgos foliculares, ya sea núcleo redondo, o cromatina clara por ejemplo, mostraron una relación negativa con la presencia de mutación, siendo relacionados con mutaciones RAS en la literatura [21, 28].

Por tanto, dados estos antecedentes, con la finalidad de valorar el uso predictivo de la mutación BRAF en muestras obtenidas mediante PAAF, nos planteamos estudiar lo que hemos denominado como “*factores diagnósticos negativos*”, considerando como Test (+) a la ausencia de rasgos eminentemente foliculares, denominándolos “No folicular”, “No núcleos redondos” y “No cromatina clara”. [21, 28].

Estos mostraron una sensibilidad de 79.1%, 83.7% y 79.1% respectivamente, lo que nos indica que la presencia de signos como la hipercelularidad, presencia de núcleos ovals, “grooves”, placas “waxy”, las “plump-cells” y las pseudoinclusiones aumentan la probabilidad de encontrar la mutación BRAF en biopsia quirúrgica. Los Valores Predictivos Positivos, con los que valoramos la probabilidad de tener mutación BRAF si Test (+), son en este caso del 82,9%, 76,6% y del 75,6% respectivamente.

En contrapartida, especificidades de entre el 65%-45% en el caso de la presencia de rasgos foliculares como núcleo redondo o folicular y la cromatina clara, los llamados Test (-), irían a favor de encontrarnos ante un caso con BRAF nativo.

El Valor Predictivo Negativo en este caso sería del 59.1%, 56.3% y 50%, indicarían la probabilidad de que no exista la mutación BRAF si Test (-).

La ausencia de rasgos propios de subtipos foliculares del carcinoma papilar de tiroides con su alta sensibilidad y valor predictivo positivo, es el signo citológico con más peso para clasificarlos dentro del grupo IV de la clasificación de Bethesda. En el caso del rasgo “núcleo en forma de hoz” este demostró más sensibilidad en los grupos V y VI. Sin embargo, al no ser un rasgo con mucha especificidad, precisó de otros como el citoplasma tipo waxy, las plump cells o de las pseudoinclusiones para la clasificación dentro de estos grupos.

Otra de las limitaciones encontradas está ligada a que la mayoría de las muestras estudiadas fueron con la técnica de Diff-Quick, con la consiguiente dificultad para valorar rasgos como “No cromatina clara”, razón por la cual este rasgo presenta alta sensibilidad y baja especificidad en los grupos V y VI del Bethesda, lo que puede condicionar la existencia de falsos negativos, al ser clasificados como Test (-), lo que supuso en nuestro caso que determinadas muestras fueran clasificadas como IV y que en posterior cirugía fueran diagnosticadas como variantes foliculares, oncocítica, macrofolicular o microcarcinoma (TABLA 1).

En cuanto a los falsos positivos que fueron pocos, pero algunos hubo, vinieron ligados a casos clasificados como Test (+) y que demostraron ser nativos para la mutación BRAF, probablemente ligado a los casos de carcinoma papilar de tiroides de variante folicular presentes en nuestro estudio.

La prevalencia de la mutación en nuestro estudio fue del 68,2%, por lo que debería haber un número significativo de falsos negativos en el grupo de 31,8% restantes.

Otro rasgo citológico que dificultó el estudio a la hora de discriminar los casos de variante folicular fueron el “No cromatina clara” o “pálida” y “No núcleo redondo” con bajo o moderado poder predictivo.

Este rasgo de “No cromatina clara” se define como una cromatina homogéneamente distribuida por el núcleo, finamente granular dando una aspecto pálido, rasgo muy frecuente en las proliferaciones papilares del carcinoma papilar de tiroides.

Por otro lado, “cromatina clara”, está más presente en los núcleos redondos foliculares, al contrario de la cromatina oscura y densa que puede observarse en los núcleos foliculares normales [17, 18].

