



Universitat de Lleida

## Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo

Esmeralda Castelblanco Echavarría

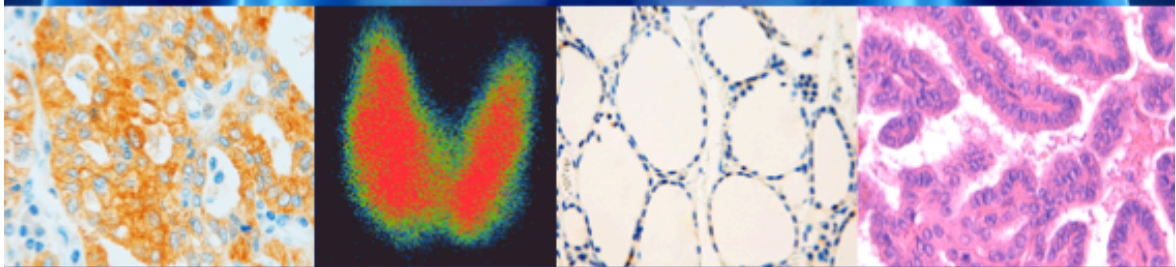
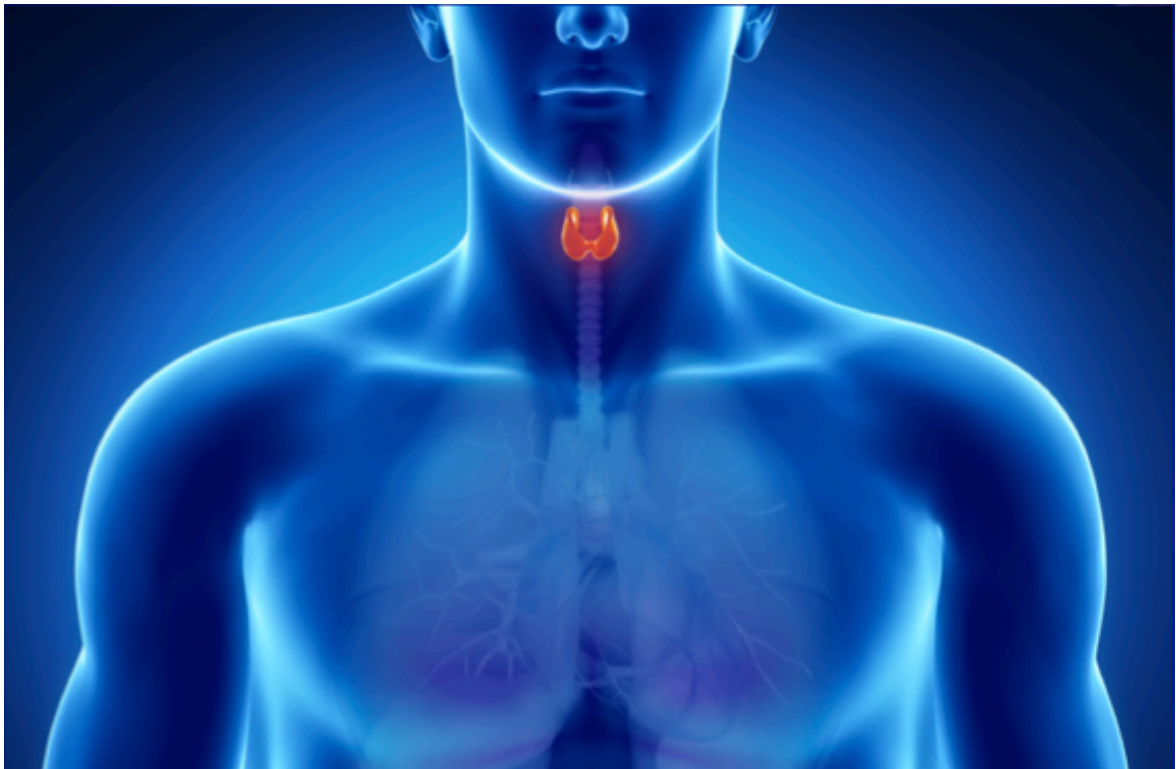
Dipòsit Legal: L.1239-2014

<http://hdl.handle.net/10803/277264>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



# Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo

Esmeralda Castelblanco Echavarría

Lleida, 2014



**Universitat de Lleida**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MARCADORES MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO  
EN CARCINOMAS DEL EPITELIO FOLICULAR TIROIDEO

TESIS DOCTORAL

ESMERALDA CASTELBLANCO ECHAVARRIA

Lleida, 2014



INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE LLEIDA

Grupo de Investigación Básica y Clínica de Inmunología y Endocrinología

Directores

Dr. Dídac Mauricio Puente

Dra. Mercedes Robledo Batanero

Tutor académico

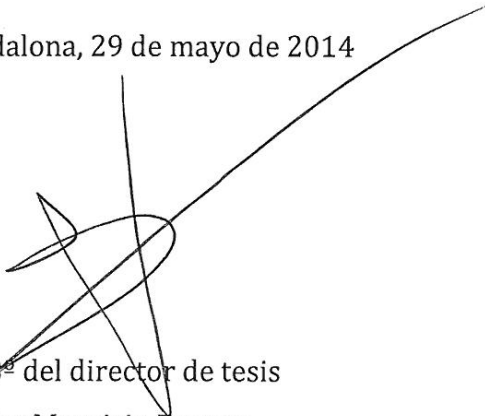
Xavier Matias-Guiu Guia

Dídac Mauricio Puente, jefe del servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Germans Trias i Pujol.

CERTIFICA: que Dña Mélida Esmeralda Castelblanco Echavarría ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: *Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo.*

Revisado el presente trabajo considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Badalona, 29 de mayo de 2014

  
VºBº del director de tesis  
Dídac Mauricio Puente

La Dra. Mercedes Robledo Batanero, jefa del grupo de Cáncer Endocrino Hereditario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

CERTIFICA: que Dña Mélida Esmeralda Castelblanco Echavarría ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: *Marcadores Moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo.*

Revisado el presente trabajo considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, Mayo de 2014

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a vertical stroke and a horizontal line extending to the right.

VºBº de la Codirectora de tesis

Mercedes Robledo Batanero

El Dr. Xavier Matias-Guiu, director científico del Instituto de Investigación Biomédica de Lleida y catedrático de Anatomía Patológica en la Universidad de Lleida.

CERTIFICA: que Esmeralda Castelblanco Echavarría ha realizado bajo su tutoría la Tesis Doctoral que lleva por título: *Marcadores Moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo.*

Revisado el presente trabajo considera que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, 3 de Junio de 2014



VºBº del tutor de la tesis  
Xavier Matias-Guiu

MARCADORES MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO  
EN CARCINOMAS DEL EPITELIO FOLICULAR TIROIDEO



*No hay porque tener miedo, pues somos inmortales.*

*Somos sólo almas.*

*Brian Weiss*

## Financiación del doctorando

1. Beca del programa d'ajuts destinats a universitats, centres de recerca i fundacions hospitalàries per a la contractació de personal investigador novell (2012FI\_B2 00125)
2. Beca pre-doctoral per la formació i col·laboració de Llicenciats per a projectes de recerca en medicina de la Fundación Alicia Cuello de Merigó.

*A mi familia*

*En memoria de mi abuelo, mi tío Manuel y mis amigas Diana y Marcela*

## AGRADECIMIENTOS

Virginie, gracias por creer en mi y meterme el gusanillo del doctorado!, ha sido una experiencia magnífica y he conocido gente maravillosa.

Gracias a todas las personas que forman parte del servicio de patología y genética molecular. En algún momento de estos años, cada una de ellas me ha enseñado, ayudado, colaborado o apoyado. Especialmente quiero agradecer al Dr. Matias-Guiu, y a la Dra. Gallel, por su valioso apoyo y sus enseñanzas en anatomía patológica e investigación. A Judith, Lidia, Ana, Dolors, Pilar y Javier por los cortes, las explicaciones, las extracciones y demás, muchas gracias!

A mis directores de tesis, Dr. Mauricio y Dra. Robledo, así como al Dr. Maravall, por darme la oportunidad de trabajar en un campo tan interesante como el cáncer de tiroides.

Un "Gracias" muy especial para Adriana, Jordi, y Vicki por las sugerencias y correcciones del documento.

Al servicio de endocrinología y nutrición, especialmente a Lola, Javier y Vero por su ayuda con la revisión de las historias clínicas.

A todos mis amigos y compañeros del instituto, especialmente a Anaïs, Manu, Alicia, Nuria y a las chicas de nefrología, patología e inmunología porque de estos años tengo momentos fantásticos para recordar.

A la unidad de estadística por su ayuda. Montse, gracias por enseñarme a conocer los límites de mi paciencia.

A los pacientes que han dado su consentimiento para utilizar sus muestras en los proyectos de investigación. Y a los endocrinólogos y patólogos de los hospitales que participaron en este estudio.

A mis amigos Alex, Talía, Wilson, Juliana, Nando, Claudia y Juan por estar siempre. Y a David, por no quedarse.

Y a las personas más importantes en mi vida, mi familia, que me mandan su buena energía desde el otro lado del océano!

## ÍNDICE

Resúmenes .....	3
Abreviaturas .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1. La glándula tiroides .....	13
2. Cáncer de tiroides. Aspectos generales .....	15
2.1 Carcinoma papilar de tiroides .....	17
2.2 Carcinoma folicular de tiroides .....	21
2.3 Carcinoma anaplásico .....	22
2.4 Carcinoma pobremente diferenciado .....	23
3. Diagnóstico .....	23
4. Tratamiento .....	25
5. Factores clínicos de pronóstico .....	28
6. Sistemas de estadiaje del cáncer de tiroides .....	30
7. Cáncer de tiroides asociado a síndromes hereditarios .....	32
8. Alteraciones genéticas comunes en el cáncer de tiroides .....	34
9. Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico .....	43
10. Punto de partida de este estudio .....	51
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	55
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	57
1. Pacientes y datos clínicos .....	59
2. Diseño y construcción de las matrices de tejido .....	64
3. Expresión de las proteínas codificadas por los genes de la firma molecular mediante inmunohistoquímica .....	66
4. Identificación de las alteraciones genéticas asociadas a las diferentes patologías.....	69
5. Secuenciación de los miRNAs con RNA-seq .....	74
6. Análisis estadístico .....	75
<b>RESULTADOS</b> .....	81
<b>SECCIÓN 1</b>	
1. Caracterización de la serie general .....	83

## SECCIÓN 2

1. Inmunohistoquímica de las proteínas de la firma molecular .....	90
2. Identificación de proteínas con valor diagnóstico y pronóstico .....	90
3. Árboles de clasificación para pronóstico .....	95
4. Árboles de clasificación para diagnóstico .....	98
5. Sistemas de puntuación de los árboles de clasificación .....	100

## SECCIÓN 3

1. Perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre subtipos histológicos y TN ....	114
2. Perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre grupos de diagnóstico .....	117
3. Perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre PTC $BRAF^{V600E}$ y $BRAF^{WT}$ y grupos de pronóstico .....	119

## DISCUSION .....

1. Características de la serie general .....	124
2. Proteínas diferencialmente expresadas para diagnóstico y predicción del pronóstico.....	125
3. Firmas de expresión de proteínas para mejorar el diagnóstico de los carcinomas del epitelio folicular tiroideo .....	129
4. Firmas de expresión de proteínas para predecir el pronóstico de los carcinomas del epitelio folicular tiroideo .....	131
5. Identificación de grupos de miRNAs diferencialmente expresados .....	132
6. Identificación de grupos de miRNAs específicos de cada tipo histológico .....	134
7. Perfil diferencial de miRNAs entre carcinomas y adenomas foliculares .....	137
8. Perfil diferencial de miRNAs para PTC con o sin mutación $BRAF^{V600E}$ .....	138
9. miRNAs asociados a papilares con buen y mal pronóstico .....	139

## CONCLUSIONES .....

## BIBLIOGRAFIA .....

## ANEXOS .....

## Resumen

### Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico en carcinomas del epitelio folicular tiroideo

**Introducción:** Los cánceres del epitelio folicular tiroideo constituyen la neoplasia endocrina más común. Sin embargo, sus alteraciones genéticas y epigenéticas más conocidas carecen aún de capacidad pronóstica. Además, el tratamiento del cáncer de tiroides no ha cambiado en las últimas décadas ya que no existen opciones terapéuticas para pacientes con una pobre respuesta al tratamiento o con neoplasias agresivas. El objetivo del estudio fue identificar posibles marcadores tumorales tanto para el diagnóstico como para la predicción del pronóstico en el cáncer de tiroides.

**Diseño:** Se realizó una validación inmunohistoquímica de perfiles proteínicos diferenciales de genes de una firma molecular identificada previamente por el grupo en una serie de 313 tumores. Además, se examinó el perfil de expresión diferencial de miRNAs usando RNA-seq en una serie de 59 tumores de tiroides congelados.

**Resultados:** Se identificaron modelos de expresión proteínica que mejoran el diagnóstico diferencial entre tumores malignos (carcinomas foliculares) y benignos (hiperplasias y adenomas), así como entre tumores de buen y mal pronóstico para los subtipos del carcinoma bien diferenciado de tiroides. Además, se obtuvieron perfiles de expresión diferencial de miRNAs que caracterizan subtipos histológicos, y perfiles diferencialmente expresados entre los subgrupos con mayor dificultad para el diagnóstico. También, dentro del subtipo de carcinomas papilares, se identificaron tanto perfiles de pronóstico como perfiles asociados a la presencia de la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>. **Conclusiones:** Los modelos de expresión proteínica permitirían disminuir el número cirugías, y los modelos de predicción obtenidos permitirían identificar, en el momento del diagnóstico, a aquellos casos de peor pronóstico. Los perfiles de miRNAs obtenidos permitirían discriminar no sólo el cáncer de tiroides del tejido tiroideo normal, sino también casos con mal pronóstico que se beneficiarían de una terapia personalizada.

## Abstract

### Molecular markers of diagnosis and prognosis in follicular epithelia of thyroid carcinomas

**Introduction:** Carcinomas of the thyroid follicular epithelia are the most common endocrine neoplasia. However, at present, the genetic and epigenetic alterations in these thyroid tumors lack of any prognostic value. In addition, thyroid cancer treatment has not changed in decades despite the lack of therapeutic options for patients with a poor response to therapy, or for those with aggressive tumors. The aim of the study was to identify protein and miRNA profiles of value for the diagnosis and/or prediction of prognosis of thyroid cancer. **Design:** To obtain protein and miRNA an immunohistochemical analysis identified protein profiles of genes previously identified by the group in a series of 313 thyroid tumors that are differentially expressed in the various tumor subtypes. Also, RNA-seq identified expression profiles of miRNAs from a series of 59 thyroid frozen tumors. **Results:** Distinct protein expression patterns were identified that improve both the differential diagnosis between malignant (follicular carcinomas) and benign (hyperplasia and adenomas) tumors, as well as among malignant thyroid tumors. Also, specific protein profiles discriminate patients with good and poor prognosis among well-differentiated thyroid carcinoma. In addition, differential miRNAs expression profiles were identified among histologic subtypes, and also among those tumors of difficult diagnosis. Importantly, among papillary carcinomas, certain miRNA profiles were associated with prognosis and also with the presence of the *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation. **Conclusions:** Protein expression patterns allow reducing the number of surgeries, the prediction models obtained allow the identification of cases of poor prognosis at the time of diagnosis. The distinct miRNAs profiling allows to better discriminate not only thyroid cancer from normal thyroid tissue, but also those cases with poor prognosis who would benefit from a personalized therapy.



## Resum

### Marcadors moleculars de diagnòstic i prognòstic a carcinomes l'epiteli fol·licular tiroïdal

**Introducció:** Els càncers de l'epiteli fol·licular tiroïdal són la neoplàsia endocrina més comú. No obstant, les alteracions genètiques i epigenètiques conegudes no tenen valor pronòstic. A més, el tractament del càncer de tiroide no ha canviat en les últimes dècades ja que no hi ha encara opcions terapèutiques per a pacients amb una pobra resposta al tractament o amb neoplàsies agressives. L'objectiu de l'estudi va ser identificar possibles marcadors tant per al diagnòstic com per a la predicció del pronòstic en el càncer de tiroide. **Disseny:** Es va realitzar una validació immunohistoquímica de perfils proteics diferencials de gens d'una firma molecular identificada prèviament pel grup en una sèrie de 313 tumors. A més, es va examinar el perfil d'expressió diferencial de miRNA utilitzant RNA-seq en una sèrie de 59 tumors de tiroïdes congelats. **Resultats:** Es van identificar models d'expressió proteica que milloren el diagnòstic diferencial entre tumors malignes, (carcinomes fol·liculars) i benignes (hiperplàsies i adenomes), així com entre tumors de bon i mal pronòstic per als subtipus de carcinoma ben diferenciat de tiroide. A més, es van obtenir perfils d'expressió diferencial de miRNA que caracteritzen subtipus histològics, perfils diferencialment expressats entre els subgrups amb major dificultat per al diagnòstic, i dins del subgrup de carcinomes papil·lars, perfils de pronòstic i perfils associats a la presència de la mutació *BRAF*<sup>V600E</sup>. **Conclusions:** Els models d'expressió proteica permetrien disminuir el nombre de cirurgies, els models de predicció obtinguts permetrien identificar aquells casos de pitjor pronòstic en el moment del diagnòstic. Els perfils de miRNA obtinguts permetrien discriminar no només el càncer de tiroide del teixit tiroïdal normal, sinó també casos amb mal pronòstic que es beneficiarien d'una teràpia personalitzada.

**ABREVIATURAS**

ATC	Carcinoma anaplásico o indiferenciado de tiroides
BRAF	v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CT	Cáncer de tiroides
FA	Adenoma folicular de tiroides
FTC	Carcinoma folicular de tiroides
FVPTC	Variante folicular de carcinoma papilar de tiroides
IHQ	Inmunohistoquímica
OVFTC	Variante oncocítica del carcinoma folicular de tiroides
PAAF	Punción-aspiración con aguja fina
PDTC	Carcinoma pobremente diferenciado de tiroides
PTC	Carcinoma papilar de tiroides
PTCnoFV	Carcinoma papilar de variante no folicular
SDPTC	Variante esclerosante difusa de carcinoma papilar de tiroides
TCPTC	Variante de células altas de carcinoma papilar de tiroides
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
WDTC	Carcinoma bien diferenciado de tiroides

# 1. Introducción

En la actualidad, el cáncer diferenciado de tiroides es el sexto cáncer más frecuente en mujeres, y constituye el 90% de los tumores de origen endocrino. La punción-aspiración con aguja fina (PAAF) es el test más utilizado para el diagnóstico prequirúrgico. Sin embargo, debido a que no se alcanza un diagnóstico preciso en un 30% de los casos, entonces clasificados como indeterminados, se realizan procedimientos quirúrgicos de diagnóstico (hemitiroidectomía), con riesgos para los pacientes y con alto coste para el sistema de salud. El tratamiento de este tipo de cáncer se basa principalmente en la cirugía (tiroidectomía), seguido de la ablación con  $I^{131}$ , y de la terapia hormonal sustitutiva-supresiva con tiroxina de por vida. Aproximadamente, el 25% de los pacientes sufre de persistencia o recidiva de la enfermedad y, por el momento, no existen tratamientos alternativos claramente establecidos para los casos que tienen un comportamiento agresivo. Todo ello hace imprescindible continuar investigando para mejorar la precisión en el diagnóstico y en predecir el pronóstico de la enfermedad, lo que permitiría brindar a los pacientes un tratamiento personalizado, mejorando así también su calidad de vida. Con el presente estudio pretendimos establecer una herramienta de fácil utilización para incrementar tanto la precisión en el diagnóstico como el intentar predecir un pronóstico de la evolución de la enfermedad.

## 1. La glándula tiroides

La glándula tiroides es un órgano endocrino situado en la parte frontal del cuello a la altura de las vértebras C5 y T1. Se encuentra por debajo del cartílago cricoides, y descansa sobre la tráquea, a la que abraza hasta alcanzar posteriormente al esófago. Su peso en el adulto oscila entre 15 y 30 gramos y varía con la ingesta de yodo, la edad, el sexo, la funcionalidad de la glándula o el estatus hormonal del individuo. La tiroides es, en general, de mayor peso y tamaño en las mujeres, aumentando tanto en el embarazo como durante el ciclo menstrual (1,2).

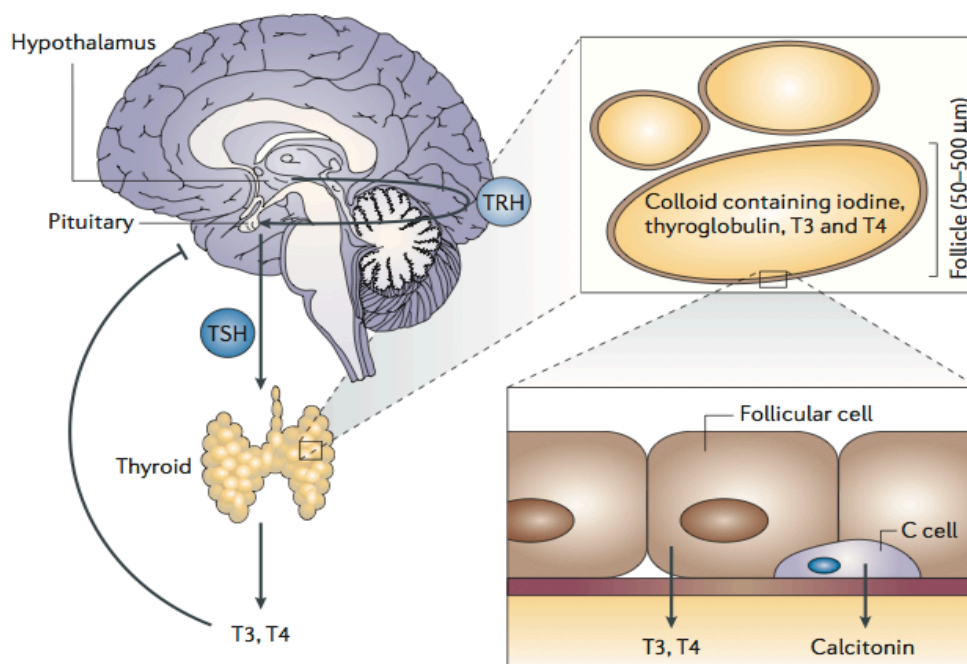
Está formada por dos lóbulos unidos por un istmo que le dan forma de mariposa.

Tiene una cápsula fibrosa que la cubre totalmente, y también septos que le dan al parénquima un aspecto lobular. La unidad básica de la glándula es el folículo, que mide en promedio 200  $\mu\text{m}$  y está constituido por dos tipos celulares: a) las células foliculares que constituyen el 98% de la tiroides, son células epiteliales de origen endodérmico y se caracterizan por estar polarizadas, y por tener núcleos redondos con cromatina difusa, y b) las células C, son células epiteliales originadas a partir de la cresta neural (ectodermo), carecen de polaridad y constituyen el 0.1% de la masa de una glándula adulta normal (1,2).

La glándula tiroides produce las hormonas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) en las células foliculares y calcitonina en las células C. La síntesis de T3 y T4 está regulada enzimáticamente y requiere de un oligoelemento esencial, el yodo. Los niveles de yodo dependen fundamentalmente de la dieta, y pueden variar ampliamente con la localización geográfica, suplementos dietéticos, aditivos alimentarios y su metabolismo está modificado por fármacos. El yodo se almacena en el coloide donde se une con fragmentos de tiroglobulina para formar T3 o T4, cuya liberación está modulada por la propia concentración de T4 en sangre. Disminuciones en la T4 inducen la liberación de TSH, que promueve la secreción de T3 y T4 a la circulación (Figura 1.1). La T4 constituye el 93% de las hormonas metabólicamente activas de la tiroides, y se convierte en T3 (7%) en los tejidos periféricos (1).

La TSH regula todos los procesos que controlan la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas, así como el número de células y la vascularización de la glándula. Las concentraciones de TSH están reguladas directamente por los niveles de hormonas tiroideas libre en sangre periférica mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, y de manera directa por la TRH sobre la hipófisis.

Las hormonas tiroideas tienen efectos sobre casi todos los tejidos del organismo. Son esenciales en los períodos de crecimiento, la organogénesis del sistema nervioso central, influyen sobre el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, además de ser necesarias para la síntesis de muchas proteínas. La calcitonina sintetizada por las células C es muy importante en la homeóstasis del calcio.



**Figura 1.1** La glándula tiroides. La función principal de la glándula tiroides es sintetizar, almacenar y secretar las hormonas tiroideas (T3 y T4), bajo el control del eje hipotálamo-hipófisis gracias al *feedback* negativo desencadenado por las mismas hormonas tiroideas (2).

## 2. Cáncer de tiroides. Aspectos generales

El cáncer de tiroides es la neoplasia de origen endocrino más frecuente. Representa el 90% de las enfermedades endocrinas y el 1% de todos los cánceres. Su incidencia anual estimada es de 162.000 nuevos casos en todo el mundo, con una mortalidad estimada de 23.000 pacientes (3), siendo su aparición tres veces más frecuente en mujeres que en hombres, donde es el sexto cáncer más común (4,5).

Su frecuencia de aparición es dos veces superior en sujetos caucásicos que en individuos de raza negra, y también existe una incidencia notablemente elevada en el sureste asiático (4).

El diagnóstico de cáncer de tiroides crece en los Estados Unidos con una frecuencia anual del 6.6% en mujeres y del 5.5% en hombres, superior a la de cualquier otro tipo de cáncer (6). El total esperado para el año 2012 era de 56.460 nuevos casos, de los

que el 75% serían diagnosticados en mujeres (7). Esta tendencia también ha sido observada en otros países de Europa, Asia, Oceanía y América del Sur (8). El seguimiento de los nódulos tiroideos y las herramientas de diagnóstico más sensibles, han mejorado la detección temprana de estos tumores (9). Sin embargo, se desconocen los factores determinantes del aumento de esta enfermedad.

A partir del accidente de la central nuclear de Chernobyl en 1986, quedó claro que la exposición a la radioactividad se asocia con un alto riesgo de desarrollar CT (10,11). Sin embargo, en general, la mayoría de los cánceres de tiroides son esporádicos, y su aparición se asocia a síndromes hereditarios en un 5 a un 15% de los casos (12).

El cáncer de tiroides engloba una gran variedad de lesiones con marcadas diferencias histológicas y clínicas. El 95% de los casos se originan en las células foliculares e incluyen: adenoma folicular (FA), carcinoma bien diferenciado (WDTC), conformado por el carcinoma papilar (PTC) y el carcinoma folicular (FTC), el carcinoma pobremente diferenciado (PDTC) y el carcinoma anaplásico o indiferenciado (ATC) (13). Del 5% restante, un 2-3% corresponde al carcinoma medular de tiroides (MTC) derivado de las células C y un 2% incluye sarcomas, linfoma, teratomas de tiroides y otros tipos mucho menos frecuentes (14).

El aumento de la incidencia de cáncer de tiroides en todo el mundo se debe fundamentalmente al incremento en el número de casos de PTC, la forma más frecuente del WDTC. El pronóstico general de los pacientes con WDTC es bueno, con una tasa alta de supervivencia, de 85% a 10 años (15). Sin embargo, aunque los WDTC están asociados a una baja mortalidad, la recidiva puede alcanzar valores de hasta un 20-30%, o mucho mayores, en algunos subgrupos de pacientes (16,17), en los que la supervivencia a los 10 años disminuye del 85 al 40%.

La supervivencia de los pacientes con WDTC que presentan metástasis varía ampliamente, con otros factores de mal pronóstico que incluyen la edad avanzada, características histológicas agresivas del tumor primario, metástasis extra-pulmonares o

múltiples, y también metástasis sin captación de  $I^{131}$  (18,19). De hecho, en los pacientes con metástasis cuyos tumores han perdido la capacidad de captar yodo, la supervivencia es tan solo del 10% a 10 años (18).

Durante años se han venido desarrollando diversos sistemas de estadiaje. En los últimos 5-10 años la comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo y progresión del cáncer de tiroides ha presentado un avance considerable. Este conocimiento proporciona una oportunidad sin precedentes para la identificación de nuevos marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico, así como de nuevas dianas terapéuticas (20,21), para desarrollar estrategias más efectivas para el manejo de estos pacientes. Aún así, el principal objetivo de los estudios más recientes continúa siendo el de mejorar tanto la precisión del estudio citológico mediante PAAF (hasta hoy, la mejor herramienta de diagnóstico) como la capacidad de predecir el pronóstico de la enfermedad.

## 2.1 Carcinoma papilar de tiroides

El carcinoma papilar de tiroides es la forma más frecuente de cáncer de tiroides; representa aproximadamente el 80% de todas las neoplasias de tiroides y su creciente incidencia puede reflejar, en parte, un aumento en el diagnóstico precoz. Los PTC son tumores de crecimiento lento y aunque en general curables, presentan un 30-65% de metástasis en los ganglios linfáticos regionales al diagnóstico, y lamentablemente, cerca del 15% de estos casos tienen un comportamiento más agresivo caracterizado por: invasión local, resistencia al tratamiento e incremento de la mortalidad (22). Aproximadamente el 25% de los casos presentan recidiva o persistencia de la enfermedad, asociada al incremento de la mortalidad. (23). Entre el 1-20% de los pacientes pueden tener metástasis a distancia en el momento del diagnóstico (24).

Las dos últimas décadas han estado marcadas por un significativo aumento en el conocimiento de las bases moleculares del PTC. Actualmente, es evidente que este tipo



de tumor está caracterizado por alteraciones genéticas dirigidas a la activación de la vía de señalización de las MAPK. De hecho, los reordenamientos cromosómicos que involucran *RET* o *TRK*, o la activación de las mutaciones puntuales de los genes *BRAF* o *RAS* son mutuamente excluyentes y están presentes en el 70% de los PTC.

De hecho, el PTC engloba muchas variantes con características histopatológicas que permiten su identificación. De especial interés por su frecuencia y características son la variante convencional o clásica (cPTC), la variante folicular (FVPTC), la esclerosante difusa (SDPTC) y la variante de células altas (TCPTC).

### **2.1.1 Variante convencional**

La variante convencional del carcinoma papilar es un tumor de crecimiento lento, bien diferenciado y frecuentemente no encapsulado. Su principal característica son los núcleos de aspecto vacío y la presencia de papilas (Figura 1.2 a). En los núcleos son comunes los contornos irregulares, las hendiduras y las pseudoinclusiones. Otras características son la formación de cuerpos de psamoma, el coloide denso, la esclerosis estromal, la presencia de células gigantes multinucleadas y los amontonamientos de células (23).

### **2.1.2 Variante folicular**

Los tumores están compuestos de folículos pequeños y medianos de forma irregular sin estructuras papilares (Figura 1.2 b). Pueden verse en esta variante células gigantes multinucleadas e intrafoliculares, sin embargo, la esclerosis estromal y los cuerpos de psamoma se observan ocasionalmente. Aproximadamente un tercio de los tumores está encapsulado. Es frecuente la afectación ganglionar y puede presentar diseminación hematógica; sin embargo, el pronóstico de estos tumores es similar al del PTC convencional. (23).

### **2.1.3 Variante esclerosante difusa**

Este tumor suele presentarse en individuos jóvenes, y se caracteriza por la implicación de uno o ambos lóbulos. En muchos tumores, se ven pequeñas estructuras papilares

entre espacios linfovascuales dilatados. Se caracterizan por una extensa metaplasia escamosa, numerosos cuerpos de psamoma, una densa infiltración linfocitaria y fibrosis estromal (Figura 1.2 c). Es frecuente que los pacientes tengan metástasis en pulmón en el momento del diagnóstico (~25%). Además, puede haber metástasis en los ganglios regionales (23).

#### 2.1.4 Variante de células altas

Esta rara variante está compuesta predominantemente por células que son tres veces más altas que anchas. Su arquitectura es una combinación de patrones papilar, trabecular y en cordones de células presentes en muchos tumores, mientras que las estructuras foliculares son infrecuentes. Tienen un citoplasma eosinofílico abundante y un núcleo similar al de la variante convencional, aunque las hendiduras y las pseudo-inclusiones tienden a ser más abundantes (Figura 1.2 d). En este tumor es habitual encontrar necrosis, mitosis y extensión extratiroidea. Suele presentarse en sujetos mayores, con frecuencia hombres y tiende a mostrar un comportamiento clínico más agresivo que la variante convencional (23).

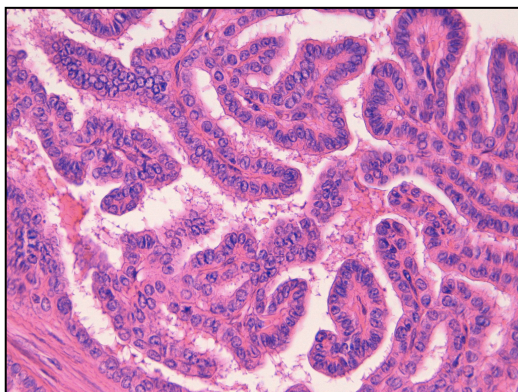
#### 2.1.5 Otras variantes del carcinoma papilar de tiroides

Existen otras variantes del carcinoma papilar que son menos comunes. Entre ellas están:

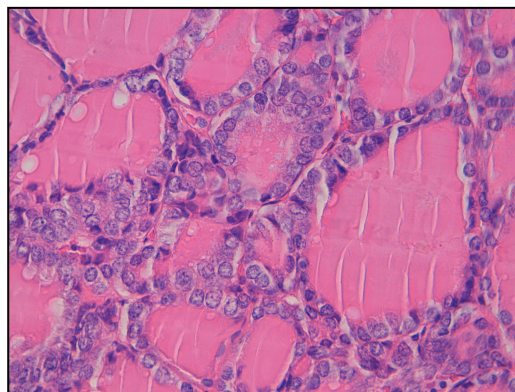
**a. Variante macrofolicular**, compuesta predominante o exclusivamente de macrofoliculos (>50%), algunos de los cuales están formados por células características del carcinoma papilar. Esta variante se caracteriza por tener una baja incidencia de metástasis ganglionar (25).

**b. Variante oncocítica**, de un color pardo-marrón característico, patrón de crecimiento papilar o folicular. Las células tienen abundante citoplasma eosinófilo, granular y mantienen las características nucleares del carcinoma papilar. En la gran mayoría de los casos presentan extensión extra tiroidea y metástasis en ganglios regionales (25).

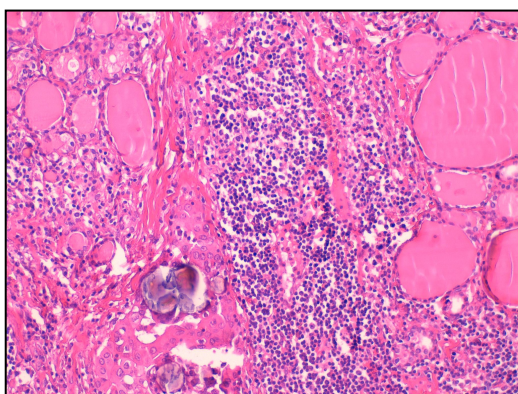
c. **Variante de células claras**, muy rara, compuesta generalmente por células con el citoplasma claro, y en los que ocasionalmente se pueden ver células oncocíticas mezcladas con las células claras (25).



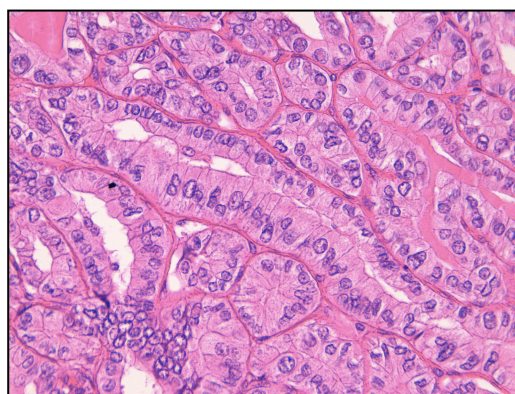
a. Variante convencional



b. Variante folicular



c. Variante esclerosante difusa



d. Variante de células altas

**Figura 1.2** Imágenes histológicas (hematoxilina-eosina) de las principales variantes del carcinoma papilar de tiroides.

d. **Variante de células columnares**, es rara, compuesta por células columnares pseudoestratificadas, algunas de las cuales pueden contener vacuolas citoplasmáticas supra y sub-nucleares. En algunos tumores se observan focalmente núcleos con las características de los papilares. Con frecuencia los tumores tienen un crecimiento local avanzado y extensión extratiroidea mostrando un comportamiento clínico más agresivo que el PTC convencional (25).

**e. Variante sólida**, en la que predominan láminas sólidas de células tumorales con características nucleares típicas de PTC. La invasión vascular y la extensión extratiroidea se presentan en cerca de un tercio de los casos (25).

**f. Variante cribiforme**, se caracteriza por la formación de puentes epiteliales rígidos que dan lugar a espacios redondeados en forma de criba. Los núcleos tienen muescas y pueden ser claros o hiper cromáticos (25).

## 2.2 Carcinoma folicular de tiroides

El carcinoma folicular de tiroides es el segundo cáncer de tiroides por su frecuencia, y representa aproximadamente el 15% de todas las enfermedades de la tiroides. Es más frecuente en mujeres y rara vez ocurre en niños. La deficiencia de yodo (26) y la irradiación han sido implicados en el desarrollo del FTC. En general, son unifocales y afectan a ganglios linfáticos con una frecuencia <5%. Por el contrario, las metástasis a distancia, principalmente en pulmón y hueso, se presentan comparativamente más frecuentemente (~20%) (23).

En algunos estudios se sugiere que los FTC se podrían originar de una lesión benigna precursora, el adenoma folicular (FA) (Figura 1.3) (27). Ambas entidades comparten las mismas características citológicas, pero son los criterios de malignidad, como la invasión capsular, la infiltración del parénquima tiroideo y la invasión vascular, los que permiten un diagnóstico diferencial. Desafortunadamente, la valoración de las capacidades invasivas pueden ser realizadas solamente a partir de preparaciones histológicas, haciendo imposible un diagnóstico preoperatorio de estas lesiones con las técnicas existentes (PAAF) (28).

Los FTC están divididos de acuerdo al grado de invasión en dos categorías: los carcinomas foliculares mínimamente invasivos, que tienen una invasión capsular y/o vascular limitada, y los carcinomas foliculares ampliamente invasivos, que tienen una

infiltración generalizada del tejido tiroideo adyacente y/o vasos (23). Al igual que ocurre en los PTC, los FTC se subdividen en variantes, atendiendo a características de crecimiento o histológicas.

### **2.2.1 Variante convencional**

El carcinoma folicular de tiroides es una neoplasia invasiva de células foliculares que no tienen las características nucleares de los papilares. Estos carcinomas tienen una morfología variable que va desde los folículos bien formados que contienen coloide a patrones de crecimiento sólido o trabecular. También se pueden ver folículos mal formados o con patrones de crecimiento atípico. Además es común ver en un tumor la coexistencia de varios patrones de crecimiento (23).

### **2.2.2 Variante oncocítica**

El carcinoma folicular oncocítico es una neoplasia maligna con origen en las células foliculares compuesta exclusiva o predominantemente de células oncocíticas (>75%), y representa 3-4% de las enfermedades tiroideas (29). Esta variante está caracterizada por una acumulación aberrante de mitocondrias. El OVFTC tiene diferentes tipos de arquitectura que van desde folículos bien formados a patrones de crecimiento sólido y/o trabecular. Los núcleos tienden a ser hipercromáticos, pleomórficos y generalmente tienen un nucléolo eosinófilo prominente. Los carcinomas tienden a ser más grandes que los adenomas de tipo oncocítico y suelen presentarse en pacientes mayores. Esta variante está asociada a metástasis ganglionares en aproximadamente el 30% de los casos, pero ocasionalmente los pacientes pueden presentar metástasis a distancia que afectan principalmente pulmón y hueso.

## **2.3 Carcinoma anaplásico o carcinoma indiferenciado de tiroides**

Los ATC representan aproximadamente el 5% de todos los tumores tiroideos. Son tumores extremadamente agresivos, compuestos de células indiferenciadas que retienen marcadores de linaje epitelial. Son muy difíciles de tratar, tienen una tasa de

mortalidad superior al 90% y una media de supervivencia de 6 meses después del diagnóstico. Presentan metástasis en el 75% de los casos, principalmente en pulmón (80%), seguido por el hueso (6-15%) y el cerebro (5-13%). Son generalmente grandes, marcadamente invasivos (40%) y consisten en una mezcla de células fusiformes, epitelioides y pleomórficas gigantes. Están masivamente infiltrados por macrófagos, lo que contribuye a su apariencia heterogénea (23,30,31).

## 2.4 Carcinoma pobremente diferenciado

El PDTC tiene un grado de gravedad intermedio entre los carcinomas diferenciados y los anaplásicos (2), y están caracterizados por un patrón de crecimiento infiltrativo, necrosis, un alto índice mitótico e invasión (23). También son habituales las metástasis en ganglios linfáticos, pulmón y hueso, aunque menos frecuentes que en el ATC (31).

## 3. Diagnóstico

Aunque el cáncer de tiroides es relativamente poco frecuente, los nódulos de tiroides son muy prevalentes. Éstos se presentan en el 5-7% de la población adulta en USA, lo que representa 10 – 18 millones de personas (32). Debido a que la gran mayoría de los nódulos tiroideos son benignos y que muchos casos de cáncer tiroideo son curables con cirugía si se detectan precozmente, un importante desafío es el de identificar aquellos nódulos que son malignos (5-10%) (33).

Ante un nódulo tiroideo, la realización de una historia clínica completa y una minuciosa exploración física del cuello son herramientas fundamentales para una detección temprana de las neoplasias tiroideas. En los casos con uno o más nódulos palpables, así como en aquellos pacientes que presentan antecedentes familiares o antecedentes de irradiación cervical, se debe realizar una exploración ecográfica de tiroides (34).

La ecografía es una técnica que permite la caracterización y valoración del riesgo de malignidad de los nódulos tiroideos, basándose en criterios como la vascularización intranodal, la irregularidad del margen y la presencia de microcalcificaciones (14,33,35). Así, para los casos que miden más de 1 cm, o aquellos valorados como de riesgo de malignidad por ecografía, además de los que tienen factores de riesgo clínico, que sean benignos con crecimiento durante el seguimiento, está indicada la PAAF.

La PAAF es actualmente la mejor prueba diagnóstica preoperatoria para diferenciar entre tumores de tiroides benignos y malignos (21,36). Esta prueba consiste en la extracción de pequeños fragmentos de tejido que son tratados como material citológico, y analizados por el patólogo utilizando el microscopio óptico (37). En general, la precisión de la PAAF es de >95% para PTC, MTC y ATC. El 68% de los cánceres de tiroides se detectan precozmente (7). Sin embargo, la PAAF tiene limitaciones y entre el 10-40% de los casos, el diagnóstico citológico es insuficiente o indeterminado para malignidad. Además, la PAAF no es capaz de distinguir entre FA y FTC, o entre un FA y un carcinoma de células oncocíticas, y los FVPTC son con frecuencia difíciles de diagnosticar (21,38).

Desde 2008, la categoría general de PAAF indeterminada ha sido dividida en tres subcategorías: lesión folicular de significado indeterminado (*FLUS Follicular Lesion of Undeterminate Significance*), neoplasia folicular u oncocítica, y sospechoso de malignidad, con una probabilidad estimada de malignidad de 5-10%, 20-30% and 50-75%, respectivamente (39). En los pacientes con hallazgos citológicos sospechosos o indeterminados, ninguno de los factores clínicos (edad, sexo, nódulos múltiples vs solitarios), de imagen (tamaño del tumor, características ecográficas del nódulo) o citológicos (células atípicas, índice mitótico) son suficientemente precisos para determinar quién debe someterse a una tiroidectomía (40).

Debido a que la citología de la PAAF no puede discriminar entre tumores benignos y malignos en hasta en un 30% de los nódulos de tiroides clasificados como

indeterminados, y que además, presentan falsos negativos y resultados citológicos discordantes, se hacen necesarias pruebas de diagnóstico adicionales que mejoren la precisión preoperatoria y ayuden a distinguir las neoplasias malignas de las benignas y así contribuir a la evolución más favorable de estos pacientes (21).

Se ha demostrado que los ensayos moleculares en las punciones, especialmente de el estudio de *BRAF* además de *RAS*, *RET/PTC* y *PAX8/PPAR $\gamma$* , pueden mejorar significativamente la exactitud del diagnóstico de la citología de la PAAF preoperatoria (38,41-43). Se ha confirmado en estudios prospectivos la utilidad de los marcadores genéticos (presencia de mutaciones *BRAF* o *RAS*, reordenamientos *RET/PTC* y *PAX8/PPAR $\gamma$* ), los niveles de expresión de las proteínas galectin-3, HBME-1 y CK19 (44), y el nuevo clasificador de expresión de genes (*Gene Expression Classifier*) (Afirma) (45,46), para mejorar la exactitud del diagnóstico preoperatorio en pacientes con nódulos de tiroides indeterminados (38,43,47,48). Además, el uso de marcadores moleculares (*BRAF*, *RAS*, *RET/PTC* y *PAX8/PPAR $\gamma$* ) ya está formalmente recomendado en algunas guías clínicas (*American Thyroid Association*) (Recomendación Grado C) (34).

#### 4. Tratamiento

La cirugía es la primera elección de tratamiento en la gran mayoría de los casos de cáncer diferenciado de tiroides. La tiroidectomía, con o sin extirpación de los ganglios linfáticos del compartimiento central (en caso de metástasis ganglionares asociadas a un alto riesgo de recidiva), se recomienda en todos los pacientes con PTC >1cm, que son la mayoría de los casos (34).

Muchos pacientes con tumores de bajo riesgo son sometidos a una cirugía de diagnóstico (lobectomía) o tiroidectomía que en el 70-80% de los casos, resulta ser innecesaria (42,44). La disección profiláctica de los ganglios del compartimiento central, exponen al paciente a una cirugía más extensa, con un alto riesgo de lesión del nervio laríngeo recurrente, lo que puede resultar en complicaciones clínicamente



significativas de la voz (disfonía) y la deglución. También incrementa el riesgo de daño en las glándulas paratiroides lo que puede resultar un tratamiento sustitutivo de por vida con vitamina D (49).

La ablación con  $I^{131}$  después de la cirugía permite destruir los restos que puedan quedar en el lecho tiroideo, y esto permite, que posteriormente, se puedan detectar precozmente las recidivas mediante las concentraciones séricas de tiroglobulina, y se precisa para el rastreo corporal total con  $I^{131}$ . En los pacientes con metástasis, el  $I^{131}$  continúa siendo el tratamiento inicial a elegir. Se han conseguido tasas de remisión del 90% a 10 años en pacientes con micrometástasis pulmonares (50). Sin embargo, el uso de  $I^{131}$  debe ser individualizado teniendo en cuenta que las dosis acumuladas mayores de 600mCi pueden generar disfunción de las glándulas lacrimales y salivales, fibrosis pulmonar, leucemia y un mayor riesgo en otras enfermedades (33,51,52).

La terapia hormonal sustitutiva con tiroxina se da a los pacientes para reemplazar las hormonas que normalmente produce el tiroides y para evitar, cuando así está indicado, que la hipófisis produzca TSH con una concentración excesiva que pudiera contribuir a la recidiva (34). De hecho, en pacientes con cáncer de tiroides de alto riesgo (estadios III y IV), la supresión de TSH (mantenimiento de TSH  $<0.1$  mU/l) disminuye las tasas de recidiva, progresión y mortalidad relacionadas con el cáncer (53).

No hay suficiente evidencia que apoye el uso de quimioterapia convencional en pacientes que desarrollan un WDTC con metástasis. Su utilización está restringida para los casos de enfermedad avanzada que no puede ser controlada ni por cirugía, ni por  $I^{131}$  o radioterapia externa. La guía de la *American Thyroid Association* sugiere que antes de someterse a quimioterapia “los pacientes con enfermedad progresiva deberían ser considerados primero para ensayos clínicos” (34). El agente más estudiado es la doxorubicina, que puede producir respuestas parciales o estabilización de la enfermedad durante pocos meses (54).

La radioterapia externa se recomienda en el tratamiento de la enfermedad que no es tratable con cirugía, incluyendo la enfermedad cervical residual y las metástasis en hueso y cerebro (34). El uso más frecuente de la radioterapia externa en WDTC ha sido para el control local y regional del cáncer de tiroides, cuando existe enfermedad residual o recurrente. En pequeñas series se han descrito tasas de control local de las metástasis del 72-81% a 4-5 años después del uso de radioterapia (55,56).

Los pacientes con WDTC avanzado con metástasis resistentes a los tratamientos antes mencionados, particularmente al  $I^{131}$ , tienen un peor pronóstico, y actualmente las investigaciones están enfocadas en el desarrollo de nuevas terapias para este grupo de pacientes. La mayoría de las moléculas diana son conocidas por estar involucradas en la carcinogénesis y progresión del cáncer de tiroides e incluyen a muchos componentes de las vías MAPK y PI3K–Akt, desde RTK (receptores tirosina quinasa) en la membrana celular, a varias moléculas de la cascada de señalización como BRAF, MEK, AKT y mTOR. Estas son dianas terapéuticas que están siendo testadas, con inhibidores de la tirosina quinasa (57,58), inhibidores de MEK (59) y terapias para restablecer la capacidad de captación de  $I^{131}$  (60,61). Además, se ha descrito que la combinación de terapias podría ser más eficaz (62,63).

Sin embargo, a pesar de la reciente proliferación de ensayos clínicos enfocados en el manejo y control del CT, en los estadios avanzados, las opciones de tratamiento siguen siendo limitadas, con respuestas parciales y estabilización de la enfermedad durante un tiempo limitado, en el mejor de los casos, pero las toxicidades son numerosas, frecuentemente graves y ocasionalmente fatales. Además, no existe aún evidencia suficiente para el uso habitual de cualquiera de estos nuevos agentes (63-65).

## 5. Factores clínicos de pronóstico

### 5.1 Edad, sexo y antecedentes familiares

La edad de los pacientes en el momento del diagnóstico es el factor pronóstico de mortalidad más importante en el cáncer de tiroides. El carcinoma de tiroides es más letal cuando la edad de diagnóstico es superior a los 40 años; la mortalidad aumenta de forma significativa en pacientes mayores de 60 años (16). El riesgo de recidiva local y a distancia es mayor en menores de 20 años. Sin embargo, las tasas de supervivencia son generalmente altas, excepto en los más pequeños ( $\leq 10$  años) (66). En mayores de 60 años también existe un alto riesgo de recidiva (40%).

Aunque las diferencias en el pronóstico según el sexo son pequeñas, este tipo de neoplasias son más agresivas y tienen una mayor tasa de mortalidad en hombres que en mujeres (67).

Aún cuando el PTC familiar es más agresivo que el esporádico, esto no implica necesariamente una peor evolución.

### 5.2 Histología del tumor

La histología del tumor es un determinante crítico del resultado de la enfermedad. En general, los WDTC están asociados a una alta tasa de supervivencia y muestran un comportamiento muy parecido en pacientes con la misma edad y estadio clínico al momento del diagnóstico. Tienen un pronóstico excelente si el tumor está confinado en el tiroides, es de tamaño pequeño y mínimamente invasivo.

Un 10% de los PTC presenta una cápsula que rodea al tumor, lo que determina una evolución favorable. Algunas variantes histológicas del PTC se asocian a un peor pronóstico. La variante de células altas está asociada a un estado de la enfermedad más avanzado, se presenta en personas mayores, tiene un alto riesgo de recidiva local, y a distancia, y una tasa de supervivencia menor comparada con la variante convencional (68).

Los FTC ampliamente invasivos, que son los menos frecuentes, tienen un mal pronóstico, y hasta el 80% de los casos presentan ya metástasis al diagnóstico.

La OVFTC está asociada a índices de recidiva y mortalidad superiores a los del resto de los FTC.

### **5.3 Tamaño del tumor**

Existe una relación directa entre el tamaño tumoral, el índice de recidiva local y la mortalidad producida por el cáncer, tanto en PTC como en FTC (16). Los cánceres de tiroides menores de 1,5 cm, que limitan su extensión al interior del tiroides, no producen casi nunca metástasis a distancia, por lo que su mortalidad es mínima.

### **5.4 Grado de invasión**

Hasta el 10% de los WDTC atraviesan la cápsula tiroidea extendiéndose más allá de los límites de la glándula, lo que aumenta la morbilidad y mortalidad. La invasión local ocurre tanto en los PTC como en los FTC, y su presencia se asocia a índices de recidiva más altos (33%) (16,69).

### **5.5 Metástasis ganglionares**

No está del todo claro si la presencia de adenopatías con metástasis implica un peor pronóstico. Los resultados de los distintos estudios son controvertidos. Por un lado, los hay que no encuentran relación entre la existencia de adenopatías y un aumento de la recidiva o la mortalidad (70,71). Por otro lado, está demostrado que la presencia de adenopatías se asocia a un incremento de las metástasis a distancia, sobre todo si esas adenopatías son bilaterales, se encuentran en la zona alta del mediastino o tienen la cápsula ganglionar infiltrada (16,72).

### **5.6 Metástasis a distancia**

La principal causa de muerte en los PTC son las metástasis a distancia. Casi el 10% de los PTC y hasta el 25% de los FTC cursan con metástasis, y la mitad de ellas están presentes en el momento del diagnóstico (73). Las metástasis a distancia son más frecuentes en las variantes oncocíticas y en los pacientes mayores de 40 años. Los órganos que con más frecuencia tienen metástasis son los pulmones (50%), los huesos (25%), pulmones y hueso (15%) y el sistema nervioso central (10%). También se

pueden encontrar metástasis en el mediastino, cerebro, glándula adrenal, piel e hígado (18). Las variables relacionadas con el pronóstico de los pacientes que presentan metástasis son la edad, el tamaño y la capacidad de captar  $I^{131}$  por las células tumorales.

Existen otros factores que pueden afectar al pronóstico de la enfermedad como:

**a. El retraso en el inicio del tratamiento.** Un retraso en el inicio del tratamiento incrementa las tasas de invasión vascular, capsular y aumenta la probabilidad de que los pacientes sufran de persistencia de la enfermedad durante el seguimiento (74).

**b. La extensión de la cirugía.** En tumores de <1 cm la extensión de la cirugía no afecta las tasas de recidiva o supervivencia. Sin embargo, los pacientes con tumores >1 cm tienen un 15% más de riesgo de recidiva cuando se les ha practicado sólo una lobectomía, y su tasa de mortalidad aumenta en un 31% cuando se la compara con la de la tiroidectomía (75).

**c. El tratamiento con  $I^{131}$ .** Algunos estudios indican claramente los beneficios de su utilización sobre las tasas de recidiva (76), metástasis a distancia, y mortalidad (16), incluso en pacientes de alto riesgo (34).

**d. La terapia de supresión con tiroxina.** La terapia de supresión de la TSH está asociada con la reducción de eventos clínicos adversos (77) y también reduce la incidencia de enfermedad recurrente (78). Sin embargo, solamente beneficia a pacientes con enfermedad avanzada (estadíos III y IV), que presentan una mejora global en la tasa de supervivencia (53).

## 6. Sistemas de estadiaje del cáncer de tiroides

En el intento por predecir un pronóstico exacto del cáncer de tiroides, se han diseñado diferentes sistemas de estadiaje: TNM (*T extensión of primary tumor, N conditions of regional lymph nodes, and M distant metastases*), AMES (*Age, distant metastases, Extent and Size of the primary tumor*), AGES (*Age, Grade, Extent and Size*), MACIS (*Distant Metastases, Age, Completeness of surgery, Invasion of the extra- thyroidal tissues and*

Size of tumor). Sin embargo, la comparación de su eficacia demuestra que ninguno de ellos es completamente satisfactorio (79-81). Así, la *European Thyroid Association* (ETA) (33) y la *American Thyroid Association* (ATA) (34), recomiendan la utilización del sistema de clasificación TNM (Tamaño del Tumor, Presencia de Nódulos Afectados y Metástasis) de la *American Joint Commission on Cancer* y la *International Union Against Cancer* (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1** Clasificación TNM para WDTC. a) Definición de T, N y M. b) Estadío según TNM (34).

a)

	Definición
T1	Tumor <2cm
T2	Tumor de 2 – 4cm
T3	Tumor >4cm limitado al tiroides o de cualquier tamaño con mínima extensión extratiroidea
T4a	Tumor de cualquier tamaño con extensión a través de la cápsula tiroidea a tejidos blandos subcutáneos, laringe, tráquea, esófago o nervio laríngeo recurrente
T4b	Invasión tumoral a fascia prevertebral o afectación de la carótida o los vasos mediastínicos
Tx	Tamaño del tumor primario desconocido, pero sin invasión extratiroidea
N0	Ausencia de metástasis
N1a	Metástasis al nivel VI (pretraqueal, paratraqueal y prelaríngeo)
N1b	Metástasis en ganglios cervicales unilateral, bilateral, o contralateral (niveles I, II, III, IV o V) o retrofaríngeos o mediastínicos superiores (nivel VII)
Nx	Ganglios linfáticos regionales sin valoración
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
Mx	Metástasis a distancia no evaluadas

b)

Estadío	Pacientes < 45 años	Pacientes ≥ 45 años
I	Cualquier T, Cualquier N, M0	T1, N0, M0
II	Cualquier T, Cualquier N, M1	T2, N0, M0
III		T3, N0, M0; T1, N1a, M0; T2, N1a, M0; T3, N1a, M0
IVA		T4a, N0, M0; T4a, N1a, M0; T1, N1b, M0; T2, N1b, M0; T3, N1b, M0; T4a, N1b, M0
IVB		T4b, Cualquier N, M0
IVC		Cualquier T, Cualquier N, M1

Sin embargo, el estadiaje TNM no muestra todos los aspectos que deben ser considerados al elegir el grado de tratamiento apropiado para cada paciente. Por lo tanto, la ETA y la ATA recomiendan que la extensión de la cirugía debe basarse en: a) la historia de exposición a radiación, b) la multifocalidad y extensión extratiroidea del tumor, c) la invasión vascular e histología del tumor, además de d) los factores considerados en el sistema de estadiaje TNM. Igualmente, la decisión de aplicar I<sup>131</sup> estará basada en el resultado de la cirugía, la histología del tumor y la extensión extratiroidea, en conjunción con el estadio TNM del tumor (33,34).

## 7. Cáncer de tiroides asociado a síndromes hereditarios

Entre el 5 y el 10% de los carcinomas de tiroides no medulares (FTC y PTC) se desarrollan en el seno de síndromes tumorales hereditarios (12). Los síndromes más comunes son:

### 7.1 Poliposis adenomatosa familiar (FAP) o síndrome de Gardner

La poliposis adenomatosa familiar es una enfermedad autosómica dominante causada por mutaciones germinales en el gen *APC* (*adenomatous polyposis coli gene*). *APC* es un gen supresor de tumor localizado en el cromosoma 5q21 (82), que codifica una proteína que participa en el complejo multiprotéico ubiquitín-proteosómico que degrada la  $\beta$ -catenina libre presente en el citoplasma. Se cree que las mutaciones de *APC* generan una proteína truncada incapaz de degradar la  $\beta$ -catenina (83). También se han descrito mutaciones somáticas del gen *APC* en formas esporádicas de cáncer de tiroides (Tabla 1.2).

Los pacientes desarrollan cientos de adenomas, principalmente localizados en colon y recto. El PTC es una de las manifestaciones extraintestinales del FAP que además incluye osteomas, alteraciones dentales, quistes epidérmicos, tumores desmoides, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina, hepatoblastoma y meduloblastoma.

Los carcinomas de tiroides asociados a FAP son generalmente bilaterales y multifocales, con un patrón de crecimiento cribiforme con áreas sólidas y fibrosis marcada (84,85). En los pacientes con FAP, la prevalencia del PTC es de 2-12% de los casos (86-88). Las mujeres jóvenes (<30 años) con FAP tienen una probabilidad 160 veces mayor de desarrollar un PTC que un individuo sin la mutación (84).

## 7.2 Síndrome de Cowden

Es una enfermedad autosómica dominante causada por una mutación germinal en el gen *PTEN* y caracterizado por el desarrollo de múltiples hamartomas y cánceres de tiroides, mama y endometrio (89). *PTEN* es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 10q23.3 que antagoniza la vía de señalización PI3K/Akt.

Dos tercios de los pacientes con síndrome de Cowden desarrollan tumores tiroideos que incluyen bocio multinodular, nódulos adenomatosos múltiples, AF, FTC y con menor frecuencia PTC. El 80% de los pacientes con este síndrome son portadores de mutaciones germinales en *PTEN*. El 10% de estos pacientes desarrollan AA que pueden evolucionar a FTC (90).

## 7.3 Complejo de Carney

El complejo de Carney es un síndrome de herencia autosómica dominante caracterizado por mixomas en diferentes localizaciones, hiperpigmentación cutánea (pecas alrededor de los labios, mucosa oral y genital, y nevus azules) e hiperactividad endocrina. Las manifestaciones más comunes relacionadas con glándulas endocrinas son acromegalia, tumores tiroideos (el PTC y el FTC se presentan en hasta el 15% de los pacientes con esta enfermedad), tumores testiculares, y síndrome de Cushing debido a la enfermedad adrenocortical nodular pigmentada primaria (PPNAD), independiente de la hormona adrenocorticotropa (91). El gen *PRKAR1A* localizado en el cromosoma 17q23-24 codifica la subunidad reguladora alfa (R1A) de la proteína quinasa A, con un papel clave en la ruta de señalización del adenosín monofosfato cíclico (AMPC) implicado en la presencia de carcinogénesis de origen endocrino (92).



Las mutaciones en *PRKAR1A* conducen a una disminución del 50% de actividad de la subunidad, acompañada por el efecto compensatorio por parte del resto de los componentes del complejo, cuyo resultado final es el aumento de la actividad de la PKA, que aumenta la proliferación celular y la tumorigénesis. Las mutaciones que activan este gen se encuentran en un 70% de los pacientes con este síndrome.

#### 7.4 Síndrome de Werner

El síndrome de Werner es una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente caracterizada por un envejecimiento prematuro. Es causado por mutaciones en el gen *WRN* (90% de los casos) localizado en el cromosoma 8p11-12. Este gen codifica la proteína RecQ helicasa y exonucleasa, importante en la reparación y replicación del DNA. La tasa de incidencia global del cáncer de tiroides (PTC, FTC y ATC) es del 18% (93).

### 8. Alteraciones genéticas comunes en el cáncer de tiroides

Los carcinomas de tiroides derivados de las células foliculares presentan una progresión que va desde WDTC altamente curables, hasta los tumores ATC casi uniformemente incurables (94). El PDTC y las variantes agresivas de WDTC presentan grados intermedios de esta progresión. La evidencia clínica, epidemiológica y patológica apoya un concepto de progresión paso a paso (teoría del "múltiple hit"), y desdiferenciación celular esquematizado en la figura 1.3. La iniciación y progresión tumoral ocurren a través de la acumulación gradual de varias alteraciones genéticas y epigenéticas (94,95), con el correspondiente trastorno progresivo de las vías de señalización involucradas. En el cáncer de tiroides existen dos vías de señalización principalmente afectadas, la MAPK y la PI3K/AKT. Aunque también se encuentran afectadas, las vías de señalización NF- $\kappa$ B, RASSF1-MST1-FOXO3, WNT-  $\beta$ -Catenina, HIF1 $\alpha$  y la TSHR.

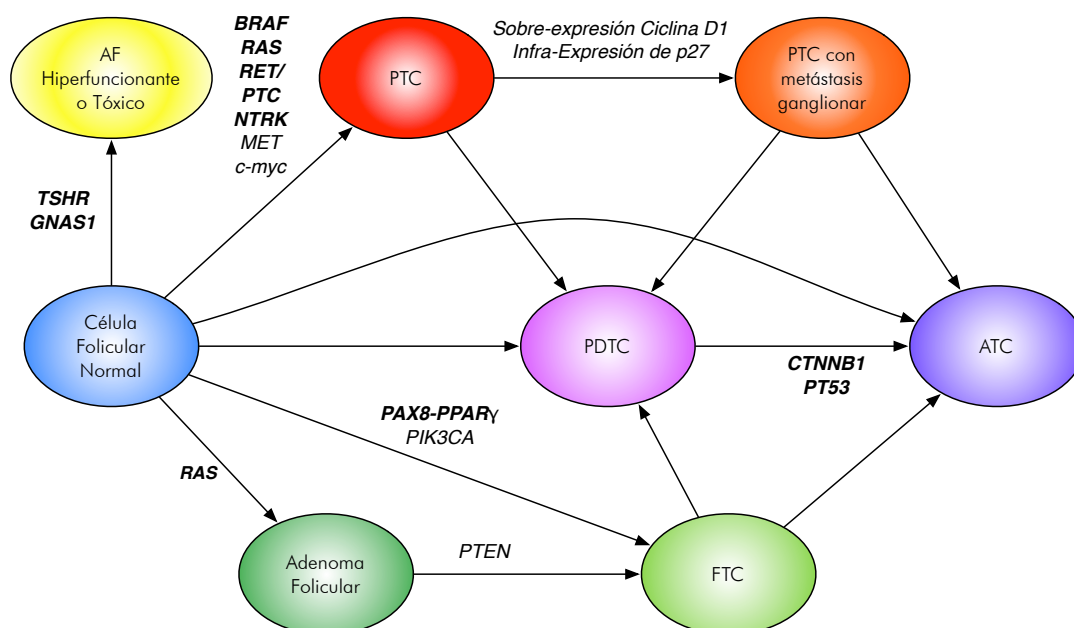


Figura 1.3. Modelo de progresión gradual de cáncer de tiroides. Adaptado de (2,27,96).

