



Facultad de Medicina – Universidad de Valladolid

Departamento de Anatomía Patológica

**HETEROGENEIDAD GENÉTICA INTRATUMORAL
ESPACIO-TEMPORAL Y EVOLUCIÓN CLONAL EN EL
CARCINOMA PAPILAR AVANZADO DE TIROIDES CON
METÁSTASIS A DISTANCIA**

**“Spatio-temporal intra-tumor genetic heterogeneity
and clonal evolution in advanced papillary thyroid
carcinomas and matched distant metastases”**

Realizado por el alumno D. José Javier Estébanez García

Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM)

Grupo Patobiología del Cáncer: Heterogeneidad inter-, intra-tumoral y Dianas Moleculares

Periodo ejecución Junio 2018 – Marzo 2020

Tutorizado por la Dra. Ginesa M^a García - Rostán y Pérez, MD, PhD

Trabajo Fin de Grado – Curso 2019-2020

ÍNDICE

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	2
2.1.- EXORDIUM EN PATOBIOLOGIA TUMORAL.....	2
2.2.- CÁNCER DE TIROIDES.....	4
2.2.1.- HISTOLOGÍA DEL TIROIDES.....	4
2.2.2.- PATOLOGÍA TUMORAL – INCIDENCIA - FACTORES DE RIESGO - CLASIFICACIÓN.....	4
2.2.3.- CARCINOMAS PAPILARES (PTC) DE ALTO RIESGO, AVANZADOS CON METÁSTASIS A DISTANCIA, RESISTENTES A RADIOYODO	6
3.- OBJETIVOS	8
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	8
4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO: IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	8
4.2.- METODOLOGÍA	10
4.2.1.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	10
4.2.2.- CUANTIFICACIÓN, PUREZA Y CALIDAD DEL ADN GENÓMICO	11
4.2.3.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	11
4.2.4.- GRADIENTE DE OPTIMIZACIÓN DE PCRS.....	12
4.2.5.- SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM).....	13
4.2.6.- PURIFICACIÓN DEL ADN	13
4.2.7.- SECUENCIACIÓN DIRECTA MEDIANTE EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE SANGER	14
5.- RESULTADOS	14
5.1.- VARIANTES GENÉTICAS IDENTIFICADAS POR GENOTIPADO GEOGRÁFICO DE Pts Y MUESTREO MULTIRREGIONAL DE MDs.....	14
5.2.- COMPARACIÓN CON LA PREVALENCIA DE MUTACIONES ENCONTRADAS EN OTROS GENES [RAS, BRAF, PIK3CA, EIF1AX Y TERTp] ANALIZADOS PREVIAMENTE EN LA MISMA SERIE	15
5.3.- RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE Pt Y SUS DMs	16
6.- DISCUSIÓN	17
7.- BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXOS – MATERIAL SUPLEMENTARIO	21
ANEXO 1 – ABREVIATURAS.....	21
ANEXO 2 – BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS	22
TP53.....	22
C-KIT.....	23
MED12.....	24
TBC1D12.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26
ANEXO 3 – FIGURAS METODOLOGÍA	27
ANEXO 4 – TABLA Y FIGURAS COMPLEMENTARIAS A LOS RESULTADOS	29
ANEXO 5 – COMUNICACIONES A CONGRESOS.....	32
PÓSTER	33

1.- RESUMEN

ANTECEDENTES: El carcinoma papilar de tiroides (PTC) representa el 65-80% de todos los cánceres de tiroides. Aunque la gran mayoría de los PTCs son tumores indolentes, alrededor del 5-15% se comportan agresivamente, desarrollando metástasis a distancia (DMs), que causan la muerte del paciente. Los mecanismos moleculares subyacentes a la diseminación metastásica son poco conocidos debido a que la gran mayoría de las investigaciones moleculares se han centrado en la descripción de las características genómicas de los tumores primarios (Pts). Poco se sabe sobre la contribución de la heterogeneidad molecular intratumoral a las DMs. Tampoco se ha analizado la existencia de cambios dinámicos en la distribución de mutaciones a través del espacio y el tiempo. Todavía nadie ha abordado, en muestras pareadas de Pt-PTC y DMs, un genotipado geográfico, multirregional, exhaustivo y dinámico, en el trascurso del tiempo, de oncogenes y genes supresores tumorales asociados con la progresión tumoral y agresividad en la carcinogénesis folicular tiroidea.

OBJETIVO – MATERIAL Y MÉTODOS: El principal objetivo de este estudio fue identificar alteraciones genéticas dinámicas indicativas de progresión y agresividad tumoral, que permitiesen: **1)** discriminar, en el momento del diagnóstico, aquellos PTCs que se van a comportar agresivamente desarrollando DMs; **2)** administrar terapias personalizadas ajustadas al perfil molecular de cada tumor. Genotipando, mediante PCR y SSCP o secuenciación directa, 12 casos de PTCs con muestras pareadas de Pt y DMs buscamos determinar la prevalencia real, en ambos tipos de muestras, de mutaciones en genes (*TP53*, *KIT*, *MED12* y *TBC1D12*) que se han asociado con progresión y agresividad tumoral en la carcinogénesis folicular tiroidea y en otros tumores. Para evaluar la contribución de la heterogeneidad genética intratumoral y la naturaleza clonal / subclonal de los eventos genéticos al desarrollo de las DMs, se caracterizaron 50 áreas tumorales, incluyendo diferentes áreas separadas en el espacio y el tiempo dentro de los Pts y las DMs. En los casos mutados se analizaron las relaciones filogenéticas entre Pt y DM.

RESULTADOS: De los 4 genes investigados sólo *KIT* resultó estar mutado en uno de los 12 casos analizados (prevalencia 8,3%). No se observaron mutaciones en regiones codificantes que activaran *MED12* o que inactivaran *TP53*. Tampoco se encontraron mutaciones en la región 5'UTR de *TBC1D12*, que pudieran disminuir su expresión. La mutación de *KIT* únicamente estaba presente en una de las 5 áreas analizadas en el caso, concretamente en una de las áreas de la metástasis ósea, lo que indicaba que era una mutación “*de novo*”, originada en la DM, que no había segregado desde el Pt que era WT en todas las áreas. Se trataba de una mutación oncogénica [CScape valor *p* 0,80] en el dominio autorregulatorio, yuxtamembrana del gen, de tipo missense, que conllevaba la sustitución de Valina por Isoleucina en el codón 559. Para el análisis filogenético del caso se incluyeron las mutaciones encontradas en el mismo caso, en un estudio previo, en la misma serie, en el que he colaborado y en el que se analizaron 7 genes. El caso mostró un patrón de árbol filogenético ramificado, no lineal y un patrón de siembra, colonización metastásica policlonal, en el que cooperaban varias subpoblaciones, clones de células mutadas presentes en el Pt, a los que se sumaba una mutación “*de novo*” en *KIT*.