Las limitaciones de nuestro estudio van ligadas en gran medida también al hecho de que la PAAF, no solo puede orientar nuestro diagnóstico final hacia un carcinoma papilar, cosa que sucede en torno a un 85%, sino que puede establecer otros posibles diagnósticos.

De ahí que los parámetros principales que hemos utilizado en nuestro estudio a la hora de valorar los rasgos citomorfológicos estén en gran medida vinculados a lo que hemos denominado como Test (+).

En cuanto a los denominados como Test (-) (variante folicular del carcinoma papilar, los denominados NIFPT o los adenomas foliculares), la dificultad radica tanto en su diagnóstico propiamente dicho como en el hecho de que solo con la excisión quirúrgica puede demostrarse la ausencia de rasgos catalogables como Test (+).

En literatura, si bien estos rasgos (cromatina clara, núcleo redondo y formaciones foliculares) no se consideran patognomónicos, sí que han sido ligados con la presencia de mutaciones de la familia RAS [20, 28]. Estos casos asocian menor tendencia a la invasión vascular, con el consiguiente menor riesgo de metástasis ganglionar.

Por otro lado, como ya se dijo anteriormente los Test (+) demostraron una alta o moderada sensibilidad a la hora de predecir la mutación BRAF, aunque con moderada o baja especificidad.

Este subgrupo asocia mayor tendencia a la metastatización, así como un crecimiento más rápido de la lesiones, asociando otras mutaciones como p53, pTERT, PI-K-AKT/mTOR y SWI-SNF, conllevando distintas situaciones a nivel clínico [28, 52].

Es por tanto, por lo que consideramos de utilidad la clasificación de los rasgos citomorfológicos como Test (+) o

Test (-), como potenciales predictores de la presencia de mutaciones BRAF o RAS, tal como se ha demostrado en estudios anteriores [20, 21, 27, 28].

Dada la búsqueda, cada vez más, de tratamientos personalizados en el enfoque terapéutico de los pacientes, el estudio de posibles parámetros citológicos que puedan predecir la presencia o no de determinadas mutaciones puede conllevar la pronta toma de decisiones para el uso de determinados fármacos, por lo que consideraríamos que la PAAF puede resultar una herramienta de gran utilidad en este contexto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.





- I. No hemos encontrado relación entre los signos citológicos estudiados y la mutación BRAF.
- II. Estadísticamente existe relación entre las categorías V y VI de la Clasificación Bethesda y la mutación BRAF.
- III. El Test (-) (o presencia de rasgos foliculares) es estadísticamente significativa ($p < 0,001$) y predice la negatividad de la presencia de mutación BRAF en la muestra histológica.
- IV. Por ende, aquellos casos que presentan los rasgos citológicos clasificados como Test (+) presentan mayor capacidad a la hora de predecir la presencia de mutación BRAF en su estudio en biopsia.
- V. La capacidad discriminatoria de los rasgos citológicos en cuanto a su poder predictivo de la mutación BRAF frente a aquellos casos de carcinoma papilar con rasgos de mutación RAS, nos puede orientar a la hora de la utilización de técnicas moleculares en los casos de diagnóstico complejo con la finalidad de la toma de decisiones clínico-terapéuticas.

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES.

RESEARCH ARTICLES | AUGUST 08 2023

Thyroid Fine Needle Aspiration, the Bethesda System, and the BRAF^{V600E} Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Association and Prediction for Biopsy

Subject Area:  [Pathology and Cell Biology](#).

[María Eugenia Galán-García](#); [María Soledad Martínez-Martin](#);
[Eduardo José Araujo-Ruano](#); [Juan Francisco Loro-Ferrer](#)  ;
[Pedro Saavedra-Santana](#)  ; [Eduardo Salido-Ruiz](#)  ; [Juan José Cabrera-Galván](#) 

Acta Cytologica (2023) 67 (4): 346–356.

<https://doi.org/10.1159/000528860>  [Article history](#).