## 8.1 Vía de señalización Ras-MAPK

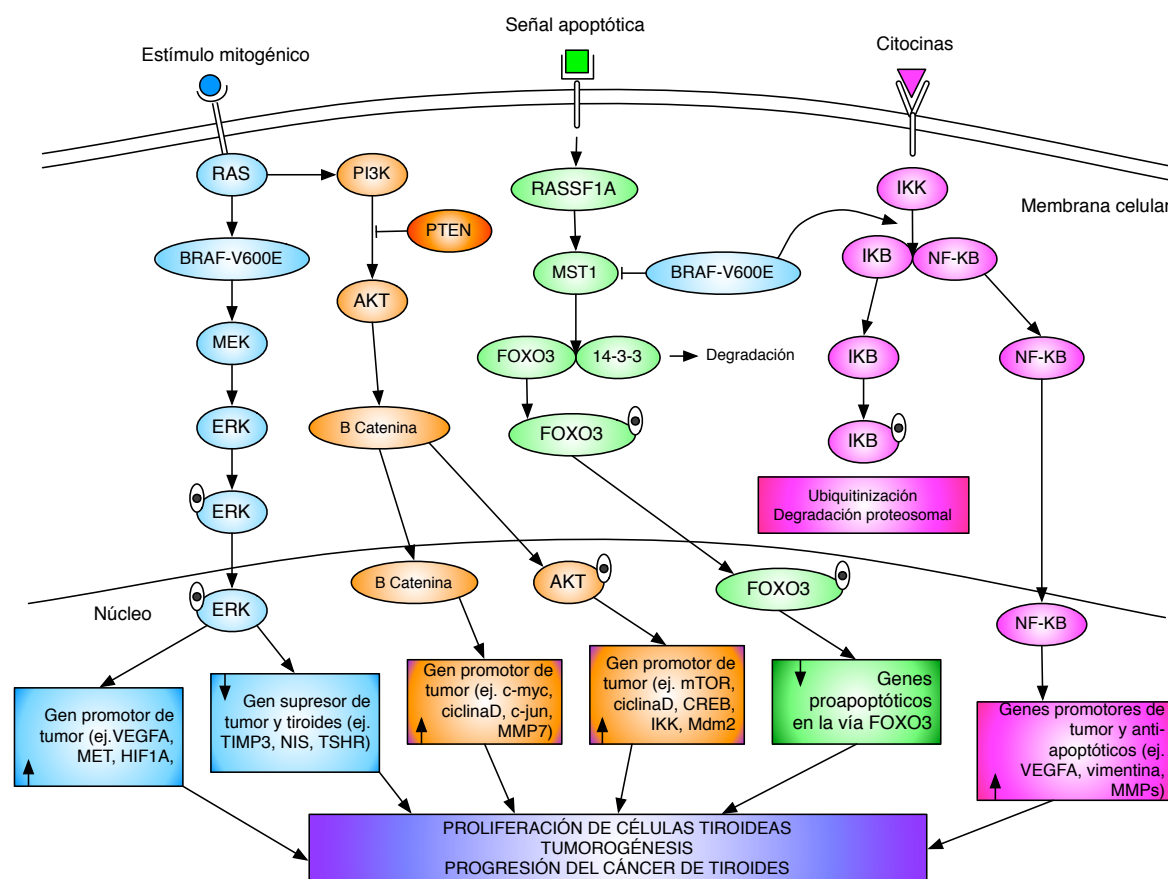
Los carcinomas bien diferenciados (PTC, FTC) se caracterizan esencialmente por una activación constitutiva de la vía de señalización MAPK, resultado de mutaciones o reordenamientos en diferentes efectores de esta vía, principalmente *RET*, *BRAF* o *RAS* (Figura 1.4).

### A. Reordenamientos cromosómicos

#### a. *RET*

*RET* (*rearranged during transfection*) fue el primer receptor tirosina quinasa en ser identificado en cáncer de tiroides (97), y sus reordenamientos son la segunda alteración genética más frecuente en PTC. Este proto-oncogén localizado en el cromosoma 10q11.2 codifica un complejo receptor, que contiene un único dominio transmembrana y 4 dominios cadherina dispuestos en tándem y localizados en la región extracelular. Estos dominios intervienen en la unión de moléculas de calcio, que estabilizan la región extracelular y facilitan el reconocimiento de los ligandos. *RET* se activa al formar un homodímero que interactúa con otras proteínas, originándose un complejo multiprotéico que incluye un ligando soluble perteneciente a la familia del

factor neurotrófico derivado de la glía (GFL ó “GDNF family ligands”) y un correceptor de superficie perteneciente a la familia de receptores de GDNF (GFRs ó “GDNF family receptors”) (98). *RET* se expresa también con niveles bajos en las células foliculares tiroideas (99), y generalmente no se detecta en tumores benignos.



**Figura 1.4** Vías de señalización implicadas en el cáncer de tiroides. Adaptado de (100).

En la actualidad hay más de 15 reordenamientos *RET/PTC* que implican a *RET* con 10 genes diferentes que son específicos de PTC (101,102). Todos los reordenamientos resultan de la fusión del dominio tirosina quinasa de *RET* con la región 5' terminal de genes heterólogos. *RET/PTC1* (60-70% de casos positivos) y *RET/PTC3* (20-30% de casos positivos) son las oncoproteínas de *RET* más comunes, y están formadas por la fusión de *RET* a los genes *H4* (*D10S170*) y *NCOA4* (*ELE1*), respectivamente (103).

Los reordenamientos *RET/PTC* activan las vías de señalización PI3K y MAPK, que resultan en una activación constitutiva de ambas vías y en la carcinogénesis (2). Estos reordenamientos se encuentran en los PTC inducidos por radiación y en cánceres

pediátricos (104), aunque también se han detectado en PTC esporádicos en los que la frecuencia es más baja y parece variar entre diferentes regiones geográficas (Tabla 1.2) (105). La causa de estos reordenamientos en los PTC esporádicos no se conoce, pero la estrecha asociación entre su presencia y el fenotipo del PTC sugiere que desempeñan un papel causal en la patogénesis (106). Los reordenamientos *RET/PTC* están presentes sólo en una pequeña fracción de PDTC, 0-13% (107), lo que sugiere que esta oncoproteína no se asocia a un alto riesgo de progresión tumoral (Figura 1.3)(101).

#### **b. *NTRK1***

El oncogén *NTRK1* (*Neurotrophic receptor tyrosine kinase*) está localizado en el cromosoma 1q22 y codifica el receptor para el factor de crecimiento neuronal. En el carcinoma de tiroides (PTC), los reordenamientos que involucraban este gen se describieron en 1989 (108). El receptor activado inicia varias cascadas de transducción de señales que incluye las vías ERK, PI3K y la fosfolipasa-C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ). Como *RET*, *NTRK1* sufre una activación oncogénica por reordenamientos cromosómicos que fusionan el dominio tirosina quinasa de *NTRK1* a la región terminal 5' de genes heterólogos. La proteína quimérica resultante exhibe una activación constitutiva de la actividad tirosina quinasa. Se han descrito varias proteínas quiméricas de *NTRK1* en el cáncer de tiroides (TRK, TRK-T1, TRK-T2, TRK-T3) (109). El oncogén *NTRK1* parece estar restringido al PTC y tiene una baja prevalencia (Tabla 1.2).

### **B. Mutaciones puntuales**

#### **a. *BRAF***

El proto-oncogén *BRAF* está situado en el cromosoma 7q24 y codifica una serina/treonina quinasa que transduce señales reguladoras a través de la cascada Ras-Raf-MEK-ERK. Su asociación con el cáncer de tiroides (PTC) fue descrito en 2003 (110). La mutación *BRAF* proporciona una ruta alternativa para la activación aberrante de la señalización de ERK, que está implicada en la carcinogénesis de varios tipos de cánceres humanos. La transversión T a A en la posición 1799 del cDNA de *BRAF*, resulta en un cambio de valina por ácido glutámico en el residuo 600 de la proteína.

Este cambio representa la mutación más frecuente en los PTCs esporádicos, y es una diana para la investigación de nuevas terapias (111). También se han descrito otras mutaciones en las posiciones 598, 599 and 601, así como reordenamientos que activan *BRAF*; (*AKAP9-BRAF*, *AGK-BRAF*) (112). Sin embargo, estas alteraciones son muy poco frecuentes.

Las mutaciones en *BRAF* pueden ocurrir en un estadio temprano del desarrollo del tumor ya que se han descrito en PTC microscópicos (Figura 1.3) (113). Aunque la mayoría de los PTC con mutación *BRAF* tiene una apariencia histológica clásica (variante convencional), la variante de las células altas considerada como una forma más agresiva, tiene una prevalencia particularmente alta, 75-100% de esta mutación (113-115). Mutaciones en *BRAF* son poco frecuentes en la variante folicular y no se encuentran en FTC ni en los AF (Tabla 1.2) (110).

Muchos (113,116,117), pero no todos (118,119) los estudios muestran que los PTC con mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> se diagnostican con mayor frecuencia con invasión extratiroidea y en un estadio más avanzado. La mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> también está asociada a la disfunción de *NIS* (sodium-iodide symporter), que ocasiona una disminución de la captación de yodo y una posterior resistencia al tratamiento con I<sup>131</sup> (60,120-122).

Las mutaciones en *BRAF* son el defecto oncogénico predominante de la vía de señalización de la MAPK en ATC. *RET/PTC*, *NTRK* y *PAX8-PPAR $\gamma$*  se ven raramente en PDTC o ATC, apoyando la noción de que los cánceres diferenciados de tiroides asociados con estos reordenamientos generalmente no progresan a PDTC o ATC (123). Estos tumores poco diferenciados o indiferenciados pueden desarrollarse *de novo* (124), aunque otros estudios sostienen que su desarrollo procede de la progresión de carcinomas papilares o foliculares pre-existentes (125) (Figura 1.3).

## **b. RAS**

Los genes de la familia *RAS* (*HRAS*, *KRAS* y *NRAS*) localizados en 11p11, 12p12 y

1p13 respectivamente, codifican proteínas G altamente relacionadas entre sí, localizadas en la superficie interna de la membrana celular, y que tienen un papel relevante en la transducción intracelular de las señales originadas desde los receptores tirosina quinasa de la membrana celular a los receptores acoplados a las proteínas G. En tiroides las mutaciones en estos genes fueron descritas en 1988 (126). En su estado inactivo RAS está acoplada a GDP (guanosín difosfato). Tras su activación se une a GTP (guanosín trifosfato) activando las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT. En estado normal, la proteína activada RAS-GTP se inactiva rápidamente. En el cáncer, las mutaciones puntuales ocurren en diferentes dominios de los genes *RAS*, y conducen a un incremento de la afinidad por GTP (mutaciones en los codones 12 y 13) o a la inactivación de la función GTPasa auto-catalítica (mutaciones en el codón 61). Como resultado, la proteína se convierte en un interruptor permanentemente encendido y activa constitutivamente todas las proteínas posteriores en la cascada de señalización (127). En el cáncer de tiroides, las mutaciones en *NRAS* que involucran el codón 61 son las más comunes (128).

Las mutaciones en genes *RAS* se presentan con una frecuencia variable en todos los tipos tumorales derivados de las células foliculares. En PTC, es relativamente infrecuente (129) y casi siempre están relacionadas con la variante folicular. En FTC, PDTC y ATC las mutaciones en *RAS* tienen una alta prevalencia (Tabla 1.2) (95) y están correlacionadas con desdiferenciación y mal pronóstico (2,130,131).

Sin embargo, las mutaciones *RAS* no son específicas de los carcinomas y ya que también se encuentran en los AF, hecho que ha sido tomado como evidencia que la activación de *RAS* podría ser un paso temprano en la carcinogénesis del tiroides (Figura 1.3), aunque esto no ha sido probado de manera concluyente (99,132).

## 8.2 Vía de señalización PI-3K-AKT-mTOR

Se han descrito alteraciones genéticas que involucran proteínas a lo largo de la vía de señalización PI3K/AKT, particularmente en FTC y ATC. Éstas incluyen el aumento del número de copias y la activación debido a mutaciones en *PIK3CA*, la inactivación de

mutaciones y deleciones en *PTEN*, y también la aparición de mutaciones activadoras de *RAS* (133,134).

#### **a. *PI-3KCA***

La vía de señalización PI-3K es un importante regulador de proliferación, apoptosis, metabolismo y motilidad celular. Las mutaciones activadoras en la subunidad catalítica de PI-3K (*PI-3KCA*) conducen a la activación de las cascadas de señalización por debajo de PI-3K. Muchas de las mutaciones han sido localizadas en los dominios helicasa (exón 9) y quinasa (exón 20) de la proteína (135). Además de las mutaciones activadoras, la amplificación del gen *PI-3KCA* contribuye al incremento de la señalización PI-3K en tumores tiroideos.

Entre los carcinomas bien diferenciados estas alteraciones ocurren principalmente en el FTC (8–13% mutaciones, 28% amplificaciones) y menos frecuentemente en el PTC (2% mutaciones, 12% amplificaciones). Su frecuencia en ATC aumenta hasta un 17% para mutaciones *PI-3KCA* y a 42% para la amplificación del gen (Tabla 1.2) (134,136).

#### **b. *PTEN***

Las mutaciones con pérdida de función en *PTEN*, (*lipid and protein phosphatase*) neutralizan la actividad de PI-3K; estas mutaciones ocurren con relativa baja frecuencia en el cáncer de tiroides (Tabla 1.2). La pérdida de expresión en *PTEN* seguido por la deleción del gen es un mecanismo más común: 3% en AF, 22% en PTC, 36% en FTC and 41% in ATC (136,137). Además, las mutaciones germinales en *PTEN* provocan el síndrome de Cowden (138).

### **8.3 Otras vías**

**a. *PAX8-PPAR $\gamma$***  El reordenamiento *PAX8-PPAR $\gamma$*  es una translocación cromosómica t(2:3)(q13;p25), que contribuye al desarrollo de cánceres de tiroides (139). Fue descrita por primera vez en AF (140). *PAX8* (*paired-box gene 8*) codifica para un factor transcripcional requerido en la génesis de los linajes de células foliculares y la expresión de genes específicos para la regulación del tiroides, mientras *PPAR $\gamma$*

(*peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas. La proteína quimérica contiene un dominio de unión al DNA de *PAX8* y funciona como un dominante negativo sobre la actividad transcripcional normal de *PPAR $\gamma$* . Los tumores asociados con *PAX8/PPAR $\gamma$*  generalmente tienen un pronóstico favorable. Los reordenamientos *PAX8/PPAR $\gamma$*  se encuentran principalmente en los FTC, y en una pequeña fracción de AF (141-143). También se han descrito en un porcentaje muy bajo de PTC (ocasionalmente en FVPTC) (Tabla 1.2) (141,142).

### **b. p53**

El gen *P53* codifica una proteína nuclear que induce la parada del ciclo, senescencia y/o apoptosis en respuesta a daño celular. Una vía defectuosa de *p53* puede contribuir a la carcinogénesis, la progresión de la enfermedad y la resistencia al tratamiento. En los carcinomas de tiroides, las mutaciones en *p53* son raras o completamente ausentes en WDTC (144-146), incluyendo aquellos que están relacionados con la radiación (147), pero frecuentes en PDTC y particularmente en ATC (Tabla 1.2) (144,145). Por lo tanto, parece ser que en el curso de la carcinogénesis tiroidea, las mutaciones *p53* son un evento tardío y están asociadas con la progresión del tumor (148) y un fenotipo más agresivo (Figura 1.3).

### **c. $\beta$ -Catenina**

La  *$\beta$ -catenina* (*CTNNB1*) es un regulador de adhesión célula-célula mediado por E-cadherina y un componente fundamental de la vía de señalización Wnt (*Wingless Signaling Pathway*) (149). Se ha descrito una alta frecuencia de mutaciones *CTNNB1* en PDTC y ATC pero no en WDTC (Tabla 1.2) (146,150), lo que sugiere que las mutaciones en *CTNNB1* tienen un papel directo en la diferenciación de los cánceres de tiroides, especialmente aquellos que progresan a ATC.

### **d. Sobreexpresión de los factores de crecimiento y sus receptores**

Se ha descrito que los cambios en la expresión de los factores de crecimiento y sus receptores, están asociados con la carcinogénesis tiroidea. Los factores de crecimiento



también conducen a la activación permanente de las vías MAPK, PI-3K y sus respectivas cascadas; entre ellos encontramos:

**1. TSH-R (*Thyroid stimulating hormone receptor*)**, activa las vías cAMP y PLC (fosfolipasa C). La pérdida de expresión del receptor de TSH (151) se considera un evento tardío en el modelo de progresión del cáncer de tiroides (152).

**2. GSP (*Gs-alpha*)**, facilita la unión del ligando TSH-R y la activación de la adenilato ciclasa resultando en un incremento de cAMP. Su sobre-expresión se ha descrito en tumores de tiroides malignos (153,154).

**3. EGF (*Epidermal growth factor*)**, inicia una cascada quinasa que activa la vía de las MAPKs. Los nódulos hiperfuncionantes y las lesiones malignas expresan altos niveles de EGF (155) con una expresión más elevada en PTC y ATC (156).

**4. VEGF (*Vascular endothelial growth factor*)**, los factores angiogénicos estimulan la neovascularización y tienen un papel importante en el crecimiento de los tumores. Se han correlacionado los niveles de VEGF y su receptor con el tamaño de los PTC y su recidiva (157).

**5. IGF-1 (*Insulin-like growth factor*)**, puede ocasionar la proliferación de tirocitos (158). Se ha descrito en AF y carcinomas de tiroides un incremento en la inmunoreactividad de IGF-1 y su receptor (159).

**Tabla 1.2** Prevalencia de las alteraciones genéticas en carcinomas del epitelio folicular de tiroides.

Alteración Genética	AF	PTC	FTC	PDTC	ATC	Referencias
Reordenamientos <i>RET/PTC</i>	2%	15-40%	0%	0-13%	0%	(101,105,107)
Mutaciones <i>BRAF</i>	0%	27-87%	0%	12-17%	20-50%	(110,123,137,160-162)
Mutaciones <i>RAS</i>	20-40%	10-20%	40-50%	40-55%	30-50%	(2,95,123,131,134)
Reordenamientos <i>PAX8/PPAR<math>\gamma</math></i>	2-30%	5%	30-47%	0%	0%	(2,141-143))
Reordenamientos <i>NTRK1</i>	0%	10-25%	0%	-	-	(163)
Mutaciones <i>PIK3CA</i>	-	2-15%	15%	-	23%	(134,136)
Mutaciones <i>PTEN</i>	-	2%	7%	-	12-50%	(137)
Mutaciones <i>CTNNB1</i>	-	0%	0%	25%	66%	(146,150)
Mutaciones <i>TP53</i>	-	0-9%	0-9%	17-38%	67-88%	(144,145)

## 9. Marcadores moleculares de diagnóstico y pronóstico

Los marcadores moleculares también son conocidos como marcadores biológicos o marcadores tumorales. Hace más de cuarenta años, los primeros marcadores descubiertos en el cáncer de tiroides fueron la medición de la tiroglobulina y los niveles de calcitonina en suero (164). Su descubrimiento ayudó a revolucionar el manejo de los pacientes con cáncer de tiroides en términos de un mejor seguimiento y diagnóstico precoz (165). El rápido avance en las técnicas moleculares ha permitido describir alteraciones asociadas a la patogénesis del cáncer de tiroides y han ayudado a mejorar el conocimiento acerca de su progresión. Los diferentes eventos moleculares

están asociados con etapas específicas del desarrollo del tumor y podrían servir como factores pronósticos y dianas terapéuticas (166,167).

### 9.1 Mutaciones puntuales

Quizás la más intensamente estudiada es el proto-oncogén *BRAF*. Algunos estudios asocian la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> con invasión extratiroidea, tumores multicéntricos, presencia de metástasis ganglionares, estado avanzado de la enfermedad, mayor edad a la presentación inicial y alta probabilidad de persistencia y recidiva (40,168-170). Además, se ha descrito que los pacientes con la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> tienen un riesgo 2.14 veces mayor (95% CI, 1.67-2.74) de recidiva y de persistencia de la enfermedad (169). Sin embargo, otros estudios no muestran una relación significativa entre la presencia de esta mutación y el comportamiento clínico (162,171,172), o restringen el alto riesgo de recidiva a pacientes mayores de 65 años (170). Entre el 20-30% de los tumores *BRAF*<sup>V600E</sup> tienen un curso clínico agresivo, y por consiguiente su impacto sobre el pronóstico de los tumores todavía está por definir (173).

Las mutaciones en *RAS*, particularmente las mutaciones en *NRAS*, están asociadas con un incremento de la agresividad de PDTC y FTC, disminuyendo la supervivencia del paciente (130,174,175), de manera que la utilidad de este marcador genético parece prometedora pero aún queda por definir (20).

### 9.2 Marcadores inmunohistoquímicos

La inmunohistoquímica es una poderosa herramienta para la investigación ya que proporciona información suplementaria a la evaluación morfológica de los tejidos. Su utilización en el estudio de marcadores celulares que definen fenotipos específicos proporciona información importante de diagnóstico, de pronóstico y también predictiva, relacionada con el estatus y la biología de la enfermedad.

Se han propuesto varios marcadores inmunohistoquímicos utilizando diferentes anticuerpos, solos o combinados en paneles, para mejorar la exactitud en el diagnóstico e intentar predecir el pronóstico de los carcinomas del epitelio folicular

(tabla 1.3). Estos marcadores pertenecen a diferentes categorías y están vinculados a la adhesión celular (galectina-3, E-cadherina, fibronectina), receptores de señalización (RET), control de la transcripción (factor de transcripción de tiroides [TTF1]), secreción (tiroglobulina, calcitonina, antígeno carcinoembrionario [CEA]), regulación del ciclo celular (p16, p21, p27, ciclina D1 y ciclina E) y la estructura celular (citoqueratina 19) (Tabla 1.3). Los hay que se encuentran en diferentes partes de la célula como la membrana y/o citoplasma (Hector Battifora mesotelial 1 [HBME-1],  $\beta$ -catenina) y el núcleo (p53) (176). También se ha descrito la expresión diferencial de paneles de proteínas para diferenciar entre nódulos malignos y benignos (177-180).

La transformación de los WDTC en ATC ha sido estudiada a través de la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores, identificando alteraciones en una amplia gama de procesos celulares como la disminución de la regulación del ciclo celular y la apoptosis (p53, Bcl2, topoisomerasa II  $\alpha$ , y MIB-1), la perturbación de la adhesión celular y de moléculas de señalización (E-cadherina,  $\beta$ -catenina), la pérdida de la función de síntesis normal (tiroglobulina), y un desarrollo progresivo de la neovascularización (VEGF) (181).

**Tabla 1.3** Marcadores inmunohistoquímicos descritos en estudios de caracterización diferencial de los diferentes subtipos de carcinomas del epitelio folicular tiroideo.

Proteína	Subtipo	IHQ	Referencia
Galectina-3	PTC y FTC	Sobre-expresión	(182-184)
CK19	PTC	Sobre-expresión	(185)
E-cadherina	FTC	Sub-expresión	(186,187)
HBME-1	PTC, y FTC	Sobre-expresión	(188)
p27	PTC	Sub-expresión	(189,190)
RET	PTC	Sobre-expresión	(191)
Ciclina D1	ATC, PTC, y FTC	Sobre-expresión	(182,192,193)
$\beta$ -catenina	PTC, y FTC	Sobre-expresión	(182,194)
P53	WDTC	Expresión positiva	(195,196)
Ki-67	OVFTC	Sobre-expresión	(197)
Bcl2	OVFTC	Expresión positiva	(197)

Otros marcadores inmunohistoquímicos estudiados incluyen: biotinidasa (198), NCAM (199) TLR-4 (200), FASN y phospho-c-Met (201); NIS, y ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) (176), CD44v, CD10, CD57, STAT3, TTF-1 (176), PPARgamma (202), y la tiroglobulina. En general, un solo marcador no llega a ser óptimo en términos de sensibilidad y especificidad. De manera que paneles de 2 o más anticuerpos son más efectivos y podrían mejorar la exactitud en el diagnóstico y la predicción del pronóstico. Desafortunadamente, ninguno de los marcadores estudiados hasta el momento ha sido confirmado como marcador aplicable en clínica para el diagnóstico y/o de pronóstico clínico (131).

### 9.3 Perfiles de expresión génica

La caracterización genómica es una potente herramienta para definir cambios en los patrones de expresión génica tumoral, que permiten identificar genes en vías de señalización esenciales para el desarrollo del tumor. El análisis de éstos perfiles de expresión permite definir marcadores que pueden llegar a convertirse en futuras dianas terapéuticas.

Las tecnologías para establecer perfiles de expresión génica, como los *microarrays* de cDNA, arrays de oligonucleótidos, secuenciación masiva o análisis seriados de expresión génica (SAGE) generan una cantidad de datos tan grande que exigen complejos análisis bioinformáticos para su utilización. En el cáncer de tiroides, los perfiles de expresión génica actuales demuestran que las mutaciones en *BRAF*, *RET/PTC* y *RAS* son determinantes clave para la variación en la expresión génica en los PTC. Existen también perfiles que evidencian, que en los PTC la desregulación de ciertos genes activa vías de señalización implicadas en la carcinogénesis (203,204) o en un comportamiento agresivo. En particular, la sobre-expresión de los genes *LIMD2*, *PTPRC* (CD45), *KIT*, *LMS7*, *SYNGR2*, *UBE2C*, *CDC2/7* o *DOCK10* conduce a aumentos de proliferación, a remodelación del esqueleto de actina y a alteraciones en la motilidad celular, todas características importantes para la progresión tumoral (22,205,206).

Varios grupos han contribuido a la identificación de perfiles génicos de PTC utilizando los *microarrays* de DNA. Entre los numerosos genes sobre-expresados, el rol de *MET*, *FN1*, *LGALS3* (galectina 3), *KRT19* (citoqueratina 19), *CITED1* (cpb/p300 interacting transactivator 1) y *PDGFA* (platelet-derived growth factor-  $\alpha$ ) ha sido confirmado también con la sobre-expresión de las respectivas proteínas mediante IHQ (207,208).

Se desconoce aún cuales de estos genes están involucrados en determinar las características morfológicas y biológicas de los PTC, o en el proceso de carcinogénesis. De hecho, en células foliculares de tiroides transfectadas con *LGALS3* ocurre una transformación maligna (209). Más importante aún, esta concordancia entre los análisis de *microarrays* y la detección IHQ de la galectina-3 y CK19 ha llevado a que sean propuestas como marcadores para el diagnóstico de CT tanto en biopsias de tumores como en material de PAAF (210).

Existen también perfiles diferenciales de expresión génica entre PTC y FTC, en los que los PTC sobre-expresan *CITED*, *CLDN10* (claudin 10), *IGFBP6* (insulin-growth-factor-binding protein 6), mientras que los FTC no expresan *CLDN10* y sub-expresan *IGFBP6* (211). Sin embargo, en la actualidad no existe aún una concordancia absoluta que permita la utilización de estas firmas moleculares para una estrategia de pronóstico que pueda predecir efectivamente la recidiva y/o la mortalidad en los pacientes con cáncer de tiroides (166,173).

#### 9.4 Marcadores epigenéticos

La epigenética describe los mecanismos que resultan en alteraciones heredables en los perfiles de expresión génica sin involucrar cambios en la secuencia del DNA subyacente. Existen tres procesos de regulación epigenética: la metilación del residuo citosina en el DNA, la modificación post-traducciona l de las histonas asociadas al DNA y los miRNAs. Entender todo aquello que concierne a los cambios epigenéticos podría tener un inmenso potencial en la detección, el diagnóstico, el tratamiento y la predicción del pronóstico del cáncer (212). Respecto al CT, la acumulación de alteraciones epigenéticas podrían tener un papel en la progresión secuencial de los

WDTC a carcinomas con metástasis y también en acelerar la progresión a los PDTC y ATC (213).

### a. Metilación

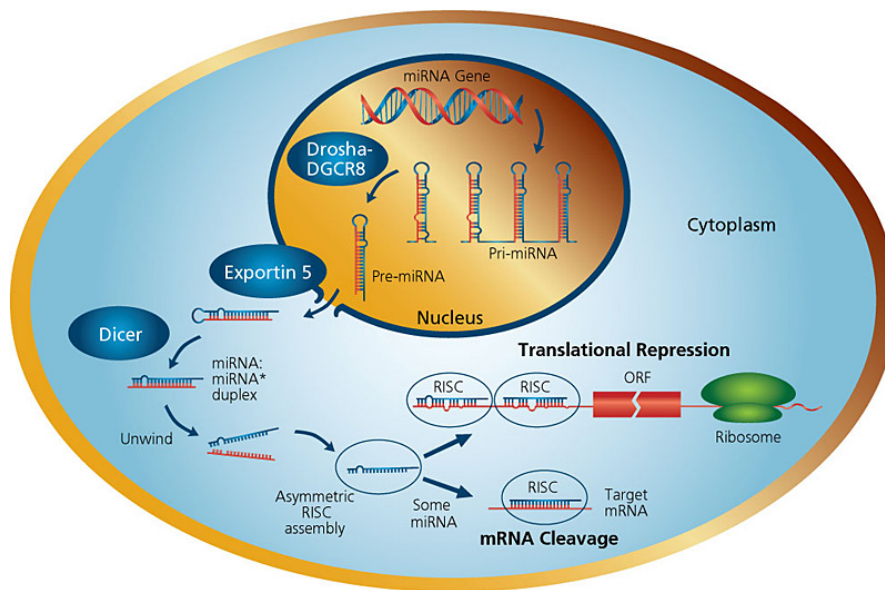
La metilación ocurre en regiones del DNA ricas en CpG (secuencias citosina-guanosina), mediante la adición covalente de un grupo metilo a la posición 5 del anillo de citosina, resultando en una metil-citosina. Los grupos de CpGs, llamados "islas CpG", generalmente se localizan dentro y alrededor de la región promotora de los genes. Las islas CpG hipermetiladas reprimen la expresión génica inhibiendo la transcripción, mientras las islas CpG no metiladas permiten la expresión de los genes cercanos. El estatus de metilación de la región promotora de un gen puede regular la expresión de genes posteriores en la cascada de señalización del gen metilado. Aunque se conoce poco de los perfiles de metilación de los diferentes tipos de carcinomas de tiroides la expresión de genes de con niveles de metilación aberrante se asocia tanto a disfunción tiroidea como a supresión tumoral (214-216).

Los genes específicos involucrados en la síntesis de hormonas tiroideas están con frecuencia desregulados durante la progresión del CT. En particular, causando anomalías tanto en la síntesis como en la secreción de hormonas tiroideas. Primero, se ha descrito que, el promotor de *TSHR* está hipermetilado y silenciado en los carcinomas de tiroides (214) y que el *NIS* está metilado y desactivado en los tumores tiroideos (215). Además, la desactivación de estos genes funcionales en las células del CT provocan una pérdida de la habilidad de concentrar yodo en los folículos.

Indudablemente el silenciamiento de genes supresores de tumor como el homólogo de la fosfatasa y tensina (*PTEN*) (217), el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 3 (*TIMP3*) (218), el receptor del ácido retinoico  $\beta 2$  (*RAR\beta 2*) (218) o *RAS* (association domain family protein 1), (*RASSF1*) (216), juega un papel importante en la carcinogénesis y la inducción de fenotipo agresivo de los diferentes tipos de tumores tiroideos (219).

## b. microRNAs (miRNA)

Los miRNAs representan otro mecanismo utilizado por las células para regular la expresión génica, y constituyen la clase más reciente de moléculas involucradas en la regulación epigenética. Se trata de pequeños RNAs (19-23nt) no codificantes endógenos que participan en la regulación génica a nivel post-transcripcional. Su forma de acción es a través de su unión a la región 3' UTR (no traducible) del mRNA diana, causando un bloqueo de la traducción o bien induciendo la degradación del mRNA (Figura 1.5) (220). Estas acciones tienen un impacto muy importante en diversos procesos biológicos incluyendo la carcinogénesis, y por lo tanto han cobrado una importancia creciente como marcadores de diagnóstico y pronóstico (221).



**Figura 1.5** Mecanismos de acción y función de los miRNAs. (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/mirna.html>)

A la fecha, se han descrito grupos de miRNAs sobre-expresados en el PTC *versus* tejido normal (miR-221, 222, 146, 21, 155, 181a y 181b) (222,223), y series de miRNAs desregulados en PTC *versus* bocios multinodulares (miR-21, 31, 221, 222) (224). También hay descritos perfiles específicos para subtipos tumorales: miRNAs sobre-expresados en PTC, (miR-187, 221, 222, 146b, 155, 122a, 31, 205, y 224), en FTC



convencionales (miR-187, 224, 155, 222, y 221), en FTC oncocíticos (miR-187, 221, 339, 183, 222, y 197), y en AF (miR-339, 224, 205, 210, 190, 328, y 342) (225). Además, se han descrito correlaciones significativas entre los patrones de expresión de miRNAs y las mutaciones somáticas en *PTC* (225,226) y *RET/PTC* (227). Se han descrito altos niveles de expresión de miR-187, 221, 222, 146b, 155, 224 y 197 en CT, y se ha propuesto, que su detección a partir de material de PAAF podría mejorar las tasas actuales de certeza en el diagnóstico de estos pacientes (225).

Los miRNAs miR-221 y 222 muestran una sobre-expresión consistente en PTC. Entre los genes diana destacan *c-KIT*, *CDKN1B*, *TNF*, y *MMP1*, hecho que sugiere un papel crucial en el proceso de la carcinogénesis tiroidea (222,228,229). Las isoformas de miR-146 (miR-146a y -146b) están igualmente sobre-expresadas en PTC. De acuerdo con los datos disponibles, el miR-146 actúa sobre *c-KIT*, *NF-κB*, *IL-1*, *TRAF6*, *IL-6*, *IL8*, *CXCR4*, *MMP9* y *EGFR* sugiriendo que miR-146b podría contribuir al desarrollo del tumor actuando sobre la vía de NF-κB (225,228,230). En relación a los marcadores de pronóstico ya existentes, Chou et al 2010 describe la sobre-expresión de miR- 221, 222 y 146b en tumores de mal pronóstico y con mutación en *BRAF* (230). Aunque existen controversias respecto a la asociación entre la expresión de estos miRNAs y la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> (231).

En el FTC se ha observado una sobre-expresión significativa y diferencial de miR-197 y miR-346 (232); y en los ATC, se ha descrito una expresión significativamente baja de miR-30d, 125b, 26a, y 30a-5p, y una sobre-expresión de miR-302, 205, 137, 187, 214, 181b, 155, 224, 222, y 221 (225).

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de confirmar la información de estas expresiones diferenciales en estudios independientes con suficiente número de pacientes y con un seguimiento clínico adecuado, así como también una caracterización completa de las dianas de estos miRNAs que pudieran proveer de nuevas dianas diagnósticas y/o terapéuticas.

## 10. Punto de partida de este estudio

Los avances en las técnicas moleculares de alto rendimiento han permitido identificar nuevos marcadores con posible utilidad como predictores de la evolución clínica. Así, estudios previos del grupo realizados mediante microarrays de cDNA generaron un clasificador de pronóstico clínico que reconocía los ATC y PDTC, y lo que es más importante, a los WDTC que recidivan y a los metastásicos. Esta firma molecular conlleva una clasificación pronóstica con un nivel de precisión del 95% en cuanto a evolución, y está constituida por 23 genes que se agrupan principalmente en las vías de señalización de la MAPK, TGF-  $\beta$ , adhesión focal y motilidad celular, activación de la polimerización de actina, y ciclo celular (233)(Tabla 1.4).

Las firmas moleculares nos permiten predecir el pronóstico, elegir terapias individualizadas contra dianas moleculares específicas e incluso ayudar a establecer estrategias de prevención. Sin embargo, un requisito indispensable es confirmar la expresión proteínica de estas firmas moleculares de expresión de genes para facilitar su utilización en la práctica clínica diaria. Por ello, el principal objetivo de esta investigación fue identificar firmas moleculares de diagnóstico y pronóstico mediante inmunohistoquímica.

A pesar de los numerosos estudios de perfiles proteínicos diferenciales en los WDTC, existen aún limitaciones graves para identificar en el momento del diagnóstico a pacientes que no responderán al tratamiento o con tumores de gran agresividad que se beneficiarían de una terapia personalizada. Con el objetivo de optimizar la identificación de marcadores de diagnóstico y pronóstico utilizamos una técnica de vanguardia como la secuenciación de nueva generación de miRNAs para obtener perfiles de expresión diferencial que contribuyan a resolver las limitaciones de la metodología utilizada hasta ahora. Si bien existe ya un trabajo utilizando esta metodología en los PTC, el principal aporte de este nuevo estudio sería que no se limitaría a un perfil descriptivo de patrones de expresión genómica, sino que se ha diseñado para obtener perfiles específicos de miRNAs de cada subtipo tumoral y su

asociación directa con la capacidad de predicción del pronóstico y su implicación con la presencia de la mutación  $BRAF^{V600E}$ .

**Tabla 1.4** Genes de la firma de pronóstico clínico identificada (233).

Símbolo del Gen	Descripción (según la base de datos Unigene <sup>#</sup> )	Cr <sup>1</sup>
ANLN	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i> )	7
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	17
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	20
CENPA	Centromere protein A, 17kDa	2
CCNB2	Cyclin B2	15
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	15
NUSAP1	Nucleolar and spindle associated protein 1	15
ASPM	Asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated ( <i>Drosophila</i> )	1
D2S448	Interleukin 1 receptor antagonist	2
DIAPH3	Diaphanous homolog 3 ( <i>Drosophila</i> )	13
RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	2
C10orf3	Chromosome 10 open reading frame 3. CEP55, centrosomal protein 55kDa	10
SIAH1	Seven in absentia homolog 1	16
SH3BGRL2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	6
C6orf209	Chromosome 6 open reading frame 209	6
SDK2	Sidekick homolog 2 (chicken)	17
APLP2	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	11
PTPRN2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	7
NCRMS	Non-coding RNA in rhabdomyosarcoma (RMS)	12
C7orf23	Chromosome 7 open reading frame 23	7
PDK2	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2.	17
ORMDL3	ORM1-like 3 ( <i>S. cerevisiae</i> )	17
PPAP2B	Phosphatidic acid phosphatase type 2B	1

# Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies ([www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)). <sup>1</sup>Cr, cromosoma.

## 2. Hipótesis y objetivos

## Hipótesis

1. El análisis inmunohistoquímico permite determinar un perfil proteínico diferencial respecto al pronóstico, a partir de la firma molecular pronóstica previamente obtenida mediante *microarrays*.
2. El perfil de microRNAs de los tumores del epitelio folicular tiroideo es diferente según su tipo histológico, genética y pronóstico.

## Objetivos

El objetivo global de esta investigación fue encontrar posibles marcadores para el diagnóstico y predicción del pronóstico de CT, evaluando mediante inmunohistoquímica la expresión de las proteínas de los genes identificados en investigaciones previas y relacionados con un peor pronóstico evolutivo en carcinomas diferenciados de tiroides. Además, se planteó determinar perfiles de expresión de miRNAs que puedan estar relacionados con el diagnóstico y la predicción del pronóstico en CT. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Correlacionar el perfil de expresión de proteínas de los tumores con los parámetros demográficos y clínicos, las características histológicas y la respuesta a tratamiento.
2. Identificar las mutaciones tempranas en los genes *BRAF* y *RAS*.
3. Establecer un perfil inmunohistoquímico que contribuya a determinar el pronóstico evolutivo de los carcinomas diferenciados de tiroides.
4. Establecer un perfil inmunohistoquímico que diferencie adenomas foliculares de carcinomas foliculares o carcinomas papilares de variante folicular.
5. Establecer un perfil de expresión de miRNAs que diferencie adenomas foliculares de carcinomas foliculares.
6. Explorar la correlación entre los patrones de expresión de miRNAs y las mutaciones oncogénicas específicas y el pronóstico evolutivo.

### 3. Material y métodos

## 1. Pacientes y datos clínicos

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se reunieron 4 series de casos, procedentes de los siguientes hospitales: Arnau de Vilanova de Lleida (HUAV), Bellvitge de Hospitalet de Llobregat (HUB), Clínic de Barcelona (HCB), Germans Trias i Pujol de Badalona (HGTP), Granollers de Granollers (HG), Sabadell de Sabadell (HPT), Clínic de Santiago de Compostela (HCS). Los tejidos fueron tratados con los protocolos normalizados de inclusión en parafina existentes en cada hospital participante en el estudio, o de inclusión en O.C.T.<sup>™</sup> del Biobanco del Hospital Arnau de Vilanova en el caso de la serie de tejidos congelados.

Los objetivos planteados en este estudio, requerían compilar los datos de tumores de tiroides con características muy distintas. Las cuatro series con las que se desarrollaron los estudios están resumidas en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Características generales de las series incluidas en el estudio.

Serie	N	Composición	Fecha de recolección	Hospitales de origen	Uso
General	313	Parafinas: AF, PTC, FTC, PDTC, ATC	1990 - 2010	HUAV, HPT, HUB, HCB, HGTP, HG y HCS	Pronóstico
HNT	40	Parafinas: HNT	2007	HUAV	Diagnóstico
PAAF	38	Bloques celulares de PAAF: AF, FTC, FVPTC	2000 - 2012	HUAV	Diagnóstico Pre-operatorio
miRNAs	68	Tejido congelado: AF, PTC, FTC	2004 - 2012	HUAV	miRNAs

AF:adenoma folicular, PTC: carcinoma papilar, FTC: carcinoma folicular, PDTC: carcinoma pobremente diferenciado, ATC: carcinoma anaplásico, HNT: hiperplasia nodular de tiroides, PAAF: punción aspiración con aguja fina.

### 1.1 Identificación de marcadores de pronóstico. Serie general

Para la identificación de marcadores de pronóstico se reunió una serie de 313 casos que en adelante denominaremos, serie general. La serie general requirió la recopilación de información clínico-patológica que permitiera la clasificación de los pacientes según la evolución de la enfermedad.

Para ello se diseñó un formulario que contenía información de las siguientes características:

1. Demográficas

Fecha de nacimiento, sexo, antecedentes de radioterapia cervical y antecedentes familiares de CT.

2. Quirúrgicas

Fecha y tipo de cirugía, linfadenectomía y tipo de linfadenectomía.

3. Anatomía patológica

Diámetro del tumor, multifocalidad, bilateralidad, invasión local y localización, metástasis ganglionares y localización, TNM y estadio, diagnóstico e histología residual.

4. Tratamiento y evolución

Tratamiento con I<sup>131</sup>, dosis de ablación y dosis acumulada de I<sup>131</sup>, recidiva, fecha y localización de la recidiva, tiroglobulina positiva sin localización, anticuerpos anti-tiroglobulina y título, fecha de éxitus y causa del mismo, y fecha del último seguimiento.

La información clínica de todos los casos fue revisada por un endocrinólogo del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Arnau de Vilanova, y con base en esta información, los casos de WDTC fueron clasificados como de buen o mal pronóstico e incluidos en el estudio si cumplían con los siguientes criterios:

1. Fueron considerados casos de buen pronóstico cuando los pacientes tuvieron como mínimo cuatro años de seguimiento libres de enfermedad tras el tratamiento inicial, definido como la ausencia de detección de tiroglobulina tras obtener una tirotropina adecuadamente estimulada, junto con una ecografía cervical sin hallazgos patológicos o en su defecto con un rastreo corporal total con I<sup>131</sup> negativo.

2. Fueron considerados casos de mal pronóstico cuando los pacientes presentaron persistencia de la enfermedad o recidiva (tiroglobulina detectable con o sin localización o anticuerpos anti-tiroglobulina positivos que no se negativizaron o tejido tumoral detectado en pruebas de imagen).



3. Las parafinas debían tener material en buen estado y suficiente para realizar los TMAs y las extracciones para los análisis genéticos.

**Tabla 3.2** Número de tumores en la serie general clasificados según diagnóstico y pronóstico.

Tipo	Diagnóstico	Buen pronóstico	Mal pronóstico	Totales
WDTC	PTC	76	56	132
	FVPTC	27	8	35
	TCPTC	2	3	5
	WLPTC	2	1	3
	SDPTC	4	3	7
	FTC	5	4	9
	OVFTC	4	2	6
ATC	ATC	-	-	12
PDTC	PDTC	-	-	23
AF	AF	-	-	81
Totales		120	77	313

Los AF de la serie estaban constituidos por: 61 (75,3%) convencionales, 18 (22,2%) de variante oncocítica y 2 (2,5%) de la variante macrofolicular. Los FTC estaban constituidos por: 2 (13,3%) ampliamente invasivos, 6 (40,0%) mínimamente invasivos, 6 (40,0%) oncocíticos y 1 (6,7%) caso para el que no se especificaba grado de invasión o tipo de variante. Los PTC estaban conformados por: 129 (70,9%) convencionales, 35 (19,2%) foliculares, 7 (3,9%) esclerosante difusa, 5 (2,8%) células altas, 3 (1,65%) Warthin-like, 2 (1,1%) oncocíticos y 1 (0,6%) de patrón sólido.

## 1.2 Identificación de marcadores de diagnóstico. Series PAAF y HNT

Para la identificación de marcadores que permitieran mejorar el diagnóstico, además de la serie general, se reunieron dos series más:

1. Una serie de 40 casos de HNT, de cuyos pacientes se recopilaron datos básicos como edad, sexo, tamaño del tumor, fecha de nacimiento, y fecha de cirugía.

2. Una serie de 38 bloques celulares de PAAF, de cuyos pacientes se recopilaban datos básicos como, fecha de nacimiento y fecha de realización de la PAAF, clasificación según el sistema Bethesda de la citología y diagnóstico del tumor resecado.

### 1.2.1 Serie de hiperplasia nodular de tiroides (HNT)

Todos los casos de esta serie provenían del mismo centro. De acuerdo con los informes de anatomía patológica, sólo en 10 casos un nódulo destacaba entre los demás y se registró el diámetro.

**Tabla 3.3** Características generales de la serie de HNT.

Característica	Valores
Sexo	
Hombre	7 (17,5%)
Mujer	33 (82,5%)
Tamaño del tumor (n=10)	
Mediana[P25;P75]	3,25 [2,12;3,88]
Edad (n=40)	
Mediana[P25;P75]	56,0 [44,0;66,2]

### 1.2.2 Serie de punción-aspiración con aguja fina

Los 38 casos de la serie correspondían a 12 AF, 13 HNT y 13 FVPTC/FTC (4 FVPTC, 9 FTC). La edad mediana [P25;P75] de realización de la PAAF para los 38 pacientes fue de 45 [38,0;53,5] años, y la mediana [P25;P75] de tiempo de seguimiento posterior fue de 2,7 [1,3;4,5] años.

La mitad de las PAAF seleccionadas, tenía un diagnóstico de proliferación moderadamente celular, "indeterminada". Una vez emitidos los diagnósticos de anatomía patológica en los tumores resecados, el 73,7% fueron HNT o AF, y el 26,3% fueron FVPTC/FTC.

**Tabla 3.4** Características de la serie de PAAF.

Características	HNT	AF	FTC/FVPTC	P valor
	N=13	N=12	N=13	
PAAF Sistema Bethesda				0,224
- Benigno (levemente celular)	7 (53,8%)	2 (15,4%)	4 (30,8%)	
- Indeterminado (moderadamente celular)	5 (26,3%)	9 (47,4%)	5 (26,3%)	
- Potencialmente neoplásico (densamente celular)	1 (20,0%)	1 (20,0%)	3 (60,0%)	
- Sospechoso neoplasia (Rasgos sugerentes de PTC)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (100,0%)	
Edad (años) Mediana [P25;P75]	52,0 [46,0;56,0]	40 [37,5;55,0]	0 [31,0;43,0]	0,002

Para conocer el grado de concordancia entre el diagnóstico de la PAAF y el diagnóstico de anatomía patológica después de la resección del tumor, se realizó un análisis de correlación policórica, y el resultado fue de  $c=0,26$ , lo que indica que el grado de concordancia entre los diagnósticos fue muy bajo. La falta de concordancia entre el diagnóstico de las PAAF y el diagnóstico después de la cirugía fue de 30,8% en las PAAF clasificadas como benignas (34,2%), y de 33,3% en las PAAF clasificadas como sospechosas o potencialmente neoplásicas (15,8%).

### 1.3 Identificación de miRNAs. Serie miRNA

Finalmente, para la identificación de los miRNAs diferencialmente expresados según tipos histológicos, presencia de la mutación  $BRAF^{V600E}$  y pronóstico, se reunieron 59 tumores y 9 tejidos normales de tiroides. Como uno de los objetivos planteados fue identificar miRNAs diferencialmente expresados según pronóstico, la inclusión de los pacientes en esta serie siguió los criterios arriba mencionados para la serie general.

La serie miRNA, estaba constituida por 35 PTCnoFV, 8 FVPTC, 6 FTC y 10 AF. Los AF tenían una proporción hombre:mujer de 1:2,3; la mediana [P25;P75] de edad del grupo fue de 50 [35,0;57,8] años, y la del diámetro del tumor de 4 [4,0;4,5]cm. En los PTCnoFV, el 33(94,3%) eran mujeres y la mediana [P25;P75] de edad del grupo fue de 49 [35,0;60,0] años. En este grupo, 14 (40%) casos presentaron metástasis ganglionares y multifocalidad; y 23 (65,7%) casos tenían invasión local en el

momento del diagnóstico. Sin embargo, sólo 1 (12,5%) caso del grupo de FVPTC presentó multifocalidad. La mediana [P25;P75] del diámetro del tumor fue de 2,6 [1,5;3,5]cm en los PTCnoFV, 4,8 [2,4;5,5]cm en los FVPTC y 4,3 [3,4;4,9]cm en los FTC. Respecto al estatus genético, 20 (57,1%) de los PTCnoFV presentaba mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>, y 1 (12,5%) de los FVPTC presentó una mutación en el gen *NRAS*. Ninguno de los casos de esta serie tenía mutación en los genes *HRAS* o *KRAS*.

## 2. Diseño y construcción de las matrices de tejido (TMA)

El diagnóstico de todos los casos fue confirmado de forma independiente por dos patólogos del Servicio de Anatomía y Genética Molecular del Hospital Arnau de Vilanova. Para ello se cortó con el micrótomo una sección de 3-5µm de grosor, y se tiñó con hematoxilina y eosina (HE). Los patólogos valoraron éstas preparaciones mediante observación con el microscopio óptico según los criterios actuales de la OMS (23).

El protocolo de tinción de las secciones de hematoxilina-eosina (HE) se detalla a continuación:

1. Los cortes se desparafinan en la batería de xilol ⇒ xilol ⇒ xilol-alcohol (1:1) ⇒ alcohol absoluto ⇒ alcohol absoluto ⇒ alcohol 96% ⇒ alcohol 80% ⇒ alcohol 50% ⇒ Agua.
2. Teñir con hematoxilina 3 minutos
3. Lavar con agua destilada
4. Teñir con eosina 2 minutos
5. Eliminar los restos de eosina con alcohol
6. Deshidratar con batería de alcohol 50% ⇒ alcohol 80% ⇒ alcohol 96% ⇒ alcohol absoluto ⇒ alcohol absoluto ⇒ xilol-alcohol (1:1) ⇒ xilol ⇒ xilol
7. Montar un cubre objetos sobre la preparación con medio de montaje (EUKITT).

En los cristales de HE de cada caso se marcaron las áreas de tejido tumoral y no tumoral que se utilizarían para hacer los TMAs. Se diseñaron plantillas para reconocer la localización exacta de cada caso, ubicando 2 cilindros guía de un tejido diferente al tiroides y, a continuación, 2 cilindros de tumor y 1 de tejido no tumoral, por duplicado de cada caso. El diámetro de los cilindros fue de 1 mm.

Una vez marcadas las áreas de tejido tumoral y no tumoral en las HE, preparado el bloque receptor y diseñadas las plantillas se fabricaron los TMAs con la ayuda de un Tissue Arrayer Manual (Beecher Instrument, MD, USA), siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

Nota: La aguja más gruesa (azul) de cada juego es la que hace el cilindro del bloque donante y la más pequeña (roja) hace el agujero en el bloque receptor. La profundidad a la que baja la aguja que hace el agujero en el bloque receptor es de 3mm.

1. Se coloca el bloque receptor en la base del *tissue arrayer*, se asegura y se ajustan los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas de los cilindros.
2. Se hace el primer agujero en el bloque de parafina receptor; para ello se introduce la aguja más pequeña hasta llegar al tope. Se extrae el cilindro de parafina y se descarta.
3. Se pone la plataforma sobre el bloque receptor y sobre ella el bloque donante. Se utiliza la aguja más gruesa para sacar un cilindro de tejido del área que nos interesa.
4. Se retira la plataforma con el bloque donante y se introduce el cilindro en el bloque receptor.
5. Se mueve el micrómetro para llegar a la siguiente posición y se repiten los pasos 4, 5 y 6 hasta terminar todos los casos.
6. Una vez finalizada la construcción del TMA se incuba el bloque durante 30 minutos a 37°– 40°C. Cuando está frío se corta con el micrótopo en secciones de 3-5µm, y se embeben en parafina para una mejor conservación hasta el momento de su utilización.

### 3. Expresión de las proteínas codificadas por los genes de la firma molecular mediante inmunohistoquímica

Primero, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar los posibles controles positivos, teniendo en cuenta también los sugeridos por las empresas proveedoras de los anticuerpos. Después, para la optimización de los anticuerpos se siguió el protocolo general de la técnica de inmunohistoquímica para tejidos embebidos en parafina, realizando las modificaciones necesarias para optimizar el protocolo de cada anticuerpo. Se utilizó el kit de tinción inmunohistoquímica Envision™ Flex (Dako, Denmark). El protocolo general de realización de la técnica se detalla a continuación:

**3.1 Desparafinización y rehidratación:** la desparafinización y rehidratación de los tejidos se realiza mediante el lavado sucesivo de los cortes en: xilol ⇒ xilol ⇒ xilol-alcohol (1:1) ⇒ alcohol absoluto ⇒ alcohol absoluto ⇒ alcohol 96% ⇒ alcohol 80% ⇒ alcohol 50% ⇒ agua. Los tiempos son de cinco minutos en los de xilol y cuatro minutos en las demás soluciones.

**3.2 Recuperación de antígeno:** este paso es necesario debido a que durante el proceso de fijación del tejido se forman puentes de metileno. De modo que es necesario realizar un desenmascaramiento de los sitios antigénicos. Los dos métodos utilizados son por calor HIER (*heat-induced epitope retrieval*), utilizado en este estudio, y el enzimático. La recuperación antigénica por calor se realiza utilizando una olla a presión, microondas o en baño de María (95°C), en soluciones de EDTA pH9 o citrato de sodio pH6. En este estudio, se utilizó el equipo PT Link (DAKO, Denmark), el tiempo de incubación fue de 20 minutos a 95°C.

#### 3.3 Protocolo general de tinción inmunohistoquímica.

La tinción se realizó siguiendo el protocolo general en el equipo Autostainer Plus (DAKO, Denmark).

- a. Bloqueo de la actividad enzimática endógena mediante el uso de un tampón fosfato con peróxido de hidrógeno (DM821), o una solución de peróxido de hidrógeno en metanol a concentraciones entre 0,3 y 3%.
- b. Lavado con tampón, *Tris Buffered Saline with Tween* (DM823).
- c. Incubación con el anticuerpo primario; las diluciones utilizadas se modifican dependiendo de los resultados obtenidos en las pruebas de optimización realizadas con cada anticuerpo (Tabla 3.5).
- d. Lavado con tampón, *Tris Buffered Saline with Tween* (DM823)
- e. En algunos casos se utilizó un *Linker* para aumentar la señal. En estos casos el *Linker mouse* o *rabbit* fue incubado durante 15 minutos.
- f. Lavado con tampón, *Tris Buffered Saline with Tween* (DM823)
- g. Incubación con el anticuerpo secundario, incubación con LSAB+System-HRP (Labeled Streptavidin Biotin Dako K0690), 15' de Link  $\Rightarrow$  Lavado con Buffer  $\Rightarrow$  15' Steptavidin peroxidase; o con Envision/HRP (DM822), la elección del secundario y el tiempo de incubación depende de si el anticuerpo fue producido en ratón, conejo o cabra y de los resultados obtenidos en la optimización de cada anticuerpo.
- h. Lavado con tampón, *Tris Buffered Saline with Tween* (DM823)
- i. Incubación con el cromógeno, DAB ( Diaminobencidina) (K3468).
- j. Lavado con tampón, *Tris Buffered Saline with Tween* (DM823).
- k. Tinción con solución de contraste, Hematoxilina (S3301).
- l. Lavado con tampón, *Tris Buffered Saline with Tween* (DM823).
- m. Lavado con Agua.

**3.4 Deshidratación y montaje.** La deshidratación de los tejidos se realiza mediante el lavado de los cortes en una batería de alcoholes:

alcohol 50%  $\Rightarrow$  alcohol 80%  $\Rightarrow$  alcohol 96%  $\Rightarrow$  alcohol absoluto  $\Rightarrow$  alcohol absoluto  $\Rightarrow$  xilol-alcohol (1:1)  $\Rightarrow$  xilol  $\Rightarrow$  xilol. Finalmente, se realiza el montaje de los cristales.

**Tabla 3.5** Anticuerpos, control positivo y diluciones utilizadas en el estudio.

Anticuerpo	Clon	Control Positivo	Proveedor	Dilución
Anti-KI-67	V9	Amígdala	Dako	Pre diluido
Anti-Vimentina	MIB-1	Apéndice	Dako	Pre diluido
Anti-ANLN	Policlonal	Amígdala	Abcam	1/500
Anti-BIRC5	Policlonal	Estómago	Sigma	1/1000
Anti-UBE2C	9D3	Cáncer de Colon	Abnova	1/500
Anti-CENP-A	Policlonal	Células HeLa	Santa Cruz	1/200
Anti-CCNB2	Policlonal	Amígdala	Sigma	1/500
Anti-PRC1	EP1513Y	Cáncer cervical	Abcam	1/1000
Anti-NUSAP1	Policlonal	Amígdala	Proteintech	1/500
Anti-ASPM	Policlonal	Células HeLa	Santa Cruz	1/500
Anti-IL1RN	Policlonal	Amígdala	Sigma	1/800
Anti-DIAPH3	Policlonal	Timo	Proteintech	1/400
Anti-RRM2	Monoclonal	Estómago	Abnova	1/1000
Anti-CEP55	Monoclonal	Cáncer Hepatocelular	Sigma-Aldrich	1/600
Anti-SIAH1	Monoclonal	Amígdala	Sigma Aldrich	1/2000
Anti-SDK2	Policlonal	Cerebelo	Sigma	1/200
Anti-APLP2	Policlonal	Placenta	Abcam	1/1000
Anti-PTPRN2	Policlonal	Páncreas	Sigma	1/200
Anti-PDK2	Policlonal	Páncreas	Sigma	1/500
Anti-PPAP2B	Policlonal	Placenta	Sigma	1/300
Anti-LMBRD1	Policlonal	Cerebro	Sigma	1/500

### 3.5 Valoración del patrón de tinción

Todos los casos fueron teñidos con los anticuerpos para KI-67 y vimentina con el fin de evaluar la integridad antigénica de las proteínas nucleares y citoplasmáticas respectivamente. Una vez evaluada la integridad antigénica se tiñeron los casos con los anticuerpos del estudio. La evaluación de los casos se realizó mediante observación en el microscopio óptico por un patólogo y un investigador de forma independiente contrastando los resultados y reevaluándose aquellos discrepantes.

El criterio para la valoración de las muestras fue el H-Score, que es la relación entre el porcentaje de las células teñidas con intensidad baja, moderada o alta:



$$\text{H-score} = (\text{N1} * 1) + (\text{N2} * 2) + (\text{N3} * 3)$$

En la ecuación, N1, N2 y N3 corresponden al porcentaje de células teñidas con cada intensidad. La intensidad de la tinción, baja, moderada o alta corresponden a los números 1, 2 y 3 respectivamente.

El valor obtenido es un número de 0 a 300 con el que se realizaron los análisis estadísticos.

## 4. Identificación de las alteraciones genéticas asociadas a las diferentes patologías

### 4.1 Extracción del DNA del tejido incluido en parafina

Para la extracción del DNA de los tejidos incluidos en parafina se utilizaron entre 20 a 40 secciones de 7µm de grosor de cada uno de los tejidos tumorales incluidos en el estudio. La extracción de DNA de este material se realizó siguiendo el protocolo de extracción comercial *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Quiagen, USA), incluyendo algunas modificaciones:

1. Añadir xilol a los cortes de tejido incluidos en parafina
2. Agitar con el vórtex 3 minutos y centrifugar 3 minutos a 13000 rpm
3. Eliminar el sobrenadante y repetir los pasos 1, 2 y 3
4. Añadir alcohol absoluto
5. Agitar con el vórtex 3 minutos, y centrifugar 3 minutos a 13.000 rpm
6. Eliminar el sobrenadante, y repetir los pasos 4, 5 y 6
7. Dejar secar el pellet 10 minutos a 60°C
8. Añadir 180µl de ATL y 20µl de proteinasa K e incubar a 60°C ON
9. Añadir 200µl de AL y 200µl de alcohol absoluto y agitar con el vórtex
10. Pasar la mezcla a una columna colocada en un tubo colector
11. Centrifugar a 13.000 durante 1 minuto y descartar el tubo colector
12. Añadir 500µl de la solución AW1 a la columna
13. Centrifugar a 13000 durante 1 minuto y descartar el tubo colector

14. Añadir 500µl de la solución AW2 a la columna
15. Centrifugar a 13.000 durante 3 minutos, para secar completamente la membrana de la columna
16. Colocar la columna en un nuevo tubo donde eluir el DNA extraído.
17. Añadir 50µl de la solución AE directamente sobre la membrana
18. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 13.000 durante 1 minuto para eluir.

#### 4.2 Cuantificación del DNA extraído

El DNA extraído se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para lo que fue necesario 0.8µl de la muestra original. Después se guardó a -80°C hasta su utilización.

#### 4.3 Caracterización de las mutaciones recurrentes *BRAF*, *HRAS*, *NRAS* y *KRAS*

El ADN genómico extraído fue utilizado para identificar mutaciones somáticas presentes en los tejidos tumorales. Este análisis se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y fue necesario diseñar cebadores o primers específicos para cada uno de los fragmentos a amplificar. Las condiciones de la PCR, el tamaño de los amplicones y la secuencia de los cebadores para cada fragmento se detallan en la tabla 3.4.

La secuencia de nucleótidos de cada uno de los genes estudiados se extrajo de la base de datos del proyecto *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). El diseño de los cebadores se realizó a través de la herramienta bioinformática Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>). Además se comprobó que la secuencia genómica complementaria a estos cebadores no presentara polimorfismos, y que el producto de la amplificación fuera únicamente el esperado mediante la herramienta PCR *in-silico* disponible en el buscador UCSC (University of California Santa Cruz; <http://genome.brc.mcw.edu>).

Todas las reacciones de PCR incluyeron un tubo sin ADN (control de contaminación) y se realizaron en un volumen final de 25µl, que contenía:

100ng de ADN genómico, un 10% del volumen final de solución de PCR 10X (cloruro potásico 50mM, Tris 10 mM), 1.5 mM cloruro de magnesio, 200  $\mu$ M de una mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 pmoles de cada uno de los cebadores diseñado para flanquear los fragmentos a analizar y 2 unidades de Taq polimerasa.

La reacción se llevó a cabo en termocicladores Eppendorf (MasterCycler Epgradient S, Alemania).

Las muestras amplificadas fueron testadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, (Metaphor, Biowhitaker Molecular Applications), y teñido con GelRed (dilución 1:50.000). Los tamaños de los productos amplificadas fueron comparados con el marcador de peso molecular (100 bp Ladder, Biotools), del cual se utilizaron 500ng en cada electroforesis. Los productos amplificadas del tamaño esperado fueron purificados y secuenciados.