CONCLUSIONES: La ausencia de mutaciones en los genes *TP53*, *MED12* y *TBC1D12* sugiere que ninguno de ellos juega un papel importante en el desarrollo de los PTCs de curso clínico agresivo, ni en la diseminación metastásica de los mismos. La baja prevalencia de mutaciones en *KIT* (8,3%) y su acotación a una única área de DM (mutación “*de novo*”) parece indicar que tampoco es un evento genético determinante en la diseminación metastásica de los Pts-PTC. Presiones de selección focales, con origen posiblemente en el microambiente de la propia DM, pueden dar origen a nuevas subpoblaciones / clones de células tumorales portadoras de mutaciones ventajosas “*de novo*” / únicas / privadas.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- EXORDIUM EN PATOBIOLOGIA TUMORAL

Según los datos de la OMS el cáncer es una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Casi una de cada 6 defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad [<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>].

La **transformación neoplásica** se produce por la expansión clonal de una única célula precursora que ha sufrido un daño genético, no letal, en genes codificantes de proteínas y/o microARNs o ARNs de gran tamaño no codificantes que regulan: **1)** la proliferación / crecimiento celular; **2)** la apoptosis o muerte celular programada y supervivencia celular; **3)** la reparación del ADN. Cuando el daño genético afecta a proto-oncogenes ↔ promotores del crecimiento celular, genes supresores tumorales ↔ inhibidores del crecimiento celular, microARNs oncogénicos / onco-miRs o microARNs supresores tumorales se altera el proceso de autorreplicación normal de las células sanas que conforman los tejidos de nuestro organismo, lo que se traduce en una proliferación celular descontrolada que no sigue la organización del tejido adyacente. Una proliferación celular que no logra ser frenada por los genes y/o microARNs inhibidores del crecimiento y que escapa a la regulación del sistema inmune del individuo. Si el daño genético afecta a los genes que integran la maquinaria de reparación del ADN, dichos genes no transforman directamente las células sanas afectando a la proliferación y supervivencia / apoptosis. Lo hacen indirectamente dependiendo de su capacidad para reparar o no el daño no letal en el ADN de proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Las células con genes de reparación no funcionantes desarrollan fenotipo mutador, tienden a acumular mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que promueven la proliferación y supervivencia celular o evasión de la apoptosis.^(1,2)

Los desencadenantes de la transformación neoplásica pueden ser: **1)** factores NO genéticos → agentes ambientales, exógenos o endógenos, que interactúan directamente o indirectamente con el genoma y dañan el ADN de nuestras células, **2)** factores genéticos → mutaciones heredadas de nuestros progenitores, en línea germinal asociadas con la predisposición genética al cáncer o cáncer hereditario y mutaciones estocásticas, espontáneas, NO ambientales por errores que las células cometen durante la replicación del ADN y división celular implicadas en el cáncer esporádico.^(1,2)

Una neoplasia / tumor maligno o cáncer es el resultado de procesos celulares sucesivos: **1)** un aumento en la replicación de un grupo de células en un tejido que se traduce en una lesión proliferativa, hiperplásica; **2)** aparición de alteraciones fenotípicas en las células que proliferan descontroladamente (ej. displasia) dentro de los límites del tejido en el que se ha producido el daño genético y posterior expansión clonal de las mismas; **3)** adquisición por parte de las células que proliferan de propiedades invasivas, que les permiten escapar de su sitio natural en el organismo, colonizar tejidos en proximidad, invadir vasos y proliferar en tejidos a distancia dando lugar a lo que se conoce como metástasis.^(1,2)

Aunque la mayoría de los tumores malignos son de origen monoclonal, en el momento en el que se hacen clínicamente evidentes (0,5-1 cm de diámetro) sus células constituyentes (100-1000 millones de células) son extremadamente heterogéneas, genéticamente muy diferentes.

La progresión tumoral, la malignización (adquisición propiedades invasivas y metastásicas) y la desdiferenciación se asocian con un aumento en la heterogeneidad molecular / genética intratumoral ⇒ POLICLONALIDAD (Figura-1).

Se generan subclones celulares con diferentes capacidades para crecer / proliferar, invadir, metastatizar y resistir o responder al tratamiento, dependiendo de las alteraciones moleculares que, de forma independiente y gradual, se van acumulando en las células neoplásicas, conforme la masa tumoral progresa y/o se maligniza (Figuras 1 y 2).

Para que se desarrolle un carcinoma es necesaria la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas con papel sobre la iniciación, la progresión y la desdiferenciación, tales como mutaciones puntuales, amplificaciones, deleciones o traslocaciones de genes y metilación aberrante de genes, que les doten de comportamiento maligno. Los desajustes, tanto en la maquinaria celular como en su microambiente tumoral (presencia de actividad inflamatoria mediada por macrófagos y fibroblastos), de la señalización a través de factores de crecimiento y de sus receptores, acompañados por numerosas alteraciones moleculares secundarias, se consideran esenciales para la progresión del cáncer y la modificación del comportamiento tumoral. ⁽¹⁻⁴⁾