PubMed:36592623

La Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP-IAP), la Sociedad Española de Citología (SEC) y la Sociedad Española de Patología Forense (SEPAF) certifican que

la Comunicación Oral titulada

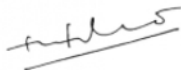
Variables citológicas de la PAAF relacionadas con la mutación BRAF V600E en el carcinoma papilar de tiroides

firmada por los siguientes autores

María Eugenia Galán García(1), M^a Soledad Martínez Martín(1), Macarena Centeno Haro(1), Eduardo Araujo Ruano(2), Pedro Saavedra Santana(2) y Juan José Cabrera Galván(2) de (1) Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil de Gran Canaria, Las Palmas y (2) Universidad Las Palmas de Gran Canaria

se ha presentado en el XXVIII Congreso Nacional SEAP-IAP / XXIII Congreso Nacional SEC / IV Congreso Nacional SEPAF celebrado en el Palacio de Congresos de Valencia del 24 al 26 de mayo de 2017

Valencia, a 26 de mayo de 2017



Enrique de Álava Casado
Presidente de la SEAP-IAP



Julio Rodríguez Costa
Presidente de la SEC



Joaquín Lucena
Presidente de la SEPAF

Variables citológicas de la PAAF relacionadas con la mutación BRAF V600E en el carcinoma papilar de tiroides

Objetivos.

El carcinoma papilar de tiroides (CPT) en un número determinado de casos se muestra con agresividad infiltrativa, metástasis regionales y repetidas recidivas, incluso después de los tratamientos inhibidores de la TSH, repetidas cirugías y ablación con I131 llegando a ser prácticamente incurable.

La PAAF es la prueba de elección inicial, junto con la ecografía, en el diagnóstico de los nódulos tiroideos. La mutación puntual BRAF V600E es potencialmente oncogénica, empeorando el pronóstico de los pacientes. Pretendemos saber qué aspectos celulares de la PAAF de Tiroides están más relacionados con dicha mutación y su porcentaje, con vistas a una futura valoración predictiva y pronóstica.

Métodos.

Hemos valorado las características citológicas de la PAAF previa en 35 casos de Carcinoma Papilar de Tiroides intervenidos en nuestro Hospital en los últimos diez años, a los que se determinó la mutación puntual BRAF V600E, mediante el sistema de Pyrosecuenciación de Quiagen ®. Se estudiaron 10 parámetros citológicos : hipercelularidad, monocapa, "waxy" citoplásmico o escamoide, núcleo oval, núcleo alargado, "groove" o inclusión nuclear, pseudoinclusión, células gigantes multinucleadas, coloide denso o "buble gum" y cuerpos de psammoma, todos sobre valores positivos o negativos y en una base de datos, tras lo cual se realizó el correspondiente estudio estadístico.

Resultados y Conclusión.

De los 35 casos estudiados las variables diagnósticas citológicas más frecuentes fueron la hipercelularidad (83%), núcleos ovoides (80%), Grooves (80%) y Waxy citoplásmico o escamoide (71%).

La mutación BRAF fue positiva (T/A >10%) en el material de biopsia en 17 casos (48,6%), siendo las variables con más tendencia a relacionarse con la misma: el "waxy" citoplásmico o escamoide, las pseudoinclusiones, las células gigantes, los núcleos alargados y los cuerpos de psamoma. De los grados de Bethesda para la PAAF tiroidea, el V (59%) fue el más relacionado con los casos mutados.