Fue necesario llevar a cabo una PCR anidada o *nested-PCR* sobre el producto de la primera PCR para algunos de los ADN extraídos de tejidos embebidos en parafina porque la muestra no se había amplificado suficiente en la primera ronda de PCR. Para ello se diseñó un primer interno dentro del amplicon de la primera PCR. Las secuencias de estos nuevos cebadores y las condiciones de estas reacciones también se detallan en la tabla 3.6. Las reacciones anidadas se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l, utilizando:

1  $\mu$ l del volumen de la primera PCR (incluyendo el blanco), un 10% del volumen final de solución de PCR 10X (cloruro potásico 50mM, Tris 10 mM), 1,5 mM cloruro de magnesio, 200  $\mu$ M de una mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 10 pmoles de cada uno de los cebadores y 2 unidades de Taq polimerasa.

La reacción se llevo a cabo en termocicladores Eppendorf (MasterCycler Epgradient S, Alemania).

#### **4.4 Purificación de los fragmentos amplificados mediante PCR**

Para eliminar restos de cebadores y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación, se empleó el reactivo ExoSAP-IT™ (GE Healthcare), que contiene una mezcla de las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina.

1. Mezclar 2µl de ExoSAP-IT™ y 5µl de producto de PCR
2. Incubar a 37°C durante 15 minutos
3. Incubar a 80°C durante 15 minutos.

#### **4.5 Secuenciación de los fragmentos purificados**

Los amplicones purificados fueron secuenciados de forma automática utilizando terminadores fluorescentes Big Dye™ (Applied Biosystems, CA, USA), y un secuenciador multicapilar ABI modelo 3730xl (Applied Biosystems, CA, USA). Para el análisis de los electroferogramas resultantes de la secuenciación, se utilizó el programa FinchTV, versión 1.4 (Applied Biosystems, CA, USA).

**Tabla 3.6** Secuencias de los cebadores, condiciones de la PCR y tamaño de los amplicones para cada uno de los fragmentos estudiados.

	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores (5'→3')	Tamaño del amplicon	Condiciones de la PCR
BRAF exón 15	BRAF e 15 F	TTCATAATGCTTGCTCTGATAGGA	235 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	BRAF e 15 R	AGCATCTCAGGGCCAAAAA		
BRAF exón 15 <u>PCR</u> <u>anidada</u>	BRAF e15 interno F	TTTTCCITTACTIONACTACACCTCAG	190 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 62°C, 30''; 72°C, 30'')x5, (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x5, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	BRAF e 15 R	AGCATCTCAGGGCCAAAAA		
HRAS exón 1	HRAS e1 F	CAGGAGACCCTGTAGGAGGA	227 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	HRAS e1 R	CCTATCCTGGCTGTGTCTCTG		
HRAS exón 2	HRAS e2 F	GATTCCTACCGGAAGCAGGT	141 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	HRAS e2 R	GATGGCAAACACACACAGGA		
KRAS exón 1	KRAS e1 F	GCCTGCTGAAAATGACTGAA	167 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	KRAS e1 R	TTGGATCATATTCGTCACACA		
KRAS exón 2	KRAS e2 F	TAGTAATTGATGGAGAAACCTG	177 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	KRAS e2 R	ATTCAATTTAAACCCACCTATA		
NRAS exón 1	NRAS e1 F	GTCACACTAGGGTTTTTCATT	210 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	NRAS e1 R	TCATATTCATCTACAAAGTGGT		
NRAS exón 2	NRAS e2 F	AGAAATGGGCTTGAATAGTT	284 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	NRAS e2 R	CCGCAAATGACTTGCTAT		
NRAS exón 2 <u>PCR</u> <u>anidada</u>	NRAS e2 interno F	TTGCATTCCCTGTGGTTTTT	238 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94°C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94°C, 30''; 60°C, 30''; 72°C, 30'')x10, (94°C, 30''; 58°C, 30''; 72°C, 30'')x10; <u>Elongación final:</u> 72°C, 10'
	NRAS e2 R	CCGCAAATGACTTGCTAT		

## 5. Secuenciación de los miRNAs con la tecnología de miRNAseq

### 5.1 Extracción del RNA del tejido congelado

Para la extracción de RNA se utilizaron entre 30 y 50 secciones de 7 $\mu$ m de grosor de cada una de las piezas de tejido congelado incluido en O.C.T.™ Se realizó un lavado del tejido con 10ml de agua DPEC (dietilpirocarbonato) para eliminar el O.C.T. El RNA se extrajo según el protocolo de TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH):

1. Homogeneizar las secciones (50-100 mg de tejido aproximadamente) en 1ml de TriReagent. Dejar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
2. Añadir 0,2ml de cloroformo. Mezclar vigorosamente. Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Centrifugar durante 15 minutos a 4°C y 13.000 rpm.
- 4.- Recuperar la fase acuosa y añadir 0,5ml de isopropanol. Mezclar e incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Centrifugar 10 minutos a 4°C y 13.000rpm.
- 6.- Descartar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 70%.
- 7.- Centrifugar 5 minutos a 4°C y 11.000rpm.
- 8.- Secar el sedimento durante 20 minutos.
- 9.- Resuspender en 20 $\mu$ l de agua DEPC. Usar 1 $\mu$ l para cuantificar con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

### 5.2 Purificación del RNA

La purificación del RNA se realizó siguiendo el protocolo comercial RNeasy® MinElute™ Cleanup Kit (Quiagen, USA):

1. Ajustar el volumen de la muestra a 100 $\mu$ l con agua libre de RNasa
2. Añadir 350 $\mu$ l de RLT y mezclar muy bien
3. Añadir 250 $\mu$ l de etanol 96-100% y mezclar
4. Transferir los 700 $\mu$ l a la columna
5. Centrifugar 15 segundos a 10.000rpm

6. Añadir 500µl de tampón RPE
7. Centrifugar 15 segundos a 10.000rpm
8. Añadir 500µl etanol 80%
9. Centrifugar 2 minutos a 10.000rpm
10. Centrifugar 5 minutos a 13.000rpm y poner un tubo de 1,5ml
11. Añadir 14µl agua libre de RNasa directamente sobre la membrana
12. Centrifugar a 13.000rpm durante 1 minuto para eluir

Se utilizó 0,8µl para testar la calidad del RNA con el bioanalizador de Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El volumen sobrante fue conservado a -80°C hasta su utilización.

### 5.3 Secuenciación

La construcción de las librerías y demás protocolos de secuenciación de los miRNAs se realizaron en el servicio de genómica del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid. Se siguieron los protocolos del equipo Illumina Genome Analyzer IIx (GAIIx), y el procesamiento de los datos primarios, el análisis de la imagen y la asignación de bases a los picos del cromatograma por ciclo se realizó con el software Real Time (RTA1.9), y la conversión al formato de lectura FASTQ fue realizada por Casava-1.8, los dos paquetes de software de Illumina.

## 6. Análisis estadístico

La totalidad de los datos fueron analizados con el programa R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0,05$ .

### **6.1 Análisis de las características demográficas y clínicas de los pacientes y patológicas de los tumores**

Para analizar el significado de las diferencias en las características demográficas y clínicas de los casos, como las patológicas de los tumores se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis en las variables cuantitativas y la prueba de  $\chi^2$  en las variables cualitativas. Para conocer las diferencias entre los dos tipos de WDTC (FTC y PTC) y entre los WDTC de buen y mal pronóstico se utilizó la prueba de Mann-Whitney en las variables cuantitativas y la prueba de  $\chi^2$  en las variables cualitativas. La supervivencia libre de progresión, definida como recidiva o muerte por CT, se estimó utilizando el test de Kaplan-Meier.

### **6.2 Análisis de la expresión inmunohistoquímica y diseño de los modelos para diagnóstico y predicción del pronóstico**

La inmunohistoquímica es una prueba comúnmente utilizada para validar los resultados obtenidos en pruebas de alto rendimiento como los *microarrays* de cDNA (234). Sin embargo, es importante comprobar que los valores de H-score en los TMAs de la serie general fueran representativos de los casos, a través de un procedimiento de validación. Para ello, se aplicó un programa de generación de muestreo aleatorio estratificado por tipo de tumor, que seleccionó 30 casos de la serie, se realizó la inmunohistoquímica en una sección completa de cada tumor con los 19 anticuerpos validados, y se efectuaron las siguientes análisis:

- a. La prueba de Wilcoxon apareado que informa si existe un sesgo sistemático entre la sección completa de los tumores y el TMA para la expresión de cada proteína.
- b. La correlación de Spearman para evaluar la asociación entre los valores de H-scores de los TMAs respecto a los de las secciones completas para la expresión de cada proteína.
- c. El coeficiente de correlación intra-clase, para medir la fiabilidad de las valoraciones cuantitativas en la expresión de cada proteína.
- d. El índice Kappa, que proporciona una medida de fiabilidad para datos cualitativos resultantes de categorizar los H-scores según presenten o no expresión, ya que para algunos anticuerpos la expresión fue nula.



Después se construyeron matrices con las correlaciones de Spearman que evaluaron la correlación entre la expresión de pares de proteínas estudiadas. Se realizó también un análisis con la técnica del *random forest*, en base a los índices de reducción media de la precisión y *Gini*, que permitieron identificar, mediante un análisis no supervisado, las proteínas que presentan un patrón de expresión similar. Luego, el análisis supervisado identificó un conjunto reducido de proteínas cuyo perfil de expresión permitió clasificar los casos según su comportamiento, es decir, de buen y mal pronóstico. También se realizó este análisis para diferenciar AF de FTC.

Se realizó un análisis multivariante de la expresión inmunohistoquímica utilizando la prueba exacta de Mann-Whitney y la prueba exacta de Fisher para evaluar las diferencias y porcentaje de expresión ( $H\text{-score} > 0$  versus  $H\text{-score} = 0$ ) entre los casos de buen y mal pronóstico. A continuación, se construyeron los árboles de clasificación, los que mediante análisis de partición recursiva aplicado a múltiples variables permite construir un árbol de decisión para clasificar correctamente los casos según la progresión, optimizando la sensibilidad y la especificidad. También se calcularon sistemas de puntuación que fueron optimizados por capacidad de discriminación, y se acabaron de configurar comprobando su comportamiento.

El modelo de regresión logística incorporó la expresión de las proteínas y las variables clínicas, relativas a la edad, sexo, diámetro del tumor, mutaciones y las metástasis al diagnóstico. Este procedimiento proporcionó la serie de variables que discriminaban mejor los casos que progresaron. Las variables se escogieron para maximizar el área bajo la curva ROC, siempre que demostraran una contribución estadísticamente significativa al modelo según la prueba de razón de verosimilitud entre el modelo con y sin la variable. Se evaluó la calibración del modelo con la prueba de Hosmer-Lemeshow, para evaluar la bondad de ajuste, es decir, el grado en que los valores predichos por el modelo se acercan a los valores observados, y luego se calculó el área bajo curva ROC que valoró el poder de discriminación, que es el grado en que el modelo distingue entre individuos en los que ocurre el evento y los que no.

Posteriormente, el modelo se simplificó en una suma de puntuaciones enteras en función de la magnitud de los coeficientes del modelo, es decir, de la importancia de la expresión de la proteína para discriminar entre los dos grupos a identificar por el modelo.

Seguidamente, se hizo el análisis de supervivencia o regresión de Cox en función de las mismas variables identificadas por el modelo logístico, incorporando el tiempo libre de progresión; y se comprobó la hipótesis de riesgos proporcionales del modelo de supervivencia para cada variable individualmente, así como para el modelo global, verificando que el riesgo de progresión se mantiene constante a lo largo del tiempo.

Finalmente, para observar el grado de discriminación de las puntuaciones en términos de supervivencia libre de progresión, se realizaron las curvas de Kaplan-Meier en función de los grupos definidos por la agrupación de las puntuaciones y se aplicó la prueba log-rank para verificar si existían diferencias significativas entre ellos. Durante la realización de cada modelo se fueron sustituyendo las proteínas y sus puntos de corte así como las variables clínicas hasta encontrar la mejor combinación para cada grupo.

### **6.3 Perfiles de expresión de miRNAs**

Se alinearon en total 1499 secuencias en esta serie teniendo en cuenta únicamente los miRNAs de tipo let o mir, y descartando las alineaciones identificadas como contaminación (chrM, hum\_5SrDNA, y hum\_rRNA). Para analizar los grupos, primero se redujo el número de miRNAs, eliminando aquellos que tenían una cantidad de lecturas inferior al tamaño del grupo más pequeño analizado ( $n_{\min}$ ).

Las secuencias fueron normalizadas y filtradas utilizando los métodos de TMM (Trimmed mean of M values) y Benjamini – Hochberg. Se filtraron miRNAs que tenían frecuencias muy bajas, es decir, un miRNA debería alcanzar las 0.5 lectura por millón en un número mínimo de  $n_{\min}$  muestras, para no ser filtrado y eliminado del análisis.

Finalmente, y con el fin de detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de miRNAs entre los grupos analizados, se probaron los modelos de: a) Poisson gene-wise modelling; b) negative binomial gene-wise modelling; c) Polya-Aepplly gene-wise modelling y; d) Neyman type A gene-wise modelling. Y de los cuatro modelos analizados, se seleccionó el modelo de Neyman para realizar los análisis, ya que este método, fue el único que logró detectar diferencias en los niveles de expresión de miRNAs entre los grupos de PTC de buen y mal pronóstico.

Del resultado obtenido, se seleccionaron todos los miRNAs con *fold-change* (FC) superior a 2 o inferior a -2, y se ordenaron según la magnitud de tres rangos: a) orden de significación, de mayor a menor significado, o equivalente, del menor al mayor p valor ajustado, b) orden de magnitud de la expresión diferencial, de mayor a menor FC, tomado como el valor absoluto en la escala logarítmica en base 2, y c) orden del número de lecturas del grupo que define el numerador del FC. Al hacer la sumatoria, los tres rangos tenían la misma importancia. Finalmente, se ordenaron los miRNAs siguiendo el orden ascendente de esta suma.

## 4. Resultados

Los resultados están divididos en tres secciones. En la primera se analiza la serie utilizada para la validación IHQ. En la segunda, se presenta el análisis del estudio inmunohistoquímico que permitió la elaboración de los modelos de diagnóstico y predicción de pronóstico. Y en la tercera, se presentan los perfiles de expresión de miRNAs de los diferentes grupos analizados y sus comparaciones.

## SECCIÓN 1

### **1. Caracterización de la serie general**

La realización de los modelos de diagnóstico y predicción del pronóstico se realizaron de acuerdo a los resultados de IHQ de la serie general (313 casos). Los modelos seleccionados para diagnóstico se testaron en la serie de 40 casos de hiperplasia nodular de tiroides, y en la de 38 bloques celulares de citología de nódulos tiroideos. En las tablas 8.1, 8.2 y 8.3 de los anexos, se presentan los datos de los pacientes de las tres series utilizadas en esta sección.

El análisis bivalente nos permitió ver las diferencias entre grupos diagnósticos (AF, PTC, FTC, ATC y PDTC), entre los dos tipos de WDTC (FTC y PTC), y entre los WDTC de buen y mal pronóstico. En la serie de CT hubo una relación 3:1 entre mujeres:hombres (tabla 4.1). La mediana [P25;P75] de edad difiere según el género, siendo de 58 [42;69] años en los hombres, y de 43 [31,5;62,5] años en las mujeres. También se observó que los grupos de CT con peor pronóstico, los PDTC/ATC, presentaron una mediana de edad y un diámetro del tumor superior a la de los demás subtipos histológicos ( $p < 0,001$ ).

En la tabla 4.2 se muestra que los subtipos de WDTC, es decir los FTC y PTC, reproducen las características específicas de cada grupo. Los FTC fueron unifocales (100%), presentaron una baja proporción de invasión local (6,59%), y una elevada proporción de metástasis a distancia (20%). En contraste, los PTC presentaron unas proporciones de 61%, 26,4% y 6,59% para las mismas variables respectivamente, con un  $p$  valor igual en las 3 comparaciones ( $p < 0,001$ ).

**Tabla 4.1** Características demográficas y clínicas más relevantes según los tipos de tumor.

Características	AF	FTC	PTC	PDTC	ATC	Total
Sexo:						
Hombre	19 (23,5%)	6 (40,0%)	41 (22,5%)	7 (30,4%)	4 (33,3%)	77 (24,6%)
Mujer	59 (72,8%)	9 (60,0%)	140 (76,9%)	16 (69,6%)	8 (66,7%)	232 (74,1%)
Sin datos	3 (3,7%)	0 (0,0%)	1 (0,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (1,28%)
Edad (años)						
Mediana [P25;P75]	45.0 [33,5;56,5]	63.0 [43,2;68,2]	41.0 [31,0;57,0]	71.5 [62,5;74,5]	72.0 [62,5;75,0]	46.5 [33,0;62,0]
Diámetro del tumor (cm)						
Mediana [P25;P75]	3.50 [3,0;4,5]	4.00 [2,5;5,0]	2.50 [1,7;3,5]	5.00 [4,0;8,0]	6.00 [5,7;8,0]	3.00 [2,0;4,5]
Tiempo de seguimiento (años)						
Mediana [P25;P75]	6.84 [5,1;8,2]	6.45 [4,8;8,4]	8.18 [5,7;11,0]	3.50 [1,2;5,3]	0.48 [0,2;0,6]	7.31 [5,0;9,6]

En la tabla 4.3, se muestra que, a pesar de que el CT fue más frecuente en las mujeres, fueron los hombres los que presentaron una mayor proporción de mal pronóstico, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ( $p=0,070$ ). En el grupo de mal pronóstico, la mediana de edad fue de 53 años, la frecuencia de invasión local de 63,3% y de las metástasis a distancia de 62,0%.

**Tabla 4.2** Descripción de las características de los tumores.

	FTC	PTC	PDTC	ATC	Todos
Multifocalidad					
No	15 (100%)	111 (61,0%)	21 (91,3%)	10 (83,3%)	157 (67,7%)
Si	0 (0,00%)	71 (39,0%)	2 (8,70%)	0 (0,00%)	73 (31,5%)
Invasión local*					
No	14 (93,3%)	132 (72,5%)	10 (43,5%)	2 (16,7%)	158 (68,1%)
Si	1 <sup>a</sup> (6,67%)	48 <sup>b</sup> (26,4%)	12 <sup>c</sup> (52,2%)	9 <sup>d</sup> (75,0%)	70 (30,2%)
Metástasis ganglionares					
No	14 (93,3%)	104 (57,1%)	14 (61%)	8 (66,7%)	140 (60,3%)
Si	1 (6,7%)	78 (42,9%)	9 (39%)	3 (25,0%)	91 (39,2%)
Estadío TNM					
I	8 (53,3%)	106 (58,2%)	1 (4,35%)	0 (0,00%)	115 (49,6%)
II	1 (6,67%)	19 (10,4%)	1 (4,35%)	1 (8,33%)	22 (9,48%)
III	5 (33,3%)	27 (14,8%)	3 (13,0%)	1 (8,33%)	36 (15,5%)
IV	1 (6,67%)	29 (15,90%)	17 (73,9%)	9 (75%)	56 (17,9%)
Recidiva a distancia**					
No	12 (80,0%)	170 (93,4%)	7 (30,4%)	1 (8,33%)	190 (81,9%)
Si	3 <sup>a</sup> (20,0%)	12 <sup>b</sup> (6,59%)	13 <sup>c</sup> (56,5%)	5 <sup>d</sup> (41,7%)	32 (13,8%)

\*Recidiva local a: Grandes vasos (GV); b: 43 en musculatura pre laríngea (MP) y 5 en otros; c: 2 en GV, 1 en MP, 1 en tráquea y 8 en otros; d: 3 en tráquea y 6 en otros. \*\* a: 2 en hueso (H) y 1 en pulmón (P); b: 1H, 9P, 1P+ H y 1P + otras; c: 1H + otras, 7P, 2P + H + otras y 1 ni en H ni en P; d: 1H, 2P, 1P + H y 1P + otros.

**Tabla 4.3** Características clínicas y patológicas respecto al pronóstico.

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	P valor
	N=120	N=77	
Sexo:			0,070
Hombre	23 (48,9%)	24 (51,1%)	
Mujer	97 (65,1%)	52 (34,9%)	
Edad:			0,004
Mediana [P25;P75]	39,0 [31,0;51,5]	53,0 [33,0;64,0]	
Invasión local:			<0,001
No	101 (69,2%)	45 (30,8%)	
Si	18 (36,7%)	31 (63,3%)	
Metástasis ganglionares:			<0,001
No	90 (76,3%)	28 (23,7%)	
Si	30 (38,0%)	49 (62,0%)	
Estadío:			<0,001
I	83 (72,8%)	31 (27,2%)	
II	14 (70,0%)	6 (30,0%)	
III	15 (46,9%)	17 (53,1%)	
IV	7 (23,3%)	23(76,7%)	
Mutaciones:			0,048
No	67 (67,7%)	32 (32,3%)	
Si	49 (52,7%)	44 (47,3%)	

Respecto a las mutaciones, teniendo en cuenta los 313 tumores incluidos en el análisis, encontramos 200 (63,9%) casos sin mutación, 104 con mutación (33,2%), y 4 (2,88%) en los que no fue posible la valoración por problemas técnicos con el material. De las mutaciones, 90 (86,5%) correspondieron a la alteración  $BRAF^{V600E}$  detectada en 87 PTC (96,6%), 2 ATC (2,2%) y 1 PDTC (1,2%); 11 mutaciones (10,6%) en el gen  $NRAS$  (Q61R, Q61K y un indel), en 5 FVPTC (45,5%), 3 AF (27,3%), 2PDTC (18,2%), y 1 FTC (9,1%); y finalmente, 3 mutaciones (2,9%) en  $HRAS$  (Q61R), en 2 AF (66,7%) y 1 ATC (33,3%). Ningún caso de la serie presentó mutación en el gen  $KRAS$ .



Además, el análisis de las diferencias en las características clínicas de la variante folicular (FVPTC) y las otras variantes del carcinoma papilar, demostró una diferencia estadísticamente significativa en la invasión local y las metástasis ( $p \leq 0,005$ ) (tabla 4.4). Además, según la prueba exacta de Fisher, los FVPTC mostraron mejor pronóstico que los FTC o el resto de PTC, siendo este resultado estadísticamente significativo ( $p=0,036$ ).

**Tabla 4.4** Características diferenciales entre FVPTC y PTCnoF.

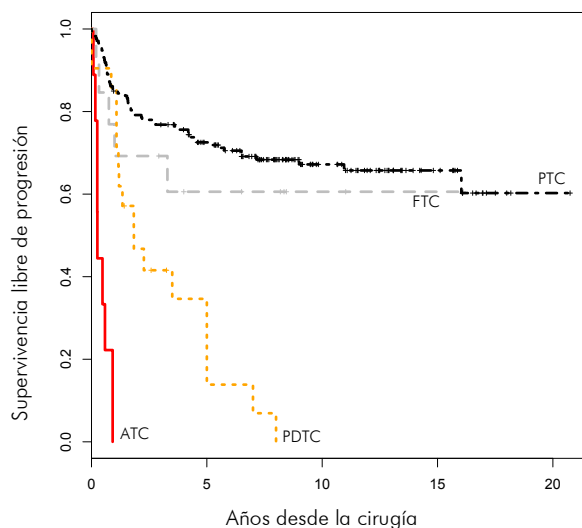
	FVPTC	PTCnoFV	p-valor
	N=38	N=190	
Invasión local:			0,005
No	34 (91,9%)	128 (67,7%)	
Si	3 (8,11%)	61 (32,3%)	
Metástasis ganglionares:			<0,001
No	31 (81,6%)	92 (48,7%)	
Si	7 (18,4%)	97 (51,3%)	
Recidiva:			0,038
No	29 (76,3%)	107 (56,6%)	
Si	9 (23,7%)	82 (43,4%)	
Recidiva Ganglionar:			0,019
No	35 (92,1%)	138 (72,6%)	
Si	3 (7,89%)	52 (27,4%)	
Mutación <i>BRAF</i> :			<0,001
V600E	2 (5,26%)	101 (53,2%)	
V600E?	2 (5,26%)	2 (1,05%)	
Delección	1 (2,63%)	0 (0,00%)	
N/V	0 (0,00%)	4 (2,11%)	
Sin mutación	33 (86,8%)	82 (43,2%)	

Finalmente, en el análisis de supervivencia libre de progresión, todos los WDTC

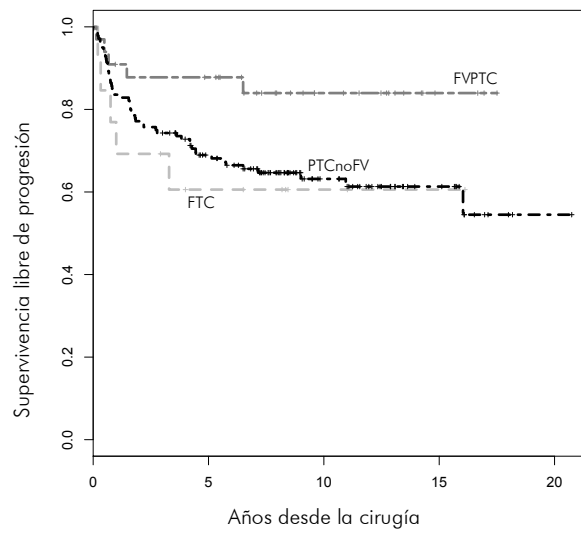
clasificados como de buen pronóstico y con seguimiento estuvieron libres de progresión de la enfermedad al finalizar el estudio (abril de 2014). La mediana de seguimiento de este grupo fue de 8,9 años.

La mediana de seguimiento del grupo de WDTC de mal pronóstico (progresión) fue de 7,2 años. Sin embargo, 6 (7,8%) de los pacientes (B63; G05, A57, B05, B10, B05) con WDTC clasificados como de mal pronóstico estaban libres de progresión de la enfermedad al final del seguimiento, y tenían una mediana de seguimiento de 5,2 años.

Sólo 3 (8,6%) de los pacientes con PDTC/ATC estaban libres de progresión de la enfermedad al final del estudio, entre 1,4 y 3,3 años de seguimiento. La mediana estimada de supervivencia libre de progresión fue diferente para ATC y PDTC, siendo de 0,3 y 2,3 años, respectivamente.



**Figura 4.1** Supervivencia de los grupos de carcinomas de la serie general hasta la recidiva o muerte por cáncer de tiroides, ATC, PDTC, PTC y FTC.



**Figura 4.2** Supervivencia de los grupos WDTC (FTC, FVPTC y PTC) de la serie general.

## **SECCIÓN 2**

### **1. Inmunohistoquímica de las proteínas de la firma molecular**

En esta sección, se describen los resultados del análisis estadístico de la IHQ, y la formulación de los modelos de diagnóstico y predicción de pronóstico. Todos los pacientes incluidos en la serie (313 casos) tienen datos de expresión de la proteína correspondiente en tejido tumoral, y 253 de ellos tienen además datos de expresión de la proteína en tejido no neoplásico. El estudio inmunohistoquímico se realizó para 19 de los 22 proteínas de la firma molecular: ANLN, BIRC5, PRC1, NUSAP1, RRM2, PTPRN2, SDK2, DIAPH3, APLP2, UBE2C, IL1RN, c7orf23, PDK2, CEP55, CCNB2, SIAH1, LMBRD1, CENP-A y PPAP2B (233). La expresión de las proteínas ASPM, SH3BGRL2, y ORMDL3 no pudo ser valorada debido a que no fue posible optimizar los protocolos de inmunohistoquímica para sus anticuerpos.

### **2. Identificación de proteínas con valor diagnóstico y pronóstico**

Se realizaron una serie de pruebas que identificaron las proteínas que mejor diferenciaban los grupos analizados.

#### **2.1 Pruebas para comprobar las diferencias de expresión de proteína entre tejido tumoral y no tumoral**

En la tabla 4.5 se presentan los resultados del test de Wilcoxon y la prueba de McNemar que evaluaron la expresión diferencial de las proteínas de interés entre el tejido tumoral y no tumoral. La expresión nuclear de BIRC5, CENP-A y CEP55 fue significativamente mayor en tejido no tumoral que en el tumor; mientras que las de ANLN, APLP2, PDK2, y PPAP2B no presentaron diferencias significativas entre los dos tipos de tejido. Tampoco las expresiones citoplasmáticas de CENP-A, NUSAP1, IL1RN, LMBRD1, PTPRN2, y c7orf23 fueron diferentes entre el tejido normal y el tumoral.

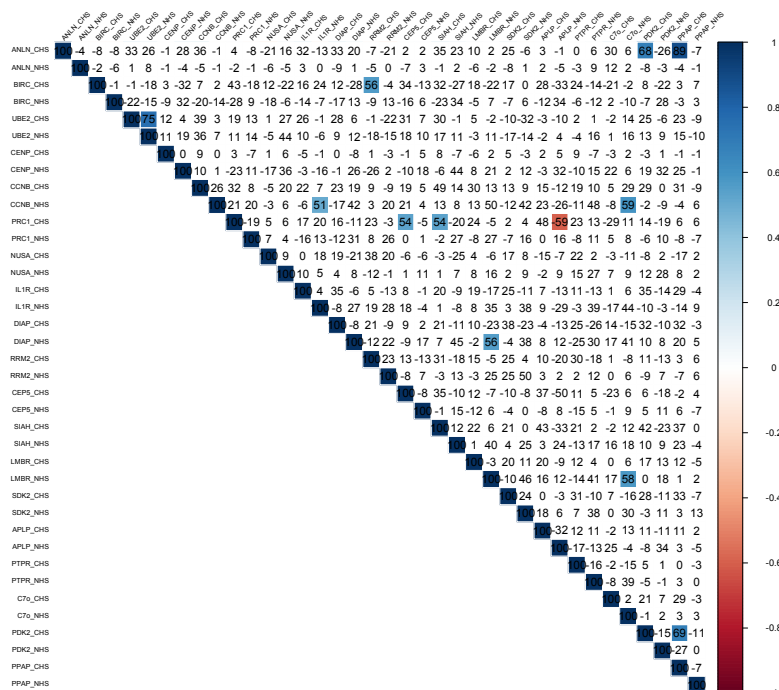
**Tabla 4.5** Diferencia de expresión media intra-individuo en tejido tumoral y no tumoral.

Proteína	N	Citoplasma				Núcleo			
		Med	Q1-Q3	Test de Wilcoxon	Prueba de McNemar	Med	Q1-Q3	Test de Wilcoxon	Prueba de McNemar
ANLN	242	33	5-132	<,0001	<,0001	0	0-0	0,7893	1
BIRC5	237	25	0-85	<,0001	<,0001	-32	-73-0	<,0001	1
UBE2C	247	0	0-1	<,0001	<,0001	1	0-2	<,0001	<,0001
CENP-A	246	0	0-0	1	1	-10	-40-0	<,0001	1
CCNB2	246	0	0-3	<,0001	<,0001	1	0-2	<,0001	<,0001
PRC1	241	96	14-140	<,0001	<,0001	0	0-1	<,0001	<,0001
NUSAP1	244	0	0-0*	<,0001	<,0001	1	0-3	<,0001	<,0001
IL1RN	259	0	0-0*	<,0001	<,0001	1	0-3	<,0001	<,0001
DIAPH3	241	0	0-6	<,0001	<,0001	1	0-5	<,0001	<,0001
RRM2	233	84	40-110	<,0001	<,0001	1	0-4	<,0001	<,0001
CEP55	242	74	24-100	<,0001	<,0001	-4	-26-0	<,0001	<,0001
SIAH1	249	93	44-108	<,0001	<,0001	1	0-4	<,0001	<,0001
LMBRD1	250	0	0-0*	<,0001	<,0001	1	0-1	<,0001	<,0001
SDK2	243	0	0-6	<,0001	<,0001	1	1-3	<,0001	<,0001
APLP2	248	47	6-88	<,0001	1	0	0-0	0,0075	0,8852
PTPRN2	243	0	0-0	0,0770	0,0411	0	0-1	<,0001	<,0001
C7orf23	252	0	0-0	0,0264	0,0148	0	0-1	<,0001	<,0001
PDK2	240	76	23-114	<,0001	<,0001	-5	-43-30	0,1180	0,5465
PPAP2B	241	42	3-147	<,0001	<,0001	0	0-0	0,3711	<,0001

\*A pesar de tener p valor <0.0001, las diferencias no son relevantes porque su rango [Q1-Q3] es 0-0, es decir, que como mínimo un 75% de los casos no tienen expresión alguna. En la tabla, Med, mediana.

## 2.2 Identificación de proteínas correlacionadas

Las matrices de correlación de Spearman evaluaron la correlación entre la expresión de pares de las proteínas estudiadas. Los números de la matriz muestran el coeficiente de correlación de Spearman multiplicado por 100. Se realizaron 3 matrices, una con la serie general (313 casos), una con WDTC (197 casos) y otra con el grupo de los FTC y AF (96 casos). En la figura 4.3 se muestran los resultados de la matriz para la serie general. Las otras dos matrices se presentan en las figuras 8.1 y 8.2 de la sección de anexos.



**Figura 4.3** Correlaciones de Spearman en toda la serie general. En la figura, el color azul indica las correlaciones positivas y el rojo las correlaciones negativas. Ambos colores indican proteínas que tienen correlaciones superiores a 0.5.

### 2.3 Identificación de valores de expresión diferencial de acuerdo al pronóstico

Finalmente, se utilizó la técnica del *Random Forest* para un análisis supervisado. Este permitió identificar proteínas que permitían asociadas con casos de buen y mal pronóstico y que también permitían diferenciar entre subtipos tumorales. Las proteínas identificadas fueron:

WDTC: RRM2n, UBE2C<sub>c</sub>, SIAH1<sub>c</sub> y PRC1<sub>c</sub>

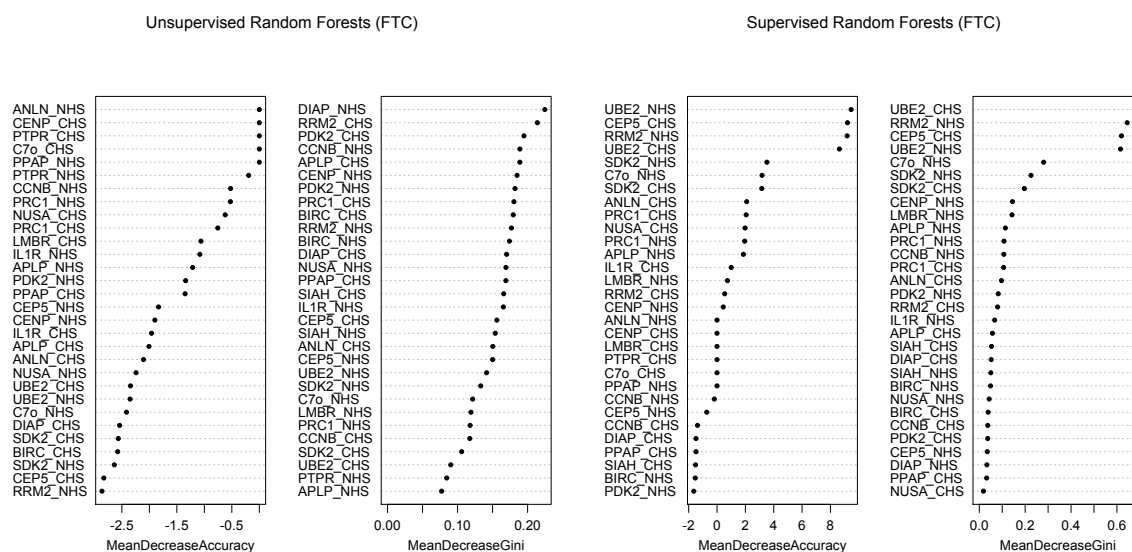
PTC: SIAH1<sub>c</sub> y PRC1<sub>c</sub>

FTC: UBE2C<sub>n</sub>, CEP55<sub>c</sub>, RRM2<sub>n</sub> y UBE2C<sub>c</sub>

PTC<sub>noFV</sub>: PRC1<sub>c</sub>

FVPTC: UBE2C<sub>c</sub>

Las proteínas útiles para diferenciar entre dos subtipos tumorales fueron NUSAP1<sub>c</sub> (WDTC<sub>b</sub> versus ATC/PDTC) y IL1RN<sub>n</sub> (AF versus FTC). La figura 4.4 muestra el análisis supervisado y no supervisado para el grupo de FTC. El análisis de los otros grupos se presentan en las figuras 8.3-8.7 en sección de anexos.



**Figura 4.4** Análisis Random forest supervisado y no supervisado para identificar las proteínas útiles para diferenciar entre buen y mal pronóstico los FTC.

## 2.4 Análisis comparativo de la expresión inmunohistoquímica según pronóstico

El análisis comparativo se realizó utilizando el test exacto de Mann-Whitney y el test de Fisher para evaluar las diferencias de expresión entre los casos de buen y mal pronóstico. Esta prueba se aplicó a todos los WDTC (PTC, FTC). Asimismo, se realizó el análisis de los FTC y los PTC separadamente. Además, se analizaron los PTC dividiéndolos en: aquellos de variante folicular (FVPTC), y los de las demás variantes de PTC (PTCnoFV). También, se realizó el análisis entre los AF vs. FVPTC/FTC. Y finalmente, entre los WDTC de buen pronóstico versus carcinomas desdiferenciados (PDTC/ATC). El resumen del análisis se muestra en la tabla 4.10, las tablas de análisis específicas de cada grupo, tablas 8.4-8.10, se encuentran en la sección de anexos.

**Tabla 4.6** Resumen del análisis bivariante de la serie general según pronóstico y comparaciones entre grupos de diagnóstico.

Proteína	WDTC	PTC	FTC	PTCnoFV	FVPTC	AF vs FTC	WDTC vs ATC/PDTC
n	120 - 77	111 - 71	9 - 6	83 - 63	27 - 8	81 - 15	120 - 35
ANLN	C+				C+	C-*	
BIRC5	C+	C+		C+		C+	C- N-
UBE2C	C+ N+	C+ N*	C+ N+	C*	C+ N+		C+ N+
CENP-A				N-		N-	
CCNB2	C+ N*	C+ N*		N*			
PRC1	C+	C+		C+			N+
NUSAP1	N-*	N-*		C+* N-	C*	N-	C+ N+
IL1RN	C+*	C+*				C* N+	
DIAPH3	C+	C+		C+*N-			C+ N-
RRM2	C+ N-	C+ N-	N-	C+	N-	C+ N+	C+
CEP55			C+		N+		
SIAH1	C+	C+		C+		N-	N-
LMBRD1	C+* N*	C+* N*		C+* N*		N-	
SDK2	N-		N-	N+*	N-	N-*	N-
APLP2	N-*	N-*	N-*			C- N-	C-
PTPRN2	C*N-*	C* N-*		C* N-*			C+*
C7orf23						C-*	
PDK2							
PPAP2B	C+	C+					C-

En la tabla, C y N citoplasma y núcleo, respectivamente. Los símbolos +, - y \* muestran que la expresión en mal pronóstico es >, < o = a la de buen pronóstico. El símbolo combinado +\* o -\* indica que la expresión positiva (>0) es > o < en mal pronóstico respecto al buen pronóstico.

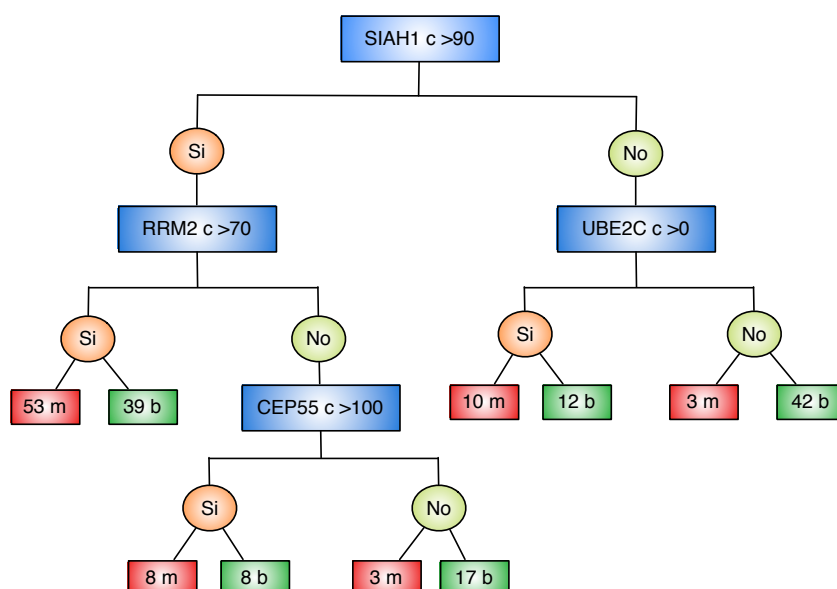
En el análisis comparativo, destacó que en los casos de WDTC de mal pronóstico la expresión citoplasmática fue mayor para ANLN, BIRC5, UBE2C, CCNB2, PRC1, IL1RN, DIAPH3, RRM2, SIAH1, LMBRD1 y PPAP2B; y la expresión nuclear fue mayor para UBE2C y menor para RRM2, SDK2 y PTPRN2 respecto a los de buen pronóstico. Además, en los PTCnoFV de mal pronóstico, la expresión citoplasmática fue mayor para BIRC5, PRC1, RRM2, DIAPH3, LMBRD1 y SIAH1, mientras que en el núcleo, hubo una mayor expresión de SDK2 y menor expresión de CENP-A, NUSAP1, DIAPH3 y



PTPRN2 respecto a los de buen pronóstico. Finalmente, el grupo de FTC vs AF, los FTC tuvieron una mayor expresión citoplasmática de BIRC5 y RRM2, y menor en ANLN, C7orf23, y APLP2. En el núcleo, hubo una mayor expresión de ILRN y RRM2, y una menor expresión de CENP-A, NUSAP1, SIAH1, LMBRD1, APLP2 y SDK2.

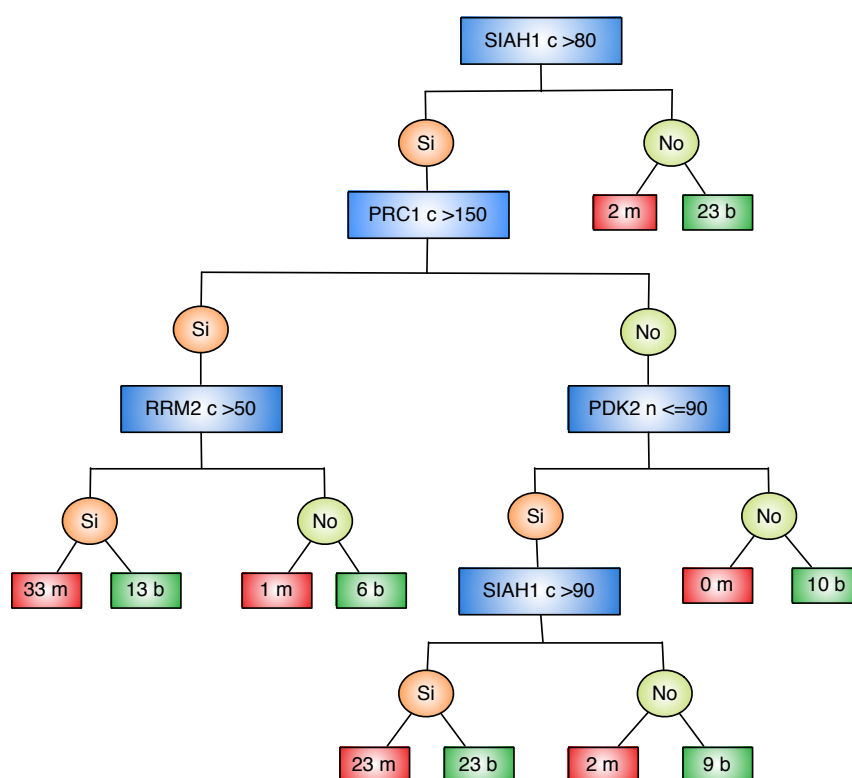
### 3. Árboles de clasificación para pronóstico

Los árboles de clasificación se construyeron para discriminar: a) entre los casos de buen y mal pronóstico para cada subtipo de WDTC, b) entre los AF y los FTC, y c) en la serie de PAAF para discriminar entre los tumores benignos (HNT, AF) y los tumores malignos (FVPTC y FTC). Inicialmente, se construyó un árbol para observar el poder de discriminación de la expresión de proteínas en el conjunto de todos los casos de WDTC. El modelo resultante,  $SIAH1c > 90$ ,  $RRM2c > 70$ ,  $UBE2C c > 0$  y  $CEP55c > 100$ , obtuvo una sensibilidad de 92,2%, pero clasificaba erróneamente a la mitad de los casos de buen pronóstico, siendo el valor de la especificidad del 50,0% (Figura 4.5).



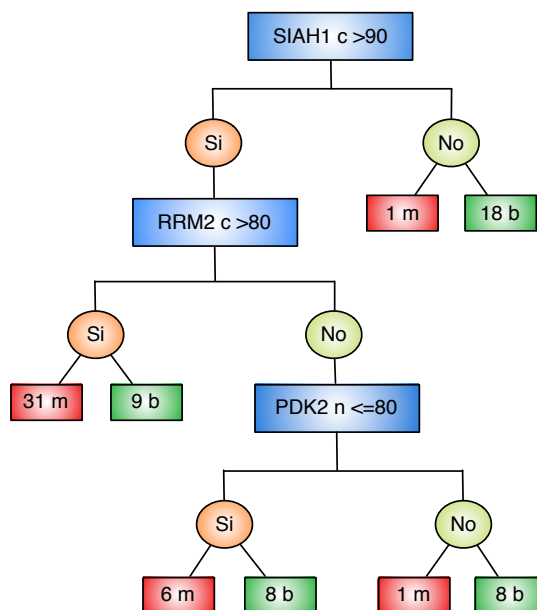
**Figura 4.5** Árbol de clasificación de los carcinomas bien diferenciados. En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.

Posteriormente, el grupo de los PTC se analizó separadamente sin lograr una mejor especificidad (árbol no mostrado). Cuando se analizó el grupo de PTC extrayendo la variante folicular (solo se consideró entonces PTCnoFV), el modelo generado identificó los H-scores de las proteínas SIAH1 $c$ >80, PRC1 $c$ >150, RRM2 $c$ >50, PDK2 $n$ ≤90, y SIAH1 $c$ >90; con una sensibilidad del 91,8%, y una especificidad del 57,1% (Figura 4.6).

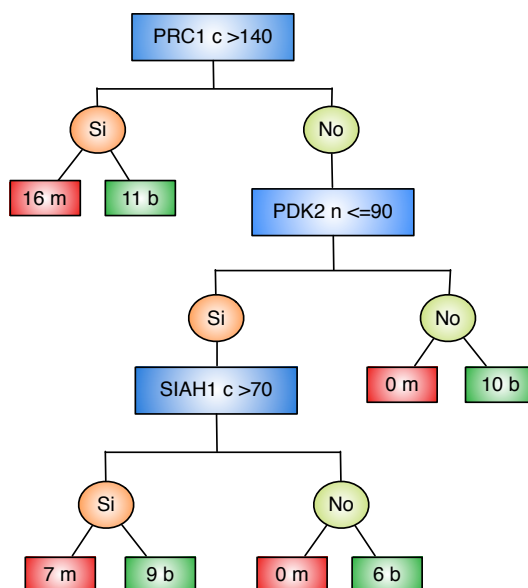


**Figura 4.6** Árbol de clasificación de los carcinomas papilares de variante no folicular (PTCnoFV). En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.

A posteriori, el grupo de los PTCnoFV, se sub-dividió según la presencia o ausencia de la mutación  $BRAF^{V600E}$ , descrita como un marcador de mal pronóstico. El árbol generado con el grupo de casos de PTCnoFV con la mutación  $BRAF^{V600E}$  identificó una combinación de 3 proteínas (SIAH1 $c$ >90, RRM2 $c$ >80 y PDK2 $n$ ≤80), con una sensibilidad de 94,9% y una especificidad de 60,5% (Figura 4.7). Cuando se consideró el grupo de casos de PTCnoFV sin la mutación en  $BRAF$ , la expresión de las proteínas PRC1>140, PDK2 $n$ ≤90 y SIAH1 $c$ >70, alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad del 44,4% (Figura 4.8).

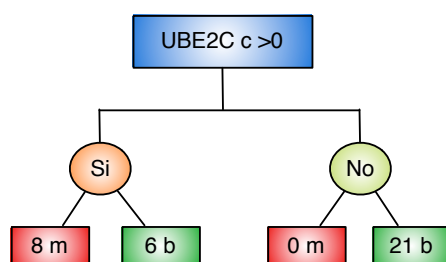


**Figura 4.7** Árbol de clasificación de PTC de variante no folicular con mutación. En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.



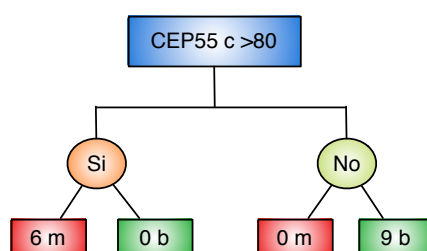
**Figura 4.8.** Árbol de clasificación de los PTC de variante no folicular sin mutación. En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.

El árbol generado con los casos de FVPTC, identificó que la expresión de una proteína, UBE2Cn>0, puede discriminar entre los casos de buen y mal pronóstico con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 77,8% (Figura 4.9).



**Figura 4.9** Árbol de clasificación de los FVPTC. En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.

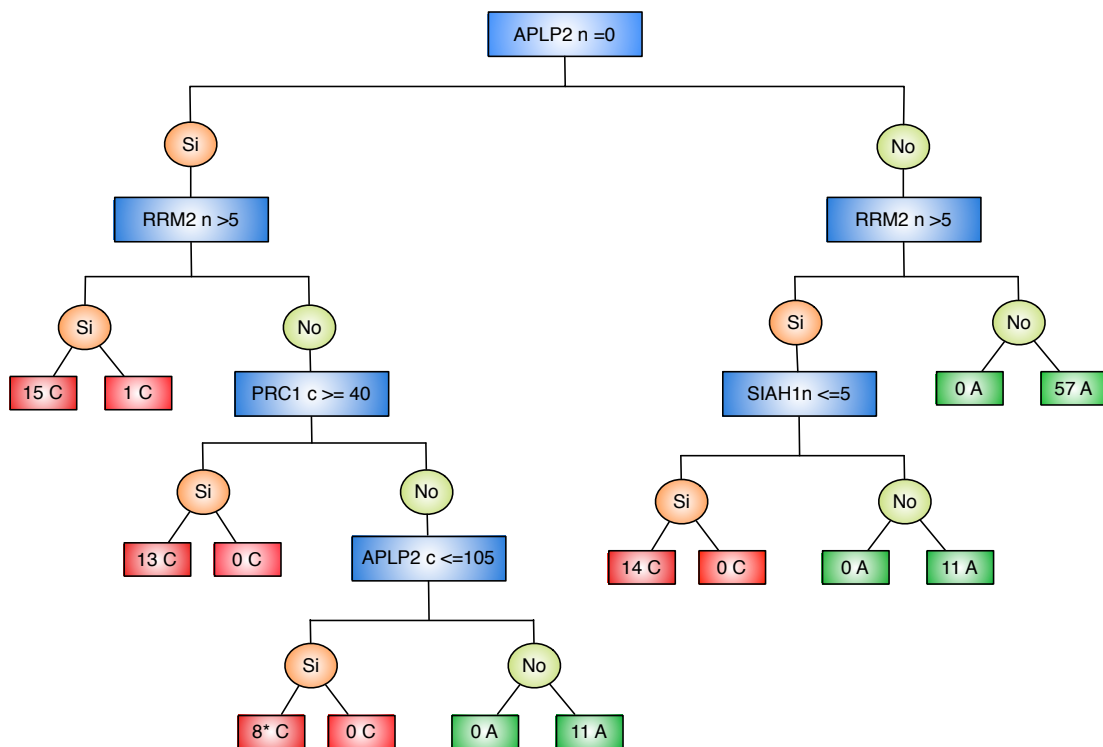
Finalmente, el árbol generado con los FTC para discriminar los casos de mal pronóstico identificó la expresión de una proteína, CEP55c>80, con una sensibilidad y una especificidad de 100% (Figura 4.10).



**Figura 4.10** Árbol de clasificación de los FTC. En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.

#### 4. Árboles de clasificación para diagnóstico

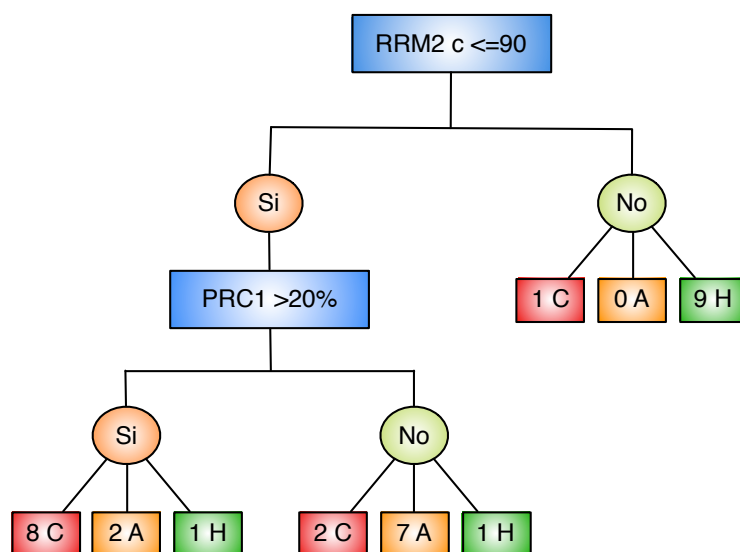
Para identificar un conjunto de proteínas que mejoraran el diagnóstico diferencial entre los tumores malignos (FVPTC y FTC) y los benignos (AF) del epitelio folicular tiroideo primero se construyó un árbol con los casos de la serie general. El modelo con mejor capacidad para discriminar tumores benignos y malignos, estuvo compuesto por la expresión de las proteínas, APLP2n=0, RRM2n>5, PRC1c≥40, APLP2c≤105 y SIAH1n≤5. Este modelo alcanzó una sensibilidad del 100% y una especificidad de 98,8% (Figura 4.11). Posteriormente, este modelo fue aplicado a la serie de hiperplasias nodulares de tiroides (HNT), en la cual se obtuvo una especificidad del 94,8%.



**Figura 4.11** Árbol de clasificación de tumores malignos (FTC/FVPTC) vs tumores benignos (AF) de la serie general. En la figura, c=expresión citoplasmática, n=expresión nuclear, m=mal pronóstico y b=buen pronóstico.

Finalmente, se generó el árbol con los casos de la serie de PAAF, para el cual se tuvo en cuenta el H-score de RRM2 y el porcentaje de células que expresaron PRC1, y se determinaron tres modelos que identificaron a:

- Los carcinomas (C),  $RRM2c \leq 90 + PRC1 > 20\%$ ; con una sensibilidad de 72,7% y la especificidad del 83,3%.
- Los adenomas (A),  $RRM2c \leq 90 + PRC1 \leq 20\%$ ; con una sensibilidad del 77,8% y una especificidad del 86,4%.
- Las hiperplasias (H),  $RRM2c > 90$ ; con una sensibilidad del 81,8% y una especificidad del 94,4% (Figura 4.12).



**Figura 4.12** Árbol de clasificación de los tumores malignos (FTC/FVPTC) vs tumores benignos (AF, HNT) en la serie de PAAF. En la figura C=carcinoma, A=adenoma y H=hiperplasia.

## 5. Sistemas de puntuación de los árboles de clasificación

A partir de los resultados de árboles de clasificación se aplicó el modelo de regresión logística, para elaborar modelos de diagnóstico diferencial entre AF y FTC, así como modelos de predicción de pronóstico. Estos modelos se mejoraron incorporando aquellos datos clínicos más relevantes entre los casos de buen y mal pronóstico (edad, diámetro del tumor, metástasis al diagnóstico y mutaciones), que mostraron una diferencia estadísticamente significativa. Una vez seleccionado el mejor sistema de puntuación, se aplicó el test de Kaplan-Meier para la estimación del tiempo libre de progresión.

### 5.1 Carcinomas bien diferenciados de tiroides (WDTC)

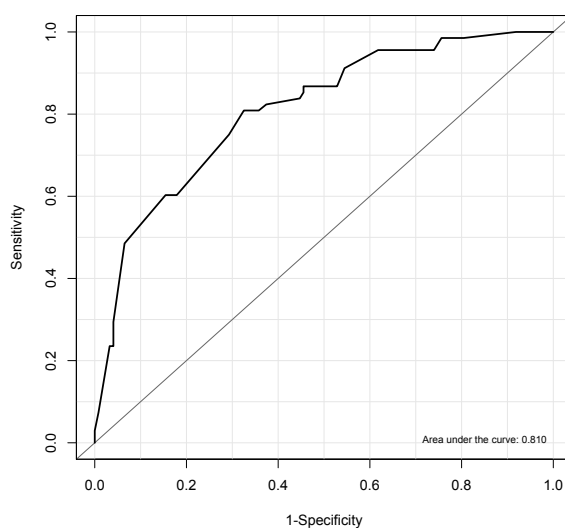
Este grupo incluye todos los casos de PTC y FTC presentes en la serie general. El modelo que mejor discrimina los casos que progresaron está constituido por: SIAH1c > 95, RRM2c > 55, RRM2n < 10, edad > 70 años y CEP55 ≤ 100.

**Tabla 4.11** Modelo de regresión logística y modelo de Cox en WDTC.

	Regresión logística			Regresión de Cox	
	Coefficiente	OR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
Intercepto	-5,38	-	<0,00001	-	-
SIAH1 <sub>c</sub> >95	1,35	3,9(1,8; 8,9)	0,000949	5,0(2,3;11,0)	0,00005
RRM2 <sub>c</sub> >55	1,52	4,6(1,9;12,3)	0,001406	3,7(1,7; 7,9)	0,00098
RRM2 <sub>n</sub> <10	2,20	9,0(2,8;38,7)	0,000859	5,1(1,7;15,3)	0,00342
Edad>70	2,22	9,2(2,7;35,5)	0,000669	8,2(3,8;17,9)	<,00001
CEP55≤100	0,68	2,0(1,0; 4,1)	0,064153	2,7(1,5; 4,7)	0,00064

El área bajo la curva ROC es de 0,810 (Figura 4.13), y con una calibración aceptable con el modelo de Hosmer-Lemeshow ( $p=0,237$ ). Los coeficientes reales se transformaron en enteros consecutivos para reproducir el modelo de una forma simple, de manera que el sistema de puntuación quedó definido por:

$$2*(SIAH1_{c}>95)+2*(RRM2_{c}>55)+ 3*(RRM2_{n}<10)+ 3*(Edad>70)+1*(CEP55\leq 100)$$

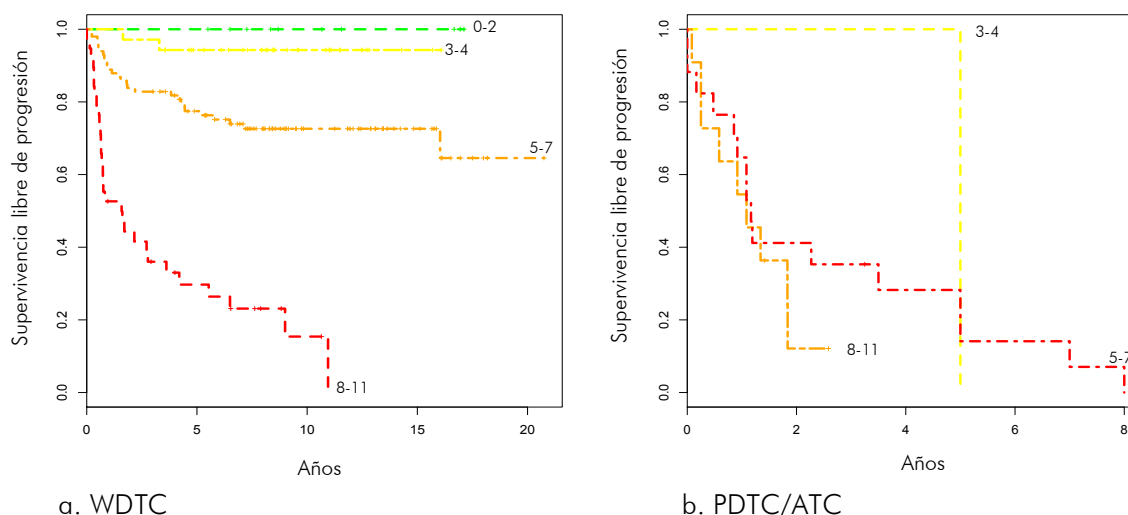
**Figura 4.13** Curva ROC del modelo de puntuación para los WDTC.

**Tabla 4.12** Puntuación del grupo de carcinomas bien diferenciados según progresión con los porcentajes de sensibilidad, especificidad y supervivencia a 5 años\*.

Puntuación	Sin progresión	Progresión	% Progresión	Sensibilidad	Especificidad	% supervivencia a 5 años
0-2	10	0	0,0%	100,0%	8,1%	100%
3-4	33	3	8,3%	95,6%	35,0%	94,3%
5-7	72	32	30,8%	48,5%	93,5%	77,4%
8-11	8	33	80,5%	-	-	29,7%

\* Los valores de sensibilidad y especificidad se refieren a las puntuaciones superiores a las indicadas en su fila.

El orden de magnitud de los coeficientes del modelo de Cox coincidieron con los del modelo logístico, por lo que el sistema de puntuación es válido a partir de los dos análisis. En la figura 4.14, se observan las curvas de Kaplan-Meier para supervivencia de los grupos. El test/contraste de Log-Rank indicó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p=0$ ). Este modelo también se aplicó al grupo constituido por los carcinomas pobremente diferenciados (PDTC) y los indiferenciados (ATC), en donde es interesante destacar que ninguno de los casos obtuvo puntuaciones entre 0-2, y sólo un caso obtuvo una puntuación de 3-4.



**Figura 4.14** Supervivencia libre de progresión de los grupos de puntuación para a) WDTC, b) PDTC/ATC. En base a los modelos de pronóstico estimados, cada curva muestra la supervivencia libre de progresión de los pacientes con la puntuación indicada sobre ella.



## 5.2 Carcinomas papilares de tiroides (PTC)

El grupo de los carcinomas papilares se analizó reagrupándolos como en los árboles de clasificación para conseguir modelos óptimos que discriminasen los casos de mal pronóstico. Los grupos están constituidos de la siguiente manera: PTC (abarca todas las variantes histológicas), PTCnoFV, PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y PTCnoFV sin mutación en  $BRAF^{WT}$ . En las tablas 4.13–4.16, se detallan las variables utilizadas en el modelo generado para cada uno de los cuatro grupos y su nivel de significación para el análisis de regresión logística y de Cox.