ETAPAS EN LA CARCINOGENÉISIS

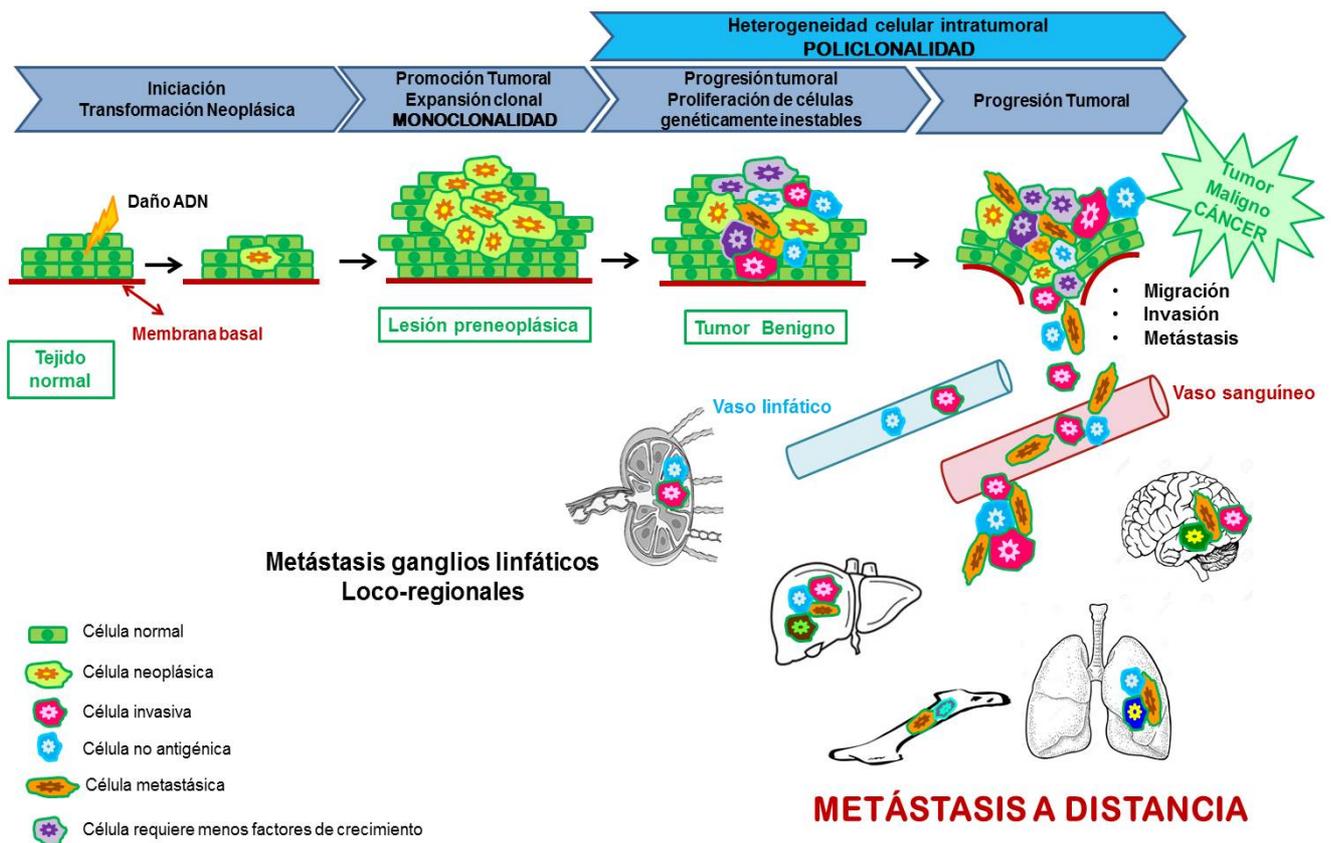


Figura 1. Etapas en el proceso carcinogénico. Fuente: elaboración propia.

Con la progresión aumentan aquellas variantes celulares más agresivas, con mayor capacidad para invadir, metastatizar, evadir / sortear las defensas naturales de nuestro organismo y resistir a las terapias convencionales (Figuras 1 y 2).

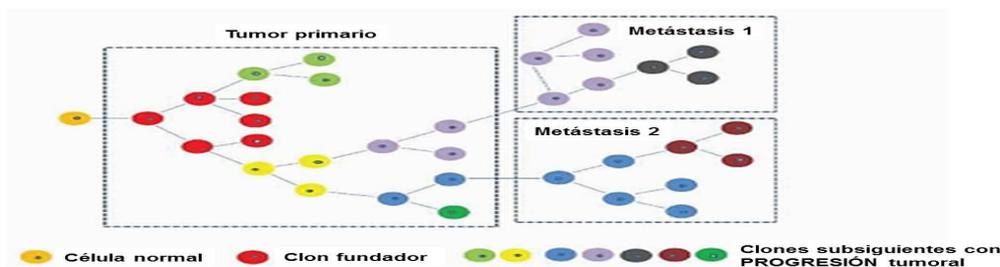


Figura 2. Progresión tumoral – Heterogeneidad molecular intratumoral – POLICLONALIDAD. Fuente: elaboración propia.

La carcinogénesis es un proceso **microevolutivo, prolongado en el tiempo, extraordinariamente dinámico, con múltiples etapas a nivel fenotípico y genotípico.**

2.2.- CÁNCER DE TIROIDES

2.2.1.- HISTOLOGÍA DEL TIROIDES

El tiroides se encarga de regular el metabolismo a través de las hormonas tiroideas. El tejido tiroideo está conformado por lóbulos separados por tejido conectivo por donde discurren vasos sanguíneos a los que se liberan las hormonas. Cada lóbulo está formado por 20-40 folículos. Los folículos constituyen las unidades funcionales de la glándula tiroides. Son formaciones esféricas revestidas por una membrana basal, sobre cuya cara interna descansa el epitelio folicular, que es un epitelio cuboideo a columnar bajo, dependiendo del grado de actividad de las células que lo conforman o tireocitos, responsables de la síntesis de las hormonas tiroideas T3 y T4. Entre la membrana basal y el epitelio folicular o por fuera de la membrana basal encontramos otro tipo de células de estirpe neuroendocrina, mucho menos numerosas, de citoplasma granular que son las células C o parafoliculares responsables de la síntesis de la calcitonina, hormona reguladora de los niveles de calcio.⁽³⁾

2.2.2.- PATOLOGÍA TUMORAL – INCIDENCIA - FACTORES DE RIESGO - CLASIFICACIÓN

En el tiroides podemos encontrar lesiones hiperplásicas, adenomas benignos y tumores malignos (carcinomas), que pueden derivar de las células epiteliales foliculares o de células C.

El cáncer de tiroides supone una de las pocas neoplasias malignas que ha incrementado su incidencia, hasta prácticamente triplicarse en las últimas tres décadas.^(4,5,6) En el último estudio publicado sobre la situación del Cáncer en USA en 2018, el cáncer de tiroides aparece como la segunda causa de cáncer en las mujeres, mostrando uno de los mayores incrementos en la incidencia media anual entre los años 2010 y 2014.⁽⁷⁾ Representa la neoplasia endocrina maligna más frecuente de nuestro organismo.