Se concluye que la hipercelularidad en monocapa, los cambios "waxy" citoplásmicos y el patrón cromatínico del núcleo, junto a las pseudoinclusiones, están más relacionados con la mutación BRAF. El grado de Bethesda V relacionado con la mutación revela su coexistencia con el CPT clásico y sólido, mientras que el grado IV lo estaría con la forma folicular del CPT.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Xing M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer . *Lancet* 2013; 381: 1058–69
2. Xing M. Prognostic utility of BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;321(1):86-93. Doi: 10.1016/j.mce.2009.10.012
3. Lubitz CC, Sosa JA. The changing landscape of papillary thyroid cancer: Epidemiology, management, and the implications for patients. *Cancer.* 2016;122(24):3754-9. Doi: 10.1002/cncr.30201
4. Wiltshire JJ, Drake TM, Uttley L, Balasubramanian SP. Systematic Review of Trends in the Incidence Rates of Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2016;26(11):1541-52. Doi: 10.1089/thy.2016.0100

5. Wei X. Risk and Prognostic Factors for BRAFV600E Mutations in Papillary . Hindawi BioMed Research International Volume 2022, Article ID 9959649, 13 pages <https://doi.org/10.1155/2022/9959649>
6. Rosai Ackermann. Surgical Pathology. Vol 1. Pág 300.
7. Cibas E. S. The 2017 Bethesda System for Reporting . THYROID Volume 27, Number 11, 2017 ^a Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/thy.2017.0500
8. Willems JS, Löwhagen T. The role of fine-needle aspiration cytology in the management of thyroid disease. *Clin Endocrinol Metab.* 1981;10(2):267-73. Doi: 10.1016/s0300-595x(81)80020-5
9. Gharib H, Papini E, Garber JR, Duick DS, Harrell RM, Hegedüs L, et al. American association of clinical endocrinologists, american college of endocrinology, and associazione medici endocrinologi medical

guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules – 2016 update. *Endocrine Practice*. 2016; 22(Supplement 1):1-60.

10. Kitahara C. Understanding the ever changing incidence of thyroid cancer. *Natura reviews. Endocrinology*. Volume 16 | November 2020 | 617-618 <https://doi.org/10.1038/s41574-020-00414-9>
11. Pellegriti G. Worldwide Increasing Incidence of Thyroid Cancer: Update on Epidemiology and Risk Factors. *Volume 2013 | Article ID 965212 | <https://doi.org/10.1155/2013/965212>*
12. Shah J. Thyroid carcinoma: epidemiology, histology a diagnosis. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2015 April ; 13(4 Suppl 4): 3–6
13. Bai Y. Updates in the Pathologic Classification of Thyroid Neoplasms: A Review of the World Health

Organization Classification. Endocrinol Metab

2020;35:696-715

<https://doi.org/10.3803/EnM.2020.807> pISSN 2093-

596X · eISSN 2093-5978

14. Romero A. Tumores de la glándula tiroides con cambio de célula clara. Un potencial evento de error diagnóstico. *Patología* 2016 oct; 54(4):188-196.

15. Villalba F. Warthin-like, una variante infrecuente del carcinoma papilar de tiroides. *Cir esp.* 2020;98(10):630–640

<https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2020.01.005>

16. Rossi E. Somatic mutations in solid tumors: a spectrum at the service of diagnostic armamentarium or an indecipherable puzzle? The morphological eyes looking for BRAF and somatic molecular detections on cyto-histological samples.

Oncotarget, 2017, Vol. 8, (No. 2), pp: 3746-3760 doi:
10.18632/oncotarget.12564

17. Douglas P. Clark, William C. Faquin. Thyroid
Cytopathology New York, NY: Springer; 2010.
(Essentials in Cytopathology; vol. 2nd ed). ISBN: 978-
1-4419-5952-2
18. Syed Z. Ali, Edmund S. Cibas. The Bethesda System
for Reporting Thyroid Cytopathology : Definitions,
Criteria, and Explanatory Notes [Internet]. Vol.
Second edition. Cham, Switzerland: Springer; 2018 .
ISBN: 978-3-319-60569-2
19. Prete A. Update on Fundamental Mechanisms of
Thyroid cáncer. *Front. Endocrinol.*, 13 March 2020
Sec. Thyroid Endocrinology Volume 11 -
2020 | <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00102>