**Tabla 4.13** Modelos de progresión en PTC.

	Regresión logística			Regresión de Cox	
	Coeficiente	OR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
Intercepto	-6,21	-	<0,000001	-	-
SIAH1c>95	1,90	6,7(2,7;17,8)	0,000007	7,4(3,1;17,6)	0,00001
RRM2c>55	1,82	6,2(2,3;18,4)	0,000500	4,5(2,0;10,2)	0,00034
RRM2n<10	1,97	7,2(2,0;34,4)	0,005211	3,7(1,2;11,2)	0,01876
Edad>70	2,58	13,2(3,5;56,6)	0,000252	10,5(4,6;23,6)	<,00001
CEP55≤100	1,21	3,4(1,5;7,9)	0,003632	3,9(2,1;7,2)	0,00001

**Tabla 4.14** Modelos de progresión en PTCnoFV.

	Regresión logística			Regresión de Cox	
	Coeficiente	OR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
Intercepto	-5,75	-	0,000003	-	-
SIAH1c>95	1,79	6,0(2,2;18,9)	0,000932	7,3(2,6;21,1)	0,00022
RRM2c>55	1,80	6,0(2,2;19,2)	0,001077	4,4(1,9;10,1)	0,00044
RRM2n<10	1,72	5,6(1,1;48,3)	0,064379	3,9(0,9;17,0)	0,06548
Edad>70	2,60	13,5(2,8;79,8)	0,002003	9,3(3,8;22,3)	<,00001
CEP55≤100	1,23	3,4(1,5; 8,5)	0,005522	4,2(2,2; 8,0)	<,00001

**Tabla 4.15** Modelos de progresión en PTCnoFV  $BRAF^{V600E}$ .

	Regresión logística			Regresión de Cox	
	Coeficiente	OR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
Intercepto	-4,02	-	6,55e-05	-	-
SIAH1c>95	2,10	8,2(1,9;58,6)	0,0124	15,2(1,9;122,3)	0,1040
RRM2c>55	1,37	3,9(1,2;14,9)	0,0314	3,90(1,4;10,8)	0,0090
Edad en [45,70]	0,62	1,9(0,6;6,6)	0,3165	1,17(0,5;2,8)	0,7151
Edad>70	2,23	9,3(1,2;115,3)	0,0478	6,35(2,1;19,4)	0,0012
CEP55c≤100	1,36	3,9(1,3;13,3)	0,0221	4,83(2,1;11,1)	0,0002

**Tabla 4.16** Modelos de progresión en PTCnoFV  $BRAF^{WT}$ .

	Regresión logística			Regresión de Cox	
	Coeficiente	OR (95%IC)	P valor	HR (95%IC)	P valor
Intercepto	-4,33	-	0,00400	-	-
RRM2c>55	2,48	12,0(1,3;401,5)	0,06337	4,4(0,6;34,6)	0,1531
Edad en [45,70]	0,44	1,5(0,3;7,0)	0,56044	1,2(0,4;3,8)	0,7500
Edad>70	2,19	8,9(0,5;319,2)	0,14564	3,0(0,6;14,3)	0,1641
PRC1c>140	2,12	8,3(2,3;37,7)	0,00269	4,2(1,3;13,2)	0,0151

Los coeficientes reales de cada modelo se transformaron en enteros consecutivos para reproducir los modelos de forma simple, de manera que los sistemas de puntuación para estos grupos quedaron definidos por:

PTC

$$2*(SIAH1c>95)+2*(RRM2c>55)+2*(RRM2n<10)+3*(Edad>70)+1*(CEP55\leq 100)$$

PTCnoFV

$$2*(SIAH1c>95)+2*(RRM2c>55)+2*(RRM2n<10)+3*(Edad>70)+1*(CEP55\leq 100)$$

PTCnoFV con mutación

$$2*(SIAH1c>95)+1*(RRM2c>55)+2*(Edad>70)+1*(CEP55c\leq 100)$$

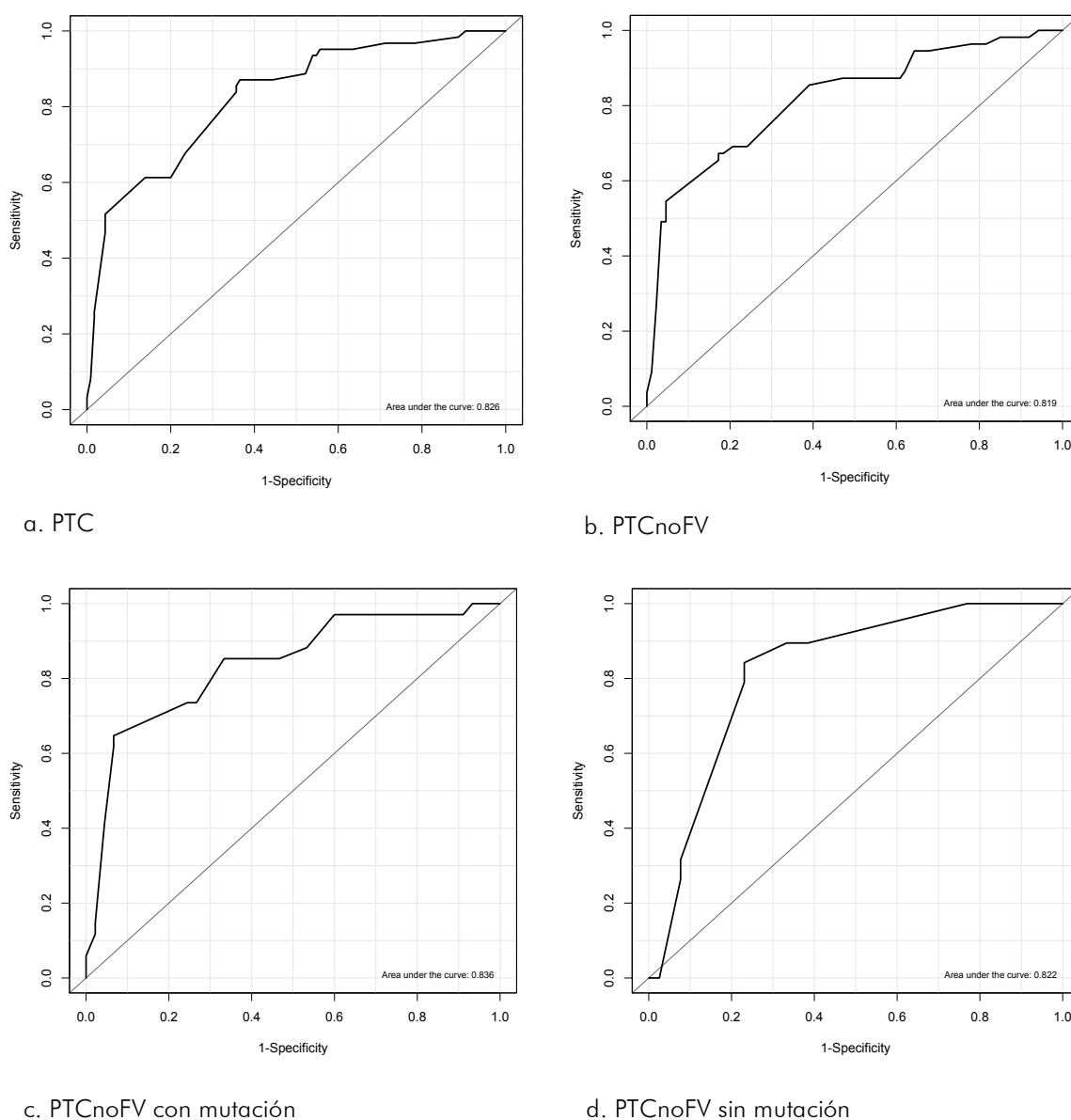
PTCnoFV sin mutación

$$2*(RRM2c>55)+1*(Edad>70)+1*(PRC1c>140)$$

Los modelos para PTC, PTCnoFV, PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y PTCnoFV sin mutación tuvieron un área bajo la curva ROC de 0.826, 0.819, 0.836 y 0.822,

respectivamente. Todos ellos mostraron una calibración aceptable con el modelo de Hosmer-Lemeshow ( $p=0,2414$ ,  $p=0,1044$ ,  $p=0,2$  y  $p=0,133$ , respectivamente) (Figura. 4.15).

En las tablas 4.17–4.20, se puede apreciar el porcentaje de progresión, la sensibilidad, especificidad y la tasa de supervivencia libre de recidiva o muerte por cáncer de tiroides a 5 años en los grupos de puntuación, de los análisis para PTC, PTCnoFV, PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y PTCnoFV sin mutación.



**Figura 4.15** Curvas ROC de los modelos de puntuación para identificar mal pronóstico en: a) PTC, b) PTCnoFV, c) PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y d) PTCnoFV sin mutación.

**Tabla 4.17** Puntuación de los grupos de PTC según la progresión con los porcentajes de sensibilidad y especificidad y supervivencia a 5 años.

Puntuación	No progresión	Progresión	% progresión	Sensibilidad	Especificidad	% supervivencia a 5 años
0-3	33	2	5,7%	96,8%	28,7%	97,1%
4-5	47	10	17,5%	80,6%	69,6%	87,1%
6	28	18	39,1%	51,6%	93,9%	72,3%
7-10	7	32	82,1%	-	-	29,3%

**Tabla 4.18** Puntuación de los grupos de PTCnoFV según progresión con los porcentajes de sensibilidad, especificidad y supervivencia a 5 años.

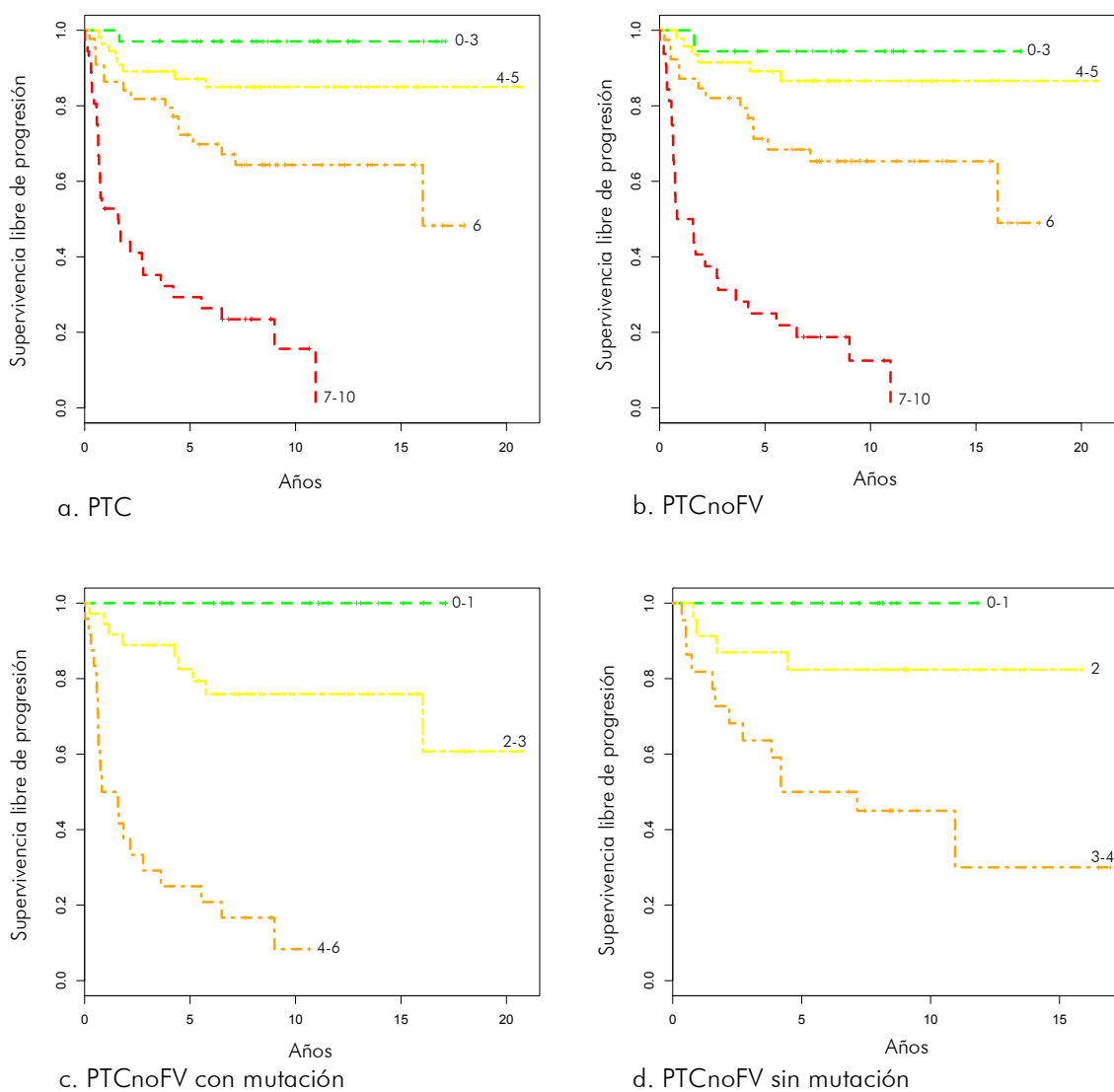
Puntuación	No progresión	Progresión	% de progresión	Sensibilidad	Especificidad	% supervivencia a 5 años
0-3	17	2	10,5%	96,4%	19,5%	94,4%
4-5	41	7	14,6%	83,6%	66,7%	89,1%
6	25	16	39,0%	54,5%	95,4%	71,3%
7-10	4	30	88,2%	-	-	25,0%

**Tabla 4.19** Puntuación de los grupos de PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  según progresión con los porcentajes de sensibilidad, especificidad y la supervivencia a 5 años.

Puntuación	No progresión	Progresión	% de progresión	Sensibilidad	Especificidad	% supervivencia a 5 años
0-1	15	1	6,3%	97,1%	33,3%	100%
2-3	27	11	28,9%	64,7%	93,3%	82,5%
4-6	3	22	88,0%	-	-	25,0%

**Tabla 4.20** Puntuación de los grupos de PTCnoFV sin mutación  $BRAF$  según progresión con los porcentajes de sensibilidad, especificidad y la supervivencia a 5 años.

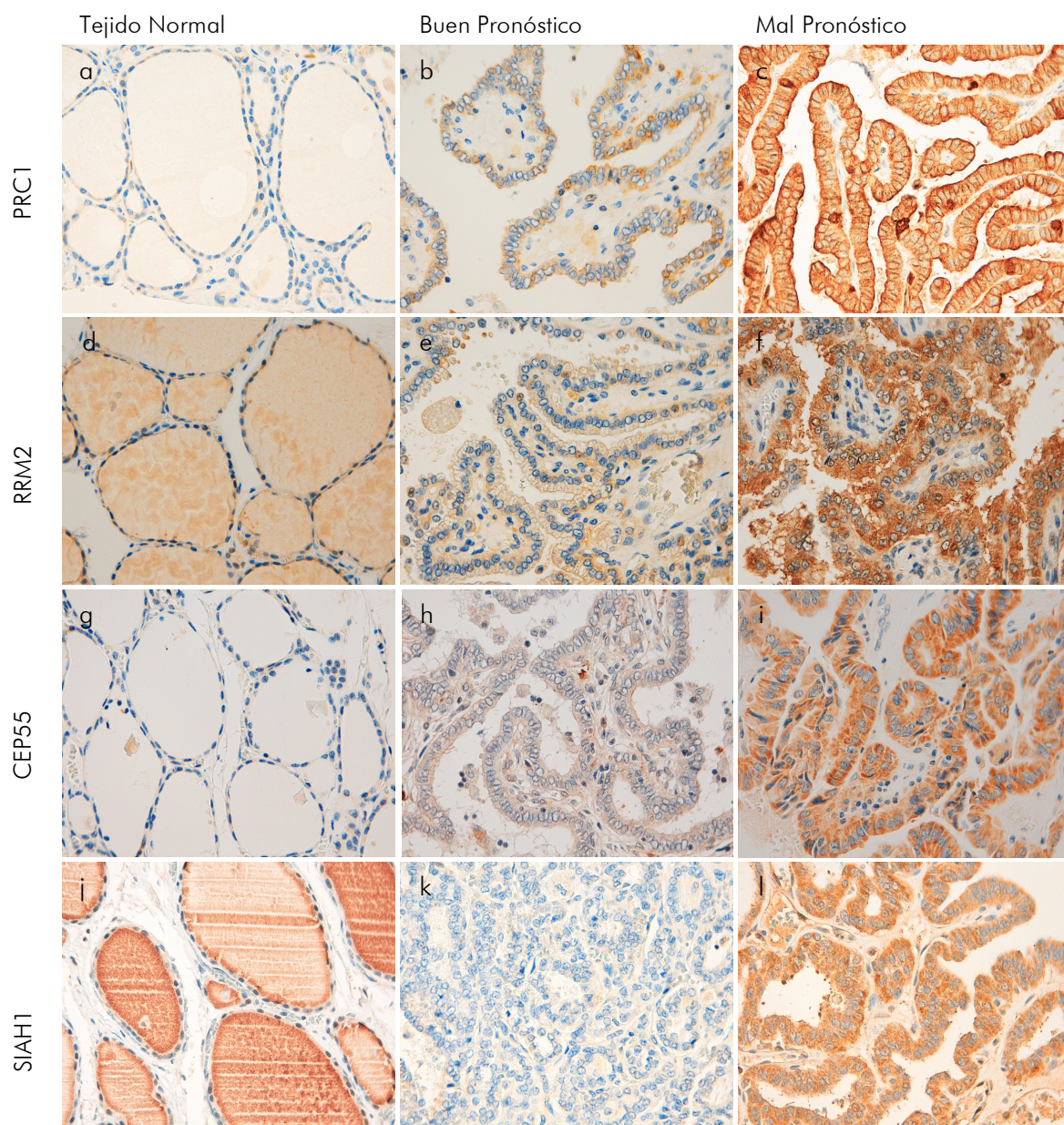
Puntuación	No progresión	Progresión	% de progresión	Sensibilidad	Especificidad	% supervivencia a 5 años
0-1	11	0	0%	100%	28,2%	100%
2	19	4	17,4%	78,9%	76,9%	82,4%
3-4	9	15	62,5%	-	-	50,0%



**Figura 4.16.** Curvas de supervivencia libre de progresión de, a) PTC, b) PTCnoFV, c) PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y d) PTCnoFV sin mutación. En base a los modelos de pronóstico estimados, cada curva muestra la supervivencia libre de progresión de los pacientes con la puntuación indicada sobre ella.

En la figura 4.16, se observan las curvas de Kaplan-Meier para supervivencia según los grupos de puntuación. La prueba de Log-Rank indicó que existían diferencias estadísticamente significativas para cada grupo analizado, PTC, PTCnoFV, PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y PTCnoFV sin mutación, ( $p=0$ ,  $p=0$ ,  $p=1,8e-11$  y  $p=0,000474$ , respectivamente). En las figura 4.17 se presentan las imágenes

inmunohistoquímicas de las proteínas utilizadas para predecir el pronóstico.



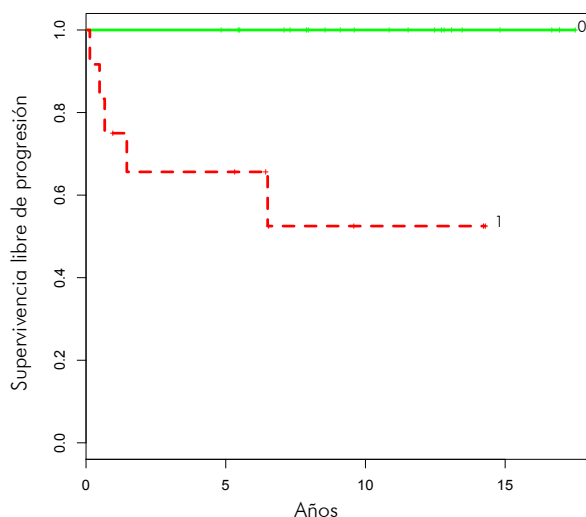
**Figura 4.17** Imágenes inmunohistoquímicas de tejido normal, un caso de buen pronóstico y un caso de mal pronóstico; a, b, c, PRC1; d, e, f, RRM2; g, h, i, CEP55; y j, k, l SIAH1 en carcinomas papilares de tiroides, (40x).

### 5.3 Variante folicular del carcinoma papilar de tiroides

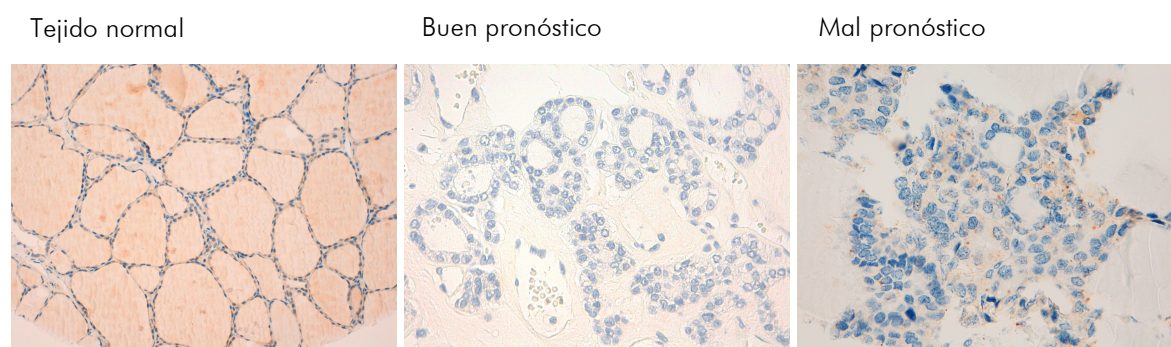
Debido a la escasez de muestra no fue posible estimar un modelo de regresión logística, ya que se requieren 10 eventos por grupo como mínimo. Por lo que sólo se contó con el resultado del árbol de clasificación para este grupo, con una sensibilidad de 100% (8/8), y una especificidad de 77,8% (21/27).

**Tabla 4.21** Puntuación según la progresión para FVPTC.

Puntuación	No progresión	Progresión	% progresión
0 UBE2C <sub>c</sub> =0	21	0	0%
1 UBE2C <sub>c</sub> >0	6	8	57%

**Figura 4.18** Supervivencia libre de progresión de los FVPTC. En base a los modelos de pronóstico estimados, cada curva muestra la supervivencia libre de progresión de los pacientes con la puntuación indicada sobre ella.

En la figura 4.17, se muestran las curvas de Kaplan-Meier para supervivencia de los grupos. La prueba de Log-Rank indica que existe diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p= 0,000673$ ). En los FVPTC, la supervivencia libre de recidiva o muerte por CT fue del 65,6% a 5 años. En las figura 4.19 se presentan las imágenes inmunohistoquímicas de las proteínas utilizadas para predecir el pronóstico.

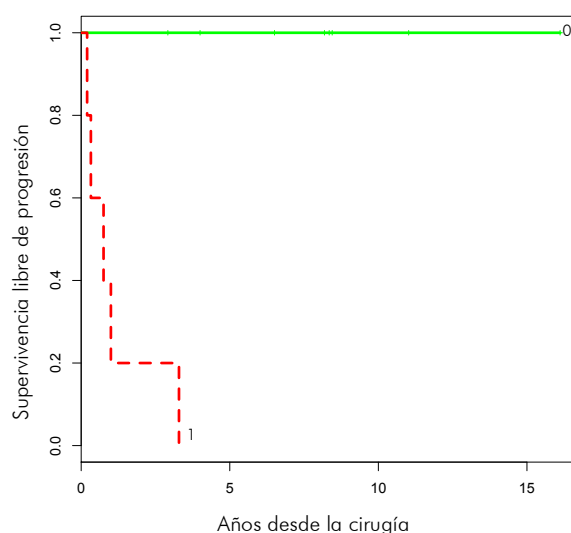
**Figura 4.19** Imágenes inmunohistoquímicas de UBE2C en FVPTC, (40x).

## 5.4 Carcinomas foliculares de tiroides

Como en el grupo anterior, debido a la escasez de muestra, no fue posible aplicar los modelos de regresión. El árbol de clasificación de este grupo tuvo una sensibilidad de 100% (6/6), y una especificidad de 100% (9/9).

**Tabla 4.22** Puntuación según progresión para FTC.

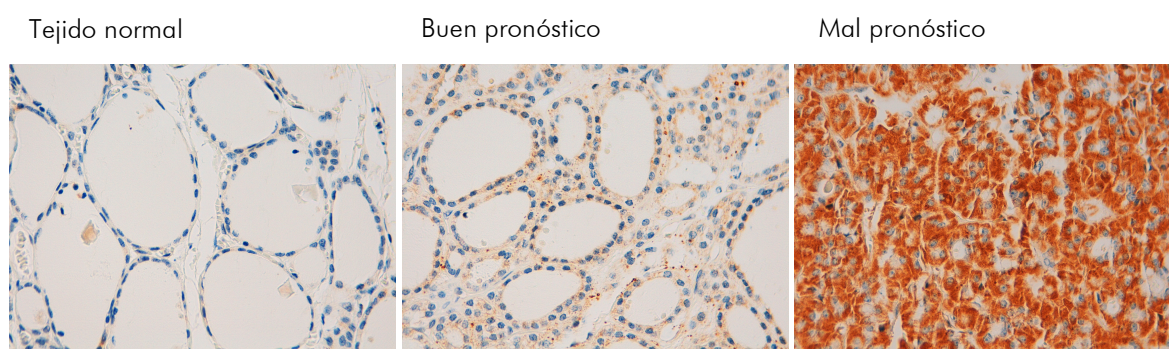
Puntuación	No progresión	Progresión	% progresión
0 CEP55 ≤ 80	9	0	0%
1 CEP55 > 80	0	6	100%



**Figura 4.20** Supervivencia libre de progresión de los FTC. En base a los modelos de pronóstico estimados, cada curva muestra la supervivencia libre de progresión de los pacientes con la puntuación indicada sobre ella.

En la figura 4.20 se observan las curvas de Kaplan-Meier para supervivencia de los grupos. La prueba de Log-Rank indicó que existían diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p= 0,00013$ ). En los FTC, la supervivencia libre de recidiva o muerte por CT fue del 0% a los 5 años. En las figura 4.21 se presentan las imágenes inmunohistoquímicas de las proteínas utilizadas para predecir el pronóstico.





**Figura 4.21** Imágenes inmunohistoquímicas de CEP55 en FTC, (40x).

### 5.5 Carcinomas foliculares y variante folicular del papilar vs. adenomas foliculares

Para encontrar un modelo que discriminara entre los FTC/FVPTC y los AF, se partió del árbol de clasificación del grupo con el fin de obtener el mejor sistema diferencial de puntuación.

$$4*(APLP2n=0)+2*(RRM2n>5)+1*(PRC1c\geq 40)$$

Con este sistema de puntuación, el 0 identificó sólo a los AF, y consiguió separar 44 (54,3%) completamente. En cuanto al resto de puntuaciones, los valores 1, 2 y 4 identificaron a los casos que cumplieron con 1 única condición, los valores 3, 5 y 6 identificaron a los casos que cumplieron con 2 de las condiciones, y el valor 7 identificó a aquellos casos que cumplieron con las tres. La puntuación de 1 no recoge ningún FTC o FVPTC, el sistema de puntuación se agrupó en:

**Tabla 4.23** Puntuación de la probabilidad de pertenecer a un grupo.

Puntuación	FVPTC/FTC	AF	Sensibilidad	Especificidad
0-1 Probable AF	0	57	100%	71.3%
2-3 Probable AF o FTC de buen pronóstico	14	11	72%	85%
4-7 Probable FTC de mal pronóstico	36*	12	-	-

\* en este grupo se clasifican todos los FTC de mal pronóstico.

Para el objetivo principal de distinguir entre AF y FTC, la sensibilidad de la regla de puntuación de los últimos dos grupos, es decir, 2 o más puntos, sería del 100%, IC95%: [92,9%, 100%] y la especificidad del 71,3% [60,0%, 80,8%].

## 5.6 Sistema de puntuación para las PAAF

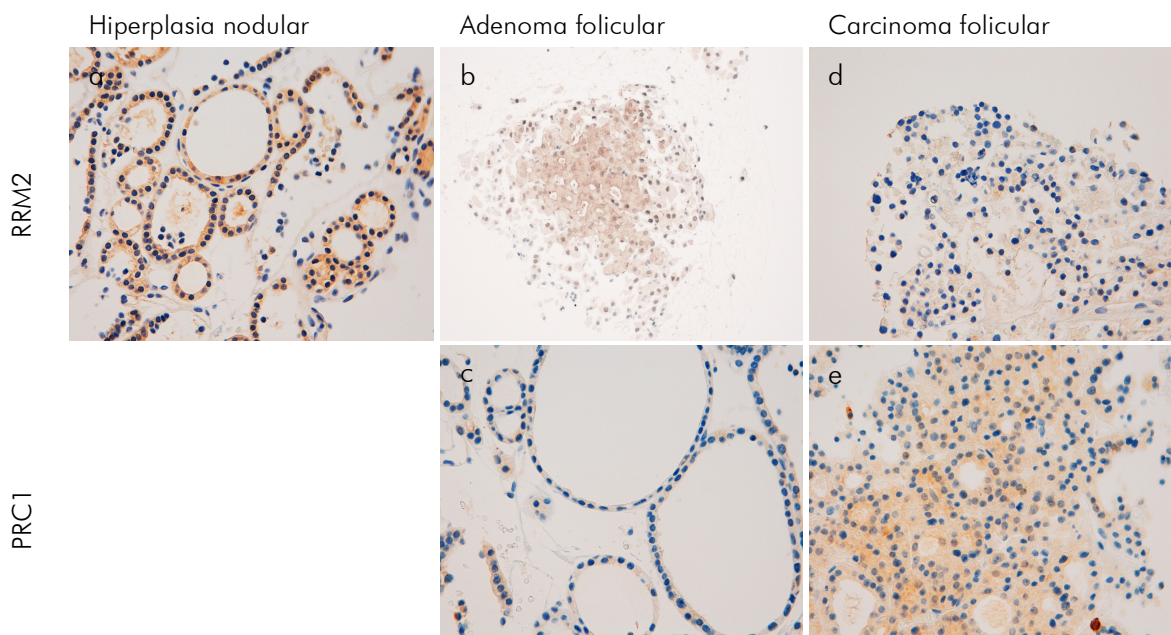
Los H-scores de la expresión del grupo de PAAF no tenían una relación directamente proporcional con los valores de los TMAs. Las expresiones de RRM2 y PRC1 diferían según la muestra fuera del bloque celular de las PAAF o de los TMA. En el caso de las HNT, tampoco se vio un resultado comparable en estas proteínas. Por lo tanto, se construyó un modelo basado en las expresiones de RRM2 y PRC1 del árbol de clasificación y se elaboró el sistema de puntuación que mejor diferenciaba entre FTC, AF y HNT en las muestras de PAAF:

$$1*(PRC1_c > 20) + 2*(RRM2_c \leq 90)$$

El resultado de la suma de las dos puntuaciones es un valor de 0 a 3 indicativo de la probabilidad de pertenecer a un grupo (Tabla 4.24). Y en la figura 4.22 se presentan las imágenes inmunohistoquímicas de las proteínas utilizadas para el diagnóstico diferencial.

**Tabla 4.24** Puntuación de la probabilidad de pertenecer a un grupo.

Puntuación	FTC	AF	HNT	Sensibilidad	Especificidad
0 Probable HNT	0	0	2	100%	9.1%
1 Probable HNT	0	0	8	100%	45.5%
2 Probable AF	2	6	1	77%	77.3%
3 Probable FTC	7	3	2	-	-



**Figura 4.22** Imágenes inmunohistoquímicas de PRC1 y RRM2 en PAAF indeterminada. a, hiperplasia nodular de tiroides RRM2 > 90; b y c, adenoma folicular RRM2 ≤ 90, PRC1 < 20%; y carcinoma folicular RRM2 ≤ 90, PRC1 > 20%, (40x).

## SECCIÓN 3

En la tercera sección, se describen los perfiles de expresión de miRNAs por grupos de diagnóstico y pronóstico. El análisis según pronóstico se realizó sólo para el grupo de los PTCnoFV, debido a que sólo se contaba con 8 casos de FVPTC y 6 FTC. Se confirmó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre buen y mal pronóstico en cuanto a la invasión local ( $p=0,002$ ) y las metástasis ganglionares ( $p=0,002$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el diámetro del tumor (2,5 y 2,7cm,  $p=0,17$ ) o en la frecuencia de mutaciones en *BRAF*, que fue del 62,5% y 60% ( $p=1$ ), para buen y mal pronóstico, respectivamente.

### **1. Perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre el tejido normal y grupos tumorales, AF, PTCnoFV, FVPTC y FTC**

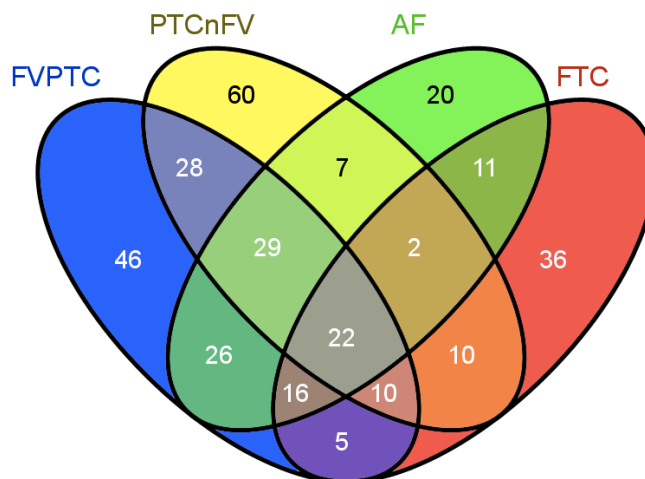
Una vez normalizados y filtrados los miRNAs con poca expresión, los 9 tejidos normales presentes en la serie fueron comparados con los demás grupos de tumores: AF, PTCnoFV, FVPTC y FTC. El modelo de Neyman proporcionó una serie miRNAs con expresión diferencial: 133 miRNAs para los AF, 168 miRNAs para los PTCnoFV, 182 miRNAs para los FVPTC y 112 miRNAs para los FTC. Cada serie de miRNAs fue ordenada según la magnitud del p valor ajustado, el fold change y la cantidad de lecturas.

En la tabla 4.25, se presentan los primeros 10 miRNAs de cada subtipo tumoral. En la tabla 4.26 y en el diagrama de Venn de la figura 4.23, se comparan los perfiles de expresión de miRNAs exclusivos para cada subtipo analizado, AF, PTCnoFV, FVPTC y FTC, y los que son comunes a dos o más grupos. En la sección de anexos, se encuentran las tablas 8.11-8.14 con todos los miRNAs diferencialmente expresados para cada grupo con un valor de p ajustado, inferior al nivel de significación,  $p<0,05$ .

**Tabla 4.25** Los 10 primeros miRNAs de cada grupo: AF, PTCnFV, FVPTC y FTC, respecto al tejido normal\*.

AF		PTCnFV		FVPTC		FTC	
miRNA	Fold	miRNA	Fold	miRNA	Fold	miRNA	Fold
mirR-200c	1,39	miR-221	3,95	miR-423	-1,10	miR-181b	-1,15
mirR-151b	1,14	miR-146b	5,26	miR-3184	-1,10	miR-101	-1,24
mirR-197	-1,25	miR-222	3,47	miR-125b	2,17	miR-199a	-1,40
mirR-941	1,23	miR-21	2,02	miR-200c	1,36	miR-186	-1,18
mirR-1301	1,86	miR-143	-1,26	miR-151b	1,47	miR-199b	-1,57
mirR-182	1,77	miR-181a	1,01	miR-125b	2,26	miR-574	-1,45
mirR-99b	1,60	miR-197	-1,08	miR-197	-1,29	miR-744	-1,51
mirR-128	-1,25	miR-320b	-1,03	miR-125a	1,45	miR-1291	2,68
mirR-199a	-1,22	miR-375	2,73	miR-99b	1,84	miR-5701	1,73
mirR-218	-1,76	miR-34a	2,65	miR-100	1,91	miR-345	-1,97

\* Fold hace referencia al logaritmo en base 2 del *fold change*, es decir, la razón de expresión respecto al tejido normal. Cuando el símbolo es negativo, significa que el miRNA está sub-expresado.



**Figura 4.23** Diagrama de Venn de los miRNAs expresados en cada grupo y sus interacciones.

**Tabla 4.26** Perfiles de expresión de miRNAs en tumores del epitelio folicular.

Grupos	n	miRNAs
AF, PTC y FTC	22	miR-96, 99b, 101-2, 133b, 197, 200c, 218-1, 224, 320c-1, 320c-2, 365a, 365b, 433, 500b, 504, 1301, 1268b, 1268a, 1291, 4732, 5701-1, 5701-2
WDTC	10	miR-144, 181b-1, 181b-2, 221, 451a, 451b, 486, 548t, 548ae-2 y 4454
AF	20	<u>Sobre-expresados</u> miR-22, 190a, 765, 874, 941-1, 941-2, 941-3, 941-4, 1343, 1914, 3928, 4485, y 4775 <u>Sub-expresados</u> miR-92a-2, 218-2, 429, 548c, 548z, 3928, 4516, y 4640
PTCnoFV	60	<u>Sobre-expresados</u> miR-21, 29b-1, 33a, 135b, 146b, 147b, 200b, 212, 222, 301b, 375, 508, 509-1, 509-2, 509-3, 513c, 514a-1, 514a-2, 514a-3, 564, 659, 668, 1248, 1908, 3168, 3651, 3690-1, 3690-2, 4442, 4802, 4520a, 4787, 4791, 6503, y let-7i <u>Sub-expresados</u> miR-1-1, 1-2, 26b, 30c-1, 30c-2, 126, 139, 145, 152, 192, 195, 320a, 363, 532, 548h-2, 548h-3, 548h-4, 584, 605, 873, 1270-1, 1270-2, 3652, 4664, y 6511b-1
PTCnoFV y FTC	10	<u>Sobre-expresados</u> miR-31 y 6723 <u>Sub-expresados</u> miR-28, 30a, 320d-1, 320d-2, 548ay, 577, 1179, y 1287
PTCnoFV y FVPTC	28	<u>Sobre-expresados</u> miR-15a, 29a, 29b-2, 99a, 125a, 125b-1, 125b-2, 181a-1, 181a-2, 187, 449b, 450a-1, 450a-2, 503, 542, 551b, 1226, 2114, 3613, 4709, y 4758 <u>Sub-expresados</u> miR-548aa-1, 548aa-2, 548ad, 548d-1, 548d-2, 1275, y 3127
FTC	36	<u>Sobre-expresados</u> miR-20b, 103a-1, 103a-2, 103b-1, 103b-2, 885, 1227, 1229, 3607, y 3960 <u>Sub-expresados</u> miR-23b, 26a-1, 26a-2, 130a, 133a-1, 133a-2, 138-1, 138-2, 181c, 186, 205, 296, 328, 345, 376c, 548h-1, 574, 650, 744, 1266, 3157, 3943, 4661, 5189, 5193 y 6087
FTCy FVPTC	5	<u>Sub-expresados</u> miR-9-1, 9-2, 9-3, 323a, y 3154
FTC y AF	11	<u>Sobre-expresados</u> miR-17, 185, 219-1, y 454 <u>Sub-expresados</u> miR-19b-1, 19b-2, 34c, 184, 193b, 455, y 4448
FTC, FVPTC y AF	16	<u>Sobre-expresado</u> miR-3200 <u>Sub-expresados</u> miR-34b, 101-1, 214, 223, 381, 494, 1247, 199a-1, 199a-2, 199b, 1249, 3120, 3622a, 3622b, 3934
FVPTC	46	<u>Sobre-expresados</u> miR-27b, 29c, 30d, 100, 130b, 135a-2, 141, 148b, 194-1, 194-2, 338, 450b, 548e, 628, 3065, 4510 <u>Sub-expresados</u> miR-7-2, 7-3, 10b, 129-1, 193a, 370, 382, 410, 431, 432, 433, 487b, 493, 505, 625, 663a, 675, 1273a, 1273f, 1303, 1304, 3135b, 3159, 4419a, 4430, 4524a, 4524b, 4677, 4685, y 6501

En la tabla están los grupos de miRNAs que son exclusivos para cada grupo WDTC, AF, PTCnoFV, FVPTC y FTC. Además de los que son comunes a dos o más grupos. Los grupos diagnóstico y sus intersecciones están ilustrados en el diagrama de Venn, figura 4.23.

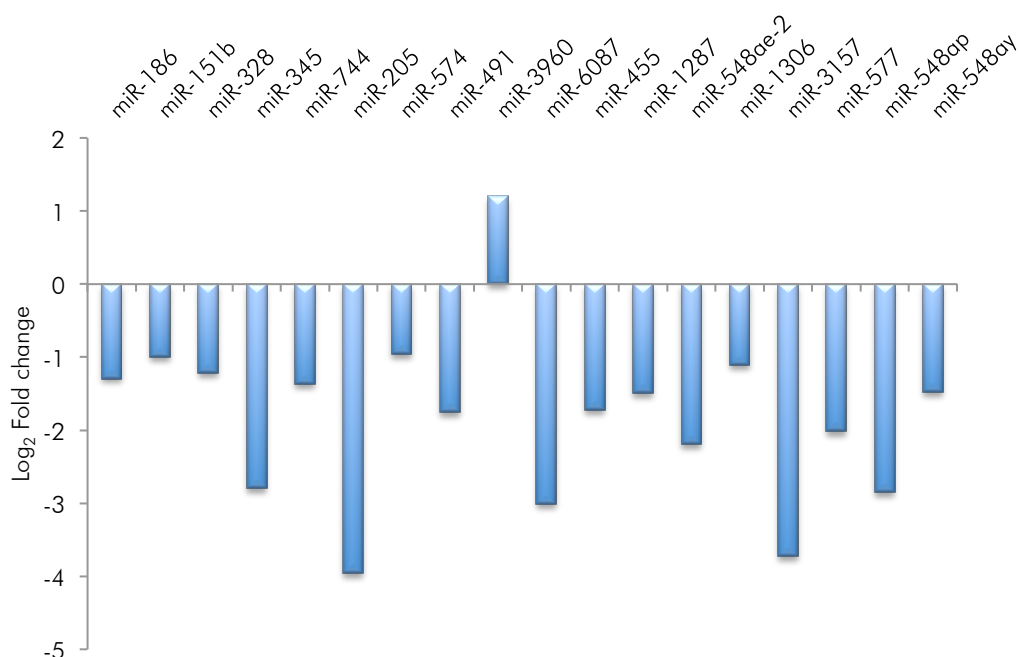
## 2. Perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre grupos de diagnóstico.

### a. Carcinomas foliculares + FVPTC vs. adenomas foliculares

Se reunieron los 6 FTC y los 8 FVPTC de la serie, y se compararon con los 10 AF. Una vez normalizados y filtrados, sólo se identificó al miR-219-1 con expresión diferencial de acuerdo con el modelo de Neyman.

### b. Carcinomas foliculares vs. adenomas foliculares

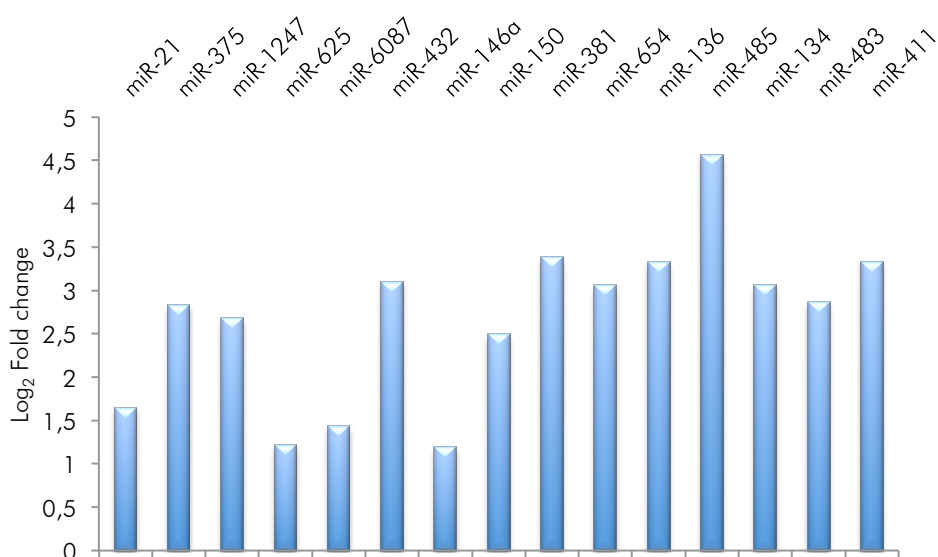
Se compararon los 6 FTC con los 10 adenomas de la serie y el modelo de Neyman identificó una serie de 18 miRNAs con expresión diferencial. En esta serie, 17 miRNAs están sub-expresados en los FTC respecto a los AF (Figura 4.24). En la sección de anexos se presenta la tabla 8.15 con todos los miRNAs diferencialmente expresados.



**Figura 4.24** Niveles de expresión de los miRNAs diferencialmente expresados entre FTC y AF.

### c. Carcinomas papilares de variante no folicular vs. variante folicular

Se compararon los 8 FVPTC y los 35 PTCnoFV de la serie y el modelo de Neyman identificó una serie de 137 miRNAs con expresión diferencial. Los primeros 15 están sobre-expresados en los PTCnoFV respecto a los FVPTC y se muestran en la figura 4.25. En la sección de anexos se encuentra la tabla 8.16 con todos los miRNAs diferencialmente expresados.



**Figura 4.25** Niveles de expresión de miRNAs diferencialmente expresados entre PTCnoFV y FVPTC.

### d. Carcinomas papilares vs. carcinomas foliculares

Se compararon los 35 PTCnoFV con los 6 FTC de la serie y el modelo de Neyman proporcionó una serie de 140 miRNAs con expresión diferencial. En la figura 4.26, se muestran los 15 primeros miRNAs de acuerdo con el algoritmo aplicado, y que están sobre-expresados en los PTCnoFV respecto a los FTC. En la sección de anexos se encuentra la tabla 8.17 con los miRNAs diferencialmente expresados.



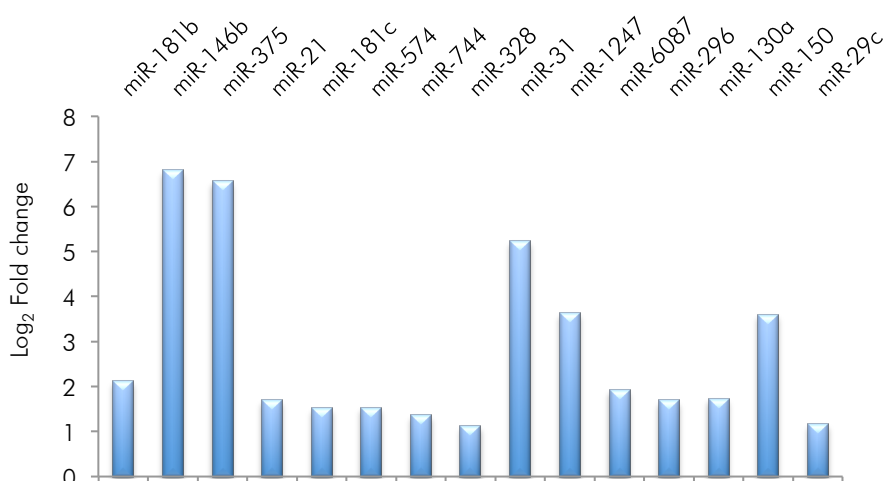
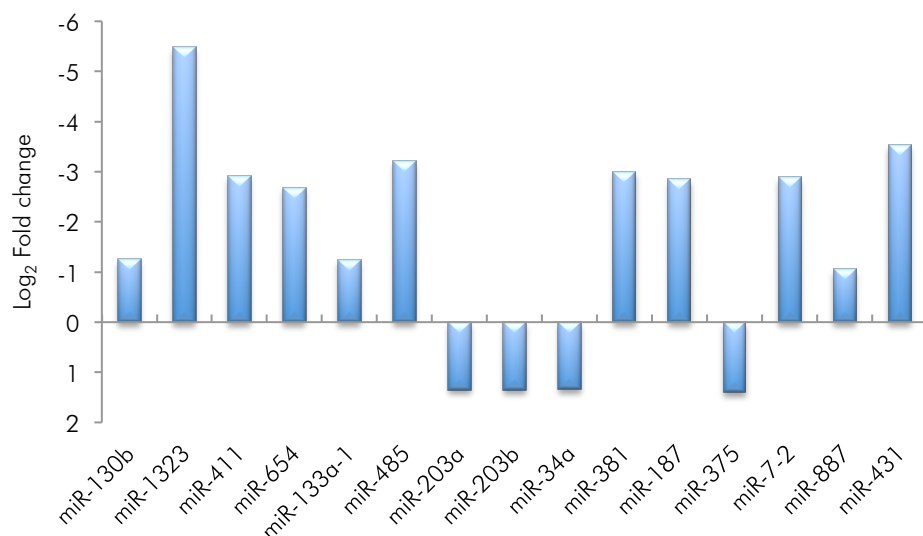


Figura 4.26 miRNAs diferencialmente expresados entre PTCnoFV y FTC.

### 3. Perfiles de expresión diferencial de miRNAs entre grupos con diferente estatus genético (mutación $BRAF^{V600E}$ ) y de pronóstico

#### a. PTC con mutación vs. PTC sin mutación

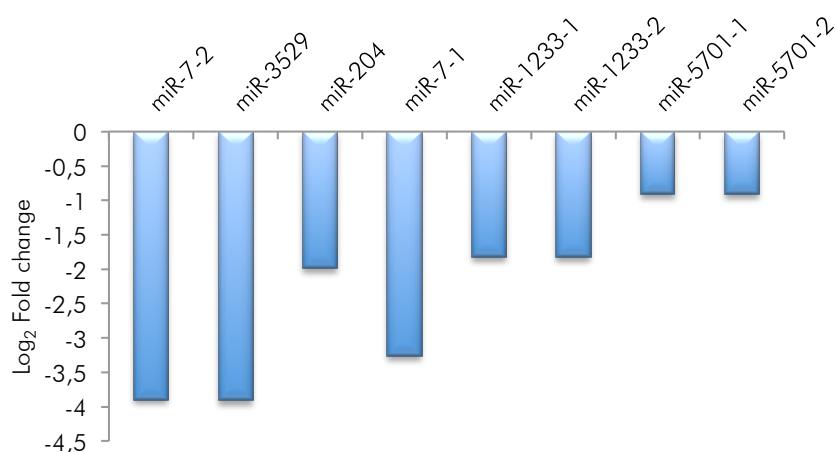
La comparación de 20 PTC con la mutación  $BRAF^{V600E}$  con 15 PTC WT sin mutación mediante el modelo de Neyman identificó una serie de 47 miRNAs con expresión diferencial. En la figura 4.27, se muestran los 15 primeros de acuerdo con el algoritmo aplicado. En la sección de anexos se presenta la tabla 8.18 con todos los miRNAs diferencialmente expresados. La frecuencia de mal pronóstico respecto a la mutación  $BRAF$  fue de 47,4% en casos con la mutación  $BRAF^{V600E}$  mutados y 50% en tumores sin mutación.



**Figura 4.27** miRNAs diferencialmente expresados entre PTC  $BRAF^{V600E}$  y  $BRAF^{WT}$ .

**b. PTC de mal pronóstico versus PTC de buen pronóstico**

La comparación de los 15 PTC de mal pronóstico con los 16 PTC de buen pronóstico mediante el modelo de Neyman identificó una serie de 8 miRNAs con expresión diferencial. Los ocho miRNAs estaban sub-expresados en los casos de mal pronóstico (Figura 4.28). La frecuencia de mutación  $BRAF^{V600E}$  fue de 62,5% en los casos de buen y del 60% en los de mal pronóstico.



**Figura 4.28** miRNAs diferencialmente expresados en PTC según pronóstico.

## 5. Discusión

La contribución más valiosa de este estudio es haber determinado firmas de expresión de proteínas en una serie de 313 tumores de tiroides, que no sólo validan la firma molecular de pronóstico previamente propuesta por el grupo (233), sino que pueden contribuir a mejorar el diagnóstico y a predecir el pronóstico evolutivo de los carcinomas del epitelio folicular tiroideo. Se han identificado además, en una serie de 59 tumores de tiroides congelados, grupos de miRNA que muestran una expresión diferencial entre los tipos de WDTC (PTC y FTC) y el tejido tiroideo normal, así como entre varios subtipos histológicos. En concreto, entre FTC y AF, PTC y FTC, PTC con y sin mutación  $BRAF^{V600E}$ , y entre PTC de buen y mal pronóstico.

De acuerdo con el criterio histológico vigente, existen dos grupos de neoplasias en los tumores del epitelio folicular: benignas (AF), y malignas (PTC y FTC) (23). Sin embargo, existen lesiones de difícil diagnóstico y pronóstico por ser de naturaleza incierta, al no cumplir los criterios establecidos (235). A pesar de los avances en las técnicas de inmunohistoquímica y de biología molecular, encaminados a identificar marcadores específicos de WDTC, no existen aún herramientas robustas de diagnóstico y pronóstico que puedan ser utilizadas en la práctica clínica diaria a nivel global. Indudablemente, las tecnologías de alto rendimiento, como la genómica y la proteómica, muy útiles en la mejora de herramientas de diagnóstico y pronóstico en cáncer en general, podrían serlo también en el CT en particular (236).

En este sentido, los perfiles de expresión génica han definido firmas moleculares con un gran número de genes implicados en los procesos de tumorigénesis y de progresión del CT (204,233,237). Igualmente, se han descrito series de miRNAs característicos de los principales tipos de CT, así como de grupos de miRNAs asociados a un mayor riesgo de progresión y cuya expresión depende tanto de las características clínicas como de las mutaciones primarias (225,232,238-242).

## 1. Características de la serie general

La serie general estudiada incluye los 313 casos disponibles para validar por IHC la firma transcripcional previamente publicada por el grupo (Montero-Conde, 2008). Esta serie corrobora las características descritas en otras series en cuanto a frecuencia de las diferentes variantes de CT, distribución por sexo, 3 veces mayor en mujeres (23) y los parámetros asociados con mal pronóstico, como la edad (superior a 45 años), la invasión local, la presencia de metástasis ganglionares (34), la tiroglobulina positiva y la presencia de la mutación  $BRAF^{V600E}$  en los PTC (117).

Los WDTC tienen, en su mayoría, alterada la ruta de las MAPK a través de mutaciones somáticas en genes clave para su regulación, como *BRAF*, *N-RAS* o *H-RAS*, o reordenamientos entre el proto-oncogén *RET* y otros genes no relacionados que se expresan de forma ubicua en las células foliculares (reordenamientos *RET/PTC*) (113). Conocer qué mutación es la que origina un CT es esencial para su correcta clasificación, y para identificar marcadores específicos relacionados con su comportamiento clínico en fases posteriores.

Existe gran variabilidad en las series publicadas en cuanto a frecuencia de mutaciones, atribuibles en parte a las diferentes clasificaciones utilizadas en los distintos estudios. En la serie general de 313 casos, la frecuencia de mutaciones coincide con la establecida por estudios previos: 27-87% *BRAF* en los PTC; y 5% *BRAF* y ~40% *NRAS* en los FVPTC (110,123,162,243). Sin embargo, en los FTC y AF, la frecuencia de mutaciones en los genes *NRAS* y *HRAS* observada en la serie general está por debajo de las descritas previamente para ambos grupos (2,95). Estas diferencias podrían atribuirse a las limitaciones de la secuenciación por Sanger cuando existe heterogeneidad tumoral, y/o debido al bajo número de casos evaluados.

En cuanto a la controvertida asociación entre la presencia de la mutación  $BRAF^{V600E}$  y el mal pronóstico, los resultados del presente estudio, a pesar de no estar diseñado para ello, coinciden con trabajos previos (115,244). Los tumores con  $BRAF^{V600E}$  están

asociados a un alto riesgo de desarrollar un comportamiento más agresivo y tener un resultado menos favorable a corto y medio plazo. De hecho, la supervivencia libre de progresión a 5 años fue del 25% y del 50% en los PTCnoFV con y sin mutación  $BRAF^{V600E}$ , respectivamente. Sin embargo, la mutación  $BRAF^{V600E}$  no es un factor predictivo independiente de recidiva, ya que la frecuencia de mutación fue de 52% y 61% en los casos de buen y mal pronóstico, respectivamente, ( $p=0,3$ ).

## 2. Proteínas diferencialmente expresadas para diagnóstico y predicción del pronóstico

Desde su desarrollo, hace más de 40 años, el uso de la inmunohistoquímica ha experimentado un crecimiento espectacular debido al número de marcadores comerciales disponibles, la calidad de los mismos, así como por la mejora de los procedimientos técnicos utilizados. Así, la inmunohistoquímica ha pasado a ser una técnica de elección para validar los resultados de pruebas de alto rendimiento como los *microarrays* de cDNA (234). Sin embargo, para su optimización, es necesario conocer las peculiaridades y limitaciones de la técnica para cada tejido a la hora de interpretar los resultados. En el caso de la tiroides, es necesario tener en cuenta su alto nivel endógeno de biotina cuando se emplean técnicas de estreptavidina-biotina. Por este motivo, para la IHQ de este estudio se utilizó Envision™, un polímero de dextrano que no utiliza biotina.

La firma molecular en la que se basa este estudio tiene 23 genes, de los que solo uno no codifica una proteína. De las 22 proteínas restantes, fue posible validar los protocolos de IHQ para 19 de ellas. De modo que, en los 313 casos de la serie general se utilizaron los 19 anticuerpos comercialmente disponibles. El análisis estadístico demostró que un grupo de 6 de las 19 proteínas, esto es PRC1, SIAH1, RRM2, UBE2C, CEP55, y APLP2, solas o en diferentes combinaciones, eran capaces de discriminar entre grupos de diagnóstico, y entre buen y mal pronóstico.

Los resultados demuestran que los datos de expresión génica del *microarray* están correlacionados con los análisis cuantitativos de la IHC. Cinco de los seis anticuerpos mostraron el resultado esperado de acuerdo a los datos de expresión génica. Solamente SIAH1 mostró resultados discordantes. En concreto, este gen mostró sobre-expresión en los datos del *microarray* en los casos de buen pronóstico. En el análisis inmunohistoquímico, esta proteína estaba sobre-expresada en los tumores de mal pronóstico.

De las 22 proteínas que conformaban la firma molecular inicial, solo BIRC5 y UBE2C han sido relacionadas previamente con el cáncer de tiroides (245-247). Si bien se había sugerido que la expresión de BIRC5 depende del grado de diferenciación del tumor y podía diferenciar AF de FTC (245,246), los análisis de expresión diferencial, y los modelos de diagnóstico y predicción del pronóstico del presente estudio indicaron que BIRC5 no permite diferenciar ni entre grupos de diagnóstico, ni entre un buen y mal pronóstico. En cambio, este estudio permite proponer por primera vez seis proteínas, cuya evaluación por técnicas inmunohistoquímicas conduce a la discriminación entre subtipos histológicos, y entre tumores de buen y mal pronóstico.

La proteína UBE2C (ubiquitin – conjugating enzyme E2C), clave para la fase G2/M, se expresa abundantemente en las fases M y G1, y disminuye en las fases G1 tardía, S y G2 del ciclo celular. La expresión de UBE2C se ha asociado al grado de malignidad del tumor en astrocitomas, y neoplasias de mama, pulmón, ovario, vejiga, linfoma y tiroides. En el CT, UBE2C está aumentada en los ATC, y tiene una expresión moderada en los WDTC (247-255). En la serie general, esta proteína se expresa débilmente en los WDTC y con una intensidad moderada en los ATC y PDTC, confirmando los hallazgos anteriormente mencionados. Sin embargo, existe una diferencia significativa entre los casos de buen y mal pronóstico. De hecho, en el grupo de FVPTC su expresión en los casos de buen pronóstico es nula ( $H\text{-score} > 0$ ), convirtiéndose así en la proteína más importante asociada al pronóstico en este subtipo, con una sensibilidad del 100% y una especificidad de 77.8%.

La proteína CEP55 (centrosomal protein 55 kDa) (C10orf3) ayuda a la célula a salir de la mitosis y citocinesis. Los niveles de esta proteína están elevados en una amplia variedad de cánceres, como el colorectal, estómago, pulmón, páncreas, hepatocelular, mama y en la progresión de carcinomas escamosos en cabeza y cuello, pero no había sido descrita previamente en el cáncer de tiroides (256-261). CEP55 promueve la proliferación, migración e invasión celular, de modo que su expresión se asocia a mal pronóstico. (262,263). La transformación mediada en parte por la vía de señalización de PI3K/AKT, es la más importante en desarrollo y progresión de los FTC. De hecho, para el grupo de los FTC, CEP55 fue la proteína más importante, ya que individualmente con un H-score >80 discriminó casos con mal y buen pronóstico con una sensibilidad y una especificidad del 100%. De este modo, CEP55 podría resultar ser no sólo un marcador de mal pronóstico, sino también una posible diana terapéutica para mejorar el tratamiento de este subtipo de tumores.

La proteína PCR1 (protein regulador of citokinesis 1) está involucrada en la citocinesis (260,264,265). Su expresión aumenta marcadamente durante la fase S y G2/M del ciclo celular, y cae dramáticamente después de que la célula salga de la fase de mitosis y entre en G1. Se sobre-expresa en cáncer de mama, colon, células grandes de pulmón, páncreas y colangiocarcinoma, pero no en células normales (266), y su transcripción es suprimida por p53 (267). Hasta la fecha no se había descrito su expresión en CT. Dado que desempeña un papel esencial en la unión de las dos mitades del huso y la formación de la zona media durante la citocinesis (268), no sorprende que en este estudio PCR1 contribuya en los modelos de diagnóstico a discriminar carcinomas de adenomas, y en los modelos de pronóstico a diferenciar entre los que tienen un buen pronóstico y los que no.

APLP2 (amyloid beta (A4) precursor-like proteína 2) es una proteína relacionada con las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (269), que participa en la transmisión neuromuscular, el aprendizaje espacial y la plasticidad sináptica, y que ha sido implicada en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (270). APLP2 promueve la proliferación celular en el cáncer de páncreas, y está sub-



expresada en tumores neuroendrínicos de estómago y pulmón (271,272). Si bien no se ha asociado al cáncer de tiroides, *APP* (Amyloid precursor protein), un miembro de esta familia, actúa como un factor de crecimiento autocrino en células del epitelio folicular (273). En la firma molecular de genes con valor pronóstico, *APLP2* estaba subexpresado en los tumores de mal pronóstico. En este estudio, si bien la expresión fue similar entre los casos de buen y mal pronóstico, la expresión nuclear fue significativamente mayor en los AF. De hecho, la expresión de *APLP2* fue la variable más importante para diferenciar los AF de los tumores con un patrón de crecimiento folicular (FTC y FVPTC).

La proteína *RRM2* (ribonucleotide reductase M2 polypeptide) es la subunidad pequeña de la ribonucleótido reductasa, un complejo enzimático esencial para la producción y el mantenimiento de los niveles de desoxiribonucleósidos trifosfato (dNTPs) esenciales para la síntesis del DNA. La síntesis de DNA y la proliferación celular están controladas durante el ciclo celular por la síntesis y degradación de la subunidad *RRM2* (274,275). La sobreexpresión de *RRM2* se ha descrito en cáncer de esófago, y estómago (276), y aumenta el potencial invasivo y de metástasis en el cáncer de colon (275). De este modo, una alta expresión de *RRM2* en el CT podría constituir también un marcador de malignidad. De hecho, en esta serie, *RRM2* no solo es parte de modelos para identificar un mal pronóstico, sino que en los modelos diagnósticos contribuye en la identificación de carcinomas foliculares.

La proteína *SIAH1* (seven in absentia homolog 1) es una ligasa E3 involucrada en la ubiquitinización y degradación de proteínas específicas por parte del proteosoma. *SIAH1* fue inicialmente identificado como gen supresor tumoral (277). La expresión de *SIAH1* también se ha asociado a crecimiento tumoral y metástasis. De hecho, en varios tipos de cáncer como páncreas, nasofaríngeo y mama, se la ha propuesto como una nueva diana terapéutica debido a su papel central como inhibidor de vías oncogénicas y angiogénicas, Ras, HIF-1 $\alpha$ /VEGF, WNT, estrógenos, y también daño del DNA, entre otras (278-281).

En este estudio, SIAH1 fue importante en los modelos de pronóstico en los PTC. Sin embargo, existe una discordancia importante, ya que el gen está sobre-expresado en los tumores de buen pronóstico mientras que la proteína está sobre-expresada en los de mal pronóstico. Como se ha mencionado antes, también se ha descrito la sobre-expresión de esta proteína en otros carcinomas. De modo que, los resultados de esta serie sugieren que SIAH1 podría tener valor como marcador de malignidad en los PTC. Esta proteína no ha sido descrita anteriormente en cáncer de tiroides. Por lo tanto, constituye una importante contribución de este trabajo, que requiere tanto su validación en otra serie como la realización de estudios funcionales para dilucidar su posible utilización como diana terapéutica en CT.

### **3. Firmas de expresión de proteínas para mejorar el diagnóstico de los carcinomas del epitelio folicular tiroideo**

Mejorar el diagnóstico puede no sólo maximizar los efectos beneficiosos de una terapia agresiva, sino que también puede minimizar posibles complicaciones y efectos secundarios en los pacientes con bajo riesgo. El test molecular (Afirma® *Gene Expression Classifier*) identifica los nódulos benignos en las PAAF indeterminadas con una sensibilidad de 92% y una especificidad de 52% (45). La utilización de este test lograría disminuir las cirugías hasta en un 74%, con un ahorro global de \$1,453 (1.070€) por paciente y un escaso 0,07 QALY (año de vida ajustado por calidad). Sin embargo, la proporción de nódulos malignos que se dejan de tratar no varía, 1,4% nódulos malignos perdidos con las técnicas de diagnóstico actuales y 1,4% perdidos con el uso del test molecular. Teniendo en cuenta que el coste del test es de \$3,200 (2.355€), la obtención de marcadores que tengan una sensibilidad similar, tendría una ventaja económica mucho mayor, ya que el coste de una determinación inmunohistoquímica es de 30€ aproximadamente (282). Por lo tanto, existe una necesidad de realizar estudios como el presente, que identifiquen marcadores que puedan ser utilizados en la práctica clínica diaria.