La interacción de los factores de riesgo ambientales, las alteraciones genéticas y la inestabilidad genómica son determinantes en el desarrollo tumoral. Los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de tiroides son: la exposición a radiación, la carencia de yodo en la dieta, los factores inmunológicos (como la tiroiditis linfocítica), los factores hormonales, la historia familiar y la raza.^(3,4)

Los carcinomas de tiroides se dividen en dos grandes grupos dependiendo del tipo de célula del que derivan⁽³⁾:

- **Carcinomas derivados del epitelio folicular.** Representan más del 95% de los tumores malignos de la glándula tiroides. En este grupo se incluyen 4 tipos histológicos con diferente grado de diferenciación:

- *Carcinomas papilares (PTCs)*. Son los más frecuentes (80-85%). Se trata de carcinomas bien diferenciados, que expresan marcadores de diferenciación celular folicular (Tg, TPO, TTF, PAX8) y diferenciación celular epitelial (CK19), con núcleos distintivos, que son determinantes en el diagnóstico. Existen diferentes histotipos en función del patrón de crecimiento y algunas características citoarquitecturales (papilar / clásico, folicular, mixto, sólido, trabecular, células altas, columnar...). Metastatizan preferentemente por vía linfática, en ganglios linfáticos loco-regionales. El 70% tienen buen pronóstico.
- *Carcinomas foliculares (FTCs)*. Representan el 5-10% de los cánceres de tiroides. Se trata de carcinomas bien diferenciados, que expresan marcadores de diferenciación celular folicular (Tg, TPO, TTF, PAX8) y diferenciación celular epitelial (Citoqueratinas). Son tumores, hiper celulares, con diferentes patrones de crecimiento (folicular, trabecular, sólido, cribiforme, insular-like), vascularización profusa, que metastatizan preferentemente por vía sanguínea (pulmón, hueso, cerebro, riñón...). La supervivencia a los 10 años en los mínimamente invasivos es del 95% y en los ampliamente invasivos del 50%.
- *Carcinomas pobremente diferenciados (PDTCs)*. Constituyen el 5-10% del total de cánceres de tiroides. Son carcinomas, como su propio nombre indica, poco diferenciados, que expresan débilmente y de forma focal marcadores de diferenciación celular folicular (Tg, TPO, TTF, PAX8). Muestran núcleos distintivos convolutos, en “uva pasa”. Son frecuentes las mitosis y la necrosis. Ocupan un espacio, desde el punto de vista morfológico y de comportamiento, intermedio entre los carcinomas diferenciados (foliculares y papilares) y los indiferenciados / anaplásicos. La supervivencia a los 5, 10 y 15 años es del 50%, 34% y 0% respectivamente.
- *Carcinomas indiferenciados / anaplásicos (ATCs)*. Representan un 2-3% de los cánceres de tiroides. Se trata de carcinomas compuestos en parte o en su totalidad por células indiferenciadas con alguna evidencia morfológica, inmunohistoquímica o ultraestructural de diferenciación celular epitelial, que no expresan marcadores de diferenciación celular folicular (Tg, TPO, TTF, PAX8). Muestran marcado pleomorfismo celular y nuclear, un índice mitótico muy alto y extensas áreas de necrosis y hemorragia. Pueden ocurrir “*de novo*” o derivar de PTCs, FTCs o PDTCs. Son extremadamente invasivos y metastásicos. El 95% de los pacientes fallecen en los 6 primeros meses desde el diagnóstico por compromiso de estructuras cervicales vitales y metástasis a distancia (DM).
- **Carcinomas derivados de las células C o parafoliculares ↔** Son los Carcinomas Medulares (MCs). Este grupo de tumores sólo representa un 3-5% de las neoplasias malignas tiroideas. El 70-80% son esporádicos, unilaterales, sin mutaciones en *RET* y con un curso clínico moderado. El 30% son hereditarios, bilaterales, con mutaciones en *RET* y curso clínico generalmente bueno, a excepción de aquellos que se asocian al complejo sindrómico MEN2B. Se caracterizan por núcleos en sal y pimienta, escasas mitosis, septos fibro-vasculares en el estroma y depósitos de amiloide en 80-85% de los casos. Depósitos que se visualizan con tinciones rojo congo y tioflavina T. Las células expresan calcitonina y marcadores neuroendocrinos (cromogranina A, sinaptofisina, enolasa neuronal específica). Metastatizan preferentemente vía linfática.

Más del 95% de las neoplasias malignas que afectan al tiroides derivan, pues, de las células foliculares. La agresividad de estos tumores se correlaciona inversamente con el grado de diferenciación de los mismos, de manera que los tumores bien diferenciados, tanto PTCs como

FTCs, son los menos agresivos. Existen, no obstante, evidencias histopatogenéticas que revelan que carcinomas bien diferenciados, ya sean de histotipo papilar o de histotipo folicular, con un curso clínico a priori indolente o bueno, pueden progresar a carcinomas agresivos pobremente diferenciados (PDCs) o indiferenciados / anaplásicos /ATCs^(3,4,8) (Figura-3).

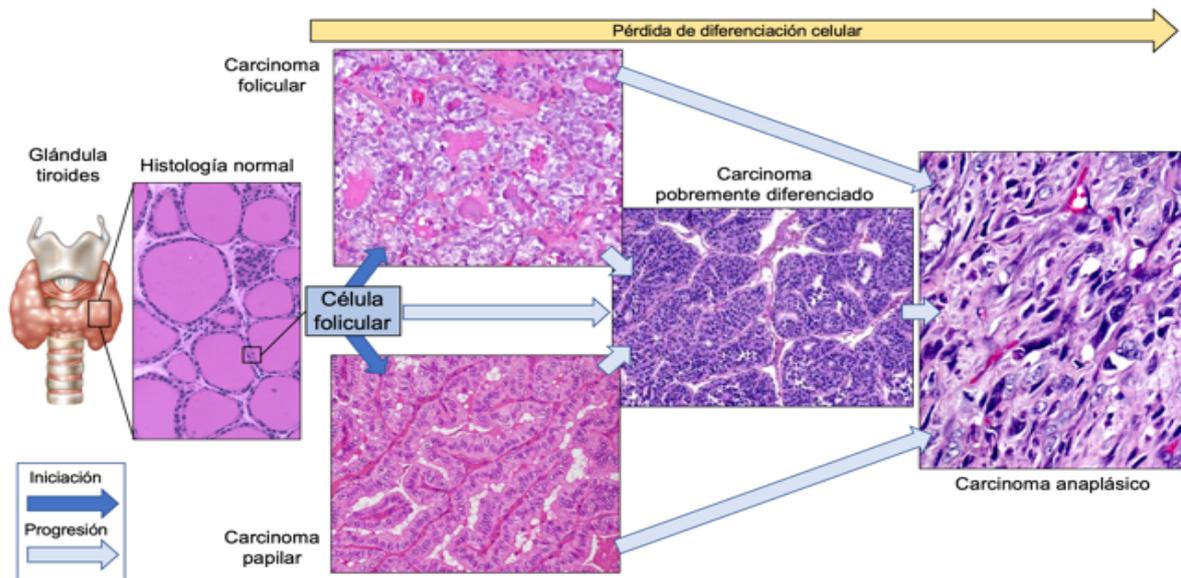


Figura 3. Modelo de progresión en la tumorigénesis folicular del tiroides. Fuente: elaboración propia.