20. Fagin JA, Wells SA. Biologic and Clinical Perspectives on Thyroid Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(11):1054-67. DOI 10.1056/NEJMra1501993
21. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159 (3):676-90. DOI 10.1016/j.cell.2014.09.050
22. Zafón C. Vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica. Vol. 56. Núm. 4. páginas 176-186 (Abril 2009) DOI: 10.1016/S1575-0922(09)70982-9
23. Zimmer D. Utilizing Dynamic Risk Stratification in Patients With Tall Cell Variant Papillary Thyroid

Cancer. *Laryngoscope*, 133:2430–2438, 2023
<https://doi.org/10.1002/lary.30725>

24. Finkelstein A, Levy GH, Hui P, Prasad A, Virk R, Chhieng DC, et al. Papillary thyroid carcinomas with and without BRAF V600E mutations are morphologically distinct. *Histopathology*. 2012;60(7):1052-9. Doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04149.
25. Virk RK, Van Dyke AL, Finkelstein A, Prasad A, Gibson J, Hui P, et al. BRAFV600E mutation in papillary thyroid microcarcinoma: a genotype-phenotype correlation. *Mod Pathol*. 2013;26(1):62-70. Doi: 10.1038/modpathol.2012.152
26. Virk RK, Theoharis CGA, Prasad A, Chhieng D, Prasad ML. Morphology predicts BRAF (V⁶⁰⁰E) mutation in papillary thyroid carcinoma: an interobserver

- reproducibility study. *Virchows Arch.* 2014; 464(4):435-42. Doi: 10.1007/s00428-014-1552-3
27. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7 (10):569-80. DOI 10.1038/nrendo.2011.142
28. Landa I, Ibrahimasic T, Boucai L, Sinha R, Knauf JA, Shah RH, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest.*2016;126(3):1052-66. DOI 10.1172/JCI85271
29. Pappa T, Ahmadi S, Marqusee E, Johnson HL, Nehs MA, Cho NL, et al. Oncogenic Mutations in PI3K/AKT/mTOR Pathway Effectors Associate with Worse Prognosis in BRAFV600E -Driven Papillary Thyroid Cancer Patients. *Clin Cancer Res.*

2021;27(15):4256-64. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-21-0874

30. Cheng SP, Hsu YC, Liu CL, Liu TP, Chien MN, Wang TY, et al. Significance of allelic percentage of BRAF c.1799T > A (V600E) mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21 Suppl 4:S619-626. Doi: 10.1245/s10434-014-3723-5
31. Li C, Lee KC, Schneider EB, Zeiger MA. BRAF V600E mutation and Its Association with Clinicopathological Features of Papillary Thyroid Cancer: A Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12):4559-70. Doi: 10.1210/jc.2012-2104
32. Jeong D, Jeong Y, Park JH, Han SW, Kim SY, Kim YJ, et al. BRAF (V600E) mutation analysis in papillary thyroid carcinomas by peptide nucleic acid clamp

real-time PCR. *Ann Surg Oncol.* 2013;20(3):759-66.

Doi: 10.1245/s10434-012-2494-0

33. Rossi ED, Bizzarro T, Martini M, Capodimonti S, Fadda G, Larocca LM, et al. Morphological parameters able to predict BRAF(V600E) -mutated malignancies on thyroid fine-needle aspiration cytology: Our institutional experience. *Cancer Cytopathol.* 2014;122(12):883-91. Doi: 10.1002/cncy.21475
34. Xing M. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Cancer: Pathogenic Role, Molecular Bases, and Clinical Implications. *Endocr Rev.* 2007;28(7):742-62. Doi: 10.1210/er.2007-0007
35. Knauf JA, Fagin JA. Role of MAPK pathway oncoproteins in thyroid cancer pathogenesis and as

drug targets. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(2):296-303.