Para diferenciar los AF de tumores que tienen un patrón de crecimiento folicular (FTC y FVPTC), la expresión de APLP2 fue la variable que mayor peso tuvo en la construcción del modelo. Tanto en los árboles de clasificación ( $APLP2_n=0$ ,  $RRM2_n>5$ ,  $PRC1_c\geq 40$ ,  $SIAH1_n\leq 5$ ,  $APLP2_c\leq 105$ ), como en los sistemas de puntuación ( $4*APLP2_n=0+2*RRM2_n>5+1*PRC1_c\geq 40$ ), la sensibilidad fue del 100% y la especificidad de 98.8% y 71.3%, respectivamente. Además, estos dos modelos se aplicaron a la serie de tumores benignos (HNT) y obtuvieron una especificidad de 94.8% y 94.9% respectivamente. Estos resultados indican que sería un modelo excelente para el diagnóstico diferencial en tumores resecados. Sin embargo, debido a que la expresión proteínica en los tumores y en las PAAF no fue comparable, se construyó un modelo diferente de acuerdo a las proteínas que mejor diferencian estos grupos.

En la serie de PAAF, para diferenciar entre los FTC, AF y HNT, se diseñó un modelo constituido por el H-score de RRM2, y el porcentaje de las células positivas para PRC1. En el árbol de clasificación, este modelo permitió separar la serie de PAAF constituida por carcinomas, adenomas e hiperplasias con sensibilidades de 72.7%, 77.8% y 81.8% y especificidades de 83.3%, 86.4% y 94.4%, respectivamente.

En los sistemas de puntuación en que se agruparon los AF y las HNT (tumores benignos), la sensibilidad fue del 100% y la especificidad de 45.5%. Es un modelo interesante que diferencia claramente entre los tumores malignos (FTC) y los tumores benignos (AF y HNT). Sería imprescindible validar estos modelos en una serie más grande de PAAF. Específicamente, la identificación de las HNT tienen una excelente sensibilidad y especificidad, mejorando incluso las descritas en la literatura (45).

#### 4. Firmas de expresión de proteínas para predecir el pronóstico de los carcinomas del epitelio folicular tiroideo

La utilidad de la mutación  $BRAF^{V600E}$  para el pronóstico de los PTC ha sido analizada en muchos estudios con resultados controvertidos, y es una cuestión que aún no está completamente resuelta. En algunos de ellos, se ha descrito que pacientes con tumores  $BRAF^{V600E}$  tienen mayor riesgo de un comportamiento agresivo, y con resultados del tratamiento menos favorables a corto y medio plazo (244). Sin embargo, la mutación  $BRAF^{V600E}$  no es un factor predictivo independiente y, por lo tanto, algunos autores no aconsejan su uso como un marcador de pronóstico en la práctica clínica (172,244,283).

El grupo de los PTC fue analizado exhaustivamente, atendiendo al diferente comportamiento biológico asociado a sus distintas variantes histológicas y a su estatus genético. Por lo tanto, se dividió el grupo en: a) todos los PTC, b) los PTC excluyendo la variante folicular (PTCnoFV), c) los PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$ , d) los PTCnoFV sin  $BRAF^{V600E}$  y e) los FVPTC, y se aplicaron árboles de clasificación seguidos de sistemas de puntuación para obtener modelos óptimos que discriminasen buen y mal pronóstico.

En los modelos de pronóstico identificados para cada subgrupo (PTC, PTCnoFV, PTCnoFV con mutación  $BRAF^{V600E}$  y PTCnoFV sin mutación  $BRAF^{WT}$ ) las variables utilizadas fueron muy similares. Sin embargo, la sensibilidad y especificidad mejoraron con el fraccionamiento del grupo de PTC, corroborando que cada subtipo histológico o subgrupo con características genéticas similares tienen un comportamiento biológico diferente.

También se examinó la importancia de diferentes características clínicas (metástasis a distancia, el tamaño del tumor y la edad) a la hora de mejorar la capacidad predictiva de los modelos. Sin embargo, el hecho de incluir tanto las metástasis como el tamaño

del tumor reducía la sensibilidad y especificidad. Contrariamente, la edad avanzada demostró ser el factor más importante para un pronóstico desfavorable (284).

Es importante tener en cuenta, que en los árboles de clasificación, no todas las proteínas utilizadas son útiles para la clasificación de todos los pacientes. De modo que utilizar un panel completo de anticuerpos basados en estos modelos implica un mayor coste en términos económicos o de tiempo, debido a que la evaluación de algunos anticuerpos no sería necesaria, o implicaría esperar el resultado de expresión de una proteína para hacer la siguiente. No obstante, los árboles de clasificación definieron las proteínas más importantes para diferenciar cada grupo, y de acuerdo a la identificación de proteínas importantes para cada grupo, se construyeron los sistemas de puntuación. Estos modelos permiten utilizar el poder de discriminación de cada anticuerpo, disminuyen el número de anticuerpos necesarios para clasificar cada grupo, incorporan variables clínicas y permiten obtener medidas de sensibilidad, especificidad y tasa de supervivencia para cada grupo de puntuación.

La principal limitación encontrada en este estudio fue la imposibilidad de reunir una serie adicional con la suficiente potencia estadística para validar los modelos contruidos en base a la expresión de las proteínas seleccionadas para mejorar el diagnóstico y predecir el pronóstico de los carcinomas del epitelio folicular tiroideo. Por tanto, será necesaria su validación en una serie independiente en el futuro.

## **5. Identificación de grupos de miRNAs diferencialmente expresados**

Los miRNAs están involucrados en una serie de acciones críticas en numerosos procesos biológicos como la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, ya que controlan el 60% de los genes que codifican proteínas esenciales en los procesos biológicos (285). De este modo, las alteraciones en su expresión están asociadas con el desarrollo tumoral, y los trastornos metabólicos, cardiovasculares y neurológicos

(286-288). Además, cada miRNA puede tener más de 100 dianas, y puede actuar como supresor de tumor reprimiendo la traducción de un oncogén, o actuar como un oncogén reprimiendo la traducción de genes supresores de tumor (289,290). Por lo tanto, las medidas de su expresión alterada podrían ser útiles como marcadores de subtipo histológico, estadio de diferenciación, diagnóstico y pronóstico.

Una herramienta útil para el estudio de miRNAs ha sido el reciente desarrollo de la secuenciación de alto rendimiento, utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación como el RNA-seq. La corta longitud de lectura de los miRNAs los hace especialmente adecuados para cuantificar los niveles de expresión de miRNAs comparada con los *microarrays*, que tienen más ruido de fondo debido a hibridaciones cruzadas (291). Además, comparada con la qPCR, hasta ahora la mejor técnica para cuantificar transcripción, o los *microarrays*, cuyo diseño se restringe sólo a los miRNAs descritos en las bases de datos, la secuenciación de alto rendimiento ofrece por primera vez una aproximación genómica ya que identifica todos los miRNAs presentes en la muestra (292).

Actualmente, existen muy pocos estudios en los que se aplique la tecnología de RNA-seq para identificar y cuantificar perfiles de miRNAs en los WDTC (293,294). No obstante, durante los últimos años, el uso de las tecnologías de *microarrays* y qPCR ha permitido obtener perfiles de miRNAs característicos de los diferentes tipos histológicos de tumores tiroideos. Si bien estos miRNAs probablemente participan en el desarrollo de neoplasias derivadas de las células del epitelio folicular, su contribución a la patogenia del tumor es aún incierta (225,232,238,239,241,242,295).

En esta tesis doctoral, se identificaron series de miRNAs desregulados en los diferentes subtipos tumorales de cáncer tiroideo utilizando RNA-seq. Estos hallazgos confirman, muchos de los miRNAs descritos en la literatura. Sin embargo, la aportación más valiosa es que se han identificado nuevos miRNAs, diferencialmente expresados en los subtipos tumorales analizados, y que se asocian significativamente con la severidad de

la tumorigénesis y de la progresión del CT. Indudablemente, estos resultados pueden contribuir a mejorar el conocimiento de la biología de la patología tiroidea.

## **6. Identificación de grupos de miRNAs específicos de cada tipo histológico**

En los AF, se confirmó la sub-expresión previamente descrita de miR-31, 130a, 193b, 197, 199a, 199b, 218, 223, 328, 429, 455, 494 (238,240), y la sobre-expresión de 200c, 34a, 96, 182, 221 y 224 en comparación al TN (225,238). Sin embargo, algunos miRNAs presentaron una expresión diferente a la descrita, específicamente la sobre-expresión de miR-20a y 943, y la sub-expresión de 136, 181b y 345 (238). De hecho no es extraño encontrar este tipo de discordancias en la literatura, y posteriormente se discutirá este punto, dado que no es exclusivo de este tipo histológico.

En estudios en una serie de PTC, FTC y ATC, la sub-expresión de miR-218-2 y su gen diana *SLIT3* se asoció a invasión y progresión del CT y, además, a la proliferación de tumores benignos HNT y AF (296). En concordancia con el estudio de Guan et al., la sub-expresión de miR-218-2, característica de los AF en este estudio, podría considerarse un punto a favor de la teoría de la transformación maligna de algunos AF a FTC, (2,96). De hecho, este miRNA está sub-expresado en todos los tumores, tiene una diferencia estadísticamente significativa respecto al TN en los PTC, y una tendencia marcada a la sub-expresión en los 6 FTC y 8 FVPTC, aunque no llega a ser significativa, posiblemente debido al bajo número de casos. De hecho, la expresión de miR-218-2 es similar en AF y FTC (35,2 y 44,2 lecturas normalizadas por millón, respectivamente).

En los FTC, se confirmó la sub-expresión de miR-9, 31, 34b, 101, 130a, 138, 144, 181c, 193b, 199a, 199b, 205, 218, 223, 451, 455, 486, 574, y 855, y la sobre-expresión de miR-96, 221 y 224 (225,232,238,240,297-299). A diferencia de lo

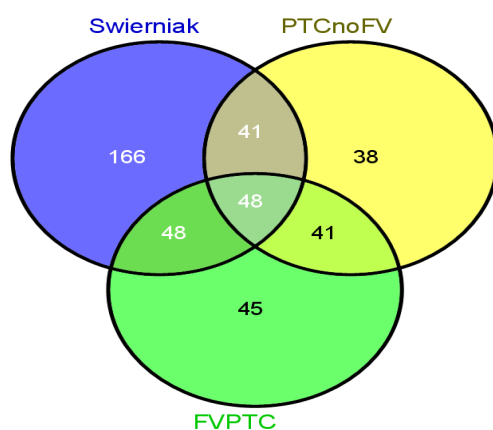
descrito previamente, en este estudio observamos en FTC una sobre-expresión de miR-17 y 20a, y sub-expresión de miR-345 (238,240). Este hecho también fue observado en el grupo de los AF respecto al tejido normal. El miR-199a sub-expresado en FTC en este estudio, también ha sido descrito en PTC como un supresor de tumor (300).

En los FVPTC, se confirmó la sub-expresión de miR-7, 197, 199a, -199b, y la sobre-expresión de miR-34a, 141, 182 y 221 (238). Sin embargo, no se pudo confirmar la sub-expresión de miR-99a, 125a, 136, 191 y 494 (301). Además, se observó una sobre-expresión del miR-100 entre los tumores pertenecientes a este subgrupo, a diferencia de lo descrito en un estudio previo (238). Este microRNA ha sido descrito sobre-expresado en FTC, en cuyas células promueve la transición de la fase G1 a S del ciclo celular (302). Es probable que en FVPTC tenga el mismo papel relacionado con progresión del ciclo celular.

En los PTC, se confirma la sobre-expresión descrita en otros estudios de miR-21, 31, 34a, 125b, 146b, 181a, 181b, 182, 187, 196a, 221, 222, 224, y 375 respecto al TN (222-225,231,242,303-307). También se encuentra sub-expresión de miR-26 101, 126, 363, 486 (304,306,308,309). La sobre-expresión de miR-146b, notable en los PTC, está descrita como un marcador diagnóstico, además de tener un papel importante en la proliferación celular y la invasión (310). Una de sus dianas es *SMAD4* (SMAD family member 4), un importante miembro de la vía de señalización de *TGF-β* (311). Otros miRNAs previamente descritos y asociados a PTC son miR-221 y 222, cuya sobre-expresión induce PTC en líneas de células foliculares a través de la regulación negativa de *p27*, que a su vez induce progresión del ciclo celular (229). También cabe destacar el miR-34a, cuya sobre-expresión dirige la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/Bad en células de PTC mediante la regulación de *GAS1* (Growth arrest specific 1) (307). Por último, el miR-26a, cuya sub-expresión en PTC regula directamente a la ciclina B1, ciclina A, bcl-xl y AKt mediante *CKS2*, uno de sus genes diana (309), y el miR-126, comúnmente sub-expresado en cáncer, y que induce proliferación, migración e invasión a través de la inducción de la expresión de oncogenes como *Bcl2*, *KRAS* o *MERTK* (308).



La confirmación de miRNAs ya descritos en la literatura sugiere que dichos miRNAs tienen un papel importante como factores clave en el desarrollo y progresión de los diferentes subtipos de carcinomas del epitelio folicular tiroideo. De hecho, es interesante analizar el trabajo de Swierniak et al. 2013, que es el único estudio previo a éste basado en secuenciación. Primero, es importante tener en cuenta que su serie estuvo constituida sólo por 14 PTC y 14 TN. Además, no especificaba las variantes histológicas, por lo que se asume que todos ellos eran cPTC. Como en esta tesis, los autores identificaron un perfil de miRNAs específico de PTC al compararlo con tejido normal (293). Tanto en aquel trabajo como en el presente estudio se confirma que la desregulación de miRNAs es importante en los PTC, así como en otros tipos histológicos, por su implicación en la tumorigénesis, (Figura 5.1).



**Figura 5.1** Diagrama de Venn comparando la expresión diferencial de los miRNAs significativos en la serie de PTC de Swierniak y en los grupos PTCnoFV y FVPTC de este estudio, respecto al tejido normal.

El hecho que en este estudio se hayan identificado miRNAs ya descritos utilizando *microarrays* así como RNA-seq sirve como una validación externa de los datos, que dan fiabilidad y solidez a los hallazgos. Una aportación valiosa de la serie analizada en esta tesis ha sido la identificación de miRNAs no descritos previamente como asociados al CT. Entre ellos, los que mostraron mayor significación estadística fueron miR-143, 320, 423, 532 y 3184. El estudio en profundidad de sus dianas biológicas

podría ser útil para resolver cuestiones aún controvertidas en el diagnóstico y tratamiento del CT.

El diagrama de Venn de la figura 5.1 permite identificar listas de miRNAs específicas de PTCnoFV (41/168) y de FVPTC (48/182), que coinciden con los descritos por Swierniak. Este estudio ha discriminado por subtipos histológicos, con listas de microRNAs específicas para FVPTC y PTCnoFV, corroborando estudios genéticos y clínicos que demuestran que la FVPTC se comporta de una manera diferente a las demás variantes histológicas de los PTC.

## 7. Perfil diferencial de miRNAs entre carcinomas y adenomas foliculares

De acuerdo con los datos previamente publicados, la sobre-expresión de miR-7, 100, 125b, 138, 144, 146a, 146b, 187, 192, 197, 200b, 221, 222, 346 y 768, y la sub-expresión de miR-155 y 328 discriminan entre lesiones benignas (FA) y malignas (FTC), (232,238,239,294).

Si bien en este estudio se identificó la sub-expresión de miR-138 asociada a FTC, la comparación de FTC *versus* AF solo permitió confirmar la sub-expresión de miR-328 en FTC (238). Este miRNA regula genes involucrados en la proliferación y la apoptosis. En el estudio realizado por Keutgen, el miR-328 formaba parte de un panel de 4 miRNAs que diferenciaba entre lesiones malignas y benignas clasificadas como indeterminadas por PAAF, aunque no especificaba si estaba sobre o sub-expresado en FTC (312).

Por otro lado, este estudio permitió identificar una serie compuesta por 13 microRNAs (miR-345, 6087, 186, 744, 577, 491, 3157, 548ae, 548ay, 548ap, 1287, 1306, 3960) todos sub-expresados, excepto miR-3960. Si bien ninguno de, ellos ha sido descrito en CT, la desregulación de miR-186, 577, 491, 1287 y 744 han sido

referidos en otros tipos de cáncer, como esófago, boca, pulmón, glioblastoma, ovario, páncreas e hígado, en los cuales, la sub-expresión de alguno de estos miRNAs promueve proliferación celular, migración e invasión a través de genes diana como *ROCK1* (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1), *GIT1* (G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1), *MMP-2/9* (Matrix metalloproteinase 2/9), *Bcl-XL* (B cell lymphoma-extra large), *TP53* (Tumor protein 53), *TGF-β1* (Transforming growth factor beta1), entre otros (313-319). La sub-expresión de estos miRNAs en los FTC sugieren una activación de los procesos implicados en la carcinogénesis, lo cual explicaría la expresión diferencial entre los FTC y los AF. Merece la pena destacar que el hecho de disponer de un bajo número de FTC puede restar solidez a los resultados. Por tanto, son necesarios estudios basados en series más amplias que confirmen estos hallazgos.

Aún cuando se necesitan más estudios, una lista de microRNAs bien definidos tendría una utilidad inmediata en el diagnóstico diferencial de tumores de histología incierta, o en la discriminación entre tumores benignos y malignos (297). Sin embargo, los datos contradictorios sobre algunos miRNAs, como miR-197, 181b y 328, complica en parte su aplicación a la clínica (225,232,238). Las discrepancias podrían explicarse por diferencias en los siguientes aspectos: a) técnica utilizada para la cuantificación, *microarrays*, RT-PCR ó RNA-seq; b) tipos de muestra, tejido congelado o tumores embebidos en parafina; c) la extracción del RNA de secciones completas del tumor o la utilización de micro-disección de áreas específicamente seleccionadas para el análisis.

## 8. Perfil diferencial de miRNAs para PTC con o sin mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>

Como ya se ha mencionado, la mutación *BRAF*<sup>V600</sup> es la más prevalente entre los PTCs. De hecho, algunas series describen que hasta el 75% de los casos muestran esta alteración. Datos genómicos previos, como análisis de perfiles de metilación o de

expresión génica, han demostrado un efecto evidente de la mutación primaria sobre el perfil de expresión global que muestra el tumor. Con estos antecedentes, sería esperable que la mutación  $BRAF^{V600}$  también afectase de forma significativa la expresión de microRNAs, hecho que se confirma en algunos estudios (320,321). Sin embargo, otros estudios han mostrado que  $BRAF^{V600E}$  no parece influir en la expresión de miRNAs en PTCs, incluido el estudio de Swierniak, realizado con la misma metodología que la que aquí se ha expuesto (225,231,293).

En el presente estudio, un 57% de los PTC eran  $BRAF^{V600E}$ , y se identificaron 47 miRNAs expresados diferencialmente entre los PTC  $BRAF^{V600E}$  y  $BRAF^{WT}$ , confirmando la sobre-expresión descrita de miR-203 y 221 en los PTC  $BRAF^{V600E}$  (320,321). Además, el presente estudio permitió identificar una serie adicional de 21 microRNAs, miR-29a, 376a, 1323, 411, 654, 485, 381, 133b, 377, 432, 873, 483, 365a, 1285, 940, 410, 301b, 758, 2114, 1910, y 3928, no descritos previamente en asociación al CT. Los miR-3928, 654, 2114 y 1910 no han sido descritos en ningún cáncer. Todos los demás miRNAs han sido asociados a diferentes tipos de cáncer como pulmón, próstata, riñón, glioblastoma, páncreas, o mama, (322-327). Estos microRNAs tienen dianas como *Sp1* (Specific protein 1), *TP63* (Tumor protein 63), o *TGM2* (Transglutaminase 2), que promueven proliferación, migración, invasión, o resistencia a medicamentos. Sería importante validar su expresión diferencial en los PTC con y sin la mutación  $BRAF^{V600E}$ , y llevar a cabo ensayos funcionales que permitan evaluar el efecto, tanto de su sobre-expresión como de su inhibición, sobre los procesos biológicos.

## 9. miRNAs asociados a papilares con buen y mal pronóstico

En general, los PTC tienen un comportamiento favorable, aunque algunos tumores recidivan y originan metástasis a distancia (328). El comportamiento agresivo de los PTC es difícil de predecir y no hay concordancia entre los diferentes estudios realizados hasta ahora (113,116,119). Sin embargo, varios miRNAs han sido descritos como

desregulados en los PTC de mal pronóstico, como los miR-146b, 221, 222, 31, 1301, 15a, 21, 1271, 20a, 551b, 503 y 224, sobre-expresados (242,303,329-334), y miR-1, 1275, 3173 sub-expresados.

Si bien en este estudio todos los miRNAs mencionados en el párrafo anterior fueron identificados solo en PTC respecto al TN, ninguno se expresó diferencialmente entre PTC de buen y mal pronóstico. Sin embargo, se identificó la sub-expresión de miR-7 en los PTC de mal pronóstico. Este miRNA es un supresor de tumor, cuya sub-expresión se ha asociado al desarrollo de cáncer y metástasis (335). Además de miR-7, este estudio identificó 4 nuevos miRNAs (miR-3529, 204, 1233, 5701) no descritos previamente en asociación al CT. La sub-expresión de miR-204 ha sido asociada a mal pronóstico en los carcinomas nasofaríngeo, renal y endometrio. Sus dianas *CDC42* (cell division cycle 42), *MAP1LC3B* (Microtubule-associated protein 1 lighth chain 3 beta), *NTRK2* (Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2), promueven proliferación, invasión y metástasis. Los otros 3 miRNAs no han sido asociados a mal pronóstico. De hecho, miR-1233 es un marcador de diagnóstico en suero de pacientes con carcinoma renal (336-339), miR-3529 solo ha sido identificado en ovejas, y miR-5701 no tiene ninguna entrada en PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Sería importante definir el gen diana del miR-204 en CT y su implicación en el mal pronóstico de los PTC.

En resumen, en este estudio se han utilizado técnicas de uso rutinario en un contexto clínico, como la inmunohistoquímica, y una tecnología más reciente, como la secuenciación de nueva generación, sobre dos series de carcinomas del epitelio folicular tiroideo. Como resultado destacamos el haber identificado marcadores inmunohistoquímicos con capacidad de discriminación entre subtipos histológicos del epitelio folicular, y entre los carcinomas papilares de buen y mal pronóstico. Asimismo, se han confirmado algunos de los miRNAs previamente descritos, y se han encontrado nuevos miRNAs relacionados con diferentes tipos de carcinomas del epitelio folicular. Además, se han descrito perfiles de miRNAs relacionados con el diagnóstico diferencial entre AF y FTC, con la presencia o ausencia de la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> en los carcinomas papilares, y entre grupos de buen y mal pronóstico.

La aplicación de la firma de proteína identificada en este estudio en la práctica clínica, podría permitir a los clínicos tener un diagnóstico más preciso en los nódulos indeterminados, disminuyendo así el número cirugías. Además, utilizando tanto los modelos inmunohistoquímicos como los perfiles de expresión de miRNAs asociados a mal pronóstico, se podrían identificar al diagnóstico aquellos casos con potencial mala evolución. Esto podría conllevar una mejora en la calidad de vida de los pacientes gracias a un seguimiento clínico más estrecho y abriría una puerta hacia una terapia personalizada. Para ello, sería imprescindible validar estos resultados en series con un número de casos suficientes para alcanzar una potencia estadística adecuada.

## 6. Conclusiones

1. La inmunohistoquímica es una herramienta útil para validar la posible utilidad de genes identificados mediante microarrays de DNA en carcinomas del epitelio folicular tiroideo.
2. De acuerdo a los datos observados en este estudio, los tumores con  $BRAF^{V600E}$  están asociados a un alto riesgo de desarrollar comportamiento más agresivo. Sin embargo, la mutación  $BRAF^{V600E}$  no es un factor predictivo independiente de recidiva.
3. Se han definido perfiles de expresión diferencial de proteínas para los carcinomas papilares y sus subgrupos (carcinomas papilares de variante folicular, y carcinomas papilares de variante no folicular con y sin mutación  $BRAF^{V600E}$ ) que mediante un sistema de puntuación permiten predecir el pronóstico de estos tumores.
4. La expresión de la proteína CEP55 tiene una notable capacidad de discriminación entre los carcinomas foliculares de buen y mal pronóstico, alcanzando una sensibilidad y especificidad del 100%.
5. Los carcinomas foliculares y carcinomas papilares de variante folicular pueden ser diferenciados de los adenomas foliculares mediante el modelo  $4*(APLP2n=0)+2*(RRm2n>5)+1*(PRC1c\geq 40)$ . Para muestras provenientes de PAAF el modelo que discrimina ambos subtipos fue  $1*(PRC1c)+2*(RRM2n\leq 90)$ .
6. La sub-expresión de los miRNAs miR-186, 577, 491, 1287 y 744 permite discriminar los carcinomas foliculares de los adenomas foliculares. Probablemente, este hecho sea debido a que sus genes diana son *ROCK1*, *GIT1*, *MMP-2/9*, *Bcl-XL*, *TP53*, o *TGF- $\beta$ 1*, cuya desregulación se ve implicada en la activación de la proliferación celular, migración e invasión.



7. Los carcinomas papilares de mal pronóstico mostraron sub-expresión de miR-204. Probablemente, este hecho sea debido a que sus genes diana son *CDC42*, *MAP1LC3B* o *NTRK2*, cuya desregulación se ve implicada en la activación de la proliferación celular, migración e invasión.

8. Se ha definido un perfil de miRNAs (miR-29a, 376a, 1323, 411, 485, 381, 133b, 377, 432, 873, 483, 365a, 1285, 940, 410, 301b, y 758) cuya sub-expresión esta implicada en procesos de proliferación celular, migración e invasión a través de la regulación de genes diana como *Sp1*, *TP63* y *TGM2* y que se expresan de manera diferencial entre los carcinomas papilares con y sin *BRAF*<sup>V600E</sup>.

## 7. Bibliografía

1. Lloyd RV, Douglas BR, Young WF. Endocrine diseases. Amer Registry of Pathology; 2002. 1 p.
2. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):292–306.
3. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893–917.
4. Enewold L, Zhu K, Ron E, Marrogi AJ, Stojadinovic A, Peoples GE, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Mar;18(3):784–91.
5. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2010 Sep 8;60(5):277–300.
6. Hayat MJ, Howlader N, Reichman ME, Edwards BK. Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*. 2007 Jan;12(1):20–37.
7. Society AC. Cancer Facts and Figures 2012. American Cancer Society. 2012 Jan 1.
8. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, Han X, Ward MH, Sjodin A, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973–2002. *Cancer Causes Control*. 2008 Nov 19;20(5):525–31.
9. Rego-Iraeta A, Pérez-Méndez LF, Mantinan B, Garcia-Mayor RV. Time trends for thyroid cancer in northwestern Spain: true rise in the incidence of micro and larger forms of papillary thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2009 Apr;19(4):333–40.
10. Detours V, Wattel S, Venet D, Hutsebaut N, Bogdanova T, Tronko MD, et al. Absence of a specific radiation signature in post-Chernobyl thyroid cancers. *Br J Cancer*. 2005 Apr 25;92(8):1545–52.
11. Fagin JA. Familial nonmedullary thyroid carcinoma--the case for genetic susceptibility. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997 Feb;82(2):342–4.
12. Eng C. Familial papillary thyroid cancer--many syndromes, too many genes? *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000 May;85(5):1755–7.
13. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):501–11.
14. Peli M, Capalbo E, Lovisatti M, Cosentino M, Berti E, Mattai Dal Moro R, et al. Ultrasound guided fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: Guidelines and recommendations vs clinical practice; a 12-month study of 89 patients. *J Ultrasound*. 2012 Jun;15(2):102–7.
15. Eustatia-Rutten CFA, Corssmit EPM, Biermasz NR, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW. Survival and death causes in differentiated thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Jan;91(1):313–9.

16. 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.
17. Brown RL, de Souza JA, Cohen EE. Thyroid cancer: burden of illness and management of disease. *J Cancer.* 2011;2:193–9.
18. Durante C, Haddy N, Baudin E, Leboulleux S, Hartl D, Travagli JP, et al. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: benefits and limits of radioiodine therapy. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006 Aug;91(8):2892–9.
19. Sampson E, Brierley JD, Le LW, Rotstein L, Tsang RW. Clinical management and outcome of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer presenting with distant metastasis at diagnosis. *Cancer.* 2007 Oct 1;110(7):1451–6.
20. Xing M, HAUGEN BR, Schlumberger M. Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. *Lancet.* 2013 Mar 23;381(9871):1058–69.
21. Shibu D, Chung K-W, Kebebew E. Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol.* 2008 Jan;20(1):13–8.
22. Cerutti JM, Oler G, Michaluart P, Delcelo R, Beaty RM, Shoemaker J, et al. Molecular profiling of matched samples identifies biomarkers of papillary thyroid carcinoma lymph node metastasis. *Cancer Research.* 2007 Aug 15;67(16):7885–92.
23. DeLellis R, Lloyd R, Heitz P, Eng C. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs (IARC WHO Classification of Tumours) [Internet]. 1st ed. DeLellis R, Lloyd R, Heitz P, Eng C, editors. World Health Organization; 2004.
24. Hay ID, Thompson GB, Grant CS, Bergstralh EJ, Dvorak CE, Gorman CA, et al. Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World Journal of Surgery.* 2002 Aug;26(8):879–85.
25. DeLellis RA. Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol.* 2006;94(8):662–9.
26. Woodruff SL, Arowolo OA, Akute OO, Afolabi AO, Nwariaku F. Global variation in the pattern of differentiated thyroid cancer. *Am J Surg.* 2010 Oct;200(4):462–6.
27. Pallante P, Battista S, Pierantoni GM, Fusco A. Deregulation of microRNA expression in thyroid neoplasias. *Nature Publishing Group.* 2013 Nov 19.
28. Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, et al. Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Research.* 2004 Apr 15;64(8):2898–903.
29. Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, et al. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer.* 2000 Jul 1;89(1):202–17.

30. Ryder M, Ghossein RA, Ricarte-Filho JCM, Knauf JA, Fagin JA. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2008 Dec;15(4):1069–74.
31. Patel KN, Shaha AR. Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Cancer Control*. 2006 Apr;13(2):119–28.
32. Frates MC, Benson CB, Doubilet PM, Kunreuther E, Contreras M, Cibas ES, et al. Prevalence and distribution of carcinoma in patients with solitary and multiple thyroid nodules on sonography. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Sep;91(9):3411–7.
33. Pacini F. European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *European Journal of Endocrinology*. 2006 Jun 1;154(6):787–803.
34. Cooper DS, Doherty GM, HAUGEN BR, Hauger BR, Kloos RT, Lee SL, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2009. pp. 1167–214.
35. Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, et al. Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002 May;87(5):1941–6.
36. Layfield LJ, Cibas ES, Gharib H, Mandel SJ. *Thyroid Aspiration Cytology: Current Status*. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2009 Mar 1;59(2):99–110.
37. Abele JS, Miller TR, King EB, Lowhagen T. Smearing techniques for the concentration of particles from fine needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol*. 1985 Jan;1(1):59–65.
38. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, Haugen BR, Klopper JP, Zhu Z, et al. Molecular Testing for Mutations in Improving the Fine-Needle Aspiration Diagnosis of Thyroid Nodules. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2009 Jun 3;94(6):2092–8.
39. Baloch ZW, LiVolsi VA, Asa SL, Rosai J, Merino MJ, Randolph G, et al. Diagnostic terminology and morphologic criteria for cytologic diagnosis of thyroid lesions: a synopsis of the National Cancer Institute Thyroid Fine-Needle Aspiration State of the Science Conference. *Diagn Cytopathol*. 2008 Jun;36(6):425–37.
40. Kebebew E, Weng J, Bauer J, Ranvier G, Clark OH, Duh Q-Y, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg*. 2007 Sep;246(3):466–70–discussion470–1.
41. Xing M, Clark D, Guan H, Ji M, Dackiw A, Carson KA, et al. BRAF mutation testing of thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens for preoperative risk stratification in papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Jun 20;27(18):2977–82.

42. Nikiforova MN, Nikiforov YE. Molecular diagnostics and predictors in thyroid cancer. *Thyroid*. 2009 Dec;19(12):1351–61.
43. Musholt TJ, Fottner C, Weber MM, Eichhorn W, Pohlenz J, Musholt PB, et al. Detection of papillary thyroid carcinoma by analysis of BRAF and RET/PTC1 mutations in fine-needle aspiration biopsies of thyroid nodules. *World Journal of Surgery*. 2010 Nov;34(11):2595–603.
44. Boelaert K, McCabe CJ. Thyroid cancer: finding the malignant thyroid nodule in the haystack. *Nature Publishing Group*. 2011 Oct;:563–4.
45. Alexander EK, Kennedy GC, Baloch ZW, Cibas ES, Chudova D, Diggans J, et al. Preoperative diagnosis of benign thyroid nodules with indeterminate cytology. *N Engl J Med*. 2012 Aug 23;367(8):705–15.
46. Hodak SP, Rosenthal DS, erican Thyroid Association Clinical Affairs Committee. Information for clinicians: commercially available molecular diagnosis testing in the evaluation of thyroid nodule fine-needle aspiration specimens. *Thyroid*. 2013 Feb;23(2):131–4.
47. Nikiforov YE, Ohori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, et al. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Nov;96(11):3390–7.
48. Filicori F, Keutgen XM, Buitrago D, AlDailami H, Crowley M, Fahey TJ, et al. Risk stratification of indeterminate thyroid fine-needle aspiration biopsy specimens based on mutation analysis. *Surgery*. 2011 Dec;150(6):1085–91.
49. Randolph GW. Papillary cancer nodal surgery and the advisability of prophylactic central neck dissection: primum, non nocere. *Surgery*. 2010 Dec;148(6):1108–12.
50. Casara D, Rubello D, Saladini G, Masarotto G, Favero A, Girelli ME, et al. Different features of pulmonary metastases in differentiated thyroid cancer: natural history and multivariate statistical analysis of prognostic variables. *J Nucl Med*. 1993 Oct;34(10):1626–31.
51. Sawka AM, Thabane L, Parlea L, Ibrahim-Zada I, Tsang RW, Brierley JD, et al. Second primary malignancy risk after radioactive iodine treatment for thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid*. 2009 May;19(5):451–7.
52. Pacini F, Schlumberger M, Harmer C, Berg GG, Cohen O, Duntas L, et al. Post-surgical use of radioiodine (131I) in patients with papillary and follicular thyroid cancer and the issue of remnant ablation: a consensus report. 2005. pp. 651–9.
53. Jonklaas J, Sarlis NJ, Litofsky D, Ain KB, Bigos ST, Brierley JD, et al. Outcomes of patients with differentiated thyroid carcinoma following initial therapy. *Thyroid*. 2006 Dec;16(12):1229–42.
54. Williams SD, Birch R, Einhorn LH. Phase II evaluation of doxorubicin plus cisplatin in advanced thyroid cancer: a Southeastern Cancer Study Group Trial. *Cancer Treat Rep*. 1986 Mar;70(3):405–7.

55. Azrif M, Slevin NJ, Sykes AJ, Swindell R, Yap BK. Patterns of relapse following radiotherapy for differentiated thyroid cancer: implication for target volume delineation. *Radiother Oncol*. 2008 Oct;89(1):105–13.
56. Terezakis SA, Lee KS, Ghossein RA, Rivera M, Tuttle RM, Wolden SL, et al. Role of external beam radiotherapy in patients with advanced or recurrent nonanaplastic thyroid cancer: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Mar 1;73(3):795–801.
57. Castellone MD, Carlomagno F, Salvatore G, Santoro M. Receptor tyrosine kinase inhibitors in thyroid cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008 Dec;22(6):1023–38.
58. Stommel JM, Kimmelman AC, Ying H, Nabioullin R, Ponugoti AH, Wiedemeyer R, et al. Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science*. 2007 Oct 12;318(5848):287–90.
59. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine Reviews*. 2007 Dec;28(7):742–62.
60. Riesco-Eizaguirre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> targeting to the membrane. *Endocrine Related Cancer*. 2006 Mar;13(1):257–69.
61. Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, et al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med*. 2013 Feb 14;368(7):623–32.
62. Brose MS. In search of a real “targeted” therapy for thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1;18(7):1827–9.
63. Haugen BR, Sherman SI. Evolving Approaches to Patients with Advanced Differentiated Thyroid Cancer. *Endocrine Reviews*. 2013 Apr 10.
64. Safavi A, Vijayasekaran A, Guerrero MA. New insight into the treatment of advanced differentiated thyroid cancer. *J Thyroid Res*. 2012;2012:437569.
65. Sethi K, Sarkar S, Das S, Mohanty B, Mandal M. Biomarkers for the diagnosis of thyroid cancer. *J Exp Ther Oncol*. 2010;8(4):341–52.
66. Kumar A, Bal CS. Differentiated thyroid cancer. *Indian J Pediatr*. 2003 Sep;70(9):707–13.
67. Sipos JA, Mazzaferri EL. Thyroid cancer epidemiology and prognostic variables. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2010 Aug;22(6):395–404.
68. Leung AK-C, Chow S-M, Law SCK. Clinical features and outcome of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Laryngoscope*. 2008 Jan;118(1):32–8.
69. Mazzaferri EL. Management of low-risk differentiated thyroid cancer. *Endocr Pract*. 2007 Sep;13(5):498–512.

70. Shaha AR, Shah JP, Loree TR. Risk group stratification and prognostic factors in papillary carcinoma of thyroid. *Ann Surg Oncol*. 1996 Nov;3(6):534–8.
71. Bhattacharyya N. A population-based analysis of survival factors in differentiated and medullary thyroid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Jan;128(1):115–23.
72. Ito Y, Higashiyama T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, MATSUZUKA F, et al. Risk factors for recurrence to the lymph node in papillary thyroid carcinoma patients without preoperatively detectable lateral node metastasis: validity of prophylactic modified radical neck dissection. *World Journal of Surgery*. 2007 Nov;31(11):2085–91.
73. Benbassat CA, Mechlis-Frish S, Hirsch D. Clinicopathological characteristics and long-term outcome in patients with distant metastases from differentiated thyroid cancer. *World Journal of Surgery*. 2006 Jun;30(6):1088–95.
74. Yeh MW, Demircan O, Ituarte P, Clark OH. False-negative fine-needle aspiration cytology results delay treatment and adversely affect outcome in patients with thyroid carcinoma. *Thyroid*. 2004 Mar;14(3):207–15.
75. Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS, et al. Extent of surgery affects survival for papillary thyroid cancer. *Ann Surg*. 2007 Sep;246(3):375–81–discussion381–4.
76. Sawka AM, Thepamongkhon K, Brouwers M, Thabane L, Browman G, Gerstein HC. Clinical review 170: A systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 Aug;89(8):3668–76.
77. McGriff NJ, Csako G, Gourgiotis L, Lori C G, Pucino F, Sarlis NJ. Effects of thyroid hormone suppression therapy on adverse clinical outcomes in thyroid cancer. *Ann Med*. 2002;34(7-8):554–64.
78. Pujol P, Daures JP, Nsakala N, Baldet L, Bringer J, Jaffiol C. Degree of thyrotropin suppression as a prognostic determinant in differentiated thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996 Dec;81(12):4318–23.
79. Sherman SI, Brierley JD, Sperling M, Ain KB, Bigos ST, Cooper DS, et al. Prospective multicenter study of thyrocarcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer*. 1998 Sep 1;83(5):1012–21.
80. Brierley JD, Panzarella T, Tsang RW, Gospodarowicz MK, O'Sullivan B. A comparison of different staging systems predictability of patient outcome. Thyroid carcinoma as an example. *Cancer*. 1997 Jun 15;79(12):2414–23.
81. Lang B, Lo C-Y, Chan W-F, Lam K-Y, Wan K-Y. Restaging of differentiated thyroid carcinoma by the sixth edition AJCC/UICC TNM staging system: stage migration and predictability. *Ann Surg Oncol*. 2007 May;14(5):1551–9.



82. Cetta F, Montalto G, Gori M, Curia MC, Cama A, Olschwang S. Germline mutations of the APC gene in patients with familial adenomatous polyposis-associated thyroid carcinoma: results from a European cooperative study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000 Jan;85(1):286–92.
83. Schneikert J, Grohmann A, Behrens J. Truncated APC regulates the transcriptional activity of beta-catenin in a cell cycle dependent manner. *Hum Mol Genet*. 2007 Jan 15;16(2):199–209.
84. Cameselle-Teijeiro J, Chan JK. Cribriform-morular variant of papillary carcinoma: a distinctive variant representing the sporadic counterpart of familial adenomatous polyposis-associated thyroid carcinoma? *Mod Pathol*. 1999 Apr;12(4):400–11.
85. Soravia C, Sugg SL, Berk T, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, et al. Familial adenomatous polyposis-associated thyroid cancer: a clinical, pathological, and molecular genetics study. *Am J Pathol*. 1999 Jan;154(1):127–35.
86. Herraiz M, Barbesino G, Faquin W, Chan-Smutko G, Patel D, Shannon KM, et al. Prevalence of thyroid cancer in familial adenomatous polyposis syndrome and the role of screening ultrasound examinations. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Mar;5(3):367–73.
87. Steinhagen E, Guillem JG, Chang G, Salo-Mullen EE, Shia J, Fish S, et al. The prevalence of thyroid cancer and benign thyroid disease in patients with familial adenomatous polyposis may be higher than previously recognized. *Clin Colorectal Cancer*. 2012 Dec;11(4):304–8.
88. Jarrar AM, Milas M, Mitchell J, Laguardia L, O'Malley M, Berber E, et al. Screening for thyroid cancer in patients with familial adenomatous polyposis. *Ann Surg*. 2011 Mar;253(3):515–21.
89. Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet*. 2002 Apr;70(4):829–44.
90. Parisi MA, Dinulos MB, Leppig KA, Sybert VP, Eng C, Hudgins L. The spectrum and evolution of phenotypic findings in PTEN mutation positive cases of Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 2001 Jan;38(1):52–8.
91. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)*. 1985 Jul;64(4):270–83.
92. Stratakis CA, Courcoutsakis NA, Abati A, Filie A, Doppman JL, Carney JA, et al. Thyroid gland abnormalities in patients with the syndrome of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas (Carney complex). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1997 Jul;82(7):2037–43.
93. Ishikawa Y, Sugano H, Matsumoto T, Furuichi Y, Miller RW, Goto M. Unusual features of thyroid carcinomas in Japanese patients with Werner syndrome and possible genotype-phenotype relations to cell type and race. *Cancer*. 1999 Mar 15;85(6):1345–52.

94. Carcangiu ML, Steeper T, Zampi G, Rosai J. Anaplastic thyroid carcinoma. A study of 70 cases. *Am J Clin Pathol.* 1985 Feb;83(2):135–58.
95. Motoi N, Sakamoto A, Yamochi T, Horiuchi H, Motoi T, Machinami R. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract.* 2000;196(1):1–7.
96. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. Nature Publishing Group. Nature Publishing Group; 2011 Aug 30;7(10):569–80.
97. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell.* 1985 Sep;42(2):581–8.
98. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 1996 Jul 4;382(6586):80–3.
99. Fagin JA, Mitsiades N. Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2008 Dec;22(6):955–69.
100. Omur O, Baran Y. An update on molecular biology of thyroid cancers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 Dec 18.
101. Tallini G, Asa SL. RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Adv Anat Pathol.* 2001 Nov;8(6):345–54.
102. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol.* 2008 May;21 Suppl 2:S37–43.
103. Santoro M, Melillo RM, Fusco A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2006. pp. 645–53.
104. Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Research.* 1997 May 1;57(9):1690–4.
105. Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2006 Sep;91(9):3603–10.
106. Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F, Fusco A, Vecchio G. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2002 Jun;963:116–21.
107. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnson C, et al. RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2002 Jan;87(1):370–9.

108. Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*. 1989 Dec;4(12):1457–62.
109. Brzezińska E, Pastuszek-Lewandoska D, Lewiński A. Rearrangements of NTRK1 oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Neuro Endocrinol Lett*. 2007 Jun;28(3):221–9.
110. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Research*. 2003 Apr 1;63(7):1454–7.
111. Woyach JA, Shah MH. New therapeutic advances in the management of progressive thyroid cancer. *Endocrine Related Cancer*. 2009 Sep;16(3):715–31.
112. Ricarte-Filho JC, Li S, Garcia-Rendueles MER, Montero-Conde C, Voza F, Knauf JA, et al. Identification of kinase fusion oncogenes in post-Chernobyl radiation-induced thyroid cancers. *J Clin Invest*. 2013 Nov 1;123(11):4935–44.
113. Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003 Nov;88(11):5399–404.
114. Min HS, Lee C, Jung KC. Correlation of immunohistochemical markers and BRAF mutation status with histological variants of papillary thyroid carcinoma in the Korean population. *J Korean Med Sci*. 2013 Apr;28(4):534–41.
115. Barbaro D, Incensati RM, Materazzi G, Boni G, Grosso M, Panicucci E, et al. The BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer with positive or suspected pre-surgical cytological finding is not associated with advanced stages or worse prognosis. *Endocrine*. 2014 Apr;45(3):462–8.
116. Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005 Dec;90(12):6373–9.
117. O'Neill CJ, Bullock M, Chou A, Sidhu SB, Delbridge LW, Robinson BG, et al. BRAF(V600E) mutation is associated with an increased risk of nodal recurrence requiring reoperative surgery in patients with papillary thyroid cancer. *Surgery*. 2010 Dec;148(6):1139–45–discussion1145–6.
118. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pascucci R, Martinelli M, et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 May;89(5):2414–20.
119. Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, et al. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch*. 2005 Jun;446(6):589–95.

120. Riesco-Eizaguirre G, Rodríguez I, la Vieja De A, Costamagna E, Carrasco N, Nistal M, et al. The BRAFV600E oncogene induces transforming growth factor beta secretion leading to sodium iodide symporter repression and increased malignancy in thyroid cancer. *Cancer Research*. 2009 Nov 1;69(21):8317–25.
121. Morari EC, Marcello MA, Guilhen ACT, Cunha LL, Latuff P, Soares FA, et al. Use of sodium iodide symporter expression in differentiated thyroid carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Aug;75(2):247–54.
122. Sabra MM, Dominguez JM, Grewal RK, Larson SM, Ghossein RA, Tuttle RM, et al. Clinical outcomes and molecular profile of differentiated thyroid cancers with radioiodine-avid distant metastases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 May;98(5):E829–36.
123. Costa AM, Herrero A, Fresno MF, Heymann J, Alvarez JA, Cameselle-Teijeiro J, et al. BRAF mutation associated with other genetic events identifies a subset of aggressive papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Apr;68(4):618–34.
124. Pilotti S, Collini P, Mariani L, Placucci M, Bongarzone I, Vigneri P, et al. Insular carcinoma: a distinct de novo entity among follicular carcinomas of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol*. 1997 Dec;21(12):1466–73.
125. Sobrinho-Simões M, Sambade C, Fonseca E, Soares P. Poorly differentiated carcinomas of the thyroid gland: a review of the clinicopathologic features of a series of 28 cases of a heterogeneous, clinically aggressive group of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol*. 2002 Apr;10(2):123–31.
126. Suarez HG, Villard du JA, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, et al. Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene*. 1988 Apr;2(4):403–6.
127. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jan;3(1):11–22.
128. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Mar;13(3):184–99.
129. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 1990 Oct;4(10):1474–9.
130. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2003 Sep 1;21(17):3226–35.
131. Ruggeri RM, Campennì A, Baldari S, Trimarchi F, Trovato M. What is New on Thyroid Cancer Biomarkers. *Biomark Insights*. 2008;3:237–52.
132. Capella G, Matías-Guiu X, Ampudia X, de Leiva A, Perucho M, Prat J. Ras oncogene mutations in thyroid tumors: polymerase chain reaction-restriction-fragment-length polymorphism analysis from paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol*. 1996 Mar;5(1):45–52.

133. Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C, Knauf JA, et al. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology*. 2006 Feb;147(2):1014–9.
134. Garcia-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJA, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Research*. 2005 Nov 15;65(22):10199–207.
135. Vogt PK, Kang S, Elsliger M-A, Gymnopoulos M. Cancer-specific mutations in phosphatidylinositol 3-kinase. *Trends Biochem Sci*. 2007 Jul;32(7):342–9.
136. Wang Y, Hou P, Yu H, Wang W, Ji M, Zhao S, et al. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 Jun;92(6):2387–90.
137. Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 15;13(4):1161–70.
138. Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*. 1997 May;16(1):64–7.
139. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, et al. PAX8-PPAR $\gamma$ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*. 2000 Aug 25;289(5483):1357–60.
140. Bondeson L, Bengtsson A, Bondeson AG, Dahlenfors R, Grimelius L, Wedell B, et al. Chromosome studies in thyroid neoplasia. *Cancer*. 1989 Aug 1;64(3):680–5.
141. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, Tallini G, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003 May;88(5):2318–26.
142. Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, et al. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002 Aug;87(8):3947–52.
143. Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, et al. PAX8-PPAR $\gamma$  rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Jan;91(1):213–20.
144. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, et al. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Research*. 1992 Mar 1;52(5):1369–71.

145. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest.* 1993 Jan;91(1):179–84.
146. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol.* 2004;15(4):319–27.
147. Nikiforov YE, Nikiforova MN, Gnepp DR, Fagin JA. Prevalence of mutations of ras and p53 in benign and malignant thyroid tumors from children exposed to radiation after the Chernobyl nuclear accident. *Oncogene.* 1996 Aug 15;13(4):687–93.
148. Matías-Guiu X, Villanueva A, Cuatrecasas M, Capella G, de Leiva A, Prat J. p53 in a thyroid follicular carcinoma with foci of poorly differentiated and anaplastic carcinoma. *Pathol Res Pract.* 1996 Dec;192(12):1242–9–discussion1250–1.
149. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem.* 2007 Nov 1;102(4):820–8.
150. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Research.* 1999 Apr 15;59(8):1811–5.
151. Brönnegård M, Törning O, Böös J, Sylven C, Marcus C, Wallin G. Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1994 Aug;79(2):384–9.
152. Shi Y, Zou M, Farid NR. Expression of thyrotrophin receptor gene in thyroid carcinoma is associated with a good prognosis. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1993 Sep;39(3):269–74.
153. Suarez HG, Villard du JA, Caillou B, Schlumberger M, Parmentier C, Monier R. gsp mutations in human thyroid tumours. *Oncogene.* 1991 Apr;6(4):677–9.
154. Goretzki PE, Lyons J, Stacy-Phipps S, Rosenau W, Demeure M, Clark OH, et al. Mutational activation of RAS and GSP oncogenes in differentiated thyroid cancer and their biological implications. *World Journal of Surgery.* 1992 Jul;16(4):576–81–discussion581–2.
155. Lemoine NR, Hughes CM, Gullick WJ, Brown CL, Wynford-Thomas D. Abnormalities of the EGF receptor system in human thyroid neoplasia. *Int J Cancer.* 1991 Oct 21;49(4):558–61.
156. Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Michigishi T, Noguchi M, Matsubara F, et al. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal, benign and malignant thyroid tissues. *Histopathology.* 1991 Jan;18(1):11–8.
157. Fenton C, Patel A, Dinauer C, Robie DK, Tuttle RM, Francis GL. The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. *Thyroid.* 2000 Apr;10(4):349–57.

158. Minuto F, Barreca A, Del Monte P, Cariola G, Torre GC, Giordano G. Immunoreactive insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I-binding protein content in human thyroid tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1989 Mar;68(3):621–6.
159. Bachrach LK, Näntö-Salonen K, Tapanainen P, Rosenfeld RG, Gargosky SE. Insulin-like growth factor binding protein production in human follicular thyroid carcinoma cells. *Growth Regul*. 1995 Jun;5(2):109–18.
160. Quiros RM, Ding HG, Gattuso P, Prinz RA, Xu X. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer*. 2005 Jun 1;103(11):2261–8.
161. Santarpia L, El-Naggar AK, Cote GJ, Myers JN, Sherman SI. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Ras/Raf-Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Mutations in Anaplastic Thyroid Cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 Oct 9;93(1):278–84.
162. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, et al. Correlation between B-RAFV600E mutation and clinico-pathologic parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocrine Related Cancer*. 2006 Jun;13(2):455–64.
163. Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, et al. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996 May;81(5):2006–9.
164. Melvin KE, Miller HH, Tashjian AH. Early diagnosis of medullary carcinoma of the thyroid gland by means of calcitonin assay. *N Engl J Med*. 1971 Nov;285(20):1115–20.
165. Srinivas PR, Kramer BS, Srivastava S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncology*. 2001 Nov;2(11):698–704.
166. Patel KN. Genetic mutations, molecular markers and future directions in research. *Oral Oncol*. 2013 Apr 17.
167. Grogan RH, Mitmaker EJ, Clark OH. Cancers | Free Full-Text | The Evolution of Biomarkers in Thyroid Cancer—From Mass Screening to a Personalized Biosignature. *Cancers*. 2010.
168. Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007 Nov;92(11):4085–90.
169. Kim TH, Park YJ, Lim JA, Ahn HY, Lee EK, Lee YJ, et al. The association of the BRAF(V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer*. 2012 Apr 1;118(7):1764–73.

170. Howell GM, Carty SE, Armstrong MJ, LeBeau SO, Hodak SP, Coyne C, et al. Both BRAF V600E mutation and older age ( $\geq 65$  years) are associated with recurrent papillary thyroid cancer. *Ann Surg Oncol*. 2011 Dec;18(13):3566–71.
171. Brzezińska E, Pastuszek-Lewandoska D, Wojciechowska K, Migdalska-Sek M, Cyniak-Magierska A, Nawrot E, et al. Investigation of V600E BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Neuro Endocrinol Lett*. 2007 Aug;28(4):351–9.
172. Zoghalmi A, Roussel F, Sabourin J-C, Kuhn J-M, Marie J-P, Dehesdin D, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: predictive value for long-term prognosis and radioiodine sensitivity. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2014 Feb;131(1):7–13.
173. Witt RL, Ferris RL, Pribitkin EA, Sherman SI, Steward DL, Nikiforov YE. Diagnosis and management of differentiated thyroid cancer using molecular biology. *Laryngoscope*. 2013 Apr;123(4):1059–64.
174. Fukahori M, Yoshida A, Hayashi H, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, et al. The association between RAS gene mutations and clinical characteristics in follicular thyroid tumors: new insights from a single center and a large patient cohort. *Thyroid*. 2012 Mar 10.
175. Volante M, Rapa I, Gandhi M, Bussolati G, Giachino D, Papotti M, et al. RAS mutations are the predominant molecular alteration in poorly differentiated thyroid carcinomas and bear prognostic impact. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Dec;94(12):4735–41.
176. Fischer S, Asa SL. Application of immunohistochemistry to thyroid neoplasms. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Mar;132(3):359–72.
177. Sethi K, Sarkar S, Das S, Rajput S, Mazumder A, Roy B, et al. Expressions of CK-19, NF-kappaB, E-cadherin, beta-catenin and EGFR as diagnostic and prognostic markers by immunohistochemical analysis in thyroid carcinoma. *J Exp Ther Oncol*. 2011;9(3):187–99.
178. Hooff L, van der Veldt AAM, Hoekstra OS, Boers M, Molthoff CFM, van Diest PJ. Hexokinase III, cyclin A and galectin-3 are overexpressed in malignant follicular thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Feb;68(2):252–7.
179. Wiseman SM, Griffith OL, Melck A, Masoudi H, Gown A, Nabi IR, et al. Evaluation of type 1 growth factor receptor family expression in benign and malignant thyroid lesions. *Am J Surg*. 2008 May;195(5):667–73–discussion673.
180. Melck A, Masoudi H, Griffith OL, Rajput A, Wilkins G, Bugis S, et al. Cell Cycle Regulators Show Diagnostic and Prognostic Utility for Differentiated Thyroid Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007 Sep 20;14(12):3403–11.
181. Wiseman SM, Griffith OL, Deen S, Rajput A, Masoudi H, Gilks B, et al. Identification of molecular markers altered during transformation of differentiated into anaplastic thyroid carcinoma. *Arch Surg*. 2007 Aug;142(8):717–27–discussion727–9.



182. Weinberger PM, Adam B-L, Gourin CG, Moretz WH, Bollag RJ, Wang BY, et al. Association of nuclear, cytoplasmic expression of galectin-3 with beta-catenin/Wnt-pathway activation in thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007 May;133(5):503–10.
183. Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology*. 2002 Jan;40(1):80–7.
184. Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, et al. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet*. 2001 May 26;357(9269):1644–50.
185. Tong J, Wang Y, Da J-P. [Usefulness of CK19, HBME-1 and galectin-3 expressions in differential diagnosis of thyroid papillary microcarcinoma from benign lesions]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2011 Aug;33(8):599–604.
186. Kato N, Tsuchiya T, Tamura G, Motoyama T. E-cadherin expression in follicular carcinoma of the thyroid. *Pathol Int*. 2002 Jan;52(1):13–8.
187. Breclj E, Frković Grazio S, Auersperg M, Bracko M. Prognostic value of E-cadherin expression in thyroid follicular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2005 Jun;31(5):544–8.
188. Mase T, Funahashi H, Koshikawa T, Imai T, Nara Y, Tanaka Y, et al. HBME-1 immunostaining in thyroid tumors especially in follicular neoplasm. *Endocr J*. 2003 Apr;50(2):173–7.
189. Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O. Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 1998 Aug;11(8):735–9.
190. Khoo MLC, Beasley NJP, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL. Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002 Apr;87(4):1814–8.
191. Mai KT, Vaccani JP, Thomas J, Odell PF. Immunostaining for ret oncogene proteins in papillary thyroid carcinoma: a correlation of ret immunoreactivity and potential of lymph node metastasis. *Thyroid*. 2001 Sep;11(9):859–63.
192. Wang S, Lloyd RV, Hutzler MJ, Safran MS, Patwardhan NA, Khan A. The role of cell cycle regulatory protein, cyclin D1, in the progression of thyroid cancer. *Mod Pathol*. 2000 Aug;13(8):882–7.
193. Balta AZ, Filiz AI, Kurt Y, Sucullu I, Yucel E, Akin ML. Prognostic value of oncoprotein expressions in thyroid papillary carcinoma. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):734–41.
194. Hosal SA, Apel RL, Freeman JL, Azadian A, Rosen IB, LiVolsi VA, et al. Immunohistochemical Localization of p53 in Human Thyroid Neoplasms: Correlation with Biological Behavior. *Endocr Pathol*. 1997;8(1):21–8.

195. Nishida T, Nakao K, Hamaji M, Nakahara MA, Tsujimoto M. Overexpression of p53 protein and DNA content are important biologic prognostic factors for thyroid cancer. *Surgery*. 1996 May;119(5):568–75.
196. Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology*. 1994 Mar;24(3):205–10.
197. Hoos A, Stojadinovic A, Singh B, Dudas ME, Leung DHY, Shaha AR, et al. Clinical significance of molecular expression profiles of Hürthle cell tumors of the thyroid gland analyzed via tissue microarrays. *Am J Pathol*. 2002 Jan;160(1):175–83.
198. So AK-C, Kaur J, Kak I, Assi J, MacMillan C, Ralhan R, et al. Biotinidase is a novel marker for papillary thyroid cancer aggressiveness. *PLoS ONE*. 2012;7(7):e40956.
199. Yang A-H, Chen J-Y, Lee C-H, Chen J-Y. Expression of NCAM and OCIAD1 in well-differentiated thyroid carcinoma: correlation with the risk of distant metastasis. *J Clin Pathol*. 2012 Mar;65(3):206–12.
200. Hagström J, Heikkilä A, Siironen P, Louhimo J, Heiskanen I, Mäenpää H, et al. TLR-4 expression and decrease in chronic inflammation: indicators of aggressive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Pathol*. 2012 Apr;65(4):333–8.
201. Liu J, Brown RE. Immunohistochemical expressions of fatty acid synthase and phosphorylated c-Met in thyroid carcinomas of follicular origin. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(8):755–64.
202. Gustafson KS, LiVolsi VA, Furth EE, Pasha TL, Putt ME, Baloch ZW. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in follicular-patterned thyroid lesions. Caveats for the use of immunohistochemical studies. *Am J Clin Pathol*. 2003 Aug;120(2):175–81.
203. Delys L, Detours V, Franc B, Thomas G, Bogdanova T, Tronko M, et al. Gene expression and the biological phenotype of papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 2007 Dec 13;26(57):7894–903.
204. Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene*. 2005 Oct 6;24(44):6646–56.
205. Fluge Ø, Bruland O, Akslen LA, Lillehaug JR, Varhaug JE. Gene expression in poorly differentiated papillary thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2006 Feb;16(2):161–75.
206. Rosen J, He M, Umbricht C, Alexander HR, Dackiw APB, Zeiger MA, et al. A six-gene model for differentiating benign from malignant thyroid tumors on the basis of gene expression. *Surgery*. 2005 Dec;138(6):1050–6–discussion1056–7.
207. Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, et al. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Dec 18;98(26):15044–9.

208. Yano Y, Uematsu N, Yashiro T, Hara H, Ueno E, Miwa M, et al. Gene expression profiling identifies platelet-derived growth factor as a diagnostic molecular marker for papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Mar 15;10(6):2035–43.
209. Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, et al. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Letters*. 2003 May 30;195(1):111–9.
210. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2001 Apr;14(4):338–42.
211. Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, et al. Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 1;22(17):3531–9.
212. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer*. 2009 Feb 24;100(4):571–7.
213. Kondo T, Asa SL, Ezzat S. Epigenetic Dysregulation in Thyroid Neoplasia. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*. 2008 Jun;37(2):389–400.
214. Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokumaru Y, Guo Z, Westra WB, et al. Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Research*. 2003 May 1;63(9):2316–21.
215. Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter gene methylation status. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1999 Jul;84(7):2449–57.
216. Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma. *Cancer Research*. 2002 Jul 1;62(13):3698–701.
217. Alvarez-Nuñez F, Bussaglia E, Mauricio D, Ybarra J, Vilar M, Lerma E, et al. PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2006 Jan;16(1):17–23.
218. Hu S, Liu D, Tufano RP, Carson KA, Rosenbaum E, Cohen Y, et al. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2006 Nov 15;119(10):2322–9.
219. Russo D, Damante G, Puxeddu E, Durante C, Filetti S. Epigenetics of thyroid cancer and novel therapeutic targets. *J Mol Endocrinol*. 2011 Jun;46(3):R73–81.
220. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
221. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834–8.

222. Pallante P. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocrine Related Cancer*. 2006 Jun 1;13(2):497–508.
223. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Dec 27;102(52):19075–80.
224. Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, et al. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol*. 2007;18(3):163–73.
225. Nikiforova MN, Tseng GC, Steward D, Diorio D, Nikiforov YE. MicroRNA Expression Profiling of Thyroid Tumors: Biological Significance and Diagnostic Utility. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008 May 1;93(5):1600–8.
226. Cahill S, Smyth P, Denning K, Flavin R, Li J, Potratz A, et al. Effect of BRAFV600E mutation on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer*. 2007;6:21.
227. Cahill S, Smyth P, Finn SP, Denning K, Flavin R, O'Regan EM, et al. Effect of ret/PTC 1 rearrangement on transcription and post-transcriptional regulation in a papillary thyroid carcinoma model. *Mol Cancer*. 2006;5:70.
228. Chen Y-T, Kitabayashi N, Zhou XK, Fahey TJ, Scognamiglio T. MicroRNA analysis as a potential diagnostic tool for papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2008 Jun 27;21(9):1139–46.
229. Visone R, Russo L, Pallante P, De Martino I, Ferraro A, Leone V, et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocrine Related Cancer*. 2007 Sep 1;14(3):791–8.
230. Chou C-K, Chen R-F, Chou F-F, Chang H-W, Chen Y-J, Lee Y-F, et al. miR-146b is highly expressed in adult papillary thyroid carcinomas with high risk features including extrathyroidal invasion and the BRAF(V600E) mutation. *Thyroid*. 2010 May;20(5):489–94.
231. Sheu S-Y, Grabellus F, Schwertheim S, Handke S, Worm K, Schmid KW. Lack of correlation between BRAF V600E mutational status and the expression profile of a distinct set of miRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res*. 2009 Jun;41(6):482–7.
232. Weber F. A Limited Set of Human MicroRNA Is Deregulated in Follicular Thyroid Carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006 Jun 13;91(9):3584–91.
233. Montero-Conde C, Martín-Campos JM, Lerma E, Gimenez G, Martínez-Guitarte JL, Combalá N, et al. Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information. *Oncogene*. 2007 Sep 17;27(11):1554–61.