2.2.3.- CARCINOMAS PAPILARES (PTC) DE ALTO RIESGO, AVANZADOS CON METÁSTASIS A DISTANCIA, RESISTENTES A RADIOYODO

La mayoría de los PTCs de histotipo papilar, folicular o mixto son tumores indolentes, de crecimiento lento con bajo potencial de DM, que responden habitualmente a la cirugía asociada o no a ablación de restos tumorales con I^{131} y tratamiento hormonal sustitutivo, con un excelente pronóstico (tasa de supervivencia específica de la enfermedad a 10 años de hasta el 95%)⁽³⁾. Existe, no obstante, un grupo gradualmente creciente (5-15%) de variantes clásicas, foliculares infiltrativas o mixtas de PTCs que se comportan de manera agresiva, que invaden localmente tejidos del cuello, recidivan frecuentemente, desarrollan DMs y en muchos casos dejan de responder al I^{131} , con una tasa de supervivencia específica de la enfermedad a cinco años significativamente menor (promedio 50%).^(3,9) Lim y colaboradores han demostrado recientemente un incremento significativo en la mortalidad asociada a la incidencia del cáncer de tiroides, particularmente en los carcinomas papilares en estadios avanzados con metástasis a distancia, que se analizan en este TFG.⁽¹⁰⁾ Se ha demostrado que las DMs son un factor pronóstico adverso en los PTCs, siendo la causa más frecuente de muerte. El desarrollo de metástasis óseas conlleva un pronóstico sombrío, incluso cuando los tumores captan I^{131} . Las metástasis pulmonares, particularmente si su aspecto radiográfico es macronodular, determinan un curso clínico deletéreo. Los pacientes fallecen a pesar de la administración de I^{131} , de quimioterapias agresivas de rescate o de la administración de múltiples drogas aprobadas por la FDA, que van dirigidas específicamente frente a diferentes alteraciones genéticas descritas en los tumores.^(3,9) En las últimas directrices publicadas por el grupo de trabajo de la Sociedad Americana de Tiroides [American Thyroid Association (ATA)] para la estratificación del riesgo en pacientes con carcinomas diferenciados de tiroides, los PTCs con DMs se clasifican como tumores de alto riesgo [ATA-high risk].⁽¹¹⁾ Con las herramientas clínico-

morfológicas-moleculares existentes en la actualidad no es posible discriminar, en el momento del diagnóstico, aquellos PTCs que se van a comportar agresivamente desarrollando DMs, lo que impide una correcta estratificación de los pacientes con PTCs basada en el riesgo de progresión de la enfermedad y ello supone una barrera para el éxito de la medicina de precisión. A pesar de que en los últimos 20 años ha mejorado sustantivamente nuestro conocimiento del espectro de mutaciones presentes en los tumores “*primarios*” de tiroides de tipo papilar y que ello ha determinado grandes avances en el manejo de los pacientes y en los enfoques terapéuticos, la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de tiroides con DMs no ha mejorado.^(12,13) Resulta imperativo identificar marcadores moleculares fiables que anticipen el desarrollo de DMs en pacientes con PTCs. Biomarcadores que ayudarán a los médicos en: **1)** la estratificación precisa de pacientes con PTCs basada en el riesgo de progresión, metastatización de la enfermedad; **2)** la toma de decisiones basadas en el curso clínico y la planificación terapéutica.

Aunque algunas alteraciones genético-moleculares presentes en las DMs pueden diferir de aquellas presentes en los tumores primarios (Pt) de los que se han originado [ver Figuras 1 y 2], lo cierto es que en la mayoría de los estudios realizados en pacientes con cáncer de tiroides metastásico se evalúan únicamente las alteraciones genéticas presentes en muestras del Pt y se correlacionan, mediante análisis estadísticos, los resultados obtenidos en el Pt con un parámetro clínico conocido, de pronóstico sombrío, como es la presencia o ausencia de DMs.^(14,15) En los últimos años, varios estudios han recopilado las alteraciones genéticas encontradas en “*muestras de tumores primarios*” de tipo papilar (PTC) con y sin DMs, estableciendo dos grupos de pacientes que los autores denominan DM-PTCs versus control-PTCs sin DMs, aunque en ningún caso se ha genotipado tejido metastásico.⁽¹⁶⁻¹⁹⁾ Hasta el momento sólo cuatro estudios (dos de ellos en los últimos meses de 2020) han analizado un número representativo de muestras pareadas de Pt-PTC y sus DMs ⁽²⁰⁻²³⁾ pero, que sepamos, todavía nadie ha abordado, en muestras pareadas de Pt-PTC y DMs, un genotipado geográfico, multirregional, exhaustivo y dinámico, en el trascurso del tiempo, de oncogenes y genes supresores tumorales asociados con progresión tumoral y agresividad en la carcinogénesis folicular tiroidea. Ese enfoque, que busca revelar la dinámica evolutiva del proceso mutacional durante el desarrollo de las DMs por los PTCs, determinar la naturaleza clonal o subclonal de las mutaciones y paralelamente establecer el grado de heterogeneidad genética intra-tumoral e inter-tumoral, entre los clones de células presentes en el Pt y los clones de células presentes en las DMs, es muy importante porque las mutaciones en genes que promueven (“drivers”) la progresión tumoral y el desarrollo de metástasis son cada vez más determinantes en la planificación y éxito del tratamiento. La heterogeneidad genética no detectada entre las metástasis no sólo impide el éxito de las terapias dirigidas adaptadas al perfil molecular de las células tumorales, sino también el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Existe una imperiosa necesidad de llevar a cabo en PTCs en estadios avanzados (AS-PTCs) análisis sistemáticos y meticulosos de la arquitectura genética del tumor primario y sus DMs, así como evaluar la dinámica de los espectros mutacionales somáticos a través del tiempo y el espacio. La dificultad de encontrar muestras pareadas de tumor primario y sus DMs, al no biopsiarse de forma rutinaria las DMs en los pacientes con AS-PTCs, supone un escollo importante para mejorar nuestra comprensión actual de los PTCs de alto riesgo y, por ende, una barrera para mejorar su manejo clínico y supervivencia.