Doi: 10.1016/j.ceb.2009.01.013

36. Penna GC, Vaisman F, Vaisman M, Sobrinho-Simões M, Soares P. Molecular Markers Involved in Tumorigenesis of Thyroid Carcinoma: Focus on Aggressive Histotypes. *Cytogenet Genome Res.* 2016;150(3-4):194-207. Doi: 10.1159/000456576
37. Bible KC, Kebebew E, Brierley J, Brito JP, Cabanillas ME, Clark TJ, et al. 2021 American Thyroid Association Guidelines for Management of Patients with Anaplastic Thyroid Cancer. *Thyroid.* 2021;31(3):337-86. DOI 10.1089/thy.2020.0944
38. Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, Soria JC, et al. Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant

- Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(1):7-13. DOI 10.1200/JCO.2017.73.6785
39. Wang JR, Zafereo ME, Dadu R, Ferrarotto R, Busaidy NL, Lu C, et al. Complete Surgical Resection Following Neoadjuvant Dabrafenib Plus Trametinib in BRAFV600E-Mutated Anaplastic Thyroid Carcinoma. *Thyroid*. 2019;29(8):1036-43. DOI 10.1089/thy.2019.0133
40. Rossi ED, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Straccia P, Angrisani B, et al. Analysis of immunocytochemical and molecular BRAF expression in thyroid carcinomas: a cytohistologic institutional experience. *Cancer Cytopathol*. 2014;122(7):527-35. Doi: 10.1002/cncy.21416
41. Rossi ED, Bizzarro T, Martini M, Capodimonti S, Cenci T, Fadda G, et al. Morphological features that can

predict BRAFV600E -mutated carcinoma in paediatric thyroid cytology. *Cytopathology*. 2017;28(1):55-64.

Doi: 10.1111/cyt.12350

42. Rossi ED, Bizzarro T, Fadda G, Larocca LM, Schmitt F.

Is morphology alone able to predict BRAF-mutated malignancies on thyroid FNAC? *Virchows Arch*.

2014;465(2):247-8. Doi: 10.1007/s00428-014-1607-5

43. Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J, editors

(2017). WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs (4th edition). IARC: Lyon 2017. ISBN: 978-92-

832-4493-6

44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning:

a laboratory manual. Molecular cloning: a laboratory manual 1989 (Ed. 2). Available at:

<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901>

616061

45. The R Project for Statistical Computing [Internet].
2020. Available at: <https://www.r-project.org/>
46. Guerra A, Sapio MR, Marotta V, Campanile E, Rossi S, Forno I, et al. The Primary Occurrence of BRAFV600E Is a Rare Clonal Event in Papillary Thyroid Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):517-24. Doi: 10.1210/jc.2011-0618
47. de Biase D, Cesari V, Visani M, Casadei GP, Cremonini N, Gandolfi G, et al. High-Sensitivity BRAF Mutation Analysis: BRAF V600E Is Acquired Early During Tumor Development but Is Heterogeneously Distributed in a Subset of Papillary Thyroid Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(8):E1530-8. Doi: 10.1210/jc.2013-4389
48. Bakhos R, Selvaggi SM, DeJong S, Gordon DL, Pitale SU, Herrmann M, et al. Fine-needle aspiration of the

thyroid: rate and causes of cytohistopathologic discordance. *Diagn Cytopathol.* 2000;23(4):233-7. Doi: 10.1002/1097-0339 (200010)23:4<233::aid-dc3>3.0.co;2-I X

49. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 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;26(1):1-133. Doi: 10.1089/thy.2015.0020
50. Chehade JM, Silverberg AB, Kim J, Case C, Mooradian AD. Role of repeated fine-needle aspiration of thyroid nodules with benign cytologic features.

*Endocr Pract.*2001;7(4):237-43. Doi:

10.4158/EP.7.4.237

51. Hall A, Meyle KD, Lange MK, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, et al. Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene. *Oncotarget.* 2013;4(4):584-99. Doi: 10.18632/oncotarget.965
52. Melo M, da Rocha AG, Vinagre J, Batista R, Peixoto J, Tavares C, et al. TERT promoter mutations are a major indicator of poor outcome in differentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(5):E754-765.