234. Simon R, Sauter G. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2003 Oct;5(26):1–12.
235. Suster S. Thyroid tumors with a follicular growth pattern: problems in differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Jul;130(7):984–8.
236. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005 Nov;5(11):845–56.
237. Williams MD, Zhang L, Elliott DD, Perrier ND, Lozano G, Clayman GL, et al. Differential gene expression profiling of aggressive and nonaggressive follicular carcinomas. *Human Pathology*. 2011 Sep;42(9):1213–20.
238. Lassalle S, Hofman V, Ilie M, Bonnetaud C, Puisségur M-P, Brest P, et al. Can the microRNA signature distinguish between thyroid tumors of uncertain malignant potential and other well-differentiated tumors of the thyroid gland? *Endocrine Related Cancer*. 2011 Oct;18(5):579–94.
239. Vriens MR, Weng J, Suh I, Huynh N, Guerrero MA, Shen WT, et al. MicroRNA expression profiling is a potential diagnostic tool for thyroid cancer. *Cancer*. 2012 Jul 1;118(13):3426–32.
240. Rossing M, Borup R, Henao R, Winther O, Vikesaa J, Niazi O, et al. Down-regulation of microRNAs controlling tumourigenic factors in follicular thyroid carcinoma. *J Mol Endocrinol*. 2012 Feb;48(1):11–23.
241. Dettmer M, Vogetseder A, Durso MB, Moch H, Komminoth P, Perren A, et al. MicroRNA expression array identifies novel diagnostic markers for conventional and oncocytic follicular thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jan;98(1):E1–7.
242. Yip L, Kelly L, Shuai Y, Armstrong MJ, Nikiforov YE, Carty SE, et al. MicroRNA signature distinguishes the degree of aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Jul;18(7):2035–41.
243. Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol*. 2003 Jul;120(1):71–7.
244. Russo M, Malandrino P, Nicolosi ML, Manusia M, Marturano I, Trovato MA, et al. The BRAF(V600E) mutation influences the short/medium-term outcome of classic papillary thyroid cancer, but is not an independent predictor of unfavorable outcome. *Thyroid*. 2014 May 2.
245. Zhang H-Y, Meng X, Du Z-X, Fang C-Q, Liu G-L, Wang H-Q, et al. Significance of survivin, caspase-3, and VEGF expression in thyroid carcinoma. *Clin Exp Med*. 2009 Feb 10;9(3):207–13.
246. Ito Y, Yoshida H, Uruno T, Nakano K, Miya A, Kobayashi K, et al. Survivin expression is significantly linked to the dedifferentiation of thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 2003 Sep;10(5):1337–40.

247. Pallante P, Berlingieri MT, Troncone G, Kruhoffer M, Orntoft TF, VIGLIETTO G, et al. UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer*. 2005 Aug 2;93(4):464–71.
248. Takahashi Y, Ishii Y, Nishida Y, Ikarashi M, Nagata T, Nakamura T, et al. Detection of aberrations of ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene (UBE2C) in advanced colon cancer with liver metastases by DNA microarray and two-color FISH. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2006 Jul;168(1):30–5.
249. Troncone G, Guerriero E, Pallante P, Berlingieri MT, Ferraro A, Del Vecchio L, et al. UbcH10 expression in human lymphomas. *Histopathology*. 2009 May;54(6):731–40.
250. Wagner KW, Sapinoso LM, El-Rifai W, Frierson HF, Butz N, Mestan J, et al. Overexpression, genomic amplification and therapeutic potential of inhibiting the UbcH10 ubiquitin conjugase in human carcinomas of diverse anatomic origin. *Oncogene*. 2004 Jun 21;23(39):6621–9.
251. Guerriero E, Ferraro A, Desiderio D, Pallante P, Berlingieri MT, Iaccarino A, et al. UbcH10 expression on thyroid fine-needle aspirates. *Cancer Cytopathology*. 2010 Jun 25;118(3):157–65.
252. Pallante P, Malapelle U, Berlingieri MT, Bellevicine C, Sepe R, Federico A, et al. UbcH10 overexpression in human lung carcinomas and its correlation with EGFR and p53 mutational status. *Eur J Cancer*. 2013 Mar;49(5):1117–26.
253. Berlingieri MT, Pallante P, Sboner A, Barbareschi M, Bianco M, Ferraro A, et al. UbcH10 is overexpressed in malignant breast carcinomas. *Eur J Cancer*. 2007 Dec;43(18):2729–35.
254. Berlingieri MT, Pallante P, Guida M, Nappi C, Masciullo V, Scambia G, et al. UbcH10 expression may be a useful tool in the prognosis of ovarian carcinomas. *Oncogene*. 2007 Mar 29;26(14):2136–40.
255. Lee J-J, Foukakis T, Hashemi J, Grimelius L, Heldin N-E, Wallin G, et al. Molecular cytogenetic profiles of novel and established human anaplastic thyroid carcinoma models. *Thyroid*. 2007 Apr;17(4):289–301.
256. Sakai M, Shimokawa T, Kobayashi T, Matsushima S, Yamada Y, Nakamura Y, et al. Elevated expression of C10orf3 (chromosome 10 open reading frame 3) is involved in the growth of human colon tumor. *Oncogene*. 2005 Sep 19.
257. Chen C-H, Lu P-J, Chen Y-C, Fu S-L, Wu K-J, Tsou A-P, et al. FLJ10540-elicited cell transformation is through the activation of PI3-kinase/AKT pathway. *Oncogene*. 2007 Jun 21;26(29):4272–83.
258. Martinez-Garay I, Rustom A, Gerdes H-H, Kutsche K. The novel centrosomal associated protein CEP55 is present in the spindle midzone and the midbody. *Genomics*. 2006 Feb;87(2):243–53.
259. Inoda S, Morita R, Hirohashi Y, Torigoe T, Asanuma H, Nakazawa E, et al. The feasibility of Cep55/c10orf3 derived peptide vaccine therapy for colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2011 Feb;90(1):55–60.

260. Li J, Wang J, Jiao H, Liao J, Xu X. Cytokinesis and cancer: Polo loves ROCK“n” Rho(A). *J Genet Genomics*. 2010 Mar;37(3):159–72.
261. Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Nakatsugawa M, Kiriya K, Nakazawa E, et al. Cep55/c10orf3, a tumor antigen derived from a centrosome residing protein in breast carcinoma. *J Immunother*. 2009 Jun;32(5):474–85.
262. Tao J, Zhi X, Tian Y, Li Z, Zhu Y, Wang W, et al. CEP55 contributes to human gastric carcinoma by regulating cell proliferation. *Tumour Biol*. 2014 May;35(5):4389–99.
263. Chen C-H, Lai J-M, Chou T-Y, Chen C-Y, Su L-J, Lee Y-C, et al. VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5052.
264. Jiang W, Jimenez G, Wells NJ, Hope TJ, Wahl GM, Hunter T, et al. PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol Cell*. 1998 Dec;2(6):877–85.
265. Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Apr;10(4):265–75.
266. Shimo A, Nishidate T, Ohta T, Fukuda M, Nakamura Y, Katagiri T. Elevated expression of protein regulator of cytokinesis 1, involved in the growth of breast cancer cells. *Cancer Science*. 2007 Feb;98(2):174–81.
267. Li C, Lin M, Liu J. Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis. *Oncogene*. 2004 Nov 8;23(58):9336–47.
268. Kurasawa Y, Earnshaw WC, Mochizuki Y, Dohmae N, Todokoro K. Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J*. 2004 Aug 18;23(16):3237–48.
269. Tuli A, Sharma M, Naslavsky N, Caplan S, Solheim JC. Specificity of amyloid precursor-like protein 2 interactions with MHC class I molecules. *Immunogenetics*. 2008 May 2;60(6):303–13.
270. Jacobsen KT, Iverfeldt K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Mar 31;66(14):2299–318.
271. Arvidsson Y, Andersson E, Bergstrom A, Andersson MK, Altiparmak G, Illerskog AC, et al. Amyloid precursor-like protein 1 is differentially upregulated in neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Endocrine Related Cancer*. 2008 Jun 1;15(2):569–81.
272. Peters HL, Tuli A, Wang X, Liu C, Pan Z, Ouellette MM, et al. Relevance of amyloid precursor-like protein 2 C-terminal fragments in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2012 Oct;41(4):1464–74.

273. Pietrzik CU, Hoffmann J, Stöber K, Chen CY, Bauer C, Otero DA, et al. From differentiation to proliferation: the secretory amyloid precursor protein as a local mediator of growth in thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Feb 17;95(4):1770–5.
274. Hu Z-Z, Huang H, Cheema A, Jung M, Dritschilo A, Wu CH. Integrated Bioinformatics for Radiation-Induced Pathway Analysis from Proteomics and Microarray Data. *J Proteomics Bioinform*. 2008 May;1(2):47–60.
275. Zhang K, Hu S, Wu J, Chen L, Lu J, Wang X, et al. Overexpression of RRM2 decreases thrombospondin-1 and increases VEGF production in human cancer cells in vitro and in vivo: implication of RRM2 in angiogenesis. *Mol Cancer*. 2009;8(1):11.
276. Kolesar J, Huang W, Eickhoff J, Hahn K, Alberti D, Attia S, et al. Evaluation of mRNA by Q-RT-PCR and protein expression by AQUA of the M2 subunit of ribonucleotide reductase (RRM2) in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Jun;64(1):79–86.
277. Telerman A, Amson R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):206–16.
278. House CM, Möller A, Bowtell DDL. Siah proteins: novel drug targets in the Ras and hypoxia pathways. *Cancer Research*. 2009 Dec 1;69(23):8835–8.
279. Schmidt RL, Park CH, Ahmed AU, Gundelach JH, Reed NR, Cheng S, et al. Inhibition of RAS-Mediated Transformation and Tumorigenesis by Targeting the Downstream E3 Ubiquitin Ligase Seven in Absentia Homologue. *Cancer Research*. 2007 Dec 15;67(24):11798–810.
280. Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, Zen Y, Nakanishi Y, Tsuji A, et al. Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Letters*. 2013 Apr 30;331(1):52–7.
281. He H-T, Fokas E, You A, Engenhardt-Cabillic R, An H-X. Siah1 proteins enhance radiosensitivity of human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2010;10:403.
282. Li H, Robinson KA, Anton B, Saldanha IJ, Ladenson PW. Cost-effectiveness of a novel molecular test for cytologically indeterminate thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Nov;96(11):E1719–26.
283. Gouveia C, Can NT, Bostrom A, Grenert JP, van Zante A, Orloff LA. Lack of association of BRAF mutation with negative prognostic indicators in papillary thyroid carcinoma: the University of California, San Francisco, experience. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Nov;139(11):1164–70.
284. Elisei R, Molinaro E, Agate L, Bottici V, Masserini L, Ceccarelli C, et al. Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Apr;95(4):1516–27.



285. Krützfeldt J, Poy MN, Stoffel M. Strategies to determine the biological function of microRNAs. *Nat Genet.* 2006 Jun;38 Suppl:S14–9.
286. Kolesnikov NN, Titov SE, Veriaskina IA, Karpinskaia EV, Shevchenko SP, Akhmerova LG, et al. [MicroRNA, evolution and cancer]. *Tsitologiya.* 2013;55(3):159–64.
287. Kloosterman WP, Plasterk RHA. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell.* 2006 Oct;11(4):441–50.
288. Akama T, Sue M, Kawashima A, Wu H, Tanigawa K, Suzuki S, et al. Identification of microRNAs that mediate thyroid cell growth induced by TSH. *Mol Endocrinol.* 2012 Mar;26(3):493–501.
289. Fabbri M, Valeri N, Calin GA. MicroRNAs and genomic variations: from Proteus tricks to Prometheus gift. *Carcinogenesis.* 2009 Jun;30(6):912–7.
290. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007 Feb 1;302(1):1–12.
291. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan;10(1):57–63.
292. Eminaga S, Christodoulou DC, Vigneault F, Church GM, Seidman JG. Quantification of microRNA expression with next-generation sequencing. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013 Jul;Chapter 4:Unit4.17.
293. Swierniak M, Wojcicka A, Czetwertynska M, Stachlewska E, Maciag M, Wiechno W, et al. In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug;98(8):E1401–9.
294. Stokowy T, Eszlinger M, Świerniak M, Fujarewicz K, Jarzab B, Paschke R, et al. Analysis options for high-throughput sequencing in miRNA expression profiling. *BMC Res Notes.* 2014;7:144.
295. Rodríguez-Rodero S, Fernández AF, Fernández-Morera JL, Castro-Santos P, Bayon GF, Ferrero C, et al. DNA methylation signatures identify biologically distinct thyroid cancer subtypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jul;98(7):2811–21.
296. Guan H, Wei G, Wu J, Fang D, Liao Z, Xiao H, et al. Down-Regulation of miR-218-2 and Its Host Gene SLIT3 Cooperate to Promote Invasion and Progression of Thyroid Cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug;98(8):E1334–44.
297. Dettmer M, Perren A, Moch H, Komminoth P, Nikiforov YE, Nikiforova MN. Comprehensive MicroRNA Expression Profiling Identifies Novel Markers in Follicular Variant of Papillary Thyroid Carcinoma. *Thyroid.* 2013 Nov;23(11):1383–9.
298. Wojtas B, Ferraz C, Stokowy T, Hauptmann S, Lange D, Dralle H, et al. Differential miRNA expression defines migration and reduced apoptosis in follicular thyroid carcinomas. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 May 5;388(1-2):1–9.

299. Jikuzono T, Kawamoto M, Yoshitake H, Kikuchi K, Akasu H, Ishikawa H, et al. The miR-221/222 cluster, miR-10b and miR-92a are highly upregulated in metastatic minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2013 Jun;42(6):1858–68.
300. Minna E, Romeo P, De Cecco L, Dugo M, Cassinelli G, Pilotti S, et al. miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Mar 16.
301. Colamaio M, Borbone E, Russo L, Bianco M, Federico A, Califano D, et al. miR-191 down-regulation plays a role in thyroid follicular tumors through CDK6 targeting. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Dec;96(12):E1915–24.
302. Zhang S, Deng B, Zhang Y, Jiang N. Expression of miR-100 and RBSP3 in FTC-133 cells after exposure to 131I. *Nucl Med Commun*. 2014 Apr 30.
303. Wang Z, Zhang H, He L, Dong W, Li J, Shan Z, et al. Association between the expression of four upregulated miRNAs and extrathyroidal invasion in papillary thyroid carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2013;6:281–7.
304. Liu X, He M, Hou Y, Liang B, Zhao L, Ma S, et al. Expression profiles of microRNAs and their target genes in papillary thyroid carcinoma. *Oncol Rep*. 2013 Apr;29(4):1415–20.
305. Lin X, Guan H, Li H, Liu L, Liu J, Wei G, et al. miR-101 inhibits cell proliferation by targeting Rac1 in papillary thyroid carcinoma. *Biomed Rep*. 2014 Jan;2(1):122–6.
306. Zhang J, Liu Y, Liu Z, Wang X-M, Yin D-T, Zheng L-L, et al. Differential expression profiling and functional analysis of microRNAs through stage I-III papillary thyroid carcinoma. *Int J Med Sci*. 2013;10(5):585–92.
307. Ma Y, Qin H, Cui Y. MiR-34a targets GAS1 to promote cell proliferation and inhibit apoptosis in papillary thyroid carcinoma via PI3K/Akt/Bad pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Nov 29;441(4):958–63.
308. Ebrahimi F, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y. miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives. *Exp Mol Pathol*. 2014 Feb;96(1):98–107.
309. Lv M, Zhang X, Li M, Chen Q, Ye M, Liang W, et al. miR-26a and its target CKS2 modulate cell growth and tumorigenesis of papillary thyroid carcinoma. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e67591.
310. Hardin H, Guo Z, Shan W, Montemayor-Garcia C, Asioli S, Yu X-M, et al. The Roles of the Epithelial-Mesenchymal Transition Marker PRRX1 and MicroRNA 146b-5p in Papillary Thyroid Carcinoma Progression. *Am J Pathol*. 2014 Jun 17.
311. Geraldo MV, Yamashita AS, Kimura ET. MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- $\beta$  by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene*. 2012 Apr 12;31(15):1910–22.
312. Keutgen XM, Filicori F, Crowley MJ, Wang Y, Scognamiglio T, Hoda R, et al. A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin Cancer Res*. 2012 Apr 1;18(7):2032–8.

313. Cui G, Cui M, Li Y, Liang Y, Li W, Guo H, et al. MiR-186 targets ROCK1 to suppress the growth and metastasis of NSCLC cells. *Tumour Biol.* 2014 Jun 4.
314. Yuan X, He J, Sun F, Gu J. Effects and interactions of MiR-577 and TSGA10 in regulating esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6(12):2651–67.
315. Huang W-C, Chan S-H, Jang T-H, Chang J-W, Ko Y-C, Yen T-C, et al. miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Research.* 2014 Feb 1;74(3):751–64.
316. Zhou Y, Li Y, Ye J, Jiang R, Yan H, Yang X, et al. MicroRNA-491 is involved in metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibitions of matrix metalloproteinase and epithelial to mesenchymal transition. *Liver Int.* 2013 Sep;33(8):1271–80.
317. Wang Y, Chen M, Tao Z, Hua Q, Chen S, Xiao B. Identification of predictive biomarkers for early diagnosis of larynx carcinoma based on microRNA expression data. *Cancer Genetics.* 2013 Sep;206(9-10):340–6.
318. Li X, Liu Y, Granberg KJ, Wang Q, Moore LM, Ji P, et al. Two mature products of MIR-491 coordinate to suppress key cancer hallmarks in glioblastoma. *Oncogene.* 2014 Apr 21.
319. Guo R, Wang Y, Shi W-Y, Liu B, Hou S-Q, Liu L. MicroRNA miR-491-5p targeting both TP53 and Bcl-XL induces cell apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells through mitochondria mediated pathway. *Molecules.* 2012;17(12):14733–47.
320. Zhou Y-L, Liu C, Dai X-X, Zhang X-H, Wang O-C. Overexpression of miR-221 is associated with aggressive clinicopathologic characteristics and the BRAF mutation in papillary thyroid carcinomas. *Med Oncol.* 2012 Dec;29(5):3360–6.
321. Huang Y, Liao D, Pan L, Ye R, Li X, Wang S, et al. Expressions of miRNAs in papillary thyroid carcinoma and their associations with the BRAFV600E mutation. *European Journal of Endocrinology.* 2013 May;168(5):675–81.
322. Nadal E, Zhong J, Lin J, Reddy RM, Ramnath N, Orringer MB, et al. A MicroRNA Cluster at 14q32 Drives Aggressive Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2014 Jun 15;20(12):3107–17.
323. Formosa A, Markert EK, Lena AM, Italiano D, Finazzi-Agro E, Levine AJ, et al. MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene.* 2013 Oct 28.
324. Hidaka H, Seki N, Yoshino H, Yamasaki T, Yamada Y, Nohata N, et al. Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2012 Jan;3(1):44–57.

325. Zhang R, Luo H, Wang S, Chen W, Chen Z, Wang H-W, et al. MicroRNA-377 inhibited proliferation and invasion of human glioblastoma cells by directly targeting specificity protein 1. *Neuro-oncology*. 2014 Jun 20.
326. Funamizu N, Lacy CR, Parpart ST, Takai A, Hiyoshi Y, Yanaga K. MicroRNA-301b promotes cell invasiveness through targeting TP63 in pancreatic carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2014 Mar;44(3):725–34.
327. Anaya-Ruiz M, Bandala C, Perez-Santos JLM. miR-485 acts as a tumor suppressor by inhibiting cell growth and migration in breast carcinoma T47D cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(6):3757–60.
328. Nixon IJ, Witcher MM, Palmer FL, Tuttle RM, Shaha AR, Shah JP, et al. 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.
329. Lee JC, Zhao JT, Clifton-Bligh RJ, Gill A, Gundara JS, Ip JC, et al. MicroRNA-222 and MicroRNA-146b are tissue and circulating biomarkers of recurrent papillary thyroid cancer. *Cancer*. 2013 Dec 15;119(24):4358–65.
330. Acibucu F, Dökmetaş HS, Tutar Y, Elagoz S, Kilicli F. Correlations between the expression levels of micro-RNA146b, 221, 222 and p27Kip1 protein mRNA and the clinicopathologic parameters in papillary thyroid cancers. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Mar;122(3):137–43.
331. Yang Z, Yuan Z, Fan Y, Deng X, Zheng Q. Integrated analyses of microRNA and mRNA expression profiles in aggressive papillary thyroid carcinoma. *Mol Med Rep*. 2013 Nov;8(5):1353–8.
332. Geraldo MV, Fuziwara CS, Friguglietti CUM, Costa RB, Kulcsar MAV, Yamashita AS, et al. MicroRNAs miR-146-5p and let-7f as prognostic tools for aggressive papillary thyroid carcinoma: a case report. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012 Nov;56(8):552–7.
333. Chou C-K, Yang KD, Chou F-F, Huang C-C, Lan Y-W, Lee Y-F, et al. Prognostic implications of miR-146b expression and its functional role in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Feb;98(2):E196–205.
334. Buda I, Bachar G, Gilam A, Modai S, Strenov Y, Pasmanik-Chor M, et al. Differential expression of microRNAs between aggressive and non-aggressive papillary thyroid carcinoma. *Head Neck Oncol*. 2012;4:52.
335. Kalinowski FC, Brown RAM, Ganda C, Giles KM, Epis MR, Horsham J, et al. microRNA-7: A tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Jun 5.
336. Ma L, Deng X, Wu M, Zhang G, Huang J. Down-regulation of miRNA-204 by LMP-1 enhances CDC42 activity and facilitates invasion of EBV-associated nasopharyngeal carcinoma cells. *FEBS Lett*. 2014 May 2;588(9):1562–70.

337. Gowrishankar B, Ibragimova I, Zhou Y, Slifker MJ, Devarajan K, Al-Saleem T, et al. MicroRNA expression signatures of stage, grade, and progression in clear cell RCC. *Cancer Biol Ther.* 2014 Mar 1;15(3):329–41.
338. Bao W, Wang H-H, Tian F-J, He X-Y, Qiu M-T, Wang J-Y, et al. A TrkB-STAT3-miR-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2013;12:155.
339. Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, et al. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e25787.

## 8. Anexos

Tabla 8.1 Datos clínicos de la serie general.

Caso	Pron	Diag	BRAF	NRAS	HRAS	Sexo	TCir	DiamT	Ttol	Recid
A00		ATC	V600E	N/A	N/A	Hombre				
A01		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	5,00	Si	Si
A02	Bueno	FTCMI	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	2,50	Si	No
A03	Malo	FTCMI	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	2,50	Si	Si
A04	Bueno	FTCMI	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	5,00	Si	No
A05	Bueno	FTCMI	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	5,00	Si	No
A06	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	5,50	Si	No
A07	Bueno	FVPTC	xxx	Q61R?	xxx	Mujer	Total	3,00	Si	No
A08		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,70	Si	Si
A09	Bueno	FTCAI	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	2,20	Si	No
A10	Malo	FTCAI	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	8,50	Si	Si
A11	Bueno	OVFTC	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	1,70	Si	No
A12	Bueno	FTCMI	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	7,00	Si	No
A13		PDTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	8,00	Si	Si
A14	Bueno	OVFTC	N/A		xxx	Hombre	Total	5,00	Si	No
A15	Malo	FTCMI	N/A	Q61R	xxx	Mujer	Total	3,00	Si	Si
A16		ATC	xxx	xxx	Q61R	Mujer	Subtotal	8,50	No	Si
A17	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	No
A18	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
A19	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	5,00	Si	No
A20	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
A21	Bueno	DSPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,50	Si	No
A22	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,20	Si	No
A23	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,20	Si	No
A24	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	Si
A25	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	1,70	si	No
A26	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	3,00	Si	No
A27	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	No
A28	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,70	Si	Si
A29		PDTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Subtotal	4,00	No	Si
A30	Malo	TCPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	5,00	Si	Si
A31	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	si	Si
A32	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
A33	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,80	Si	Si
A34	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,00	Si	No
A35	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	5,00	Si	Si
A36	Malo	cPTC	QV600E	N/A	N/A	Hombre	Total	5,00	Si	Si
A37	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,20	Si	Si
A38	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	3,00	Si	No
A39	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	1,10	Si	No
A40	Bueno	FVPTC	xxx	Q61R	xxx	Mujer	Total	2,00	Si	No
A41	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
A42	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	4,00	Si	No
A43	Bueno	cPTC	QV600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
A44	Bueno	cPTC	N/V	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
A45	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,00	Si	No
A46	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,00	Si	No
A47	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
A48	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	4,20	Si	No
A49	Bueno	fVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,50	Si	No
A50	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,40	Si	Si
A51	Bueno	DSPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	4,50	Si	No
A52	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,50	Si	No
A53	Bueno	FVPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,70	Si	No
A54	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,70	Si	No
A55	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,00	Si	Si

A56	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	Si
A57	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	No
A58	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,80	Si	No
A60	Malo	OVFTC	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	4,00	Si	Si
A63	Malo	PTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	8,50	Si	Si
A64	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,40	Si	Si
A66	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	4,30	Si	Si
A67	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	4,00	Si	Si
A68	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Subtotal	9,00	Si	Si
A69	Malo	TCPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,70	Si	Si
A72	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	Si
AA01		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre				
AA02		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,50		
AA03		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		5,00		
AA04		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,50		
AA05		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		2,20		
AA06		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	8,00		
AA07		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		8,50		
AA08		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	4,50		
AA09		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,00		
AA10		AF	N/A	Q61R	xxx	Mujer		2,50		
AA11		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	4,50		
AA12		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	7,00		
AA13		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	1,50		
AA14		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,00		
AA15		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	4,00		
AA16		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	2,50		
AA17		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre		4,00		
AA18		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre		2,40		
AA19		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		3,00		
AA20		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,50		
AA21		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		4,50		
AA22		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	6,00		
AA23		AF	N/A	indcl	xxx	Mujer	Subtotal	3,00		
AA24		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,00		
AA25		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,70		
AA26		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	3,50		
AA27		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,00		
AA28		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,00		
AA29		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,50		
AA30		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,40		
AA31		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,70		
AA32		AF	N/A	Q61R	xxx	Mujer		3,00		
AA33		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,50		
AA34		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		4,00		
AA35		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,20		
AA36		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,00		
AA37		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	3,50		
AA38		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre		4,50		
AA39		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,80		
AA40		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	3,50	No	
AA41		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	10,00		
AA42		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal			
AA43		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total			
AA44		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	2,00	No	
AA45		AF	N/A	N/V	N/V	Mujer	Subtotal			
AA46		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal			
AA47		AF	N/A	xxx	xxx		Subtotal	6,00		



AA48		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	3,00		
AA49		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer		1,60		
AA50		AF	N/A	N/V	xxx	Mujer	Subtotal	3,00		
AA51		AF	N/A	xxx	xxx					
AA52		AF	N/A	xxx	Q61R	Mujer	Subtotal	3,20		
AA53		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	2,00		
AA54		AF	N/A	xxx	xxx					
AA55		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,00		
AA56		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	1,80		
AA57		AF	N/A	N/V	N/V	Mujer	Total	3,50		
AA58		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,50		
AT01		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	3,00		
AT02		AF	N/A	xxx	Q61R	Mujer	Subtotal	3,20		
AT03		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	3,50		
AT04		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	6,00		
AT05		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	6,50		
AT06		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	6,50		
AT07		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	2,30		
AT08		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	1,80		
AT09		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	4,30		
AT10		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	1,50		
AT11		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	2,20		
AT12		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	5,00		
AT13		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,70		
AT14		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	5,50		
AT15		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	4,40		
AT16		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	5,60		
AT17		AF	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	2,40		
AT18		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	3,00		
AT19		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	4,00		
AT20		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	2,50		
AT21		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	3,20		
AT22		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	9,00		
AT23		AF	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	2,00		
B01	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
B02	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total		Si	No
B03	Bueno	DSPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total		Si	No
B04	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	1,50	Si	No
B05	Malo	FVPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	6,00	Si	No
B06	Bueno	FVPTC	xxx	N/V	xxx	Mujer	Total	2,00	Si	No
B07	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,50	Si	No
B08	Bueno	TCPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
B09	Bueno	TCPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,80	Si	No
B10	Malo	PTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,20	Si	No
B11	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	Si
B12	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	No
B13	Bueno	WLPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,80	Si	No
B15	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,80	Si	No
B16	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	3,80	Si	No
B17	Bueno	DSPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,80	Si	No
B18	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	3,20	Si	No
B19	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	4,10	Si	No
B20	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,30	Si	Si
B21	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Subtotal	2,20	si	Si
B22	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	4,20	Si	Si
B23	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,80	Si	Si
B24	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	nm	Total	2,00	Si	Si
B25	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,20	Si	Si

B27	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	4,50	Si	Si
B28	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,40	Si	Si
B30	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
B31	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
B32	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
B34	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	Si
B35	Bueno	FVPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	No	No
B36	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	0,70	Si	Si
B37	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,20	Si	No
B38	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,50	Si	No
B40	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
B41	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,80	Si	No
B42	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	No	No
B43	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	6,00	Si	No
B44	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	No
B45	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,20	Si	No
B46	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,20	No	No
B47	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	1,50	No	No
B48	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
B50	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,00	Si	No
B51	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	2,30	Si	No
B53	Malo	WLPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	1,50	Si	No
B54	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
B55	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	0,60	Si	No
B58	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	0,20	Si	No
B59	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
B60	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	3,00	Si	No
B63	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	1,00	Si	No
B64	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	1,50	Si	No
B65	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,80	Si	Si
B66	Bueno	FVPTC	2V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,30	Si	No
B68	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,20	Si	No
C05	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	1,10	Si	No
C07	Malo	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	3,00	Si	Si
C107	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,70	Si	Si
C166	Bueno	FVPTC	deletion	xxx	xxx	Hombre	Total	5,00	No	No
C168	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Subtotal	2,50	No	No
C170	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,40	Si	No
C173	Bueno	OVPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,30	No	No
C176	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	1,80	Si	No
C177	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,50	Si	No
C181	Bueno	OVFTC	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	3,10	No	No
C183	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	Si
C214	Bueno	OVFTC	N/A	xxx	xxx	Mujer	Total	1,30	No	No
C22	Malo	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,00	Si	Si
C263	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	Si
C30	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total		Si	No
C38	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	5,50	Si	No
C46	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	Si
C49	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,90	Si	No
C51	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total		Si	Si
C53	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
C60	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	2,00	Si	Si
C71	Malo	DSPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total		Si	Si
C72	Malo	cPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,00	Si	Si
C97	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	4,00	Si	Si
G02	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,30	Si	No
G05	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No

G06	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	3,50	Si	Si
G12	Malo	DSPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	5,50	Si	Si
G14	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	Si
G18	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,80	Si	No
G19	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,80	Si	No
G20	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
G22	Bueno	cPTC	N/V	N/A	N/A	Hombre	Total	3,20	Si	No
G23	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,40	Si	No
G24	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,20	Si	No
R10	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,20	Si	Si
R14	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,50	Si	Si
R15		PDTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Subtotal	4,00	No	No
R17		ATC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	Si
R20	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	Si
R24	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	4,50	Si	Si
R28	Malo	FTC	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	5,60	Si	Si
R31	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	4,50	Si	Si
R32	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	5,10	Si	Si
S01		PDTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	4,00	Si	Si
S02		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	8,00	Si	Si
S03		PDTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	9,00	Si	No
S04		PDTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	5,00	Si	Si
S06		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total		Si	Si
S07		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	4,20	No	Si
S08		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Subtotal	5,50	Si	No
S09		PDTC	xxx	Q61K	xxx	Mujer	Total		Si	Si
S10		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	7,00	Si	Si
S11		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,60	Si	No
S12		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	4,50	Si	Si
S13		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	6,00	Si	Si
S14		PDTC	xxx	Q61K	xxx	Mujer	Total	9,00		
S15		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	14,00	Si	
S16		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,80	Si	No
S17		PDTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	10,00	Si	Si
S18		ATC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	6,00	No	
S19		ATC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	8,00		
S20		ATC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	5,50	Si	
S21		ATC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	6,00	Si	
S22		ATC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	6,00		Si
S23		ATC	xxx	xxx	N/V	Hombre		8,00		
S24		ATC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	7,50	Si	Si
S25		ATC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	8,00		
S26		ATC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	5,00		Si
T01	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
T02	Malo	cPTC	N/V	N/A	N/A	Hombre	Total	1,60	Si	Si
T03	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
T04	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,60	Si	No
T05	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	4,50	Si	No
T06	Bueno	cPTC	xxx	Q61K	xxx	Mujer	Total	2,50	Si	No
T07	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
T09	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	2,60	Si	No
T10	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,80	Si	Si
T11	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,50	Si	No
T12	Bueno	cPTC	N/V	N/A	N/A	Hombre	Total	1,20	Si	No
T13	Malo	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,20	Si	Si
T14	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	3,80	Si	No
T15	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	1,20	Si	No
T16	Bueno	WLPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	4,00	Si	No

T17	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,00	Si	No
T18	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,00	Si	Si
T19	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,00	Si	No
T20	Bueno	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	8,00	Si	No
T21	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,50	Si	No
T22	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Hombre	Total	2,00	Si	Si
T23	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	3,80	Si	No
T24	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,10	Si	No
T25	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,50	Si	Si
T26	Malo	FVPTC	xxx	Q61R	N/A	Mujer	Total	1,90	Si	Si
T27	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,00	Si	Si
T29	Bueno	OVPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	6,00	Si	No
T30	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Mujer	Total	2,50	Si	Si
T31	Malo	OVFTC	N/A	xxx	xxx	Hombre	Total	4,50	Si	Si
T32		PDTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	10,50	Si	Si
T33		PDTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	4,60	Si	Si
T34	Malo	DSPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	2,60	Si	Si
T36	Malo	FVPTC	V600E?	N/A	N/A	Hombre	Total	4,50	Si	Si
T37	Bueno	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	3,00	Si	No
T38	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Mujer	Total	2,50	Si	No
T39	Bueno	FVPTC	xxx	xxx	xxx	Hombre	Total	4,40	Si	No
T40	Malo	cPTC	xxx	N/A	N/A	Mujer	Total	1,10	Si	Si
T41	Malo	TCPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	3,50	Si	Si
T43	Malo	cPTC	V600E	N/A	N/A	Hombre	Total	3,00	Si	Si
T44	Malo	FVPTC	xxx	Q61K	xxx	Hombre	Subtotal	6,30	Si	Si

En la tabla, **Pron**, pronóstico, **TCir**, tipo de cirugía, **DiamT**, diámetro del tumor; **Ttol**, tratamiento con I<sup>131</sup>; **Recid**, recidiva; **N/A**, no aplica; **N/V**, xxx, sin mutación; no valorado; **FA**, adenoma folicular; **cPTC**, carcinoma papilar variante convencional; **WLPTC**, carcinoma papilar variante warthin like; **FVPTC**, carcinoma papilar variante folicular; **DSPTC**, carcinoma papilar esclerosante difusa; **TCPTC**, carcinoma papilar variante células altas; **FTC**, carcinoma folicular; **FTCMI**, carcinoma folicular mínimamente invasor; **OVFTC**, carcinoma folicular variante oncocítica; **FTVAI**, carcinoma folicular mínimamente invasivo; **PDTC**, carcinoma pobremente diferenciado; **ATC**, carcinoma anaplásico.

Tabla 8.2 Datos clínicos de la serie de Hiperplasias nodulares de tiroides

ID	Fnacim	Fcirug	Sexo	TTumor	FUltSeg
HNT1	31/12/69	09/01/07	M	4	
HNT2	18/03/40	09/01/07	M	4	23/08/13
HNT3	14/01/31	16/01/07	M		20/01/14
HNT4	12/05/37	23/01/07	M		12/06/12
HNT5	12/10/37	23/01/07	M	1,5	21/08/13
HNT6	05/09/68	30/01/07	M		
HNT7	24/07/46	01/02/07	M		26/10/12
HNT8	13/03/67	01/02/07	M		17/12/12
HNT9	23/08/41	06/02/07	M		17/10/13
HNT10	08/08/30	13/02/07	M		15/02/12
HNT11	12/02/68	15/02/07	M		19/09/13
HNT12	16/01/63	15/02/07	M		11/02/14
HNT13	12/03/41	20/02/07	M		13/08/13
HNT14	17/02/59	27/02/07	M	3,5	21/01/13
HNT15	28/02/43	06/03/07	H	2,5	12/02/14
HNT16	02/06/31	13/03/07	M		04/09/13
HNT17	15/11/52	15/03/07	M		24/12/13
HNT18	28/12/52	20/03/07	H	2	10/10/12
HNT19	13/06/58	21/03/07	M		11/04/13
HNT20	28/01/70	27/03/07	M		24/09/13
HNT21	16/10/70	29/03/07	M	1,8	18/12/13
HNT22	22/09/39	03/04/07	M		21/01/11
HNT23	30/11/68	18/04/07	M		
HNT24	29/11/32	27/04/07	H		04/06/10
HNT25	27/08/47	03/05/07	M	3,5	06/06/13
HNT26	02/06/62	03/05/07	H	3	
HNT27	14/07/46	08/05/07	M		26/08/13
HNT28	11/08/62	10/05/07	M		01/10/13
HNT29	07/12/46	10/05/07	M		04/11/13
HNT30	21/08/63	05/05/07	M		23/04/13
HNT31	01/10/60	05/05/07	H		08/01/14
HNT32	29/01/52	22/05/07	H		
HNT33	07/01/52	24/04/07	M		24/10/13
HNT34	04/10/44	29/05/07	M		20/04/12
HNT35	06/04/63	29/05/07	M		
HNT36	02/07/49	05/06/07	H		12/02/14
HNT37	20/09/33	12/06/07	M		12/11/13
HNT38	17/10/76	14/06/07	M	4	19/09/12
HNT39	09/04/23	19/06/07	M		
HNT40	26/11/34	17/07/07	M		13/01/14

En la tabla, **Fnacim**, fecha de nacimiento, **Fcirug**, fecha de la cirugía, **TTumor**, tamaño del tumor; **Fultseg**, fecha del último seguimiento.

Tabla 8.3 Datos clínicos de la serie de PAAF.

ID	PAAF	Sistema Bethesda	Diagnóstico	Fnacim	FPAAF	FUltSeg
PF01	Fol lev- cel	Benigno	FTC	21/11/72	16/08/12	02/09/13
PF02	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	09/06/74	07/04/11	19/09/13
PF03	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	15/09/53	18/03/11	18/09/12
PF04	Fol lev- cel	Benigno	AF	22/04/80	29/08/12	28/08/13
PF05	Fol mod-cel	Indeterminado	FTC	22/07/77	29/12/10	09/01/14
PF06	Fol den-cel	Potencialmente neoplásico	AF	13/02/66	08/09/06	
PF07	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	11/10/54	17/06/10	02/09/13
PF08	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	05/07/67	03/01/13	17/06/13
PF09	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	08/04/74	17/05/12	21/02/13
PF10	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	07/07/63	23/06/09	16/01/14
PF11	Fol lev- cel	Benigno	FTC	06/10/80	07/05/07	09/12/13
PF12	Fol den-cel	Potencialmente neoplásico	FTC	17/05/63	06/11/08	03/12/13
PF13	Rsug de ptc	Sospechoso de neoplasia	FVPTC	22/08/77	08/04/09	16/09/13
PF14	Fol mod-cel	Indeterminado	FVPTC	07/08/80	12/08/11	30/12/13
PF15	Fol den-cel	Potencialmente neoplásico	FTC	09/03/76	27/07/11	17/09/13
PF16	Fol lev- cel	Benigno	FTC	31/08/73	05/12/00	14/01/14
PF17	Fol mod-cel	Indeterminado	FTC	02/08/72	18/05/11	13/11/13
PF18	Fol mod-cel	Indeterminado	FVPTC	24/10/66	13/11/09	03/12/13
PF19	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	30/09/89	22/03/12	09/07/13
PF20	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	18/04/49	23/02/11	21/05/12
PF21	Fol mod-cel	Indeterminado	AF	08/08/56	03/09/08	15/03/12
PF22	Fol den-cel	Potencialmente neoplásico	FTC	03/08/62	20/10/04	18/12/13
PF24	Fol lev- cel	Benigno	AF	03/01/54	20/05/09	11/02/14
PF25	Fol lev- cel	Benigno	HNT	14/05/47	01/12/10	18/11/13
PF26	Fol lev- cel	Benigno	HNT	27/09/51	23/07/08	07/01/14
PF27	Fol lev- cel	Benigno	HNT	29/08/68	16/11/09	
PF28	Fol mod-cel	Indeterminado	HNT	25/06/62	25/03/09	05/10/10
PF29	Fol lev- cel	Benigno	HNT	01/09/57	17/12/09	09/07/13
PF30	Fol mod-cel	Indeterminado	HNT	09/11/60	02/09/09	19/11/10
PF31	Fol lev- cel	Benigno	FTC	25/08/55	26/05/03	07/11/13
PF32	Fol lev- cel	Benigno	HNT	20/04/32	30/07/08	17/01/11
PF33	Fol mod-cel	Indeterminado	HNT	04/02/54	28/01/09	22/11/10
PF34	Fol mod-cel	Indeterminado	FVPTC	29/01/63	01/10/09	12/12/13
PF35	Fol mod-cel	Indeterminado	HNT	04/08/42	17/09/08	13/10/11
PF36	Fol lev- cel	Benigno	HNT	23/10/58	15/10/09	10/11/10
PF37	Fol mod-cel	Indeterminado	HNT	03/06/64	24/02/10	10/02/11
PF38	Fol lev- cel	Benigno	HNT	30/11/52	23/10/08	28/01/14
PF39	Fol den-cel	Potencialmente neoplásico	HNT	19/04/68	25/06/10	25/10/10

En la tabla, **PAAF**, punción aspiración con aguja fina; **Fnacim**, fecha de nacimiento, **FPAAF**, fecha de la PAAF; **Fultseg**, fecha del último seguimiento; **Fol mod-cel**, folicular moderadamente celular; **Fol lev-cel**, folicular levemente celular; **Fol den-cel**, folicular densamente celular; **FA**, adenoma folicular; **FVPTC**, carcinoma papilar variante folicular; **FTC**, carcinoma folicular.

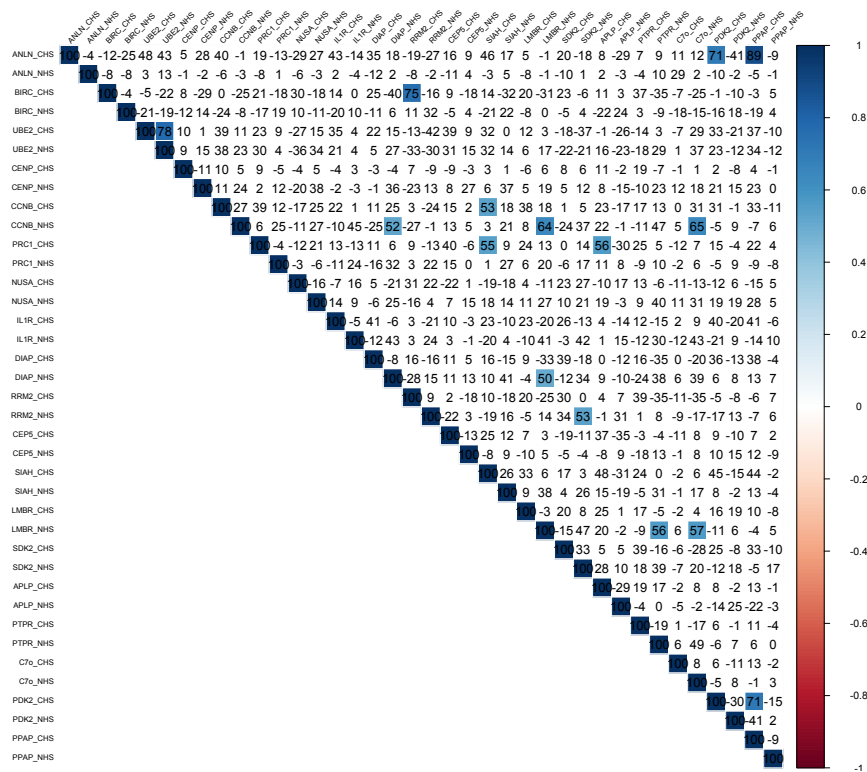


Figura 8.1 Matriz de correlación de Spearman para el grupo de los carcinomas bien diferenciados de tiroides.

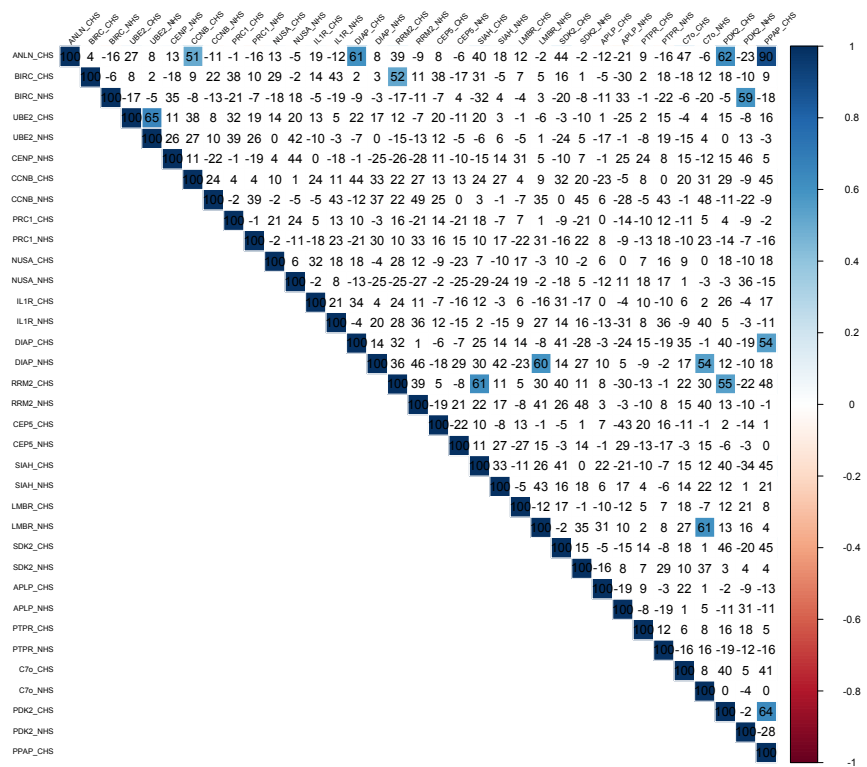


Figura 8.2 Matriz de correlación de Spearman para el grupo de adenoma folicular versus carcinomas foliculares.

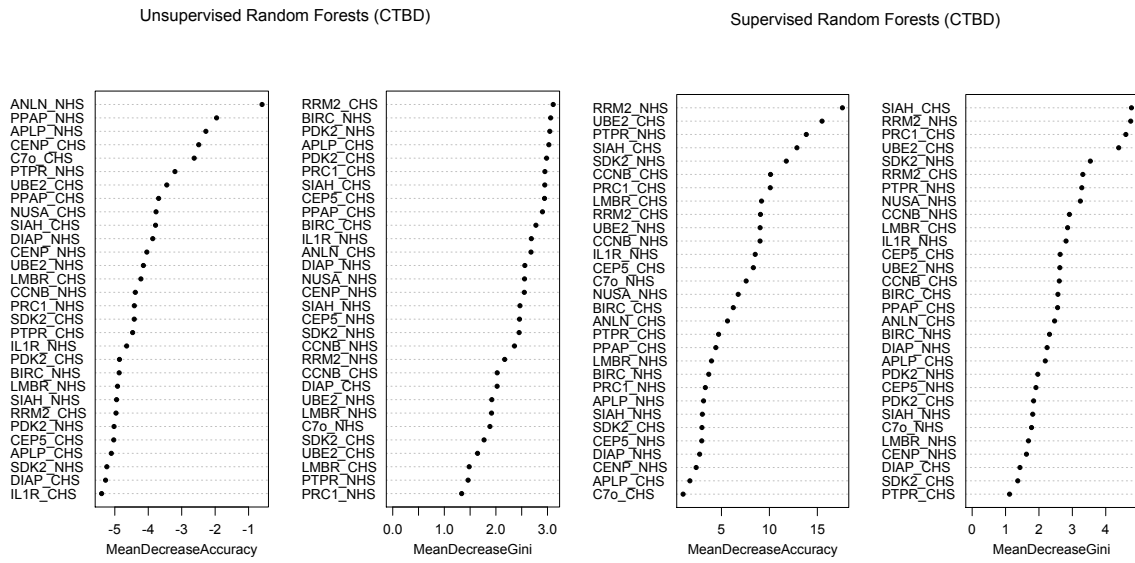


Figura 8.3 Análisis Random forest supervisado y no supervisado para identificar las proteínas que contribuyen a diferenciar entre buen y mal pronóstico en los carcinomas bien diferenciados de tiroides.

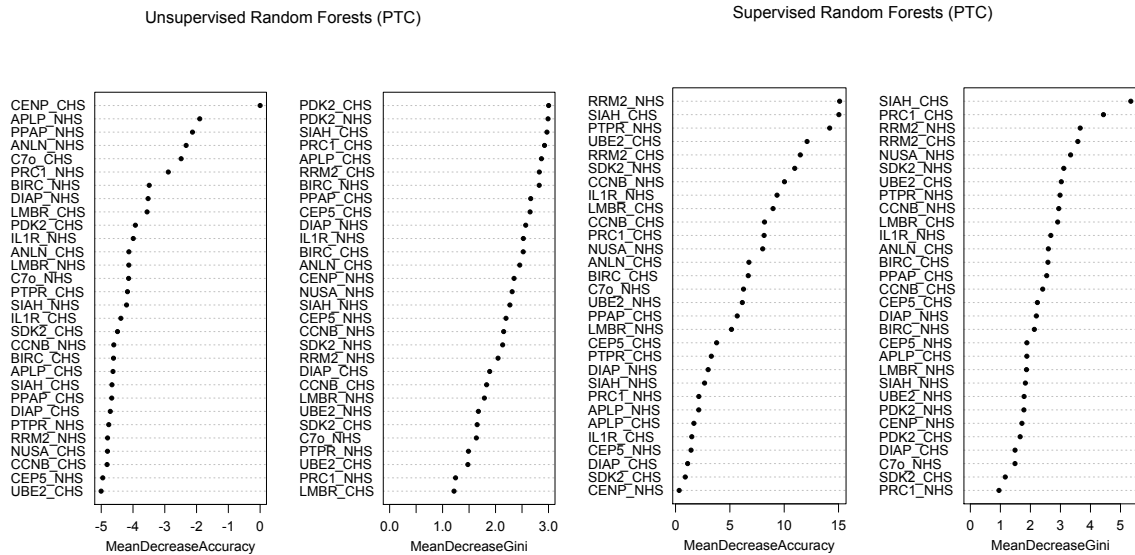
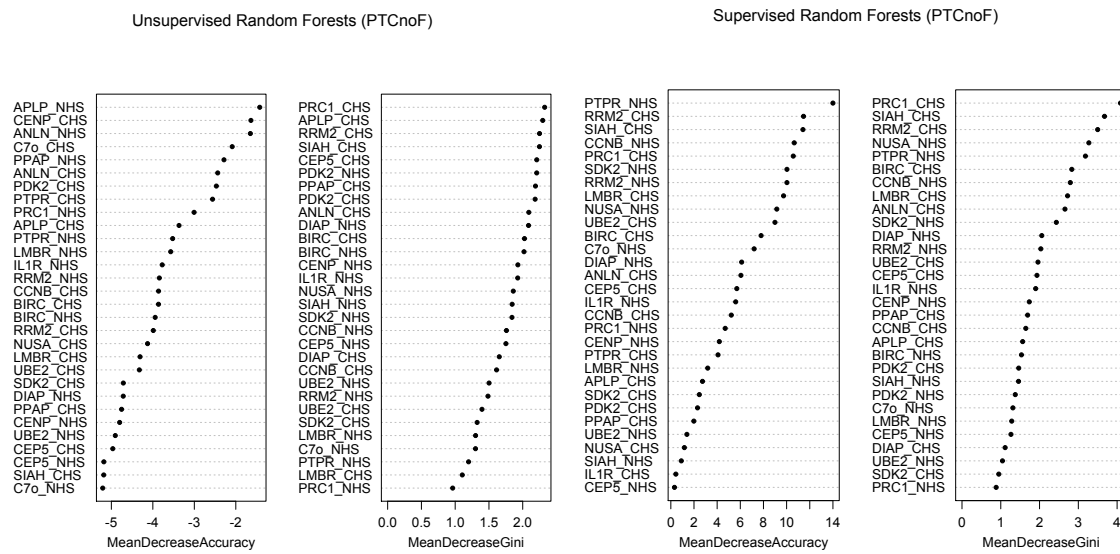
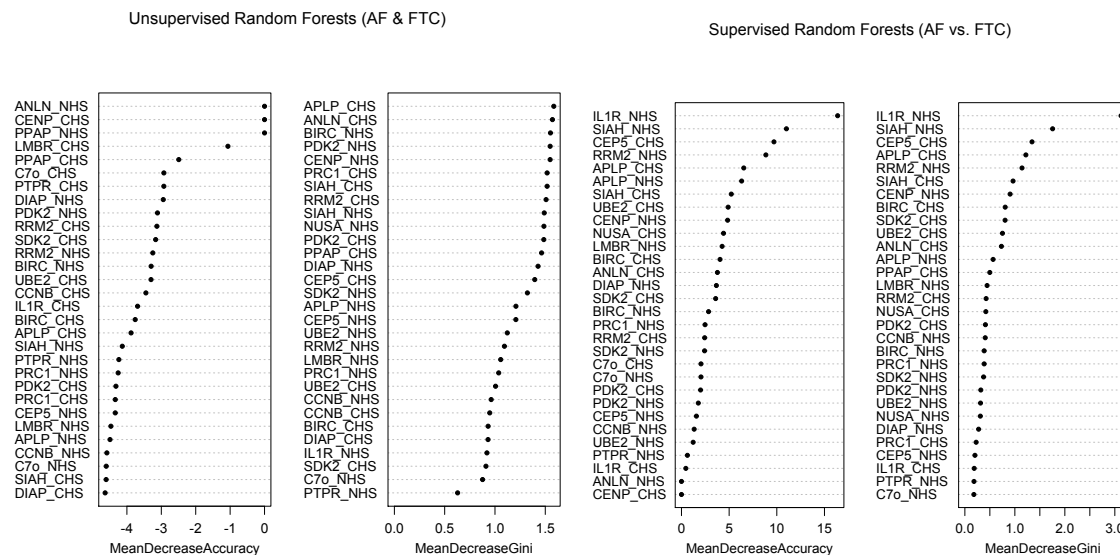


Figura 8.4 Análisis Random forest supervisado y no supervisado para identificar las proteínas que contribuyen a diferenciar entre buen y mal pronóstico en los carcinomas papilares.





**Figura 8.5** Análisis Random forest supervisado y no supervisado para identificar las proteínas que contribuyen a diferenciar entre buen y mal pronóstico en los carcinomas papilares de variante no folicular.



**Figura 8.6** Análisis Random forest supervisado y no supervisado para identificar las proteínas que contribuyen a diferenciar entre adenomas y carcinomas foliculares.

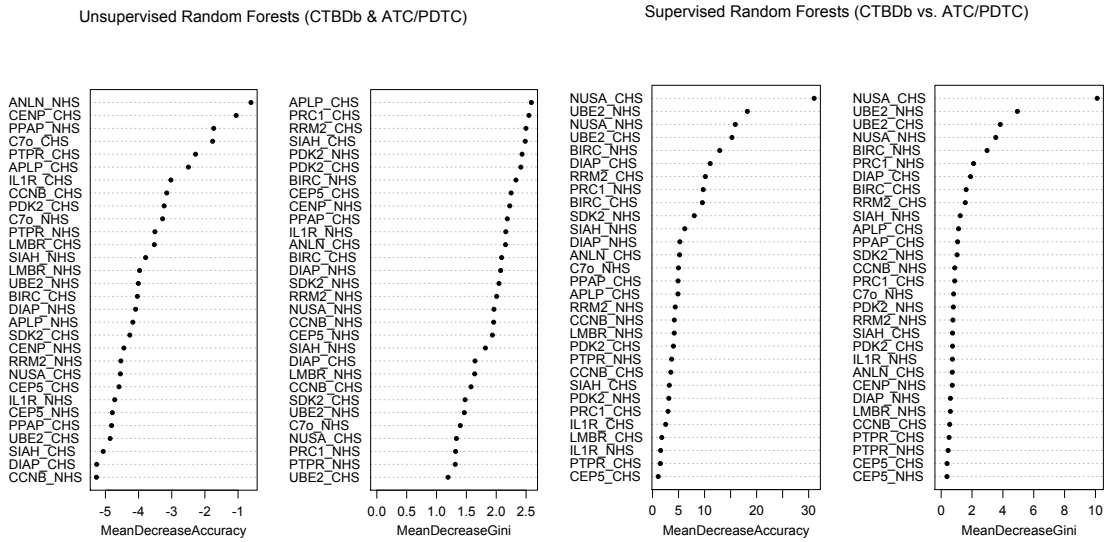


Figura 8.7 Análisis Random forest supervisado y no supervisado para identificar las proteínas que contribuyen a diferenciar entre carcinomas bien diferenciados y carcinomas pobremente o indiferenciados de tiroides.



**Tabla 8.5** Análisis comparativo de carcinomas papilares según pronóstico.

Proteína	Citoplasma						Núcleo										
	Buen Pronóstico			Mal Pronóstico			Buen Pronóstico			Mal Pronóstico			Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0			
	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3					
ANLN	108	22	3-123	67	58	3-167	0,0715	0,1584	1	108	0	0-0	67	0	0-0	0,7451	1
BIRC5	109	48	8-98	71	95	27-108	0,0096	0,1339	1	109	9	3-22	71	7	2-27	0,6905	0,7695
UBE2C	110	0	0-1	71	1	0-2	0,0004	0,0022	1	110	1	0-2	71	1	0-2	0,0467	0,1471
CENP-A	111	0	0-0	70	0	0-0	0,2121	0,3867	1	111	2	1-11	70	1	0-11	0,1139	0,5020
CCNB2	111	0	0-3	70	2	0-14	0,0263	0,2201	1	111	1	1-3	70	1	1-1	0,0098	1
PRC1	110	122	89-146	69	151	122-172	<,0001	0,5236	1	110	0	0-1	69	0	0-0	0,1744	0,1427
NUSAP1	111	0	0-0	70	0	0-0	0,4095	0,3076	1	111	2	0-5	70	1	1-2	0,0856	0,0304
ILIRN	111	0	0-0	70	0	0-2	0,0152	0,0172	1	111	2	1-5	70	2	1-3	0,118	0,5141
DIAPH3	110	0	0-4	71	1	0-8	0,0338	0,0075	1	110	3	1-6	71	2	1-4	0,1059	0,3706
RRM2	111	95	45-113	70	101	86-121	0,0147	1	111	3	0-11	70	1	0-4	0,0327	0,4115	
CEP55	109	100	83-104	71	100	89-106	0,5609	1	109	1	0-7	71	1	0-8	0,4555	0,2306	
SIAH1	111	94	58-111	70	106	100-115	0,0002	1	111	1	1-3	70	1	0-3	0,4216	0,1162	
LMBRD1	111	0	0-0	70	0	0-7	<,0001	0,0006	1	111	1	0-1	70	0	0-1	0,0098	0,0995
SDK2	111	0	0-5	71	0	0-8	0,7889	1	111	2	1-5	71	1	1-3	0,113	0,0572	
APLP2	111	117	101-144	71	115	106-150	0,2012	1	111	0	0-0	71	0	0-0	0,0264	0,0300	
PTPRN2	111	0	0-0	71	0	0-0	0,0286	0,0677	1	111	1	0-1	71	0	0-0	<,0001	0,0001
C7orf23	111	0	0-0	71	0	0-0	0,2631	0,4066	1	111	1	0-1	71	0	0-1	0,5827	0,6004
PKD2	108	109	102-170	71	128	103-171	0,1653	N/A	1	108	74	35-91	71	65	19-85	0,2453	0,6495
PPAP2B	111	35	3-140	67	113	13-153	0,0172	0,4864	1	111	0	0-0	67	0	0-0	0,7298	1

Tabla 8.6 Análisis comparativo de carcinomas foliculares según pronóstico.

Proteína	Citoplasma												Núcleo													
	Buen Pronóstico						Mal Pronóstico						Buen Pronóstico						Mal Pronóstico							
	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	N	Mdn	Q1-Q3	Fisher Test HSC>0	Mann-Whitney P	Fisher Test HSC>0		
ANLN	9	3	0-143	5	121	15-198	5	0	0-0	9	0	0-0	5	0	0-0	9	0	0-0	5	0	0-0	0,2281	0,2582	1	1,0000	
BIRC5	8	36	15-79	6	70	23-92	6	30	12-45	8	30	12-45	6	34	18-46	8	30	12-45	6	34	18-46	0,5728	1	0,9497	1	
UBE2C	9	0	0-0	6	3	2-3	6	0	0-1	9	0	0-1	6	3	2-4	9	0	0-1	6	3	2-4	0,0023	0,0070	0,0440	0,0026	
CENP-A	9	0	0-0	6	0	0-0	6	0	0-1	9	2	1-3	6	7	2-10	9	2	1-3	6	7	2-10	1,0000	1	1	0,1393	1
CCNB2	9	0	0-2	6	1	0-1	6	1	0-2	9	1	0-2	6	1	0-3	9	1	0-2	6	1	0-3	0,5762	0,6084	1	0,8127	1
PRC1	9	4	1-11	5	45	4-48	5	0	0-2	9	0	0-2	5	2	1-2	9	0	0-2	5	2	1-2	0,1469	1	0,2208	0,1206	0,2208
NUSAP1	9	0	0-19	6	0	0-0	6	0	0-0	9	1	1-1	6	1	1-2	9	1	1-1	6	1	1-2	0,4055	0,6044	1,0000	1,0000	1,0000
ILIRN	9	0	0-9	6	0	0-6	6	0	0-6	9	6	1-8	6	7	4-9	9	6	1-8	6	7	4-9	0,7396	0,6224	1	0,7671	1
DIAPH3	9	1	0-6	6	4	1-17	6	9	1-10	9	9	1-10	6	7	2-10	9	9	1-10	6	7	2-10	0,6770	1	0,9061	0,9061	1
RRM2	9	118	84-123	6	106	101-111	6	19	10-28	9	19	10-28	6	1	0-1	9	19	10-28	6	1	0-1	0,8135	1	0,0018	0,0018	0,1429
CEP55	9	3	0-24	6	107	102-110	6	1	1-1	9	1	1-1	6	1	0-1	9	1	1-1	6	1	0-1	0,0016	0,1033	1	0,5926	1
SIAH1	9	48	0-103	6	72	18-100	6	0	0-1	9	0	0-1	6	2	1-11	9	0	0-1	6	2	1-11	0,9527	0,2286	0,5804	0,2796	0,5804
LMBRD1	9	0	0-0	6	0	0-0	6	0	0-1	9	0	0-1	6	1	0-1	9	0	0-1	6	1	0-1	0,7053	1	0,7550	0,7550	1
SDK2	9	20	1-38	6	0	0-5	6	2	1-4	9	2	1-4	6	0	0-1	9	2	1-4	6	0	0-1	0,0776	0,1357	0,0069	0,0069	0,0110
APLP2	9	100	75-101	6	88	60-105	6	0	0-2	9	0	0-2	6	0	0-0	9	0	0-2	6	0	0-0	0,8133	1	0,0419	0,0419	0,044
PTPRN2	9	0	0-0	6	0	0-0	6	0	0-1	9	0	0-1	6	0	0-0	9	0	0-1	6	0	0-0	1,0000	1	0,8412	0,8412	1
C7orf23	9	0	0-0	6	0	0-0	6	0	0-0	9	0	0-0	6	1	0-2	9	0	0-0	6	1	0-2	1,0000	1	0,1675	0,1675	0,6084
PDK2	9	145	104-193	6	175	122-181	6	90	74-110	9	90	74-110	6	79	71-97	9	90	74-110	6	79	71-97	0,6889	N/A	0,6797	0,6797	1
PPA2B	9	44	2-164	5	111	1-169	5	0	0-0	9	0	0-0	5	0	0-0	9	0	0-0	5	0	0-0	0,8938	1	1,0000	1,0000	1

**Tabla 8.7** Análisis comparativo de carcinomas papilar variante no folicular según pronóstico.

Proteína	Citoplasma										Núcleo									
	Buen Pronóstico					Mal Pronóstico					Buen Pronóstico					Mal Pronóstico				
	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC > 0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC > 0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC > 0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC > 0
ANLN	81	42	9-150	0,5631	0,2814	59	114	3-168	<,0001	1	81	0	0-0	0,4015	1	59	0	0-0	0,4015	1
BIRC5	83	41	6-98	0,0017	0,1806	63	100	27-113	0,0017	0,1806	83	6	2-17	0,5545	1	63	7	2-24	0,5545	1
UBE2C	83	0	0-1	0,0425	0,1759	63	1	0-2	0,0425	0,1759	83	1	0-2	0,6859	1	63	1	0-2	0,6859	1
CENP-A	84	0	0-0	0,2501	0,4247	62	0	0-0	0,2501	0,4247	84	2	1-19	0,0239	0,2345	62	1	0-11	0,0239	0,2345
CCNB2	84	1	0-6	0,1163	0,6033	62	3	0-15	0,1163	0,6033	84	1	1-4	0,0053	1	62	1	1-1	0,0053	1
PRC1	83	133	112-151	<,0001	1	61	158	138-174	<,0001	1	83	0	0-1	0,2855	0,2815	61	0	0-0	0,2855	0,2815
NUSAP1	84	0	0-0	0,0149	0,0108	62	0	0-1	0,0149	0,0108	84	2	1-6	0,0055	0,0962	62	1	1-2	0,0055	0,0962
ILIRN	84	0	0-0	0,0968	0,1490	62	0	0-3	0,0968	0,1490	84	2	1-4	0,3632	0,3723	62	2	1-3	0,3632	0,3723
DIAPH3	83	0	0-6	0,0985	0,0135	63	1	0-8	0,0985	0,0135	83	3	1-7	0,0165	0,5153	63	2	1-4	0,0165	0,5153
RRM2	84	90	39-112	0,0033	1	62	102	89-125	0,0033	1	84	1	0-5	0,6129	1	62	1	0-4	0,6129	1
CEP55	82	101	95-105	0,4946	1	63	101	90-106	0,4946	1	82	1	0-6	1	0,5714	63	1	0-6	1	0,5714
SHAH1	84	101	68-113	0,0068	1	62	108	102-117	0,0068	1	84	1	1-3	0,1386	0,1095	62	1	1-3	0,1386	0,1095
LMBRD1	84	0	0-0	<,0001	0,0004	63	0	0-9	<,0001	0,0004	84	1	1-1	0,0142	0,1478	63	1	0-1	0,0142	0,1478
SDK2	84	0	0-8	0,6268	0,6188	63	0	0-8	0,6268	0,6188	84	2	0-4	0,5719	0,0041	63	1	1-4	0,5719	0,0041
APLP2	84	123	106-150	0,7202	1	63	116	109-153	0,7202	1	84	0	0-0	0,7553	1	63	0	0-0	0,7553	1
PTPRN2	84	0	0-0	0,0201	0,0548	63	0	0-0	0,0201	0,0548	84	1	0-1	<,0001	0,0001	63	0	0-0	<,0001	0,0001
C7orf23	84	0	0-0	0,3038	0,3923	63	0	0-0	0,3038	0,3923	84	1	0-1	0,4436	0,7112	63	0	0-1	0,4436	0,7112
PDK2	81	114	102-184	0,3932	N/A	63	134	104-175	0,3932	N/A	81	68	30-90	0,4033	0,6317	63	63	18-84	0,4033	0,6317
PPAP2B	84	54	6-147	0,1398	1	59	130	16-154	0,1398	1	84	0	0-0	0,8167	1	59	0	0-0	0,8167	1

Tabla 8.8 Análisis comparativo de carcinoma papilares variante folicular según pronóstico.