3.- OBJETIVOS

1. Establecer la prevalencia, tanto en muestras de tumor primario de PTC como en sus DMs, de mutaciones en genes que se han asociado en estudios previos en diferentes tipos de tumores, incluidos algunos histotipos de tumores tiroideos, con progresión tumoral y agresividad:
 - Oncogenes como *KIT* y *MED12*.
 - Región 5'UTR del gen *TBC1D12*.
 - Gen supresor tumoral como *TP53*.
2. Determinar la naturaleza clonal o subclonal de las mutaciones y la presencia o no de heterogeneidad genética / molecular intratumoral.
3. Valorar la existencia de cambios dinámicos en la distribución de las mutaciones a través del espacio y el tiempo.
4. Ponderar la posible implicación de las mutaciones en el desarrollo de las metástasis a distancia.
5. Evaluar posibles asociaciones entre los diferentes eventos mutacionales encontrados.
6. Analizar las relaciones filogenéticas entre el tumor primario y sus metástasis a distancia. En los PTCs no se han proporcionado modelos de evolución y progresión tumoral, con rutas de diseminación celular a nivel molecular.
7. Comparar con la prevalencia de mutaciones encontrada en otros genes [*RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *EIF1AX* y *TERTp*] analizados previamente en la misma serie. Estudios en los que he colaborado de forma puntual en estos últimos 3 años en el laboratorio [ver anexo-5 con comunicaciones a congresos].

Ver en **anexo-2** sucinta descripción de los genes analizados [función en las células normales y neoplásicas, mecanismos de activación o inactivación y dominios funcionales].

4.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO: IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS TUMORALES. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se han analizado 50 muestras tumorales, fijadas en formol y embebidas en parafina (FFPE), procedentes de una cohorte de 12 pacientes, seleccionados al azar, intervenidos de PTC, en los que también disponíamos de muestras tisulares pareadas de DMs síncronas y/o metácronas para su genotipado. Las muestras se obtuvieron de los archivos de 5 Departamentos de Anatomía Patológica de diferentes hospitales españoles. En todos los casos se dispone de información clínica y de seguimiento detallada [sexo, edad en el momento del diagnóstico, tamaño del tumor, extensión extratiroidea, invasión vascular, metástasis en ganglios linfáticos (LNM) y/o DMs en el momento del diagnóstico o durante el seguimiento, localización de DM, recurrencias, estadio tumoral, estatus del paciente (muerto por PTC → DOD o vivo con PTC / enfermedad → AWD)] para correlacionar con los resultados del genotipado. El estadiaje de los pacientes se realizó siguiendo las recomendaciones del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC), 8ª edición.⁽²¹⁾ Los pacientes se manejaron según los protocolos clínicos estándares. En ninguno de los pacientes se documentó exposición previa a radiación. De acuerdo con las pautas propuestas en 2015 por la ATA para la estratificación del riesgo en pacientes con cánceres de tiroides diferenciados, el 83% de los tumores estudiados se consideraron de alto riesgo [ATA-high risk] [10 casos] y el 17% de los tumores como de bajo riesgo [ATA-low risk] [2 casos].⁽¹¹⁾ Ninguno de los pacientes recibió terapia dirigida antes de los análisis genéticos, por lo que, las mutaciones que se pudieran encontrar reflejarían el curso

natural de la enfermedad. No responderían a influencias mutagénicas o presiones selectivas ejercidas por las terapias.

Todos los diagnósticos histológicos fueron revisados de acuerdo con los criterios histológicos establecidos ^(3,22) por la tutora del TFG. De acuerdo con los informes clínico-patológicos originales, el 75% de los casos [9 casos] se consideraron como variantes foliculares infiltrativas de PTC (FV-PTCs), el 8% de los casos [1 caso] como PTC mixtos (Mx-PTCs) (patrones papilar y folicular) compuestos predominantemente por áreas con un patrón de crecimiento FV-PTC y un 15% de los casos [2 casos] como FV-PTCs encapsulados (EFV-PTC). En los últimos 2 casos, un cuidadoso examen microscópico retrospectivo de las secciones de Pt reveló focos dudosos, poco claros, de invasión vascular. Aunque el pronóstico de los pacientes con EFV-PTCs es excelente, con una tasa de supervivencia global que no difiere significativamente de la de una población sana de edad similar, existen algunos estudios publicados en la literatura de EFV-PTC con DMs. ^(14,23)

Para determinar la naturaleza clonal o subclonal de las posibles mutaciones en *KIT*, *TP53*, *MED12* y *TBC1D12* y, paralelamente, evaluar la existencia o no de heterogeneidad molecular / genética intratumoral se ha realizado un meticuloso genotipado geográfico, multirregional de Pts y DMs (Figura-4). Para evaluar cambios dinámicos en la distribución de la carga mutacional a través del espacio y el tiempo, se genotiparon múltiples áreas en diferentes muestras tumorales procedentes de diferentes intervenciones quirúrgicas practicadas durante el curso clínico del paciente. De las 50 muestras analizadas, 25 muestras corresponden a áreas de Pt, 4 muestras a áreas de LNM síncronas y 21 muestras a áreas de DMs síncronas y/o metácronas [Tabla-1]. En 8 Pts (8/10 – 80%) se han analizado cambios focales en la apariencia microscópica o en el patrón predominante de crecimiento dentro de la misma sección del tumor o diferentes secciones del mismo tumor, embebidas en el mismo o diferentes bloques de parafina. En 4 pacientes se han caracterizado áreas diferentes de una misma DM síncrona o metácrona o áreas diferentes de distintas DMs síncronas y/o metácronas desarrolladas durante el curso clínico del paciente (Figura-4). En dos pacientes no fue posible obtener muestra del correspondiente Pt y, por lo tanto, sólo se ha caracterizado la DM. En dos casos se analizaron también LNMs síncronas. Se realizaron estudios inmunohistoquímicos para confirmar el origen tiroideo de las DMs observándose inmunorreactividad para el factor de transcripción tiroidea 1 (TTF1), tiroglobulina y/o citoqueratina 19 (CK-19) (Figura-4).

Tabla-1: Genotipado geográfico, multirregional en 12 pacientes con PTC y muestras pareadas de metástasis vía sanguínea (DMs)

Histotipo de Carcinoma Papilar de Tiroides (PTC)	Nº casos analizados (%)	Áreas analizadas con diferente apariencia microscópica o diferentes patrones de crecimiento en los tumores primarios (Pt) y metástasis en ganglios linfáticos (LNMs) y a distancia (DMs)	Nº muestras genotipadas (%)
Variantes foliculares infiltrativas de PTC (FV-PTC)	9 (75)	21 muestras Pt 1 muestras LNM 18 muestras DM	40 (80)
Variantes foliculares encapsuladas de PTC (EFV-PTC)	2 (16,6)	2 muestras Pt 2 muestras DM	4 (8)
PTC mixtos (patrones papilar/clásico y folicular) (Mx-PTC) #	1 (8,3)	2 muestras Pt 3 muestras LNM 1 muestra DM	6 (12)
TOTAL	12 (100)		50 (100)

Casos compuestos predominantemente por áreas con un patrón de crecimiento FV-PTC.

Genotipado geográfico, multirregional, exhaustivo y dinámico, en el transcurso del tiempo y el espacio, de oncogenes y genes supresores tumorales

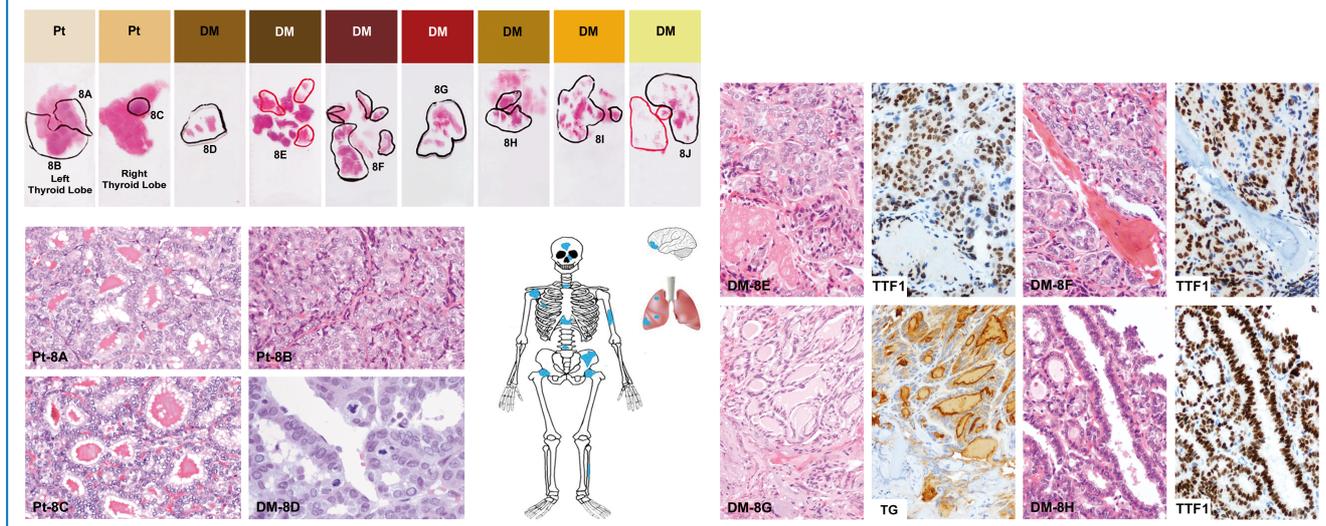


Figura 4. Muestra 1 de los 4 pacientes en los que se han caracterizado áreas diferentes de una misma DM síncrona o metácrona y áreas diferentes de distintas DMs síncronas y/o metácronas desarrolladas durante el curso clínico del paciente. Se genotiparon 3 áreas diferentes del tumor primario (Pt) multifocal y 7 áreas diferentes de metástasis a distancia (DM). Las 3 áreas de Pt (8A, 8B, 8C) pertenecen a dos biopsias diferentes de 2010. Las 7 áreas de DM pertenecen a 5 biopsias diferentes tomadas al mismo paciente en un período de 4 años (2010-2013). La primera DM (8D) corresponde a una biopsia de la vértebra D4 en 2010 (DM1), la segunda y tercera DM (8E y 8F) corresponden a biopsias de las vértebras D3 y D4 en 2012 (DM2, DM3), la cuarta DM (8G) corresponde a una biopsia del hueso esfenoides en 2013 (DM4), la quinta y sexta DM (8H y 8I) corresponden a biopsias de cerebro y duramadre en 2013 (DM5, DM6) y la séptima DM (8J) corresponde a una biopsia de fosa pterigopalatina en 2013 (DM7). Posteriormente este paciente ha desarrollado metástasis en muchas otras localizaciones (vértebras cervicales, hueso frontal, costillas, pala iliaca izda., cabeza fémur dcho. e izdo., humero dcho. y múltiples nódulos pulmonares) que no se han estudiado al no haber biopsia o ser el material insuficiente. Los fragmentos que aparecen delimitados en negro en los portas fueron microdisecionados en secciones de 5 micras consecutivas para extraer el ADN. En la figura podemos apreciar también la apariencia histológica de las diferentes áreas analizadas de Pt y de 5 áreas de DMs. Todas las DMs analizadas mostraron inmunoreactividad para TTF1, tiroglobulina y CK19 corroborando el origen tiroideo de las mismas. Se incluye inmunohistoquímica representativa junto a la H&E correspondiente en las DMs 8E, 8F, 8G y 8H.