Proteína	Citoplasma										Núcleo									
	Buen Pronóstico					Mal Pronóstico					Buen Pronóstico					Mal Pronóstico				
	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0
ANLN	27	0	0-3	0,0051	0,0118	8	6	5-11	0,0051	0,0118	27	0	0-0	0,0769	0,2286	8	0	0-0	0,0769	0,2286
BIRC5	26	86	38-101	0,1736	1	8	66	29-79	0,1736	1	26	18	13-40	0,3715	1	8	11	5-41	0,3715	1
UBE2C	27	0	0-0	0,0001	0,0001	8	1	1-2	0,0001	0,0001	27	0	0-0	0,0016	0,0130	8	2	1-2	0,0016	0,0130
CENP-A	27	0	0-0	1,0000	1	8	0	0-0	1,0000	1	27	1	0-3	0,6220	0,5531	8	1	0-9	0,6220	0,5531
CCNB2	27	0	0-0	0,5194	0,6855	8	0	0-3	0,5194	0,6855	27	1	1-1	0,5936	1	8	1	0-1	0,5936	1
PRC1	27	60	17-104	0,9540	1	8	52	28-103	0,9540	1	27	0	0-1	0,4640	0,4307	8	0	0-0	0,4640	0,4307
NUSAP1	27	0	0-2	0,0451	0,1009	8	0	0-0	0,0451	0,1009	27	1	0-2	0,6748	1	8	1	0-2	0,6748	1
ILIRN	27	0	0-0	0,0820	0,1241	8	0	0-0	0,0820	0,1241	27	2	1-7	0,3343	1	8	2	1-3	0,3343	1
DIAPH3	27	0	0-2	0,6994	1	8	0	0-2	0,6994	1	27	1	1-3	0,4312	1	8	3	1-7	0,4312	1
RRM2	27	108	82-115	0,2799	1	8	89	79-97	0,2799	1	27	12	4-21	0,0274	0,117	8	1	0-5	0,0274	0,117
CEP55	27	69	19-97	0,2082	0,5531	8	91	80-102	0,2082	0,5531	27	1	0-7	0,0230	0,1539	8	9	3-33	0,0230	0,1539
SHAH1	27	66	26-94	0,2385	1	8	87	49-102	0,2385	1	27	1	0-2	0,6349	0,3460	8	2	0-5	0,6349	0,3460
LMBRD1	27	0	0-0	0,8322	1	7	0	0-0	0,8322	1	27	1	0-1	0,3267	1	7	0	0-1	0,3267	1
SDK2	27	1	0-2	0,3315	0,4236	8	0	0-1	0,3315	0,4236	27	2	1-7	0,0084	0,1170	8	1	0-1	0,0084	0,1170
APLP2	27	99	60-107	0,6094	1	8	100	85-105	0,6094	1	27	0	0-0	0,0692	0,0815	8	0	0-0	0,0692	0,0815
PTPRN2	27	0	0-0	0,3523	1	8	0	0-0	0,3523	1	27	0	0-1	0,6877	0,6906	8	0	0-0	0,6877	0,6906
C7orf23	27	0	0-0	0,6339	1	8	0	0-0	0,6339	1	27	1	0-1	0,7045	0,2994	8	1	0-1	0,7045	0,2994
PKD2	27	104	101-112	1,0000	N/A	8	106	98-118	1,0000	N/A	27	79	37-97	0,7384	1	8	77	45-86	0,7384	1
PPAP2B	27	6	2-13	0,3355	1	8	9	3-28	0,3355	1	27	0	0-0	1,0000	1	8	0	0-0	1,0000	1

**Tabla 8.9** Análisis comparativo de adenomas versus carcinomas foliculares.

Proteína	Citoplasma										Núcleo									
	Buen Pronóstico					Mal Pronóstico					Buen Pronóstico					Mal Pronóstico				
	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0	N	Mdn	Q1-Q3	Mann-Whitney p	Fisher Test HSC>0
ANLN	81	53	9-139	0,5743	0,0218	14	68	1-166	0,5743	0,0218	81	0	0-0	1,0000	14	0	0-0	1,0000	1,0000	
BIRC5	81	1	0-19	0,0003	0,0077	14	48	15-86	0,0003	0,0077	81	14	5-44	0,4784	14	34	13-48	0,4784	0,1474	
UBE2C	81	1	0-1	0,8899	0,1164	15	0	0-2	0,8899	0,1164	81	1	1-2	0,1843	15	1	0-2	0,1843	0,0549	
CENP-A	81	0	0-0	1,0000	1,0000	15	0	0-0	1,0000	1,0000	81	20	4-59	0,0003	15	3	1-7	0,0003	0,2895	
CCNB2	81	0	0-1	0,9295	0,5626	15	0	0-1	0,9295	0,5626	81	1	0-1	0,2260	15	1	0-3	0,2260	1	
PRC1	81	7	3-29	0,4687	0,2744	14	5	2-17	0,4687	0,2744	81	1	0-2	0,5066	14	1	0-2	0,5066	1	
NUSAP1	81	0	0-0	0,4854	0,7344	15	0	0-0	0,4854	0,7344	81	3	1-5	0,0131	15	1	1-1	0,0131	0,1451	
IL1RN	81	0	0-0	0,0339	0,0881	15	0	0-9	0,0339	0,0881	81	0	0-1	<,0001	15	6	2-9	<,0001	0,0161	
DIAPH3	81	0	0-7	0,2660	0,1687	15	2	0-7	0,2660	0,1687	81	4	2-10	0,9316	15	9	1-11	0,9316	0,2895	
RRM2	81	75	15-110	0,0121	1	15	109	87-122	0,0121	1	81	1	0-2	0,0074	15	6	1-19	0,0074	0,7297	
CEP55	81	53	8-94	0,6164	0,4594	15	65	1-103	0,6164	0,4594	81	1	0-3	0,3099	15	1	0-1	0,3099	0,7297	
SIAH1	81	70	33-100	0,4924	0,1451	15	48	8-100	0,4924	0,1451	81	4	1-11	0,0047	15	1	0-4	0,0047	0,0003	
LMBRD1	81	0	0-0	0,7300	1	15	0	0-0	0,7300	1	81	1	1-2	0,0014	15	0	0-1	0,0014	0,0067	
SDK2	81	0	0-3	0,1051	0,5811	15	1	0-21	0,1051	0,5811	81	1	1-4	0,2859	15	1	0-2	0,2859	0,0106	
APLP2	80	104	100-109	0,0256	1	15	91	63-105	0,0256	1	81	2	1-8	0,0003	15	0	0-0	0,0003	0,0001	
PTPRN2	81	0	0-0	0,3322	1	15	0	0-0	0,3322	1	81	0	0-0	0,9383	15	0	0-1	0,9383	0,7796	
C7orf23	81	0	0-1	0,0204	0,0184	15	0	0-0	0,0204	0,0184	81	0	0-1	0,3928	15	0	0-1	0,3928	0,7756	
PDK2	81	113	104-156	0,1142	N/A	15	166	104-188	0,1142	N/A	81	97	55-150	0,4768	15	84	71-106	0,4768	1	
PPP2B	81	50	11-155	0,7093	1,0000	14	78	1-168	0,7093	1,0000	81	0	0-0	1,0000	14	0	0-0	1,0000	1	



**Tabla 8.10** Análisis comparativo de carcinomas pobremente o indiferenciados versus carcinomas bien diferenciados de tiroides.

Proteína	Citoplasma												Núcleo																				
	Buen Pronóstico				Mal Pronóstico				Mann-Whitney p				Fisher Test HSC > 0				Buen Pronóstico				Mal Pronóstico				Mann-Whitney p				Fisher Test HSC > 0				
	N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		N	Mdn	Q1-Q3		
ANLN	117	21	1-123	34	7	1-77		0,1623		0,5977		117	0	0-0		34	0	0-0		0,6008		1											
BRC5	117	47	8-98	35	7	0-47		0,0002		0,0009		117	10	3-25		35	0	0-4		<,0001		<,0001											
UBE2C	119	0	0-1	33	4	0-9		<,0001		0,0054		119	1	0-2		33	5	2-11		<,0001		0,0646											
CENP-A	120	0	0-0	35	0	0-0		0,0663		0,2258		120	2	1-10		35	1	0-9		0,2059		0,2598											
CCNB2	120	0	0-3	35	1	0-15		0,2669		0,7019		120	1	1-3		35	1	0-6		0,6431		0,2345											
PRC1	119	118	61-146	35	115	100-129		0,8886		1		119	0	0-1		35	1	0-7		0,0121		0,2415											
NUSAP1	120	0	0-0	35	100	2-117		<,0001		<,0001		120	2	0-5		35	7	3-43		<,0001		1											
ILIRN	120	0	0-0	35	0	0-0		0,4999		0,6419		120	2	1-5		35	1	1-4		0,5698		0,4111											
DIAPH3	119	0	0-4	35	3	0-50		0,0042		0,1209		119	3	1-7		35	1	0-4		0,011		0,0677											
RRM2	120	95	45-114	34	116	101-130		0,0005		0,5295		120	3	0-13		34	3	1-8		0,993		0,3693											
CEP55	118	100	70-104	35	100	91-105		0,5838		0,3523		118	1	0-6		35	1	0-9		0,6431		1											
SAH1	120	93	52-111	35	100	65-114		0,5706		0,618		120	1	1-3		35	0	0-2		0,0237		0,0002											
LMBRD1	120	0	0-0	35	0	0-0		0,3736		0,2888		120	1	0-1		35	1	0-2		0,6367		0,3061											
SDK2	120	0	0-7	35	0	0-4		0,3382		0,2493		120	2	1-5		35	1	0-3		0,0291		0,3311											
APLP2	120	112	100-141	35	102	40-112		0,0012		0,0499		120	0	0-0		35	0	0-0		0,2407		0,3671											
PTPRN2	120	0	0-0	35	0	0-1		0,0028		0,0086		120	1	0-1		35	0	0-1		0,1453		0,0512											
C7orf23	120	0	0-0	35	0	0-0		0,6947		0,6561		120	1	0-1		35	0	0-1		0,3634		0,6763											
PDK2	117	110	102-170	34	108	99-124		0,1902		N/A		117	75	36-93		34	81	40-104		0,2222		1											
PPAP2B	120	35	3-140	35	3	0-37		0,0007		0,0062		120	0	0-0		35	0	0-0		0,5998		1											

**Tabla 8.11** miRNAs diferencialmente expresados en adenomas foliculares respecto al tejido normal.

miRNAs	Media	TN	AF	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-151b	4281.158	2620.444	5775.8	1.1402093	5.891830	3.819412e-09	1.072092e-06
>hsa-mir-197	3633.368	5223.889	2201.9	-1.2463753	5.843596	5.108590e-09	1.072092e-06
>hsa-mir-218-1	136.895	217.667	64.2	-1.7614753	5.824362	5.733114e-09	1.072092e-06
>hsa-mir-200c	11209.737	6055.222	15848.8	1.3881218	5.752120	8.813136e-09	1.236042e-06
>hsa-mir-941-1	1173.474	691.556	1607.2	1.2166324	5.693621	1.243727e-08	1.395462e-06
>hsa-mir-377	5.737	9.444	2.4	-1.9764315	5.371062	7.827408e-08	7.318627e-06
>hsa-mir-134	19.474	31.556	8.6	-1.8754855	5.264181	1.408156e-07	1.128537e-05
>hsa-mir-128-2	400.316	576.333	241.9	-1.2524927	5.229735	1.697533e-07	1.190395e-05
>hsa-mir-1301	326.316	136.889	496.8	1.8596598	5.180211	2.216351e-07	1.381526e-05
>hsa-mir-500b	16.632	7.222	25.1	1.7971726	5.042265	4.600527e-07	2.043792e-05
>hsa-mir-941-2	2329.842	1367.111	3196.3	1.2252723	5.037594	4.714210e-07	2.043792e-05
>hsa-mir-941-3	2329.842	1367.111	3196.3	1.2252723	5.037594	4.714210e-07	2.043792e-05
>hsa-mir-941-4	2329.737	1367.111	3196.1	1.2251820	5.036708	4.736060e-07	2.043792e-05
>hsa-mir-128-1	443.474	612.222	291.6	-1.0700647	4.922417	8.548188e-07	3.425381e-05
>hsa-mir-320b-1	1500.579	2010.222	1041.9	-0.9481382	4.894852	9.837976e-07	3.679403e-05
>hsa-mir-320b-2	1506.789	2014.111	1050.2	-0.9394792	4.851908	1.222796e-06	4.287428e-05
>hsa-mir-326	113.579	150.222	80.6	-0.8982465	4.711751	2.455971e-06	8.104705e-05
>hsa-mir-101-2	3061.053	4120.444	2107.6	-0.9671989	4.607975	4.066103e-06	1.267269e-04
>hsa-mir-101-1	3068.842	4128.556	2115.1	-0.9649112	4.585285	4.533682e-06	1.338629e-04
>hsa-mir-320c-1	453.000	613.667	308.4	-0.9926525	4.553117	5.285674e-06	1.482631e-04
>hsa-mir-3934	11.158	15.889	6.9	-1.2033500	4.422569	9.753405e-06	2.605552e-04
>hsa-mir-943	2.737	1.000	4.3	2.1043367	4.269672	1.957602e-05	4.991885e-04
>hsa-mir-19b-1	249.789	329.444	178.1	-0.8873477	4.224725	2.392327e-05	5.004579e-04
>hsa-mir-19b-2	249.789	329.444	178.1	-0.8873477	4.224725	2.392327e-05	5.004579e-04
>hsa-mir-6511a-1	114.211	152.667	79.6	-0.9395448	4.214996	2.497829e-05	5.004579e-04
>hsa-mir-6511a-2	114.211	152.667	79.6	-0.9395448	4.214996	2.497829e-05	5.004579e-04
>hsa-mir-6511a-3	114.211	152.667	79.6	-0.9395448	4.214996	2.497829e-05	5.004579e-04
>hsa-mir-6511a-4	114.211	152.667	79.6	-0.9395448	4.214996	2.497829e-05	5.004579e-04
>hsa-mir-1271	35.526	17.000	52.2	1.6185151	4.205345	2.606836e-05	5.042880e-04
>hsa-mir-320c-2	397.842	545.778	264.7	-1.0439555	4.070444	4.692358e-05	8.774710e-04
>hsa-mir-365b	93.789	127.444	63.5	-1.0050400	4.035984	5.437401e-05	9.199014e-04
>hsa-mir-3173	4.105	6.556	1.9	-1.7867186	4.031375	5.545156e-05	9.199014e-04
>hsa-mir-151a	12472.158	9254.778	15367.8	0.7316404	4.029880	5.580544e-05	9.199014e-04
>hsa-mir-1291	44.474	19.556	66.9	1.7744277	4.028461	5.614328e-05	9.199014e-04
>hsa-mir-485	18.053	29.111	8.1	-1.8455761	4.023288	5.739135e-05	9.199014e-04
>hsa-mir-491	15.421	8.778	21.4	1.2856831	4.007906	6.125945e-05	9.546264e-04
>hsa-mir-365a	83.947	118.778	52.6	-1.1751302	3.965872	7.312796e-05	1.108778e-03
>hsa-mir-182	4062.368	1795.000	6103.0	1.7655347	3.942712	8.056542e-05	1.172614e-03
>hsa-mir-143	50944.053	64337.778	38889.7	-0.7262780	3.939891	8.151860e-05	1.172614e-03
>hsa-mir-502	314.526	139.444	472.1	1.7594020	3.890629	9.998478e-05	1.374203e-03
>hsa-mir-199a-1	2215.632	3167.111	1359.3	-1.2203036	3.883816	1.028299e-04	1.374203e-03
>hsa-mir-199a-2	2216.263	3168.111	1359.6	-1.2204407	3.883694	1.028815e-04	1.374203e-03
>hsa-mir-576	8.737	12.222	5.6	-1.1260079	3.863576	1.117392e-04	1.457806e-03
>hsa-mir-34c	36.895	59.778	16.3	-1.8747373	3.853523	1.164303e-04	1.484486e-03
>hsa-mir-409	129.474	199.556	66.4	-1.5875353	3.767656	1.647875e-04	2.054351e-03
>hsa-mir-4433	8.842	15.889	2.5	-2.6680182	3.758292	1.710769e-04	2.086394e-03
>hsa-mir-18a	26.947	36.000	18.8	-0.9372642	3.737905	1.855600e-04	2.214875e-03
>hsa-mir-3120	727.579	1012.222	471.4	-1.1025024	3.723862	1.961983e-04	2.243377e-03
>hsa-mir-214	727.789	1012.444	471.6	-1.1022071	3.721997	1.976535e-04	2.243377e-03
>hsa-mir-301a	149.632	92.222	201.3	1.1261608	3.719087	1.999445e-04	2.243377e-03
>hsa-mir-99b	38730.526	18683.556	56772.8	1.6034309	3.699566	2.159681e-04	2.375649e-03
>hsa-mir-92a-2	142004.526	172485.889	114571.3	-0.5902326	3.662835	2.494389e-04	2.691062e-03
>hsa-mir-501	1102.842	542.000	1607.6	1.5685437	3.645341	2.670378e-04	2.782178e-03
>hsa-mir-1268b	39.789	18.778	58.7	1.6443342	3.608293	3.082183e-04	3.143826e-03
>hsa-mir-33b	10.895	6.111	15.2	1.3145647	3.571212	3.553336e-04	3.559682e-03
>hsa-mir-136	21.737	35.333	9.5	-1.8950304	3.517902	4.349728e-04	4.281048e-03
>hsa-mir-483	42.421	74.667	13.4	-2.4782313	3.504803	4.569450e-04	4.419761e-03
>hsa-mir-34b	6.947	11.111	3.2	-1.7958593	3.486060	4.901911e-04	4.660970e-03
>hsa-mir-423	34224.842	43369.000	25995.1	-0.7384245	3.476142	5.086823e-04	4.678568e-03
>hsa-mir-3184	34224.789	43368.889	25995.1	-0.7384208	3.476122	5.087213e-04	4.678568e-03
>hsa-mir-19a	34.737	47.667	23.1	-1.0450879	3.462227	5.357244e-04	4.847441e-03
>hsa-mir-455	145.842	203.889	93.6	-1.1232027	3.441325	5.788730e-04	5.154726e-03
>hsa-mir-199b	2097.474	3012.111	1274.3	-1.2410700	3.403474	6.653484e-04	5.832195e-03
>hsa-mir-1249	51.789	73.000	32.7	-1.1586058	3.381334	7.213489e-04	6.216349e-03
>hsa-mir-4532	175.105	128.667	216.9	0.7533917	3.377150	7.324115e-04	6.216349e-03
>hsa-mir-411	38.263	55.444	22.8	-1.2820091	3.373416	7.424160e-04	6.216349e-03
>hsa-mir-330	82.263	63.000	99.6	0.6607939	3.328409	8.734368e-04	7.205853e-03
>hsa-mir-511-1	4.947	7.222	2.9	-1.3163899	3.307419	9.415995e-04	7.546247e-03
>hsa-mir-511-2	4.947	7.222	2.9	-1.3163899	3.307419	9.415995e-04	7.546247e-03
>hsa-mir-1343	22.789	11.556	32.9	1.5095010	3.297618	9.750865e-04	7.704557e-03
>hsa-mir-22	48458.579	36527.667	59196.4	0.6965198	3.273800	1.061116e-03	8.267862e-03
>hsa-mir-30e	6228.474	4733.444	7574.0	0.6781650	3.232363	1.227712e-03	9.196203e-03
>hsa-mir-3622a	22.684	31.778	14.5	-1.1319653	3.231961	1.229439e-03	9.196203e-03
>hsa-mir-3622b	22.684	31.778	14.5	-1.1319653	3.231961	1.229439e-03	9.196203e-03
>hsa-mir-185	120.053	75.667	160.0	1.0803421	3.226046	1.255133e-03	9.264861e-03
>hsa-mir-218-2	59.105	75.667	44.2	-0.7756115	3.210715	1.324051e-03	9.646657e-03
>hsa-mir-3653	152.684	100.333	199.8	0.9937556	3.201834	1.365559e-03	9.821517e-03
>hsa-mir-3199-1	3.263	5.222	1.5	-1.7997013	3.170005	1.524361e-03	1.082489e-02
>hsa-mir-224	92.579	65.667	116.8	0.8308071	3.139831	1.690454e-03	1.164345e-02

>hsa-mir-1247	191.053	288.778	103.1	-1.4859154	3.139769	1.690813e-03	1.164345e-02
>hsa-mir-96	85.737	19.333	145.5	2.9118568	3.137854	1.701895e-03	1.164345e-02
>hsa-mir-1268a	38.474	20.000	55.1	1.4620523	3.125529	1.774854e-03	1.199630e-02
>hsa-mir-4732	42.211	64.000	22.6	-1.5017491	3.119766	1.809945e-03	1.208785e-02
>hsa-mir-190a	66.158	44.556	85.6	0.9420055	3.100430	1.932402e-03	1.275385e-02
>hsa-mir-362	40.737	9.778	68.6	2.8106301	3.090826	1.996004e-03	1.302045e-02
>hsa-mir-500a	1365.211	789.444	1883.4	1.2544298	3.085837	2.029800e-03	1.308871e-02
>hsa-mir-193b	411.211	623.333	220.3	-1.5005344	3.069384	2.145005e-03	1.367441e-02
>hsa-mir-223	63.526	93.444	36.6	-1.3522652	3.035555	2.400937e-03	1.500337e-02
>hsa-mir-641	7.316	4.889	9.5	0.9584209	3.034799	2.406958e-03	1.500337e-02
>hsa-mir-1251	35.158	16.333	52.1	1.6734641	3.028807	2.455217e-03	1.513601e-02
>hsa-mir-135a-1	716.000	478.444	929.8	0.9585690	3.016946	2.553356e-03	1.536571e-02
>hsa-mir-548c	4.474	6.222	2.9	-1.1013770	3.014428	2.574646e-03	1.536571e-02
>hsa-mir-548z	4.474	6.222	2.9	-1.1013770	3.014428	2.574646e-03	1.536571e-02
>hsa-mir-3200	25.158	17.333	32.2	0.8935116	2.989435	2.794940e-03	1.633467e-02
>hsa-mir-381	28.316	40.222	17.6	-1.1924174	2.975903	2.921269e-03	1.689518e-02
>hsa-mir-4516	12.368	22.333	3.4	-2.7155919	2.946813	3.210676e-03	1.780876e-02
>hsa-mir-1307	786.211	584.778	967.5	0.7263732	2.946596	3.212923e-03	1.780876e-02
>hsa-mir-184	3.947	7.889	0.4	-4.3017502	2.942868	3.251869e-03	1.780876e-02
>hsa-mir-766	32.737	48.222	18.8	-1.3589655	2.942830	3.252271e-03	1.780876e-02
>hsa-mir-484	1480.632	1079.778	1841.4	0.7700686	2.941175	3.269700e-03	1.780876e-02
>hsa-mir-191	15959.684	12586.222	18995.8	0.5938352	2.933507	3.351565e-03	1.807911e-02
>hsa-mir-4448	8.474	15.667	2.0	-2.9696264	2.883157	3.937109e-03	2.103541e-02
>hsa-mir-4459	83.316	144.222	28.5	-2.3392597	2.859850	4.238410e-03	2.211822e-02
>hsa-mir-4485	208.368	94.000	311.3	1.7275729	2.859653	4.241044e-03	2.211822e-02
>hsa-mir-133b	21.842	31.778	12.9	-1.3006472	2.858384	4.258053e-03	2.211822e-02
>hsa-mir-494	2.316	4.222	0.6	-2.8149681	2.852305	4.340345e-03	2.232253e-02
>hsa-mir-20a	421.053	209.333	611.6	1.5467863	2.849633	4.376967e-03	2.232253e-02
>hsa-mir-4707	3.526	5.444	1.8	-1.5967879	2.837249	4.550415e-03	2.299804e-02
>hsa-mir-219-1	11.158	15.111	7.6	-0.9915384	2.808833	4.972136e-03	2.457291e-02
>hsa-mir-429	235.579	320.556	159.1	-1.0106406	2.806470	5.008759e-03	2.457291e-02
>hsa-mir-1296	140.316	102.333	174.5	0.7699509	2.806357	5.010518e-03	2.457291e-02
>hsa-mir-34a	1415.895	280.667	2437.6	3.1185318	2.804643	5.037227e-03	2.457291e-02
>hsa-mir-454	154.526	109.333	195.2	0.8362197	2.778551	5.460197e-03	2.618862e-02
>hsa-mir-4775	1.421	0.667	2.1	1.6553518	2.778456	5.461798e-03	2.618862e-02
>hsa-mir-17	271.368	193.444	341.5	0.8199663	2.732053	6.294099e-03	2.992364e-02
>hsa-mir-196a-2	9.895	1.556	17.4	3.4835855	2.688303	7.181611e-03	3.329656e-02
>hsa-mir-654	33.947	45.444	23.6	-0.9453171	2.661673	7.775343e-03	3.546524e-02
>hsa-mir-149	228.474	156.111	293.6	0.9112787	2.661653	7.775801e-03	3.546524e-02
>hsa-mir-196a-1	9.000	1.556	15.7	3.3352627	2.644546	8.180060e-03	3.700817e-02
>hsa-mir-188	13.421	6.556	19.6	1.5800637	2.624646	8.673919e-03	3.802355e-02
>hsa-mir-5701-1	301.947	223.556	372.5	0.7366070	2.624579	8.675605e-03	3.802355e-02
>hsa-mir-5701-2	301.947	223.556	372.5	0.7366070	2.624579	8.675605e-03	3.802355e-02
>hsa-mir-4640	6.842	8.778	5.1	-0.7833585	2.620118	8.789930e-03	3.822597e-02
>hsa-mir-874	1616.421	658.333	2478.7	1.9126935	2.609820	9.058984e-03	3.909300e-02
>hsa-mir-183	1665.895	320.111	2877.1	3.1679707	2.604384	9.203963e-03	3.941544e-02
>hsa-mir-4443	19.737	11.556	27.1	1.2297062	2.599677	9.331144e-03	3.965736e-02
>hsa-mir-765	2.947	1.889	3.9	1.0459363	2.593515	9.500045e-03	3.993956e-02
>hsa-mir-598	97.895	53.778	137.6	1.3553984	2.588698	9.633944e-03	3.993956e-02
>hsa-mir-504	101.105	139.889	66.2	-1.0793783	2.588282	9.645591e-03	3.993956e-02
>hsa-mir-1914	2.474	1.000	3.8	1.9259994	2.586973	9.682318e-03	3.993956e-02
>hsa-mir-3928	6.526	8.111	5.1	-0.6694023	2.558303	1.051845e-02	4.307191e-02
>hsa-mir-127	1911.263	2589.111	1301.2	-0.9926142	2.551621	1.072232e-02	4.358857e-02
>hsa-mir-3609	156.474	273.000	51.6	-2.4034580	2.515179	1.189718e-02	4.801668e-02

**Tabla 8.12** miRNAs diferencialmente expresados en carcinomas papilares de variante no folicular respecto al tejido normal.

miRNAs	Media	TN	PTC	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-197	2559.659	4398.222	2086.886	-1.0755689	8.443362	3.083390e-17	1.893202e-14
>hsa-mir-222	16256.136	1800.333	19973.343	3.4717399	7.210022	5.594266e-13	1.717440e-10
>hsa-mir-532	592.045	833.778	529.886	-0.6539817	6.998088	2.594785e-12	5.310659e-10
>hsa-mir-221	24586.455	1973.333	30401.257	3.9454244	6.946924	3.733361e-12	5.730709e-10
>hsa-mir-21	16907.523	4930.333	19987.371	2.0193317	6.880977	5.944336e-12	7.299644e-10
>hsa-mir-320b-1	1012.659	1701.000	835.657	-1.0254001	6.787600	1.140146e-11	1.166749e-09
>hsa-mir-320b-2	1017.159	1704.222	840.486	-1.0198183	6.742275	1.559254e-11	1.367688e-09
>hsa-mir-143	29118.023	54314.000	22639.057	-1.2625102	6.663355	2.676467e-11	2.054189e-09
>hsa-mir-320c-1	303.159	518.333	247.829	-1.0645377	6.414259	1.415091e-10	9.654064e-09
>hsa-mir-4532	259.727	106.444	299.143	1.4907340	6.307415	2.837336e-10	1.742124e-08
>hsa-mir-146b	73568.705	2398.333	91869.657	5.2594844	6.202579	5.554511e-10	3.100427e-08
>hsa-mir-1291	37.818	16.222	43.371	1.4187735	6.049443	1.453476e-09	7.436950e-08
>hsa-mir-320c-2	266.909	460.667	217.086	-1.0854584	5.986642	2.142172e-09	1.011764e-07
>hsa-mir-101-2	2549.705	3473.222	2312.229	-0.5869907	5.952098	2.647274e-09	1.161019e-07
>hsa-mir-181a-2	253210.795	140334.333	282236.171	1.0080349	5.655273	1.555985e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-29a	4984.841	2922.222	5515.229	0.9163548	5.652209	1.583987e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-181a-1	252027.409	139821.889	280880.257	1.0063650	5.640832	1.692304e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-6511a-1	77.727	128.889	64.571	-0.9971600	5.612558	1.993578e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-6511a-2	77.727	128.889	64.571	-0.9971600	5.612558	1.993578e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-6511a-3	77.727	128.889	64.571	-0.9971600	5.612558	1.993578e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-6511a-4	77.727	128.889	64.571	-0.9971600	5.612558	1.993578e-08	5.563894e-07
>hsa-mir-128-1	294.205	521.667	235.714	-1.1460891	5.430981	5.604510e-08	1.496161e-06
>hsa-mir-128-2	272.091	491.000	215.800	-1.1860282	5.400294	6.653161e-08	1.702100e-06
>hsa-mir-34a	1227.864	236.556	1482.771	2.6480453	5.244097	1.570496e-07	3.857138e-06
>hsa-mir-28	4040.523	5992.111	3538.686	-0.7598507	5.219286	1.796146e-07	3.974240e-06
>hsa-mir-3184	22831.795	36810.222	19237.343	-0.9361969	5.217700	1.811586e-07	3.974240e-06
>hsa-mir-423	22831.864	36810.444	19237.371	-0.9362035	5.217621	1.812357e-07	3.974240e-06
>hsa-mir-365b	69.205	107.111	59.457	-0.8491861	5.164276	2.413712e-07	5.110411e-06
>hsa-mir-375	5021.773	918.000	6077.029	2.7268000	5.139078	2.760893e-07	5.650629e-06
>hsa-mir-659	5.227	2.444	5.943	1.2816501	5.034090	4.801250e-07	9.509574e-06
>hsa-mir-504	59.273	118.889	43.943	-1.4359133	4.961375	6.999582e-07	1.343054e-05
>hsa-mir-3127	12.205	20.556	10.057	-1.0313079	4.952401	7.330342e-07	1.363888e-05
>hsa-mir-548ad	4.227	7.778	3.314	-1.2306600	4.931880	8.144212e-07	1.420576e-05
>hsa-mir-181b-2	346.136	187.667	386.886	1.0437350	4.927643	8.322741e-07	1.420576e-05
>hsa-mir-5701-1	346.159	187.667	386.914	1.0438416	4.927494	8.329111e-07	1.420576e-05
>hsa-mir-33b	13.045	5.111	15.086	1.5614741	4.840497	1.295150e-06	2.149249e-05
>hsa-mir-126	4778.455	7392.889	4106.171	-0.8483444	4.759367	1.942015e-06	3.137888e-05
>hsa-mir-3613	12.500	7.333	13.829	0.9151111	4.745356	2.081399e-06	3.276869e-05
>hsa-mir-584	80.432	137.667	65.714	-1.0669003	4.688232	2.755750e-06	4.230077e-05
>hsa-mir-181b-2	18265.568	11451.222	20017.829	0.8057839	4.663039	3.115730e-06	4.639582e-05
>hsa-mir-1268b	38.682	15.889	44.543	1.4871759	4.659249	3.173656e-06	4.639582e-05
>hsa-mir-181b-1	18152.614	11396.778	19889.829	0.8034049	4.640669	3.472836e-06	4.905053e-05
>hsa-let-7i	31788.727	18132.444	35300.343	0.9611088	4.638024	3.517565e-06	4.905053e-05
>hsa-mir-183	608.568	272.556	694.971	1.3504033	4.633525	3.594909e-06	4.905053e-05
>hsa-mir-33a	3.614	1.556	4.143	1.4131962	4.510835	6.457284e-06	8.619071e-05
>hsa-mir-195	238.364	338.889	212.514	-0.6732525	4.475628	7.618708e-06	9.952951e-05
>hsa-mir-139	192.318	317.111	160.229	-0.9848570	4.466676	7.944435e-06	1.016226e-04
>hsa-mir-6511b-1	61.114	88.111	54.171	-0.7017918	4.440882	8.959080e-06	1.122628e-04
>hsa-mir-4732	17.250	53.333	7.971	-2.7421273	4.427857	9.517378e-06	1.168734e-04
>hsa-mir-26b	6502.273	8893.778	5887.314	-0.5951867	4.415312	1.008645e-05	1.169172e-04
>hsa-mir-548aa-2	4.727	8.444	3.771	-1.1628914	4.415189	1.009220e-05	1.169172e-04
>hsa-mir-548d-2	4.727	8.444	3.771	-1.1628914	4.415189	1.009220e-05	1.169172e-04
>hsa-mir-4709	17.386	5.111	20.543	2.0069280	4.410213	1.032689e-05	1.174206e-04
>hsa-mir-4454	11.091	4.667	12.743	1.4492245	4.390582	1.130476e-05	1.260436e-04
>hsa-mir-424	110.432	56.222	124.371	1.1454427	4.386937	1.149583e-05	1.260436e-04
>hsa-mir-450a-1	61.000	21.444	71.171	1.7306943	4.372465	1.228515e-05	1.307898e-04
>hsa-mir-200c	8691.000	5172.667	9595.714	0.8914820	4.371232	1.235474e-05	1.307898e-04
>hsa-mir-3653	161.091	84.778	180.714	1.0919525	4.365052	1.270928e-05	1.322626e-04
>hsa-mir-15a	449.727	315.000	484.371	0.6207619	4.339095	1.430704e-05	1.454854e-04
>hsa-mir-4443	30.659	9.889	36.000	1.8641166	4.301268	1.698233e-05	1.681799e-04
>hsa-mir-450a-2	64.205	23.333	74.714	1.6789917	4.293178	1.761340e-05	1.716607e-04
>hsa-mir-3173	3.318	5.778	2.686	-1.1052089	4.272830	1.930077e-05	1.851668e-04
>hsa-mir-31	3201.318	385.556	3925.371	3.3478185	4.233428	2.301556e-05	2.161889e-04
>hsa-mir-551b	19.205	0.778	23.943	4.9440935	4.212143	2.529598e-05	2.284078e-04
>hsa-mir-320a	11709.841	16838.000	10391.171	-0.6963625	4.201138	2.655770e-05	2.363250e-04
>hsa-mir-192	788.341	1117.667	703.657	-0.6675454	4.196894	2.706005e-05	2.373553e-04
>hsa-mir-509-3	33.955	10.667	39.943	1.9048281	4.189143	2.800101e-05	2.421496e-04
>hsa-mir-509-1	33.136	10.556	38.943	1.8833562	4.180995	2.902367e-05	2.441169e-04
>hsa-mir-509-2	33.136	10.556	38.943	1.8833562	4.180995	2.902367e-05	2.441169e-04
>hsa-mir-19a	26.795	39.889	23.429	-0.7677179	4.159715	3.186454e-05	2.643895e-04
>hsa-mir-1268a	36.545	16.667	41.657	1.3215983	4.153498	3.274311e-05	2.653721e-04
>hsa-mir-151b	3873.909	2235.222	4295.286	0.9423358	4.152771	3.284737e-05	2.653721e-04
>hsa-mir-145	1664.773	2510.778	1447.229	-0.7948415	4.146910	3.369922e-05	2.687184e-04
>hsa-mir-182	2431.750	1514.556	2667.600	0.8166479	4.092413	4.269077e-05	3.360530e-04
>hsa-mir-362	19.795	8.333	22.743	1.4484479	4.064244	4.818844e-05	3.745279e-04
>hsa-mir-576	6.136	10.111	5.114	-0.9833369	4.058086	4.947664e-05	3.797332e-04
>hsa-mir-548aa-1	4.818	8.222	3.943	-1.0602869	4.046820	5.191808e-05	3.887525e-04
>hsa-mir-548d-1	4.818	8.222	3.943	-1.0602869	4.046820	5.191808e-05	3.887525e-04
>hsa-mir-29b-1	157.705	101.556	172.143	0.7613372	4.015849	5.923229e-05	4.381762e-04
>hsa-mir-18a	21.045	30.111	18.714	-0.6861560	4.005086	6.199479e-05	4.531524e-04
>hsa-mir-548ae-2	3.205	6.222	2.429	-1.3573220	3.992087	6.549445e-05	4.731011e-04
>hsa-mir-508	9.568	2.556	11.371	2.1537046	3.917893	8.932650e-05	6.377497e-04

>hsa-mir-365a	64.614	99.778	55.571	-0.8443752	3.871550	1.081453e-04	7.632320e-04
>hsa-mir-486	107236.386	292358.111	59633.657	-2.2935379	3.847552	1.193038e-04	8.324152e-04
>hsa-mir-1301	214.295	116.333	239.486	1.0416751	3.800438	1.444408e-04	9.964795e-04
>hsa-mir-4791	3.955	0.444	4.857	3.4500329	3.781731	1.557419e-04	1.056175e-03
>hsa-mir-500b	11.432	5.889	12.857	1.1265027	3.780468	1.565341e-04	1.056175e-03
>hsa-mir-135b	99.136	58.222	109.657	0.9133580	3.712282	2.053987e-04	1.356073e-03
>hsa-mir-548t	3.818	6.889	3.029	-1.1856339	3.682561	2.309023e-04	1.508234e-03
>hsa-mir-125b-2	31904.636	13399.333	36663.143	1.4521692	3.590807	3.296553e-04	2.108420e-03
>hsa-mir-152	487.795	821.444	402.000	-1.0309675	3.582677	3.400915e-04	2.152744e-03
>hsa-mir-513c	1.750	0.222	2.143	3.2694607	3.573370	3.524165e-04	2.207997e-03
>hsa-mir-491	11.318	7.333	12.343	0.7511354	3.568292	3.593166e-04	2.228489e-03
>hsa-mir-125a	34428.250	21577.333	37732.771	0.8063015	3.563145	3.664388e-04	2.249934e-03
>hsa-mir-125b-1	30791.364	12361.778	35530.400	1.5231677	3.554334	3.789380e-04	2.303643e-03
>hsa-mir-548ay	4.318	7.222	3.571	-1.0159415	3.551640	3.828376e-04	2.304532e-03
>hsa-mir-3168	9.909	0.889	12.229	3.7821090	3.541318	3.981330e-04	2.373337e-03
>hsa-mir-29b-2	172.591	119.778	186.171	0.6362714	3.530075	4.154422e-04	2.452707e-03
>hsa-mir-873	38.500	91.444	24.886	-1.8775777	3.501741	4.622293e-04	2.684809e-03
>hsa-mir-1287	11.455	18.778	9.571	-0.9722202	3.501008	4.635013e-04	2.684809e-03
>hsa-mir-96	35.886	16.111	40.971	1.3465622	3.495223	4.736664e-04	2.718048e-03
>hsa-mir-1226	16.864	9.222	18.829	1.0297372	3.481482	4.986479e-04	2.815091e-03
>hsa-mir-320d-1	49.045	69.111	43.886	-0.6551663	3.478445	5.043322e-04	2.815091e-03
>hsa-mir-320d-2	49.045	69.111	43.886	-0.6551663	3.478445	5.043322e-04	2.815091e-03
>hsa-mir-326	91.091	125.444	82.257	-0.6088357	3.422612	6.202263e-04	3.370079e-03
>hsa-mir-212	31.568	19.111	34.771	0.8634907	3.401759	6.695377e-04	3.606106e-03
>hsa-mir-149	279.750	133.222	317.429	1.2525972	3.371326	7.480731e-04	3.994060e-03
>hsa-mir-514a-1	1.386	0.000	1.743		Inf	3.347545	8.153068e-04
>hsa-mir-514a-2	1.386	0.000	1.743		Inf	3.347545	8.153068e-04
>hsa-mir-514a-3	1.386	0.000	1.743		Inf	3.347545	8.153068e-04
>hsa-mir-4433	4.614	13.333	2.371	-2.4912092	3.344534	8.242088e-04	4.252640e-03
>hsa-mir-503	26.659	11.444	30.571	1.4175365	3.326022	8.809483e-04	4.470267e-03
>hsa-mir-187	38.205	2.667	47.343	4.1500374	3.301013	9.633649e-04	4.848410e-03
>hsa-mir-20a	279.841	176.333	306.457	0.7973801	3.298270	9.728260e-04	4.856221e-03
>hsa-mir-4787	40.091	25.667	43.800	0.7710349	3.266282	1.089696e-03	5.395753e-03
>hsa-mir-577	9.068	17.667	6.857	-1.3653504	3.247804	1.162995e-03	5.712633e-03
>hsa-mir-363	63.114	105.667	52.171	-1.0181885	3.236466	1.210198e-03	5.897312e-03
>hsa-mir-30a	24988.682	34377.111	22574.514	-0.6067534	3.173830	1.504419e-03	7.273331e-03
>hsa-mir-641	6.886	4.111	7.600	0.8864711	3.138051	1.700755e-03	8.015353e-03
>hsa-mir-1179	9.705	24.333	5.943	-2.0337054	3.124691	1.779922e-03	8.220963e-03
>hsa-mir-2114	2.659	0.778	3.143	2.0146468	3.124552	1.780762e-03	8.220963e-03
>hsa-mir-4520a	5.909	2.667	6.743	1.3383225	3.078377	2.081318e-03	9.536783e-03
>hsa-mir-1296	127.182	86.222	137.714	0.6755466	3.075249	2.103268e-03	9.565974e-03
>hsa-mir-30c-2	4641.250	6500.333	4163.200	-0.6428208	3.018639	2.539127e-03	1.146341e-02
>hsa-mir-196a-2	10.227	1.333	12.514	3.2304665	3.013139	2.585605e-03	1.158804e-02
>hsa-mir-4442	2.205	1.000	2.514	1.3301486	3.006649	2.641442e-03	1.175250e-02
>hsa-mir-451a	1762.500	4207.667	1133.743	-1.8919270	2.974699	2.932764e-03	1.286227e-02
>hsa-mir-451b	1762.500	4207.667	1133.743	-1.8919270	2.974699	2.932764e-03	1.286227e-02
>hsa-mir-196a-1	9.614	1.333	11.743	3.1386741	2.971373	2.964715e-03	1.291018e-02
>hsa-mir-3651	39.182	25.889	42.600	0.7185204	2.955486	3.121768e-03	1.340395e-02
>hsa-mir-30c-1	4312.955	5957.222	3890.143	-0.6148166	2.933697	3.349512e-03	1.418345e-02
>hsa-mir-99a	1525.023	961.222	1670.000	0.7969062	2.923044	3.466280e-03	1.457737e-02
>hsa-mir-147b	2.386	0.778	2.800	1.8479969	2.915015	3.556716e-03	1.485594e-02
>hsa-mir-548h-4	4.523	7.111	3.857	-0.8825424	2.911719	3.594453e-03	1.491212e-02
>hsa-mir-188	8.886	5.667	9.714	0.7776076	2.899720	3.734966e-03	1.539107e-02
>hsa-mir-1275	216.250	361.667	178.857	-1.0158529	2.851613	4.349803e-03	1.780519e-02
>hsa-mir-502	181.432	117.889	197.771	0.7464063	2.834425	4.590824e-03	1.849592e-02
>hsa-mir-144	109.773	255.444	72.314	-1.8206570	2.833168	4.608918e-03	1.849592e-02
>hsa-mir-668	3.932	1.556	4.543	1.5461700	2.756758	5.837760e-03	2.268598e-02
>hsa-mir-6723	92.705	48.222	104.143	1.1107939	2.740609	6.132540e-03	2.368163e-02
>hsa-mir-564	0.955	0.222	1.143	2.3625701	2.728969	6.353269e-03	2.438067e-02
>hsa-mir-99b	25036.477	15941.000	27375.314	0.7801334	2.686401	7.222629e-03	2.754468e-02
>hsa-mir-1-2	3.068	6.333	2.229	-1.5068458	2.680890	7.342665e-03	2.782961e-02
>hsa-mir-133b	14.455	26.556	11.343	-1.2272296	2.676716	7.434764e-03	2.800580e-02
>hsa-mir-200b	3527.568	2161.444	3878.857	0.8436359	2.667948	7.631605e-03	2.826483e-02
>hsa-mir-1-1	3.091	6.333	2.257	-1.4884673	2.666041	7.675032e-03	2.826483e-02
>hsa-mir-1271	30.864	14.556	35.057	1.2681385	2.665488	7.687665e-03	2.826483e-02
>hsa-mir-1270-1	23.114	37.889	19.314	-0.9721065	2.650797	8.030208e-03	2.917484e-02
>hsa-mir-1270-2	23.114	37.889	19.314	-0.9721065	2.650797	8.030208e-03	2.917484e-02
>hsa-mir-548h-2	2.614	4.556	2.114	-1.1074567	2.641677	8.249680e-03	2.979590e-02
>hsa-mir-218-1	135.364	185.111	122.571	-0.5947688	2.597661	9.386105e-03	3.370216e-02
>hsa-mir-542	76.841	51.000	83.486	0.7110321	2.556184	1.058272e-02	3.755948e-02
>hsa-mir-1248	80.295	47.556	88.714	0.8995526	2.547728	1.084270e-02	3.826101e-02
>hsa-mir-548h-3	3.818	6.444	3.143	-1.0359793	2.533944	1.127868e-02	3.957206e-02
>hsa-mir-1908	5.886	3.556	6.486	0.8671905	2.531560	1.135563e-02	3.961568e-02
>hsa-mir-6503	6.614	3.889	7.314	0.9113590	2.518356	1.179041e-02	4.090008e-02
>hsa-mir-605	1.886	3.000	1.600	-0.9068906	2.485601	1.293328e-02	4.461255e-02
>hsa-mir-1251	22.909	14.000	25.200	0.8479969	2.478599	1.318997e-02	4.492261e-02
>hsa-mir-4802	6.477	3.222	7.314	1.1826610	2.478055	1.321006e-02	4.492261e-02
>hsa-mir-598	70.341	45.667	76.686	0.7478164	2.477176	1.324266e-02	4.492261e-02
>hsa-mir-3199-1	2.727	4.444	2.286	-0.9593580	2.470374	1.349718e-02	4.553445e-02
>hsa-mir-4758	2.955	1.778	3.257	0.8735320	2.450206	1.427745e-02	4.759434e-02
>hsa-mir-4664	0.841	2.111	0.514	-2.0373605	2.445040	1.448360e-02	4.759434e-02
>hsa-mir-3690-1	3.545	1.667	4.029	1.2733027	2.444748	1.449535e-02	4.759434e-02
>hsa-mir-3690-2	3.545	1.667	4.029	1.2733027	2.444748	1.449535e-02	4.759434e-02
>hsa-mir-449b	3.273	0.889	3.886	2.1281048	2.437544	1.478742e-02	4.829509e-02
>hsa-mir-301b	8.386	5.111	9.229	0.8524704	2.433716	1.494473e-02	4.855059e-02
>hsa-mir-3652	4.795	9.444	3.600	-1.3914690	2.427018	1.522352e-02	4.893844e-02

**Tabla 8.13** miRNAs diferencialmente expresados en carcinomas papilares de variante folicular respecto al tejido normal.

miRNAs	Media	TN	FVPTC	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-377	5.353	9.444	0.750	-3.6545034	8.376414	5.456476e-17	3.022888e-14
>hsa-mir-197	3863.412	5353.000	2187.625	-1.2909822	7.308857	2.694241e-13	7.463047e-11
>hsa-mir-134	20.176	32.667	6.125	-2.4150375	6.328919	2.468855e-10	4.559151e-08
>hsa-mir-423	33468.059	44645.667	20893.250	-1.0954832	5.652174	1.584308e-08	1.755537e-06
>hsa-mir-3184	33468.000	44645.556	20893.250	-1.0954796	5.652162	1.584420e-08	1.755537e-06
>hsa-mir-1251	48.059	16.889	83.125	2.2992080	5.592733	2.235227e-08	2.063859e-06
>hsa-mir-411	34.941	57.444	9.625	-2.5773089	5.501274	3.770561e-08	2.654885e-06
>hsa-mir-200c	10848.941	6240.667	16033.250	1.3612948	5.498343	3.833769e-08	2.654885e-06
>hsa-mir-151b	4960.412	2705.778	7496.875	1.4702460	5.426050	5.761488e-08	3.546516e-06
>hsa-mir-365b	99.000	130.222	63.875	-1.0276524	5.382043	7.364519e-08	4.067011e-06
>hsa-mir-330	96.824	64.667	133.000	1.0403321	5.365438	8.075293e-08	4.067011e-06
>hsa-mir-485	17.824	30.222	3.875	-2.9633415	5.274157	1.333677e-07	6.157140e-06
>hsa-mir-6511a-1	120.000	156.778	78.625	-0.9956611	5.182026	2.194887e-07	7.599798e-06
>hsa-mir-6511a-2	120.000	156.778	78.625	-0.9956611	5.182026	2.194887e-07	7.599798e-06
>hsa-mir-6511a-3	120.000	156.778	78.625	-0.9956611	5.182026	2.194887e-07	7.599798e-06
>hsa-mir-6511a-4	120.000	156.778	78.625	-0.9956611	5.182026	2.194887e-07	7.599798e-06
>hsa-mir-1247	169.647	299.222	23.875	-3.6476447	5.094677	3.493354e-07	1.094393e-05
>hsa-mir-96	88.000	19.667	164.875	3.0675483	5.091320	3.555791e-07	1.094393e-05
>hsa-mir-101-2	3442.176	4225.333	2561.125	-0.7222875	5.025519	5.020730e-07	1.408347e-05
>hsa-mir-409	129.176	208.667	39.750	-2.3921734	5.008188	5.494492e-07	1.408347e-05
>hsa-mir-654	30.294	47.000	11.500	-2.0310269	5.007418	5.516497e-07	1.408347e-05
>hsa-mir-101-1	3449.824	4233.778	2567.875	-0.7213706	5.004776	5.592715e-07	1.408347e-05
>hsa-mir-125b-2	42910.412	16217.000	72940.500	2.1692131	4.987171	6.126968e-07	1.475800e-05
>hsa-mir-320b-1	1593.353	2068.667	1058.625	-0.9665096	4.947837	7.504260e-07	1.678539e-05
>hsa-mir-320c-1	478.765	631.667	306.750	-1.0421001	4.943218	7.684352e-07	1.678539e-05
>hsa-mir-199b	2195.176	3106.667	1169.750	-1.4091672	4.938375	7.877619e-07	1.678539e-05
>hsa-mir-381	25.824	41.667	8.000	-2.3808218	4.927855	8.313717e-07	1.699646e-05
>hsa-mir-320b-2	1598.176	2072.778	1064.250	-0.9617284	4.914907	8.882440e-07	1.699646e-05
>hsa-mir-125b-1	41667.529	14959.444	71714.125	2.2612007	4.914585	8.897065e-07	1.699646e-05
>hsa-mir-1307	755.294	601.444	928.375	0.6262762	4.869895	1.116574e-06	2.061939e-05
>hsa-mir-320c-2	420.882	561.778	262.375	-1.0983693	4.847262	1.251770e-06	2.237034e-05
>hsa-mir-99a	2544.000	1163.111	4097.500	1.8167550	4.812706	1.489003e-06	2.577836e-05
>hsa-mir-125a	47506.235	26162.444	71518.000	1.4508090	4.769972	1.842515e-06	3.093193e-05
>hsa-mir-30d	41835.118	33157.444	51597.500	0.6379683	4.762255	1.914414e-06	3.119369e-05
>hsa-mir-99b	42759.353	19321.667	69126.750	1.8390246	4.699586	2.606899e-06	4.126349e-05
>hsa-mir-100	16767.000	7288.778	27430.000	1.9120058	4.616356	3.905375e-06	5.848003e-05
>hsa-mir-491	13.471	8.889	18.625	1.0671654	4.616338	3.905706e-06	5.848003e-05
>hsa-mir-4707	2.941	5.222	0.375	-3.7997013	4.605463	4.115488e-06	5.999949e-05
>hsa-mir-4732	39.471	65.333	10.375	-2.6547079	4.533420	5.803629e-06	8.244130e-05
>hsa-mir-183	1201.353	329.444	2182.250	2.7277093	4.491041	7.087603e-06	9.816331e-05
>hsa-mir-136	21.412	36.333	4.625	-2.9737685	4.472554	7.729099e-06	1.028956e-04
>hsa-mir-3127	18.353	25.111	10.750	-1.2239892	4.470581	7.800748e-06	1.028956e-04
>hsa-mir-29a	4630.176	3544.111	5852.000	0.7235059	4.457091	8.307929e-06	1.070370e-04
>hsa-mir-214	736.706	1046.778	387.875	-1.4322915	4.425881	9.604940e-06	1.186244e-04
>hsa-mir-3120	736.588	1046.556	387.875	-1.4319852	4.425194	9.635553e-06	1.186244e-04
>hsa-mir-500b	13.294	7.333	20.000	1.4474590	4.394772	1.108890e-05	1.335489e-04
>hsa-mir-365a	92.529	121.333	60.125	-1.0129391	4.387996	1.143996e-05	1.348455e-04
>hsa-mir-19a	37.294	48.556	24.625	-0.9795126	4.334181	1.463040e-05	1.684709e-04
>hsa-mir-1301	317.941	141.333	516.625	1.8700157	4.330149	1.490086e-05	1.684709e-04
>hsa-mir-487b	5.941	9.667	1.750	-2.4656636	4.251733	2.121229e-05	2.350322e-04
>hsa-mir-1271	45.176	17.667	76.125	2.1073405	4.240032	2.234874e-05	2.427687e-04
>hsa-mir-1249	52.647	75.778	26.625	-1.5089933	4.216665	2.479416e-05	2.641532e-04
>hsa-mir-323a	2.000	3.667	0.125	-4.8744691	4.211816	2.533259e-05	2.647973e-04
>hsa-mir-18a	28.706	36.889	19.500	-0.9197122	4.182961	2.877369e-05	2.951967e-04
>hsa-mir-493	13.059	19.444	5.875	-1.7266973	4.156824	3.227026e-05	3.250495e-04
>hsa-mir-432	24.294	38.111	8.750	-2.1228567	4.118068	3.820615e-05	3.779680e-04
>hsa-mir-127	1732.118	2688.889	655.750	-2.0357923	4.086068	4.387454e-05	4.264297e-04
>hsa-mir-450a-2	114.765	28.333	212.000	2.9034920	4.051604	5.086772e-05	4.858745e-04
>hsa-mir-450a-1	111.118	26.111	206.750	2.9851516	4.032662	5.514864e-05	5.178364e-04
>hsa-mir-502	297.824	142.778	472.250	1.7257793	4.025319	5.689813e-05	5.253594e-04
>hsa-mir-501	911.235	556.444	1310.375	1.2356702	3.955934	7.623612e-05	6.783126e-04
>hsa-mir-4443	31.706	11.889	54.000	2.1833455	3.951517	7.765738e-05	6.783126e-04
>hsa-mir-484	1517.176	1108.333	1977.125	0.8350122	3.950437	7.800862e-05	6.783126e-04
>hsa-mir-542	108.588	61.889	161.125	1.3804280	3.948363	7.868751e-05	6.783126e-04
>hsa-mir-1226	20.882	11.222	31.750	1.5003982	3.945645	7.958541e-05	6.783126e-04
>hsa-mir-382	4.000	6.333	1.375	-2.2035334	3.910988	9.191944e-05	7.715662e-04
>hsa-mir-450b	105.000	53.889	162.500	1.5923800	3.906547	9.362437e-05	7.741478e-04
>hsa-mir-486	220685.294	359546.222	64466.750	-2.4795501	3.894730	9.830822e-05	8.009229e-04
>hsa-mir-483	44.412	78.111	6.500	-3.5870162	3.878618	1.050517e-04	8.434586e-04
>hsa-mir-4454	15.235	5.444	26.250	2.2694607	3.840664	1.227019e-04	9.710983e-04
>hsa-mir-149	313.118	161.889	483.250	1.5777658	3.784344	1.541148e-04	1.169584e-03
>hsa-mir-3154	1.882	3.222	0.375	-3.1030935	3.771049	1.625629e-04	1.207131e-03
>hsa-mir-128-2	463.706	594.222	316.875	-0.9070887	3.769736	1.634202e-04	1.207131e-03
>hsa-mir-625	59.706	76.000	41.375	-0.8772401	3.703159	2.129310e-04	1.542588e-03
>hsa-mir-29c	992.882	736.222	1281.625	0.7997610	3.701412	2.144030e-04	1.542588e-03
>hsa-mir-3622a	24.294	33.111	14.375	-1.2037535	3.682260	2.311751e-04	1.621152e-03
>hsa-mir-3622b	24.294	33.111	14.375	-1.2037535	3.682260	2.311751e-04	1.621152e-03

>hsa-mir-4433	10.059	16.222	3.125	-2.3760434	3.670718	2.418697e-04	1.674948e-03
>hsa-mir-576	9.353	12.000	6.375	-0.9125372	3.647028	2.652910e-04	1.814459e-03
>hsa-mir-151a	13601.765	9554.111	18155.375	0.9262032	3.640052	2.725828e-04	1.841596e-03
>hsa-mir-326	118.412	153.333	79.125	-0.9544659	3.636109	2.767871e-04	1.847470e-03
>hsa-mir-135a-1	962.588	492.778	1491.125	1.5973921	3.613227	3.024095e-04	1.994463e-03
>hsa-mir-128-1	503.941	631.333	360.625	-0.8079025	3.530163	4.153042e-04	2.706806e-03
>hsa-mir-15a	510.118	385.444	650.375	0.7547489	3.506871	4.534094e-04	2.920800e-03
>hsa-mir-943	2.294	1.000	3.750	1.9068906	3.486620	4.891662e-04	3.114920e-03
>hsa-mir-224	123.118	68.333	184.750	1.4349130	3.475940	5.090655e-04	3.204799e-03
>hsa-mir-505	90.353	107.556	71.000	-0.5991911	3.454039	5.522565e-04	3.379304e-03
>hsa-mir-9-1	6.706	10.556	2.375	-2.1520031	3.449712	5.611841e-04	3.379304e-03
>hsa-mir-9-2	6.706	10.556	2.375	-2.1520031	3.449712	5.611841e-04	3.379304e-03
>hsa-mir-9-3	6.706	10.556	2.375	-2.1520031	3.449712	5.611841e-04	3.379304e-03
>hsa-mir-5701-1	306.765	226.667	396.875	0.8081124	3.419707	6.268851e-04	3.694621e-03
>hsa-mir-5701-2	306.765	226.667	396.875	0.8081124	3.419707	6.268851e-04	3.694621e-03
>hsa-mir-199a-1	2403.118	3261.889	1437.000	-1.1826476	3.391950	6.939702e-04	4.031546e-03
>hsa-mir-199a-2	2404.000	3263.000	1437.625	-1.1825116	3.390125	6.986073e-04	4.031546e-03
>hsa-mir-675	4.118	7.444	0.375	-4.3112017	3.372993	7.435596e-04	4.246722e-03
>hsa-mir-223	68.353	95.444	37.875	-1.3334153	3.340795	8.353896e-04	4.722509e-03
>hsa-mir-511-1	5.176	7.222	2.875	-1.3288809	3.322815	8.911415e-04	4.936924e-03
>hsa-mir-511-2	5.176	7.222	2.875	-1.3288809	3.322815	8.911415e-04	4.936924e-03
>hsa-mir-3613	12.176	9.111	15.625	0.7781573	3.294968	9.843273e-04	5.399181e-03
>hsa-mir-148b	2864.765	2246.667	3560.125	0.6641418	3.267410	1.085364e-03	5.895016e-03
>hsa-mir-3653	239.588	103.000	393.250	1.9328024	3.256330	1.128624e-03	6.033190e-03
>hsa-mir-6501	2.471	4.000	0.750	-2.4150375	3.255336	1.132584e-03	6.033190e-03
>hsa-mir-34b	7.765	11.556	3.500	-1.7231598	3.245701	1.171617e-03	6.181673e-03
>hsa-mir-504	105.529	144.667	61.500	-1.2340742	3.237067	1.207651e-03	6.311684e-03
>hsa-mir-34a	861.118	285.889	1508.250	2.3993491	3.216833	1.296141e-03	6.710859e-03
>hsa-mir-29b-2	193.000	145.000	247.000	0.7684581	3.198192	1.382921e-03	7.093875e-03
>hsa-mir-191	18906.647	12962.444	25593.875	0.9814608	3.190374	1.420889e-03	7.176426e-03
>hsa-mir-10b	16427.353	21461.667	10763.750	-0.9955813	3.188092	1.432151e-03	7.176426e-03
>hsa-mir-4685	12.471	16.556	7.875	-1.0719636	3.184830	1.448393e-03	7.176426e-03
>hsa-mir-143	53459.882	66259.000	39060.875	-0.7623922	3.183163	1.456758e-03	7.176426e-03
>hsa-mir-500a	1193.471	808.222	1626.875	1.0092795	3.162481	1.564307e-03	7.598988e-03
>hsa-mir-641	7.706	5.111	10.625	1.0557540	3.160052	1.577407e-03	7.598988e-03
>hsa-mir-1291	30.471	19.778	42.500	1.1035825	3.155248	1.603617e-03	7.626153e-03
>hsa-mir-144	214.824	314.667	102.500	-1.6182004	3.153984	1.610578e-03	7.626153e-03
>hsa-mir-433	8.118	12.889	2.750	-2.2286244	3.131403	1.739734e-03	8.167904e-03
>hsa-mir-218-1	171.176	223.111	112.750	-0.9846349	3.127473	1.763162e-03	8.208332e-03
>hsa-mir-4524a	3.706	5.444	1.750	-1.6374299	3.087493	2.018528e-03	9.241854e-03
>hsa-mir-4524b	3.706	5.444	1.750	-1.6374299	3.087493	2.018528e-03	9.241854e-03
>hsa-mir-129-1	5.059	9.000	0.625	-3.8479969	3.070381	2.137861e-03	9.707990e-03
>hsa-mir-494	2.529	4.444	0.375	-3.5670406	3.040057	2.365334e-03	1.065362e-02
>hsa-mir-548aa-2	8.000	10.111	5.625	-0.8460165	3.016246	2.559259e-03	1.134264e-02
>hsa-mir-548d-2	8.000	10.111	5.625	-0.8460165	3.016246	2.559259e-03	1.134264e-02
>hsa-mir-182	3767.706	1835.222	5941.750	1.6949331	3.010041	2.612121e-03	1.148504e-02
>hsa-mir-27b	35095.765	26925.222	44287.625	0.7179454	2.987743	2.810454e-03	1.216400e-02
>hsa-mir-3065	148.471	77.000	228.875	1.5716295	2.979930	2.883147e-03	1.228664e-02
>hsa-mir-338	148.471	77.000	228.875	1.5716295	2.979930	2.883147e-03	1.228664e-02
>hsa-mir-7-2	140.000	222.444	47.250	-2.2350588	2.970234	2.975725e-03	1.258436e-02
>hsa-mir-548ad	7.000	9.111	4.625	-0.9781736	2.962284	3.053661e-03	1.281612e-02
>hsa-mir-135a-2	1757.824	1143.667	2448.750	1.0983789	2.937492	3.308784e-03	1.367960e-02
>hsa-mir-4459	85.176	145.333	17.500	-3.0539388	2.902206	3.705447e-03	1.520606e-02
>hsa-mir-1304	9.882	11.889	7.625	-0.6408046	2.896957	3.768010e-03	1.527054e-02
>hsa-mir-370	7.000	10.556	3.000	-1.8149681	2.895123	3.790095e-03	1.527054e-02
>hsa-mir-4709	14.059	6.222	22.875	1.8782699	2.893986	3.803852e-03	1.527054e-02
>hsa-mir-2114	5.059	1.000	9.625	3.2667865	2.885512	3.907775e-03	1.557487e-02
>hsa-mir-548ae-2	5.529	7.556	3.250	-1.2170981	2.875820	4.029790e-03	1.594645e-02
>hsa-mir-3135b	14.588	24.000	4.000	-2.5849625	2.860198	4.233762e-03	1.663478e-02
>hsa-mir-7-3	119.471	195.889	33.500	-2.5478026	2.854092	4.316000e-03	1.683848e-02
>hsa-mir-30e	6188.882	4860.667	7683.125	0.6605390	2.843703	4.459264e-03	1.712244e-02
>hsa-mir-451a	3437.176	5202.000	1451.750	-1.8412734	2.842117	4.481504e-03	1.712244e-02
>hsa-mir-451b	3437.176	5202.000	1451.750	-1.8412734	2.842117	4.481504e-03	1.712244e-02
>hsa-mir-548aa-1	7.824	9.778	5.625	-0.7976535	2.821813	4.775307e-03	1.787514e-02
>hsa-mir-548d-1	7.824	9.778	5.625	-0.7976535	2.821813	4.775307e-03	1.787514e-02
>hsa-mir-221	9923.294	2405.667	18380.625	2.9336772	2.817114	4.845726e-03	1.801699e-02
>hsa-mir-181a-1	268991.529	169154.556	381308.125	1.1726152	2.803328	5.057828e-03	1.867118e-02
>hsa-mir-181a-2	269862.000	169775.000	382459.875	1.1716844	2.801341	5.089076e-03	1.867118e-02
>hsa-mir-766	36.176	49.000	21.750	-1.1717663	2.794010	5.205888e-03	1.896682e-02
>hsa-mir-1273a	320.824	511.111	106.750	-2.2594009	2.782650	5.391689e-03	1.939608e-02
>hsa-mir-3159	56.941	91.000	18.625	-2.2886261	2.777254	5.482039e-03	1.959387e-02
>hsa-mir-3200	22.471	17.667	27.875	0.6579419	2.757859	5.818132e-03	2.066183e-02
>hsa-mir-181b-2	19683.647	13855.111	26240.750	0.9213907	2.719436	6.539337e-03	2.307511e-02
>hsa-mir-1268a	29.529	20.333	39.875	0.9716378	2.713317	6.661342e-03	2.335686e-02
>hsa-mir-1275	340.882	436.333	233.500	-0.9020081	2.709995	6.728416e-03	2.344366e-02
>hsa-mir-188	9.471	6.889	12.375	0.8450853	2.706604	6.797520e-03	2.353641e-02
>hsa-mir-181b-1	19586.824	13789.444	26108.875	0.9209760	2.704373	6.843333e-03	2.354109e-02
>hsa-mir-133b	23.647	32.444	13.750	-1.2385398	2.702411	6.883856e-03	2.354109e-02
>hsa-mir-503	22.529	14.111	32.000	1.1812403	2.695423	7.029938e-03	2.389316e-02
>hsa-mir-4758	2.882	1.778	4.125	1.2143191	2.688022	7.187669e-03	2.428030e-02
>hsa-mir-141	4126.941	2369.778	6103.750	1.3649441	2.681356	7.332441e-03	2.461922e-02
>hsa-mir-410	9.000	12.444	5.125	-1.2798779	2.678621	7.392604e-03	2.467170e-02
>hsa-mir-1268b	31.471	18.889	45.625	1.2722867	2.659838	7.817828e-03	2.588663e-02
>hsa-mir-663a	13.235	20.889	4.625	-2.1752105	2.658450	7.850097e-03	2.588663e-02

>hsa-mir-194-2	102.118	76.444	131.000	0.7770832	2.654426	7.944348e-03	2.596843e-02
>hsa-mir-3609	171.941	275.556	55.375	-2.3150365	2.653395	7.968650e-03	2.596843e-02
>hsa-mir-4510	3.059	2.000	4.250	1.0874628	2.639035	8.314228e-03	2.693615e-02
>hsa-mir-194-1	93.412	68.667	121.250	0.8203029	2.633385	8.453848e-03	2.722925e-02
>hsa-mir-4532	219.059	131.000	318.125	1.2800269	2.580726	9.859289e-03	3.157252e-02
>hsa-mir-548t	6.471	8.444	4.250	-0.9905397	2.546714	1.087426e-02	3.442480e-02
>hsa-mir-4677	5.000	6.333	3.500	-0.8556101	2.523946	1.160459e-02	3.632171e-02
>hsa-mir-193a	1627.706	2176.111	1010.750	-1.1063260	2.521605	1.168209e-02	3.635888e-02
>hsa-mir-449b	2.000	1.111	3.000	1.4329594	2.518993	1.176910e-02	3.642504e-02
>hsa-mir-4430	5.941	9.444	2.000	-2.2394659	2.508201	1.213475e-02	3.734807e-02
>hsa-mir-3934	13.412	16.222	10.250	-0.6623476	2.470720	1.348415e-02	4.127191e-02
>hsa-mir-4419a	9.176	13.778	4.000	-1.7842713	2.462117	1.381197e-02	4.200989e-02
>hsa-mir-301a	185.294	94.889	287.000	1.5967397	2.460434	1.387691e-02	4.200989e-02
>hsa-mir-1303	46.824	56.000	36.500	-0.6175304	2.456701	1.402194e-02	4.221823e-02
>hsa-mir-551b	4.471	0.889	8.500	3.2573878	2.433902	1.493704e-02	4.401660e-02
>hsa-mir-431	2.882	4.000	1.625	-1.2995603	2.431794	1.502424e-02	4.403932e-02
>hsa-mir-628	21.588	16.667	27.125	0.7026575	2.428069	1.517945e-02	4.426009e-02
>hsa-mir-130b	269.235	172.778	377.750	1.1285141	2.393108	1.670632e-02	4.795492e-02
>hsa-mir-187	11.647	3.111	21.250	2.7719610	2.387356	1.697003e-02	4.836091e-02
>hsa-mir-1273f	59.000	100.667	12.125	-3.0535294	2.386225	1.702234e-02	4.836091e-02
>hsa-mir-548e	9.882	7.444	12.625	0.7620473	2.372490	1.766864e-02	4.994097e-02



**Tabla 8.14** miRNAs diferencialmente expresados en carcinomas foliculares respecto al tejido normal.

miRNAs	Media	TN	FTC	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-455	88.733	135.222	19.000	-2.8312609	8.320121	8.787365e-17	3.192509e-14
>hsa-mir-1291	40.533	12.778	82.167	2.6849163	8.300909	1.033174e-16	3.192509e-14
>hsa-mir-101-2	2100.667	2730.556	1155.833	-1.2402611	7.458181	8.772543e-14	1.373300e-11
>hsa-mir-101-1	2105.867	2735.889	1160.833	-1.2368488	7.456447	8.888672e-14	1.373300e-11
>hsa-mir-3622a	14.600	21.667	4.000	-2.4374053	6.950731	3.633971e-12	3.742990e-10
>hsa-mir-3622b	14.600	21.667	4.000	-2.4374053	6.950731	3.633971e-12	3.742990e-10
>hsa-mir-199b	1474.000	2006.556	675.167	-1.5714055	6.886206	5.729983e-12	5.058757e-10
>hsa-mir-181b-1	7025.933	9001.111	4063.167	-1.1474986	6.352942	2.112350e-10	1.631790e-08
>hsa-mir-181b-2	7071.267	9043.778	4112.500	-1.1369099	6.297725	3.020450e-10	2.074042e-08
>hsa-mir-199a-1	1583.200	2107.444	796.833	-1.4031447	6.232353	4.594811e-10	2.662577e-08
>hsa-mir-199a-2	1584.000	2108.333	797.500	-1.4025466	6.227505	4.739214e-10	2.662577e-08
>hsa-mir-574	1066.067	1428.778	522.000	-1.4526598	5.940619	2.839486e-09	1.410148e-07
>hsa-mir-744	869.400	1173.667	413.000	-1.5068090	5.933451	2.966331e-09	1.410148e-07
>hsa-mir-365b	68.800	84.222	45.667	-0.8830595	5.920041	3.218619e-09	1.420790e-07
>hsa-mir-1247	119.267	192.667	9.167	-4.3935660	5.386935	7.166928e-08	2.952774e-06
>hsa-mir-223	42.333	60.889	14.500	-2.0701261	5.018952	5.195422e-07	2.006732e-05
>hsa-mir-365a	63.067	78.222	40.333	-0.9556059	4.833755	1.339813e-06	4.728034e-05
>hsa-mir-1249	35.000	48.889	14.167	-1.7870063	4.828291	1.377097e-06	4.728034e-05
>hsa-mir-548ae-2	3.267	4.889	0.833	-2.5525410	4.762576	1.911367e-06	6.143475e-05
>hsa-mir-186	3150.667	4056.222	1792.333	-1.1782977	4.754622	1.988179e-06	6.143475e-05
>hsa-mir-320d-1	43.933	54.333	28.333	-0.9393372	4.730869	2.235608e-06	6.280027e-05
>hsa-mir-320d-2	43.933	54.333	28.333	-0.9393372	4.730869	2.235608e-06	6.280027e-05
>hsa-mir-548t	3.800	5.444	1.333	-2.0297473	4.599064	4.243935e-06	1.140327e-04
>hsa-mir-3960	7.467	4.333	12.167	1.4893848	4.577091	4.714869e-06	1.214079e-04
>hsa-mir-328	723.933	956.667	374.833	-1.3517671	4.470483	7.804312e-06	1.929226e-04
>hsa-mir-224	74.867	44.444	120.500	1.4389581	4.441892	8.917122e-06	2.119531e-04
>hsa-mir-5701-1	285.533	148.333	491.333	1.7278593	4.407379	1.046292e-05	2.309316e-04
>hsa-mir-5701-2	285.533	148.333	491.333	1.7278593	4.407379	1.046292e-05	2.309316e-04
>hsa-mir-218-1	107.933	145.667	51.333	-1.5047029	4.346156	1.385444e-05	2.875414e-04
>hsa-mir-214	512.600	677.222	265.667	-1.3500121	4.337875	1.438668e-05	2.875414e-04
>hsa-mir-3120	512.467	677.000	265.667	-1.3495386	4.337312	1.442360e-05	2.875414e-04
>hsa-mir-205	70.467	111.889	8.333	-3.7470293	4.225535	2.383740e-05	4.603598e-04
>hsa-mir-345	1499.267	2134.667	546.167	-1.9665976	4.215693	2.490124e-05	4.663323e-04
>hsa-mir-130a	922.667	1211.889	488.833	-1.3098429	4.207744	2.579324e-05	4.688300e-04
>hsa-mir-1287	11.067	14.889	5.333	-1.4811267	4.190408	2.784534e-05	4.916692e-04
>hsa-mir-28	4039.733	4733.111	2999.667	-0.6579866	4.162136	3.152847e-05	5.412388e-04
>hsa-mir-4433	6.867	10.778	1.000	-3.4299878	4.009043	6.096528e-05	1.018285e-03
>hsa-mir-3154	1.467	2.333	0.167	-3.8073549	3.819365	1.337955e-04	2.175937e-03
>hsa-mir-19b-2	178.600	217.222	120.667	-0.8481445	3.762343	1.683286e-04	2.667362e-03
>hsa-mir-19b-1	178.667	217.222	120.833	-0.8461532	3.755442	1.730358e-04	2.673404e-03
>hsa-mir-4732	29.600	42.222	10.667	-1.9848931	3.708736	2.082968e-04	3.130530e-03
>hsa-mir-548ay	4.133	5.667	1.833	-1.6280312	3.703370	2.127544e-04	3.130530e-03
>hsa-mir-3934	8.000	10.556	4.167	-1.3410369	3.665826	2.465417e-04	3.543321e-03
>hsa-mir-548h-1	1.600	2.444	0.333	-2.8744691	3.628935	2.845927e-04	3.997234e-03
>hsa-mir-26a-2	38186.000	46800.444	25264.333	-0.8894201	3.588601	3.324575e-04	4.392230e-03
>hsa-mir-320c-1	332.800	406.556	222.167	-0.8718101	3.587743	3.335530e-04	4.392230e-03
>hsa-mir-26a-1	38163.933	46791.778	25222.167	-0.8915628	3.587365	3.340369e-04	4.392230e-03
>hsa-mir-323a	1.467	2.333	0.167	-3.8073549	3.520673	4.304524e-04	5.517710e-03
>hsa-mir-4454	8.067	3.556	14.833	2.0606959	3.516372	4.374883e-04	5.517710e-03
>hsa-mir-34b	5.067	7.444	1.500	-2.3112017	3.495101	4.738824e-04	5.857187e-03
>hsa-mir-381	19.733	26.889	9.000	-1.5790132	3.486650	4.891104e-04	5.926868e-03
>hsa-mir-31	222.067	306.111	96.000	-1.6729491	3.473395	5.139187e-04	6.107726e-03
>hsa-mir-34c	28.867	40.111	12.000	-1.7409675	3.454996	5.503013e-04	6.416721e-03
>hsa-mir-3607	790.267	362.222	1432.333	1.9834203	3.427402	6.093852e-04	6.898930e-03
>hsa-mir-320c-2	295.067	361.333	195.667	-0.8849323	3.425361	6.139824e-04	6.898930e-03
>hsa-mir-133b	15.000	21.111	5.833	-1.8556101	3.420292	6.255405e-04	6.903287e-03
>hsa-mir-500b	11.333	4.778	21.167	2.1473824	3.378610	7.285333e-04	7.898835e-03
>hsa-mir-9-1	4.467	6.667	1.167	-2.5145732	3.354983	7.936973e-04	8.175082e-03
>hsa-mir-9-2	4.467	6.667	1.167	-2.5145732	3.354983	7.936973e-04	8.175082e-03
>hsa-mir-9-3	4.467	6.667	1.167	-2.5145732	3.354983	7.936973e-04	8.175082e-03
>hsa-mir-494	1.733	2.889	0.000	-Inf	3.337276	8.460380e-04	8.571336e-03
>hsa-mir-3943	1.200	2.000	0.000	-Inf	3.331324	8.643378e-04	8.615496e-03
>hsa-mir-1301	229.467	92.000	435.667	2.2435190	3.311526	9.278858e-04	9.102118e-03
>hsa-mir-138-2	1328.800	1735.000	719.500	-1.2698691	3.295618	9.820558e-04	9.482977e-03
>hsa-mir-138-1	1450.800	1856.889	841.667	-1.1415666	3.258091	1.121644e-03	1.066424e-02
>hsa-mir-6087	86.333	129.889	21.000	-2.6288168	3.250451	1.152222e-03	1.078898e-02
>hsa-mir-1179	13.533	18.889	5.500	-1.7800343	3.213663	1.310533e-03	1.208820e-02
>hsa-mir-504	75.800	93.889	48.667	-0.9480205	3.194489	1.400787e-03	1.273068e-02
>hsa-mir-3157	1.067	1.667	0.167	-3.3219281	3.181981	1.462717e-03	1.310085e-02
>hsa-mir-193b	308.067	410.333	154.667	-1.4076341	3.119808	1.809688e-03	1.597696e-02
>hsa-mir-200c	10375.667	4068.222	19836.833	2.2857113	3.094891	1.968851e-03	1.713733e-02
>hsa-mir-3173	3.267	4.444	1.500	-1.5670406	3.083952	2.042705e-03	1.753322e-02
>hsa-mir-219-1	54.600	10.222	121.167	3.5672121	3.073261	2.117334e-03	1.792483e-02
>hsa-mir-1227	14.933	4.333	30.833	2.8309417	3.051540	2.276706e-03	1.901357e-02
>hsa-mir-20b	12.600	7.889	19.667	1.3178584	3.032378	2.426349e-03	1.999311e-02
>hsa-mir-96	64.800	12.556	143.167	3.5112979	3.024455	2.490814e-03	2.025425e-02
>hsa-mir-486	166104.600	232482.000	66538.500	-1.8048578	2.969521	2.982643e-03	2.393862e-02
>hsa-mir-451a	2325.267	3330.111	818.000	-2.0253976	2.946429	3.214665e-03	2.514763e-02

>hsa-mir-451b	2325.267	3330.111	818.000	-2.0253976	2.946429	3.214665e-03	2.514763e-02
>hsa-mir-181c	1600.333	1956.111	1066.667	-0.8748789	2.910636	3.606941e-03	2.770948e-02
>hsa-mir-197	2769.733	3471.111	1717.667	-1.0149475	2.908119	3.636104e-03	2.770948e-02
>hsa-mir-144	144.800	201.111	60.333	-1.7369656	2.901338	3.715729e-03	2.770948e-02
>hsa-mir-1268b	37.800	12.667	75.500	2.5754397	2.900852	3.721500e-03	2.770948e-02
>hsa-mir-103a-2	7573.533	4494.889	12191.500	1.4395183	2.884076	3.925639e-03	2.860063e-02
>hsa-mir-103a-1	7571.000	4493.667	12187.000	1.4393780	2.883427	3.933743e-03	2.860063e-02
>hsa-mir-4448	5.867	9.444	0.500	-4.23994659	2.870143	4.102863e-03	2.948337e-02
>hsa-mir-103b-1	7497.733	4463.222	12049.500	1.4328157	2.857214	4.273782e-03	2.983969e-02
>hsa-mir-103b-2	7498.067	4463.778	12049.500	1.4326362	2.856969	4.277079e-03	2.983969e-02
>hsa-mir-650	18.600	31.000	0.000	-Inf	2.855471	4.297302e-03	2.983969e-02
>hsa-mir-1268a	36.533	13.222	71.500	2.4349786	2.839917	4.512528e-03	3.098602e-02
>hsa-mir-17	227.133	128.444	375.167	1.5463872	2.836235	4.564888e-03	3.100110e-02
>hsa-mir-20a	376.933	138.333	734.833	2.4092682	2.832446	4.619337e-03	3.102989e-02
>hsa-mir-1266	8.400	11.000	4.500	-1.2895066	2.780539	5.426877e-03	3.590609e-02
>hsa-mir-5193	0.867	1.333	0.167	-3.0000000	2.778477	5.461445e-03	3.590609e-02
>hsa-mir-454	140.333	72.556	242.000	1.7378491	2.740811	6.128773e-03	3.986928e-02
>hsa-mir-376c	1.067	1.667	0.167	-3.3219281	2.735824	6.222437e-03	4.005694e-02
>hsa-mir-5189	1.600	2.333	0.500	-2.2223924	2.728250	6.367131e-03	4.043194e-02
>hsa-mir-184	3.400	5.333	0.500	-3.4150375	2.725957	6.411537e-03	4.043194e-02
>hsa-mir-23b	2704.933	3187.556	1981.000	-0.6862216	2.715851	6.610568e-03	4.126597e-02
>hsa-mir-296	39.600	50.111	23.833	-1.0721498	2.710338	6.721462e-03	4.153863e-02
>hsa-mir-221	10325.333	1559.222	23474.500	3.9121960	2.703408	6.863240e-03	4.199488e-02
>hsa-mir-185	123.067	50.444	232.000	2.2013575	2.688042	7.187228e-03	4.270622e-02
>hsa-mir-577	10.400	14.000	5.000	-1.4854268	2.687355	7.202036e-03	4.270622e-02
>hsa-mir-3200	26.400	11.778	48.333	2.0369511	2.685735	7.237044e-03	4.270622e-02
>hsa-mir-99b	22610.533	12514.444	37754.667	1.5930607	2.684766	7.258055e-03	4.270622e-02
>hsa-mir-4661	1.533	2.111	0.667	-1.6629650	2.681695	7.325016e-03	4.270622e-02
>hsa-mir-133a-1	168.733	215.778	98.167	-1.1362412	2.675204	7.468371e-03	4.273568e-02
>hsa-mir-133a-2	168.733	215.778	98.167	-1.1362412	2.675204	7.468371e-03	4.273568e-02
>hsa-mir-6723	78.733	38.111	139.667	1.8737042	2.667661	7.638131e-03	4.330610e-02
>hsa-mir-30a	23098.800	26990.667	17261.000	-0.6449446	2.663596	7.731035e-03	4.343436e-02
>hsa-mir-1229	17.133	2.667	38.833	3.8641861	2.659211	7.832388e-03	4.360735e-02
>hsa-mir-885	9.200	0.222	22.667	6.6724253	2.634796	8.418781e-03	4.645363e-02

**Tabla 8.15** miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de carcinomas foliculares versus adenomas foliculares.

miRNAs	Media	AF	FTC	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-328	673.312	855.7	369.333	-1.2121816	5.629852	1.803639e-08	1.141704e-05
>hsa-mir-151b	3224.375	3967.9	1985.167	-0.9991155	5.298108	1.170089e-07	3.703331e-05
>hsa-mir-186	3160.750	4060.2	1661.667	-1.2889198	4.568504	4.912175e-06	1.036469e-03
>hsa-mir-345	2332.500	3435.1	494.833	-2.7953375	4.172630	3.011031e-05	4.050909e-03
>hsa-mir-205	72.375	111.5	7.167	-3.9595976	4.144981	3.398424e-05	4.050909e-03
>hsa-mir-3960	7.438	5.0	11.500	1.2016339	4.116918	3.839724e-05	4.050909e-03
>hsa-mir-491	10.750	14.6	4.333	-1.7524192	4.004798	6.207055e-05	5.612952e-03
>hsa-mir-3157	1.438	2.2	0.167	-3.7224660	3.929355	8.517387e-05	6.519526e-03
>hsa-mir-744	799.875	1038.6	402.000	-1.3693727	3.908959	9.269468e-05	6.519526e-03
>hsa-mir-548ae-2	2.688	3.8	0.833	-2.1890338	3.611300	3.046657e-04	1.928534e-02
>hsa-mir-574	831.625	1017.2	522.333	-0.9615607	3.527169	4.200282e-04	2.417071e-02
>hsa-mir-1287	9.938	13.1	4.667	-1.4891025	3.297961	9.738956e-04	4.870367e-02
>hsa-mir-548ap	1.625	2.4	0.333	-2.8479969	3.290461	1.000233e-03	4.870367e-02
>hsa-mir-1306	20.938	26.2	12.167	-1.1066328	3.228394	1.244874e-03	4.943854e-02
>hsa-mir-6087	109.000	162.3	20.167	-3.0086185	3.210564	1.324746e-03	4.943854e-02
>hsa-mir-455	46.250	62.6	19.000	-1.7201632	3.209332	1.330436e-03	4.943854e-02
>hsa-mir-548ay	3.875	5.1	1.833	-1.4760281	3.199110	1.378524e-03	4.943854e-02
>hsa-mir-577	13.062	18.2	4.500	-2.0159415	3.193450	1.405835e-03	4.943854e-02

**Tabla 8.16** miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de carcinomas papilares de variante no folicular versus carcinomas papilares de variante folicular.

miRNAs	Media	PTC	FVPTC	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-21	17626.767	20185.829	6430.875	-1.6502559	6.665614	2.635607e-11	1.678881e-08
>hsa-mir-625	65.093	72.829	31.250	-1.2206484	6.429322	1.281743e-10	3.565615e-08
>hsa-mir-1247	101.186	120.029	18.750	-2.6784154	6.388131	1.679254e-10	3.565615e-08
>hsa-mir-129-2	19.116	23.314	0.750	-4.9581798	6.029649	1.643165e-09	2.616740e-07
>hsa-mir-129-1	15.116	18.429	0.625	-4.8819442	5.869673	4.366562e-09	5.563001e-07
>hsa-mir-511-1	7.186	8.343	2.125	-1.9730787	5.478428	4.291217e-08	3.699684e-06
>hsa-mir-511-2	7.186	8.343	2.125	-1.9730787	5.478428	4.291217e-08	3.699684e-06
>hsa-mir-3656	4.186	5.000	0.625	-3.0000000	5.464338	4.646385e-08	3.699684e-06
>hsa-mir-6087	78.209	88.600	32.750	-1.4358118	5.168681	2.357514e-07	1.668596e-05
>hsa-mir-92b	15059.558	16543.229	8568.500	-0.9491262	5.054976	4.304449e-07	2.741934e-05
>hsa-mir-508	10.023	11.686	2.750	-2.0872424	4.898133	9.675150e-07	5.602791e-05
>hsa-mir-196a-2	10.093	12.114	1.250	-3.2767093	4.874734	1.089552e-06	5.783704e-05
>hsa-mir-375	5360.977	6381.457	896.375	-2.8317116	4.843309	1.276946e-06	6.257034e-05
>hsa-mir-136	28.116	33.771	3.375	-3.3228438	4.755094	1.983538e-06	8.901049e-05
>hsa-mir-1273f	21.000	23.714	9.125	-1.3778600	4.743940	2.096008e-06	8.901049e-05
>hsa-mir-432	48.326	57.829	6.750	-3.0988231	4.617249	3.888599e-06	1.548149e-04
>hsa-mir-483	30.651	36.514	5.000	-2.8684610	4.516572	6.284879e-06	2.354981e-04
>hsa-mir-377	14.860	18.114	0.625	-4.8571279	4.489268	7.146832e-06	2.529184e-04
>hsa-mir-134	32.209	38.514	4.625	-3.0578684	4.466467	7.952186e-06	2.666075e-04
>hsa-mir-381	54.070	65.000	6.250	-3.3785116	4.371577	1.233526e-05	3.928779e-04
>hsa-mir-494	8.070	9.857	0.250	-5.3011695	4.357663	1.314584e-05	3.933708e-04
>hsa-mir-370	22.233	26.800	2.250	-3.5742361	4.350451	1.358581e-05	3.933708e-04
>hsa-mir-23a	1431.930	1539.057	963.250	-0.6760646	4.309760	1.634319e-05	4.526352e-04
>hsa-mir-493	32.047	38.371	4.375	-3.1326776	4.293949	1.755232e-05	4.530451e-04
>hsa-mir-4707	2.465	2.971	0.250	-3.5711567	4.291083	1.778042e-05	4.530451e-04
>hsa-mir-382	11.977	14.457	1.125	-3.6837856	4.244988	2.186047e-05	5.355814e-04
>hsa-mir-1249	42.884	48.114	20.000	-1.2664653	4.216264	2.483828e-05	5.859993e-04
>hsa-mir-4802	6.512	7.486	2.250	-1.7342150	4.122725	3.744174e-05	8.517995e-04
>hsa-mir-485	53.372	64.943	2.750	-4.5616673	4.053048	5.055465e-05	1.043272e-03
>hsa-mir-654	60.884	72.800	8.750	-3.0565835	4.051374	5.091776e-05	1.043272e-03
>hsa-mir-766	30.209	33.343	16.500	-1.0149117	4.049408	5.134745e-05	1.043272e-03
>hsa-mir-509-3	35.349	41.114	10.125	-2.0217179	4.044615	5.240926e-05	1.043272e-03
>hsa-mir-509-1	34.535	40.086	10.250	-1.9674643	4.016183	5.914824e-05	1.108160e-03
>hsa-mir-509-2	34.535	40.086	10.250	-1.9674643	4.016183	5.914824e-05	1.108160e-03
>hsa-mir-146a	663.256	740.686	324.500	-1.1906430	3.989086	6.632850e-05	1.207179e-03
>hsa-mir-376c	2.512	3.057	0.125	-4.6121840	3.967540	7.261844e-05	1.256593e-03
>hsa-mir-184	6.930	8.257	1.125	-2.8757177	3.961344	7.452921e-05	1.256593e-03
>hsa-mir-411	61.907	74.371	7.375	-3.3340335	3.959962	7.496159e-05	1.256593e-03
>hsa-mir-196a-1	9.372	11.286	1.000	-3.4964258	3.931253	8.450425e-05	1.380236e-03
>hsa-mir-410	27.302	32.657	3.875	-3.0751304	3.906691	9.356867e-05	1.490081e-03
>hsa-mir-487b	16.070	19.429	1.375	-3.8206763	3.897940	9.701437e-05	1.507272e-03
>hsa-mir-431	14.535	17.543	1.375	-3.6733802	3.876740	1.058652e-04	1.605623e-03
>hsa-mir-505	79.558	85.286	54.500	-0.6460479	3.855253	1.156098e-04	1.633866e-03
>hsa-mir-150	3772.163	4453.600	790.875	-2.4934504	3.852823	1.167638e-04	1.633866e-03
>hsa-mir-3195	15.140	17.229	6.000	-1.5217687	3.852044	1.171360e-04	1.633866e-03
>hsa-mir-513c	1.884	2.229	0.375	-2.5711567	3.847769	1.191982e-04	1.633866e-03
>hsa-mir-323a	4.558	5.571	0.125	-5.4780473	3.841737	1.221665e-04	1.633866e-03
>hsa-mir-3168	10.628	12.657	1.750	-2.8545249	3.839835	1.231171e-04	1.633866e-03
>hsa-mir-675	2.140	2.571	0.250	-3.3625701	3.816623	1.352909e-04	1.758781e-03
>hsa-mir-1228	2.767	3.229	0.750	-2.1059334	3.794181	1.481313e-04	1.870844e-03
>hsa-mir-1323	72.581	88.771	1.750	-5.6646686	3.791426	1.497850e-04	1.870844e-03

>hsa-mir-132	217.721	235.543	139.750	-0.7531413	3.784729	1.538760e-04	1.884981e-03
>hsa-mir-369	4.233	5.171	0.125	-5.3705629	3.671022	2.415823e-04	2.903545e-03
>hsa-mir-96	57.233	40.657	129.750	1.6741538	3.645088	2.673007e-04	3.153158e-03
>hsa-mir-433	8.488	9.886	2.375	-2.0574177	3.604076	3.132648e-04	3.628176e-03
>hsa-mir-1251	32.767	25.343	65.250	1.3643987	3.581267	3.419316e-04	3.889472e-03
>hsa-mir-363	61.837	52.286	103.625	0.9868834	3.545203	3.923110e-04	4.384247e-03
>hsa-mir-6503	6.628	7.457	3.000	-1.3136605	3.531662	4.129571e-04	4.535408e-03
>hsa-mir-1185-1	4.512	5.486	0.250	-4.4556795	3.505723	4.553680e-04	4.916431e-03
>hsa-mir-323b	2.488	3.029	0.125	-4.5986374	3.478890	5.034955e-04	5.345444e-03
>hsa-mir-299	4.233	5.086	0.500	-3.3464504	3.449891	5.608124e-04	5.856353e-03
>hsa-mir-4461	12.581	14.486	4.250	-1.7690961	3.366805	7.604438e-04	7.688932e-03
>hsa-mir-539	3.674	4.429	0.375	-3.5618789	3.362062	7.736274e-04	7.700011e-03
>hsa-mir-629	46.465	50.029	30.875	-0.6963131	3.315405	9.151042e-04	8.895950e-03
>hsa-mir-650	3.256	3.971	0.125	-4.9896581	3.296837	9.778012e-04	9.296408e-03
>hsa-mir-4677	4.442	4.914	2.375	-1.0490542	3.285301	1.018735e-03	9.543147e-03
>hsa-mir-4419a	5.698	6.257	3.250	-0.9450643	3.281137	1.033894e-03	9.544785e-03
>hsa-mir-147b	2.395	2.771	0.750	-1.8856673	3.249104	1.157692e-03	1.053500e-02
>hsa-mir-3929	14.628	15.943	8.875	-0.8450912	3.229502	1.240062e-03	1.112562e-02
>hsa-mir-3159	23.837	26.000	14.375	-0.8549497	3.225193	1.258878e-03	1.113757e-02
>hsa-mir-3622a	22.465	25.029	11.250	-1.1536509	3.198720	1.380392e-03	1.184262e-02
>hsa-mir-3622b	22.465	25.029	11.250	-1.1536509	3.198720	1.380392e-03	1.184262e-02
>hsa-mir-33a	4.000	4.371	2.375	-0.8801773	3.193714	1.404552e-03	1.184262e-02
>hsa-mir-513a-1	2.047	2.400	0.500	-2.2630344	3.191996	1.412935e-03	1.184262e-02
>hsa-mir-513a-2	2.000	2.343	0.500	-2.2282690	3.163531	1.558676e-03	1.280209e-02
>hsa-mir-1273g	28.581	31.229	17.000	-0.8773318	3.161869	1.567602e-03	1.280209e-02
>hsa-mir-506	2.233	2.629	0.500	-2.3942789	3.130690	1.743960e-03	1.406205e-02
>hsa-mir-215	7.837	6.857	12.125	0.8223053	3.126778	1.767331e-03	1.407238e-02
>hsa-mir-4430	2.907	3.229	1.500	-1.1059334	3.118493	1.817783e-03	1.429540e-02
>hsa-mir-337	2.093	2.571	0.000	NA	3.110207	1.869564e-03	1.445665e-02
>hsa-mir-577	11.233	7.057	29.500	2.0635588	3.107985	1.883677e-03	1.445665e-02
>hsa-mir-152	486.140	401.971	854.375	1.0877765	3.084520	2.038809e-03	1.514930e-02
>hsa-mir-501	609.395	518.343	1007.750	0.9591592	3.083578	2.045275e-03	1.514930e-02
>hsa-mir-30c-2	4721.535	4280.743	6650.000	0.6354932	3.050005	2.288376e-03	1.675512e-02
>hsa-mir-100	11356.233	9067.686	21368.625	1.2366878	3.024238	2.492599e-03	1.761502e-02
>hsa-mir-371a	8.047	9.429	2.000	-2.2370392	3.020280	2.525410e-03	1.761502e-02
>hsa-mir-371b	8.047	9.429	2.000	-2.2370392	3.020280	2.525410e-03	1.761502e-02
>hsa-mir-5010	28.140	30.400	18.250	-0.7361749	3.018499	2.540303e-03	1.761502e-02
>hsa-mir-543	2.256	2.686	0.375	-2.8403433	3.011848	2.596628e-03	1.761502e-02
>hsa-mir-3135b	6.070	6.743	3.125	-1.1095038	3.009915	2.613209e-03	1.761502e-02
>hsa-mir-221	28168.140	31463.657	13750.250	-1.1942285	2.999941	2.700318e-03	1.791774e-02
>hsa-mir-3609	76.000	83.600	42.750	-0.9675785	2.980506	2.877722e-03	1.889803e-02
>hsa-mir-551b	21.023	24.343	6.500	-1.9049869	2.969078	2.986943e-03	1.941513e-02
>hsa-mir-30c-1	4427.349	3996.686	6311.500	0.6591788	2.959136	3.085028e-03	1.985013e-02
>hsa-mir-487a	3.233	3.886	0.375	-3.3732173	2.907211	3.646676e-03	2.295450e-02
>hsa-mir-1273a	127.279	137.771	81.375	-0.7596192	2.906227	3.658162e-03	2.295450e-02
>hsa-mir-4449	8.140	8.943	4.625	-0.9512825	2.904738	3.675603e-03	2.295450e-02
>hsa-mir-1185-2	2.698	3.286	0.125	-4.7162070	2.894168	3.801646e-03	2.351115e-02
>hsa-mir-619	29.116	31.771	17.500	-0.8603750	2.879463	3.983529e-03	2.439912e-02
>hsa-mir-500a	805.837	705.743	1243.750	0.8174820	2.865024	4.169775e-03	2.529664e-02
>hsa-mir-183	886.558	702.600	1691.375	1.2674211	2.854624	4.308780e-03	2.589333e-02
>hsa-mir-154	2.093	2.543	0.125	-4.3464504	2.851548	4.350690e-03	2.590084e-02
>hsa-mir-126	4766.512	4183.771	7316.000	0.8062510	2.844143	4.453110e-03	2.622082e-02
>hsa-mir-373	8.953	10.486	2.250	-2.2204282	2.841743	4.486766e-03	2.622082e-02
>hsa-mir-4649	1.512	1.771	0.375	-2.2399508	2.835204	4.579636e-03	2.652026e-02
>hsa-mir-665	4.302	5.143	0.625	-3.0406420	2.810123	4.952253e-03	2.822233e-02
>hsa-mir-2116	6.837	7.457	4.125	-0.8542289	2.808742	4.973551e-03	2.822233e-02
>hsa-mir-155	963.977	1086.657	427.250	-1.3467444	2.806617	5.006474e-03	2.822233e-02
>hsa-mir-376a-1	4.093	4.914	0.500	-3.2969817	2.800679	5.099522e-03	2.849470e-02
>hsa-mir-758	4.256	5.029	0.875	-2.5227937	2.796313	5.168927e-03	2.863136e-02
>hsa-mir-484	1106.372	1008.171	1536.000	0.6074372	2.790426	5.263871e-03	2.890592e-02
>hsa-mir-1295a	1.093	1.286	0.250	-2.3625701	2.786053	5.335412e-03	2.904835e-02
>hsa-mir-5588	2.744	3.057	1.375	-1.1527524	2.771935	5.572421e-03	3.008163e-02
>hsa-mir-1273e	45.698	49.286	30.000	-0.7162070	2.756019	5.850957e-03	3.113768e-02
>hsa-mir-30e	4108.814	3690.600	5938.500	0.6862432	2.755190	5.865811e-03	3.113768e-02
>hsa-mir-5096	63.791	70.629	33.875	-1.0600310	2.750078	5.958113e-03	3.136627e-02
>hsa-mir-767	5.628	6.857	0.250	-4.7776076	2.741721	6.111815e-03	3.191169e-02
>hsa-mir-4791	4.465	5.029	2.000	-1.3301486	2.738637	6.169443e-03	3.195069e-02
>hsa-mir-612	2.744	3.229	0.625	-2.3689679	2.730857	6.316993e-03	3.219140e-02
>hsa-mir-4492	1.977	2.257	0.750	-1.5895352	2.696453	7.008222e-03	3.515148e-02
>hsa-mir-99b	32360.930	27499.343	53630.375	0.9636532	2.689656	7.152569e-03	3.531927e-02
>hsa-mir-4787	41.860	45.229	27.125	-0.7376113	2.682573	7.305831e-03	3.573220e-02
>hsa-mir-4508	2.512	2.771	1.375	-1.0111982	2.680630	7.348380e-03	3.573220e-02
>hsa-mir-889	3.047	3.571	0.750	-2.2515388	2.677548	7.416332e-03	3.578942e-02
>hsa-mir-99a	1964.814	1678.943	3215.500	0.9374900	2.668494	7.619221e-03	3.649206e-02
>hsa-mir-190a	36.093	27.400	74.125	1.4357843	2.665582	7.685511e-03	3.653486e-02
>hsa-mir-873	41.628	24.743	115.500	2.2228088	2.649931	8.050832e-03	3.798800e-02
>hsa-mir-9-3	4.512	5.114	1.875	-1.4476422	2.630477	8.526508e-03	3.966467e-02
>hsa-mir-187	41.163	46.771	16.625	-1.4922732	2.628260	8.582283e-03	3.966467e-02
>hsa-mir-4485	91.023	101.200	46.500	-1.1219067	2.627837	8.592975e-03	3.966467e-02
>hsa-mir-379	1.953	2.343	0.250	-3.2282690	2.608131	9.103798e-03	4.142228e-02
>hsa-mir-4478	2.953	3.314	1.375	-1.2692664	2.583863	9.770058e-03	4.413849e-02
>hsa-mir-135a-2	1213.814	1058.486	1893.375	0.8389584	2.574103	1.005004e-02	4.508364e-02
>hsa-mir-30a	25826.605	23393.971	36469.375	0.6405487	2.567938	1.023054e-02	4.529373e-02
>hsa-mir-3934	11.628	12.543	7.625	-0.7180568	2.567649	1.023909e-02	4.529373e-02
>hsa-mir-222	18703.279	20768.086	9669.750	-1.1028177	2.561350	1.042663e-02	4.580528e-02
>hsa-mir-3614	2.395	2.657	1.250	-1.0879477	2.534224	1.126965e-02	4.916964e-02

**Tabla 8.17** miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de carcinomas papilares versus carcinomas foliculares.

miRNAs	Media	PTC	FTC	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-181b-1	15416.244	17372.571	4004.333	-2.1171773	8.516400	1.645895e-17	5.992760e-15
>hsa-mir-181b-2	15518.512	17484.143	4052.333	-2.1092223	8.511987	1.709775e-17	5.992760e-15
>hsa-mir-1247	91.049	105.200	8.500	-3.6295281	7.482849	7.272831e-14	1.699418e-11
>hsa-mir-574	1307.951	1446.486	499.833	-1.5330331	7.087917	1.361454e-12	2.385949e-10
>hsa-mir-744	923.146	1013.857	394.000	-1.3635868	6.608569	3.880534e-11	5.440508e-09
>hsa-mir-296	61.049	67.886	21.167	-1.6813139	6.581199	4.666695e-11	5.452255e-09
>hsa-mir-375	4623.268	5406.057	57.000	-6.5674710	6.061369	1.349677e-09	1.351605e-07
>hsa-mir-181c	2601.756	2875.857	1002.833	-1.5199102	5.978064	2.258053e-09	1.978619e-07
>hsa-mir-146b	70120.098	82014.771	734.500	-6.8029775	5.906388	3.496893e-09	2.723691e-07
>hsa-mir-6087	67.683	75.857	20.000	-1.9232850	5.879741	4.109100e-09	2.880479e-07
>hsa-mir-328	714.293	775.800	355.500	-1.1258352	5.813516	6.117417e-09	3.319230e-07
>hsa-mir-3622a	18.707	21.229	4.000	-2.4079354	5.812478	6.155491e-09	3.319230e-07
>hsa-mir-3622b	18.707	21.229	4.000	-2.4079354	5.812478	6.155491e-09	3.319230e-07
>hsa-mir-23b	3377.293	3640.371	1842.667	-0.9822905	5.667729	1.447029e-08	7.041253e-07
>hsa-mir-21	15477.780	17216.343	5336.167	-1.6899031	5.660800	1.506687e-08	7.041253e-07
>hsa-mir-3168	8.902	10.371	0.333	-4.9595052	5.584523	2.343432e-08	1.026716e-06
>hsa-mir-551b	17.073	19.914	0.500	-5.3157318	5.385273	7.233481e-08	2.982747e-06
>hsa-mir-3614	1.902	2.200	0.167	-3.7224660	5.243234	1.577863e-07	6.144899e-06
>hsa-mir-1291	43.537	37.629	78.000	1.0516456	5.223875	1.752176e-07	6.464606e-06
>hsa-mir-1249	37.122	41.200	13.333	-1.6276068	5.078371	3.806839e-07	1.334297e-05
>hsa-mir-627	1.341	1.543	0.167	-3.2105670	4.987002	6.132336e-07	1.965741e-05
>hsa-mir-4791	3.659	4.229	0.333	-3.6651328	4.985843	6.169231e-07	1.965741e-05
>hsa-mir-4787	34.415	38.000	13.500	-1.4930400	4.869553	1.118510e-06	3.409024e-05
>hsa-mir-6503	5.512	6.257	1.167	-2.4231116	4.829374	1.369626e-06	4.000450e-05
>hsa-mir-196a-2	9.341	10.714	1.333	-3.0064263	4.816583	1.460378e-06	4.094899e-05
>hsa-mir-223	38.341	42.429	14.500	-1.5489832	4.803126	1.562072e-06	4.211586e-05
>hsa-mir-31	2878.707	3356.914	89.167	-5.2344874	4.757186	1.963104e-06	5.096799e-05
>hsa-mir-2277	14.902	16.200	7.333	-1.1434528	4.690370	2.727108e-06	6.827510e-05
>hsa-mir-629	38.024	41.943	15.167	-1.4675211	4.626373	3.721244e-06	8.995146e-05
>hsa-mir-146a	567.902	631.657	196.000	-1.6882880	4.520360	6.173463e-06	1.437179e-04
>hsa-mir-29c	606.488	660.086	293.833	-1.1676553	4.514202	6.355569e-06	1.437179e-04
>hsa-mir-4448	3.756	4.343	0.333	-3.7036070	4.501429	6.749797e-06	1.478627e-04
>hsa-mir-193b	375.976	415.771	143.833	-1.5313926	4.482928	7.362592e-06	1.563993e-04
>hsa-mir-130a	1346.960	1499.486	453.333	-1.7258236	4.467325	7.920393e-06	1.632999e-04
>hsa-mir-129-1	13.220	15.029	2.667	-2.4945985	4.460704	8.169074e-06	1.636149e-04
>hsa-mir-3934	9.610	10.629	3.667	-1.5354067	4.403204	1.066637e-05	2.070965e-04
>hsa-mir-27b	23072.634	24759.029	13235.333	-0.9035602	4.397888	1.093091e-05	2.070965e-04
>hsa-mir-184	6.195	7.171	0.500	-3.8422605	4.371457	1.234201e-05	2.276776e-04
>hsa-mir-152	441.780	345.486	1003.500	1.5383427	4.332648	1.473265e-05	2.648099e-04
>hsa-mir-4649	1.390	1.629	0.000	NA	4.322192	1.544867e-05	2.707379e-04
>hsa-mir-187	33.293	38.257	4.333	-3.1421800	4.301512	1.696365e-05	2.900371e-04
>hsa-mir-15a	391.415	418.371	234.167	-0.8372486	4.281649	1.855136e-05	3.096311e-04
>hsa-mir-196a-1	8.732	10.057	1.000	-3.3301486	4.266851	1.982513e-05	3.208143e-04
>hsa-mir-150	3286.195	3795.743	313.833	-3.5963118	4.263370	2.013670e-05	3.208143e-04
>hsa-mir-769	425.195	449.914	281.000	-0.6790800	4.227655	2.361396e-05	3.678531e-04
>hsa-mir-455	127.902	146.600	18.833	-2.9605248	4.213129	2.518568e-05	3.838079e-04
>hsa-mir-4661	2.512	2.829	0.667	-2.0850361	4.133137	3.578450e-05	5.280255e-04
>hsa-mir-147b	2.073	2.371	0.333	-2.8307189	4.130765	3.615581e-05	5.280255e-04
>hsa-mir-5193	1.073	1.229	0.167	-2.8819442	4.078274	4.537120e-05	6.441239e-04
>hsa-mir-650	2.805	3.286	0.000	NA	4.075360	4.594321e-05	6.441239e-04
>hsa-mir-511-1	6.415	7.171	2.000	-1.8422605	3.988207	6.657470e-05	8.974782e-04
>hsa-mir-511-2	6.415	7.171	2.000	-1.8422605	3.988207	6.657470e-05	8.974782e-04
>hsa-mir-129-2	16.488	18.886	2.500	-2.9172953	3.962727	7.409857e-05	9.763587e-04
>hsa-mir-186	2814.220	3008.829	1679.000	-0.8415997	3.959167	7.521165e-05	9.763587e-04
>hsa-mir-142	755.244	855.971	167.667	-2.3519667	3.893457	9.882592e-05	1.242016e-03
>hsa-mir-151b	3431.854	3682.886	1967.500	-0.9044730	3.892493	9.921953e-05	1.242016e-03
>hsa-mir-26a-2	42858.244	46054.914	24211.000	-0.9276924	3.881797	1.036874e-04	1.260721e-03
>hsa-mir-26a-1	42847.439	46049.143	24170.833	-0.9299071	3.880340	1.043107e-04	1.260721e-03
>hsa-mir-491	9.732	10.714	4.000	-1.4214638	3.843808	1.211400e-04	1.439308e-03
>hsa-mir-211	0.854	1.000	0.000	NA	3.806931	1.407020e-04	1.638112e-03
>hsa-mir-509-3	30.707	34.543	8.333	-2.0514218	3.803708	1.425461e-04	1.638112e-03
>hsa-mir-3194	1.049	1.200	0.167	-2.8479969	3.778868	1.575430e-04	1.756754e-03
>hsa-mir-509-1	29.951	33.657	8.333	-2.0139471	3.774126	1.605698e-04	1.756754e-03
>hsa-mir-509-2	29.951	33.657	8.333	-2.0139471	3.774126	1.605698e-04	1.756754e-03
>hsa-mir-1323	55.366	64.771	0.500	-7.0172857	3.770540	1.628944e-04	1.756754e-03
>hsa-mir-381	52.610	60.000	9.500	-2.6589631	3.732160	1.898447e-04	1.973023e-03
>hsa-mir-101-1	1885.366	2016.771	1118.833	-0.8500524	3.729232	1.920645e-04	1.973023e-03
>hsa-mir-101-2	1876.561	2007.400	1113.333	-0.8504425	3.726932	1.938250e-04	1.973023e-03
>hsa-mir-4532	235.756	254.457	126.667	-1.0063858	3.726436	1.942063e-04	1.973023e-03
>hsa-mir-376c	2.415	2.800	0.167	-4.0703893	3.717660	2.010770e-04	2.011271e-03
>hsa-mir-33a	3.098	3.457	1.000	-1.7895802	3.714371	2.037094e-04	2.011271e-03
>hsa-mir-1245a	0.634	0.743	0.000	NA	3.670421	2.421510e-04	2.325313e-03
>hsa-mir-1245b	0.634	0.743	0.000	NA	3.670421	2.421510e-04	2.325313e-03
>hsa-mir-370	21.927	25.000	4.000	-2.6438562	3.660212	2.520071e-04	2.387256e-03
>hsa-mir-494	7.805	9.143	0.000	NA	3.650041	2.621982e-04	2.450679e-03
>hsa-mir-431	14.268	16.314	2.333	-2.8056715	3.642376	2.701331e-04	2.491623e-03
>hsa-mir-1913	2.122	2.400	0.500	-2.2630344	3.610357	3.057757e-04	2.783750e-03
>hsa-mir-218-1	96.488	104.714	48.500	-1.1104016	3.603745	3.136653e-04	2.818966e-03
>hsa-mir-9-1	4.098	4.657	0.833	-2.4824795	3.555298	3.775510e-04	3.267448e-03

>hsa-mir-9-2	4.098	4.657	0.833	-2.4824795	3.555298	3.775510e-04	3.267448e-03
>hsa-mir-9-3	4.098	4.657	0.833	-2.4824795	3.555298	3.775510e-04	3.267448e-03
>hsa-mir-181a-2	222738.171	244548.371	95512.000	-1.3563659	3.516986	4.364771e-04	3.731347e-03
>hsa-mir-181a-1	221567.585	243362.886	94428.333	-1.3658175	3.497249	4.700837e-04	3.970225e-03
>hsa-mir-758	4.049	4.600	0.833	-2.4646683	3.494040	4.757703e-04	3.970416e-03
>hsa-mir-1306	21.220	22.829	11.833	-0.9479841	3.480199	5.010422e-04	4.132125e-03
>hsa-mir-155	839.268	917.029	385.667	-1.2496122	3.441859	5.777317e-04	4.709185e-03
>hsa-mir-382	11.756	13.286	2.833	-2.2293035	3.414997	6.378272e-04	5.139275e-03
>hsa-mir-485	53.195	60.400	11.167	-2.4353500	3.411396	6.463109e-04	5.141611e-03
>hsa-mir-4443	28.024	31.143	9.833	-1.6631489	3.407437	6.557595e-04	5.141611e-03
>hsa-mir-659	4.756	5.143	2.500	-1.0406420	3.405628	6.601213e-04	5.141611e-03
>hsa-mir-29a	4532.073	4797.286	2985.000	-0.6844874	3.312926	9.232547e-04	7.034279e-03
>hsa-mir-125b-1	27422.537	30486.314	9550.500	-1.6745136	3.307164	9.424554e-04	7.103884e-03
>hsa-mir-20b	8.659	6.857	19.167	1.4829200	3.262609	1.103919e-03	8.232417e-03
>hsa-mir-487b	15.854	18.114	2.667	-2.7640185	3.231558	1.231174e-03	9.084765e-03
>hsa-mir-4449	9.780	7.457	23.333	1.6456975	3.222427	1.271095e-03	9.281638e-03
>hsa-mir-106a	4.488	3.600	9.667	1.4250216	3.176435	1.490973e-03	1.074306e-02
>hsa-mir-1227	7.341	3.400	30.333	3.1572974	3.174320	1.501882e-03	1.074306e-02
>hsa-mir-410	27.024	30.200	8.500	-1.8290138	3.110814	1.865726e-03	1.310935e-02
>hsa-mir-205	422.585	493.686	7.833	-5.9778227	3.110123	1.870092e-03	1.310935e-02
>hsa-mir-15b	365.463	390.657	218.500	-0.8382697	3.100159	1.934171e-03	1.342479e-02
>hsa-mir-345	1152.244	1264.286	498.667	-1.3421749	3.089026	2.008137e-03	1.380102e-02
>hsa-mir-1914	0.902	1.029	0.167	-2.6256045	3.045009	2.326733e-03	1.583534e-02
>hsa-mir-660	81.000	75.314	114.167	0.6001460	3.000486	2.695494e-03	1.799563e-02
>hsa-mir-541	0.463	0.543	0.000	NA	2.992620	2.765939e-03	1.829173e-02
>hsa-mir-3065	63.439	69.171	30.000	-1.2052138	2.980627	2.876590e-03	1.867120e-02
>hsa-mir-338	63.439	69.171	30.000	-1.2052138	2.980627	2.876590e-03	1.867120e-02
>hsa-mir-3129	1.073	1.229	0.167	-2.8819442	2.954113	3.135696e-03	2.016627e-02
>hsa-mir-1277	1.537	1.714	0.500	-1.7776076	2.947868	3.199738e-03	2.039106e-02
>hsa-mir-5683	1.293	1.486	0.167	-3.1561192	2.941950	3.261531e-03	2.059760e-02
>hsa-mir-181d	559.171	602.257	307.833	-0.9682301	2.922505	3.472283e-03	2.173277e-02
>hsa-mir-4687	6.293	6.829	3.167	-1.1086188	2.898733	3.746734e-03	2.324301e-02
>hsa-mir-612	2.561	2.857	0.833	-1.7776076	2.885238	3.911174e-03	2.405029e-02
>hsa-mir-219-1	24.439	9.886	109.333	3.4672443	2.880332	3.972565e-03	2.421414e-02
>hsa-mir-548ae-2	1.902	2.086	0.833	-1.3235759	2.873176	4.063676e-03	2.421414e-02
>hsa-mir-371a	6.293	7.086	1.667	-2.0879477	2.868699	4.121633e-03	2.421414e-02
>hsa-mir-371b	6.293	7.086	1.667	-2.0879477	2.868699	4.121633e-03	2.421414e-02
>hsa-mir-766	26.561	28.657	14.333	-0.9995206	2.866925	4.144807e-03	2.421414e-02
>hsa-mir-3926-1	0.366	0.429	0.000	NA	2.866905	4.145074e-03	2.421414e-02
>hsa-mir-3195	13.634	14.857	6.500	-1.1926451	2.849897	4.373335e-03	2.533643e-02
>hsa-mir-342	459.561	491.886	271.000	-0.8600303	2.833298	4.607040e-03	2.647160e-02
>hsa-mir-767	5.585	6.514	0.167	-5.2885695	2.783718	5.373981e-03	3.062732e-02
>hsa-mir-323a	4.561	5.286	0.333	-3.9870609	2.772682	5.559645e-03	3.142993e-02
>hsa-mir-548j	1.049	0.771	2.667	1.7894330	2.755686	5.856926e-03	3.284564e-02
>hsa-mir-654	60.073	66.686	21.500	-1.6330411	2.752089	5.921641e-03	3.294500e-02
>hsa-mir-27a	2151.122	2269.486	1460.667	-0.6357384	2.745187	6.047638e-03	3.338106e-02
>hsa-mir-4536-1	0.512	0.600	0.000	NA	2.735614	6.226405e-03	3.383496e-02
>hsa-mir-4536-2	0.512	0.600	0.000	NA	2.735614	6.226405e-03	3.383496e-02
>hsa-mir-4797	0.488	0.571	0.000	NA	2.727761	6.376571e-03	3.409880e-02
>hsa-mir-1226	38.098	16.057	166.667	3.3756785	2.721186	6.504812e-03	3.409880e-02
>hsa-mir-411	61.439	68.543	20.000	-1.7770063	2.715793	6.611732e-03	3.409880e-02
>hsa-mir-5571	2.244	2.629	0.000	NA	2.715606	6.615460e-03	3.409880e-02
>hsa-mir-369	4.195	4.743	1.000	-2.2457564	2.710624	6.715674e-03	3.428315e-02
>hsa-mir-1266	8.707	9.514	4.000	-1.2500954	2.708980	6.749036e-03	3.428315e-02
>hsa-mir-3940	7.073	7.714	3.333	-1.2105670	2.691937	7.103829e-03	3.582578e-02
>hsa-mir-548y	0.780	0.429	2.833	2.7248928	2.678162	7.402744e-03	3.706660e-02
>hsa-mir-362	28.561	19.371	82.167	2.0846229	2.653381	7.968984e-03	3.961885e-02
>hsa-mir-592	2.122	2.314	1.000	-1.2105670	2.639315	8.307366e-03	4.056854e-02
>hsa-mir-34c	30.220	33.343	12.000	-1.4743433	2.633772	8.444219e-03	4.082343e-02
>hsa-mir-496	0.439	0.514	0.000	NA	2.604772	9.193553e-03	4.389168e-02
>hsa-mir-454	94.293	71.657	226.333	1.6592666	2.604379	9.204104e-03	4.389168e-02

**Tabla 8.18** miRNAs diferencialmente expresados en la comparación de carcinomas papilares  $BRAF^{V600E}$  versus  $BRAF^{WT}$ .

miRNAs	Media	No Mut	Mut	log2fc	stat	pval	pval.adjust
>hsa-mir-130b	139.086	207.867	87.50	-1.2483035	4.048428	5.156269e-05	0.01183576
>hsa-mir-135b	104.086	72.400	127.85	0.8203906	4.040760	5.327837e-05	0.01183576
>hsa-mir-129-2	21.257	3.067	34.90	3.5084838	3.853301	1.165360e-04	0.01183576
>hsa-mir-1323	73.486	166.533	3.70	-5.4921419	3.789117	1.511838e-04	0.01183576
>hsa-mir-129-1	16.714	2.733	27.20	3.3148733	3.778333	1.578816e-04	0.01183576
>hsa-mir-203a	189.400	100.667	255.95	1.3462760	3.735078	1.876572e-04	0.01183576
>hsa-mir-203b	189.143	100.400	255.70	1.3486929	3.733294	1.889921e-04	0.01183576
>hsa-mir-654	78.943	152.533	23.75	-2.6831251	3.707396	2.094012e-04	0.01183576
>hsa-mir-411	81.000	160.467	21.40	-2.9065909	3.696339	2.187306e-04	0.01183576
>hsa-mir-485	72.171	147.200	15.90	-3.2106790	3.641892	2.706415e-04	0.01318024
>hsa-mir-133a-1	141.971	211.533	89.80	-1.2360977	3.574477	3.509289e-04	0.01387994
>hsa-mir-133a-2	141.971	211.533	89.80	-1.2360977	3.574477	3.509289e-04	0.01387994
>hsa-mir-371a	8.086	17.467	1.05	-4.0561431	3.540736	3.990127e-04	0.01387994
>hsa-mir-371b	8.086	17.467	1.05	-4.0561431	3.540736	3.990127e-04	0.01387994
>hsa-mir-431	19.571	40.933	3.55	-3.5273852	3.518227	4.344399e-04	0.01410481
>hsa-let-7e	12318.486	9194.067	14661.80	0.6732872	3.481973	4.977334e-04	0.01514976
>hsa-mir-187	43.486	85.667	11.85	-2.8538469	3.378455	7.289424e-04	0.01986743
>hsa-mir-377	19.914	40.400	4.55	-3.1504168	3.376434	7.343199e-04	0.01986743
>hsa-mir-381	71.171	142.333	17.80	-2.9993244	3.325395	8.829336e-04	0.02191469
>hsa-mir-133b	10.886	16.933	6.35	-1.4150375	3.315820	9.137474e-04	0.02191469
>hsa-mir-887	59.371	84.533	40.50	-1.0615984	3.306413	9.449865e-04	0.02191469
>hsa-mir-145	1364.943	1863.067	991.35	-0.9102129	3.240517	1.193131e-03	0.02504015
>hsa-mir-34a	1416.914	759.400	1910.05	1.3306785	3.222483	1.270846e-03	0.02504015
>hsa-mir-29a	5262.657	4003.467	6207.05	0.6326580	3.199257	1.377822e-03	0.02504015
>hsa-mir-873	23.114	38.533	11.55	-1.7382141	3.192367	1.411120e-03	0.02504015
>hsa-mir-7-2	54.800	108.400	14.60	-2.8923245	3.191584	1.414951e-03	0.02504015
>hsa-let-7i	34208.400	23488.533	42248.30	0.8469367	3.186575	1.439680e-03	0.02504015
>hsa-mir-483	39.457	75.000	12.80	-2.5507468	3.134010	1.724350e-03	0.02842926
>hsa-mir-3529	52.800	104.200	14.25	-2.8703215	3.127007	1.765959e-03	0.02842926
>hsa-mir-1285-2	22.857	28.600	18.55	-0.6245960	3.119812	1.809666e-03	0.02842926
>hsa-mir-940	15.114	22.467	9.60	-1.2266798	3.095044	1.967839e-03	0.02994804
>hsa-mir-301b	8.771	14.067	4.80	-1.5511742	3.037508	2.385430e-03	0.03520317
>hsa-mir-365a	53.029	75.600	36.10	-1.0663874	3.013447	2.582982e-03	0.03643809
>hsa-mir-758	5.543	10.933	1.50	-2.8656989	3.009271	2.618754e-03	0.03643809
>hsa-mir-432	62.086	118.200	20.00	-2.5631581	2.960854	3.067874e-03	0.04042391
>hsa-mir-375	5919.714	3063.733	8061.70	1.3957934	2.960518	3.071221e-03	0.04042391
>hsa-mir-29b-1	164.400	126.600	192.75	0.6064535	2.945036	3.229166e-03	0.04067485
>hsa-mir-370	30.029	61.533	6.40	-3.2652243	2.942349	3.257329e-03	0.04067485
>hsa-mir-2114	3.086	5.200	1.50	-1.7935491	2.925055	3.443953e-03	0.04193013
>hsa-mir-373	9.229	17.667	2.90	-2.6069051	2.916668	3.537922e-03	0.04202361
>hsa-mir-365b	56.886	78.200	40.90	-0.9350678	2.878813	3.991744e-03	0.04486274
>hsa-mir-1910	3.200	5.000	1.85	-1.4344028	2.868339	4.126329e-03	0.04486274
>hsa-mir-376a-1	5.457	11.333	1.05	-3.4321110	2.860879	4.224682e-03	0.04486274
>hsa-mir-410	35.800	73.400	7.60	-3.2717087	2.856728	4.280322e-03	0.04486274
>hsa-mir-219-1	11.086	17.867	6.00	-1.5742361	2.853682	4.321582e-03	0.04486274
>hsa-mir-221	28817.571	17859.333	37036.25	1.0522598	2.853088	4.329669e-03	0.04486274
>hsa-mir-3928	4.714	6.667	3.25	-1.0365259	2.812113	4.921718e-03	0.04993493