4.2.- METODOLOGÍA

4.2.1.- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Antes de proceder con la extracción del ADN la tutora del TFG examinó al microscopio las 50 muestras tumorales a estudiar teñidas con Hematoxilina–Eosina (H&E) con el objetivo de determinar el porcentaje de células tumorales presentes en cada una. En las secciones en las que, además de las células tumorales, había en contigüidad tiroides no tumoral u otros contaminantes tisulares (fibrosis, tejido linfoide, áreas de necrosis o hipoxia...) que podían introducir un sesgo en los resultados o alterar la calidad del ADN a extraer, se procedió a microdisecionar sobre portas varias secciones histológicas consecutivas sin teñir con el objeto de separar los distintos componentes y aumentar la cantidad de células tumorales en el área a genotipar. El porcentaje de células tumorales presentes en las áreas analizadas ha sido en todos los casos del 85-90%. En función de las características de la sección histológica y del tamaño de la biopsia se cortaron con un microtomo HM355S (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) entre 30 y 150 μm para conseguir cantidad suficiente de ADN, pero sin llegar a saturar las columnas del kit de extracción de ADN. La desparafinización y ulterior hidratación del tejido se realizó en tres pasos, en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con cierre seguro y baja retención de ADN (Sarstedt, Hildesheim, Alemania): **1**) incubación con xileno (Química Clínica Aplicada S.A., España) a 65°C; **2**) lavado con una solución de etanol 80% - xileno 20%; **3**) lavado con etanol al 100% (Ethanol Absolute Molecular Biology Grade, Merck- Millipore, Alemania). Luego se deja secar el tejido a temperatura ambiente,

durante unos 90 minutos, para permitir la evaporización del alcohol que ha impregnado la muestra. A continuación, comienza el proceso de extracción de ADN propiamente dicho siguiendo las instrucciones del kit comercial “GeneJET FFPE DNA Purification kit” (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA): **1)** Incubación en agitación a 10 rpm y 65°C con buffer de digestión y proteinasa K, hasta desintegrar el tejido y digerir completamente las proteínas; **2)** Calentamiento de la muestra 40 min a 90°C para eliminar los posibles entrecruzamientos del ADN ocasionados por el formaldehído; **3)** Adición de 10 µl de RNasa para digerir enzimáticamente el ARN presente en la muestra; **4)** Transferencia a la columna comercial de la muestra digerida y mezclada con el buffer de unión, que facilita la fijación del ADN a la membrana de la columna; **5)** Lavado del ADN unido a la membrana y eliminación de contaminantes como proteínas y ARN adicionando dos soluciones sucesivas (buffer de lavado 1 y 2) consistentes principalmente en etanol; **6)** Elución del ADN retenido por la membrana con un buffer de elución (básicamente agua carente de nucleasas). Finalizado el proceso, se preserva el ADN genómico a -20°C.

4.2.2.- CUANTIFICACIÓN, PUREZA Y CALIDAD DEL ADN GENÓMICO

Para facilitar la preparación de las diluciones de trabajo y evitar los problemas derivados del empleo de ADN con cualidades desconocidas (escasa concentración, mala calidad y pureza) todas las muestras fueron evaluadas por dos procedimientos independientes:

1.- Análisis espectrofotométrico con un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) para determinar la concentración y pureza del ADN. El ratio de absorbancia A260/280 permite detectar la contaminación por proteínas y ARN y el ratio A260/230 la presencia de sales.

2.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar la calidad y grado de degradación del ADN. Se prepararon geles con TBE 1X (dilución 1:10 de solución tampón 10X filtrada, estéril, libre de DNasas, RNasas y proteasas, compuesta por 1M Tris, 0,9M ácido bórico y 0,01M EDTA - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y agarosa al 1% (Seakem LE Agarose, Lonza, Portsmouth, NH, USA) y se tiñeron con bromuro de etidio (Ethidium Bromide 10 mg/mL, Invitrogen - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), que se intercala con las bases nitrogenadas del ADN, emitiendo fluorescencia al irradiarlo con luz UV. En cada pocillo se cargaron 3 µl de muestra y 2 µl de tampón de carga (6X Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), que, además de aumentar la densidad de la muestra, nos permite, gracias a los colorantes que incluye (Orange G → 40-50 bp y Xylene Cyanol→3030 bp en TBE), controlar el nivel de migración de las muestras. Los geles con las muestras se corren durante unas 3 horas en una cubeta de electroforesis horizontal (OwiTM A5 Large Gel System with Built-In Recirculation, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) con TBE 1X a 80V (Fuente de alimentación OwiTM EC-300XL, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Al final de la electroforesis se visualizan los geles en el Gel DocTM XR (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA), con un filtro para el bromuro de etidio. Para evaluar el tamaño de los fragmentos de ADN extraídos y, por ende, el grado de degradación del ADN se comparan las muestras con un patrón de tamaños moleculares de 100bp-1Kb (100 bp DNA ladder, exACTGene Fisher BioReagents, Wilmington, DE, USA) cargado en el primer pocillo [Ver ejemplo en Figura-1 Anexo-3].

4.2.3.- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Permite la replicación exponencial in vitro de un segmento específico de ADN, obteniendo 2^n moléculas, siendo n el número de ciclos de amplificación. Se emplea un termociclador (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) y consta de los

siguientes pasos: **1)** Desnaturalización inicial del ADN a alta T^a (95°C) 8 min, separándose en dos cadenas simples. **2)** 40-45 ciclos de replicación exponencial que incluyen cada uno de ellos 3 etapas: **A)** finalización de la desnaturalización de las moléculas de ADN molde (95°C durante 45 seg-1 min); **B)** anillamiento de los cebadores o *primers* (Sigma Aldrich Biotechnology, Gillingham, UK) *Forward* (sentido 5´-3´) y *Reverse* (sentido 3´-5´), complementarios a la secuencia inicial y final de 18-30 nucleótidos del ADN molde gracias a la bajada de T^a (55°- 64°C). La temperatura de este paso varía en función del ADN molde y los *primers* que utilizemos; **C)** extensión de los primers anillados al ADN molde a 72°C durante 45 seg-1 min por medio de la acción de una Taq polimerasa termoestable. **3)** Elongación final de las nuevas cadenas de ADN a 72°C 10 min. La eficiencia de la amplificación se comprueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, durante 30 min a 120 Voltios.

La PCR se realiza en tubos eppendorf de 0,2ml (estériles, libres de RNAsas, DNAsas, ADN y pirógenos, Molecular BioProducts, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e incluye los siguientes reactivos: **1)** buffer de reacción 10X libre de MgCl₂ [75 mM Tris HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄] (Biotools, B&M Labs, España) diluido a 1X en el volumen final de PCR de 30µl. Controla el pH del proceso, afectando a la actividad y fidelidad de la Taq ADN polimerasa; **2)** MgCl₂ 50 mM (Biotools, B&M Labs, España) a una concentración entre 1,5-3,0 mM dependiendo de la secuencia a amplificar. Su carencia inactiva el enzima y su exceso merma su fidelidad, aumentando las uniones inespecíficas; **3)** cebadores a una concentración óptima entre 0,2-0,5 µM; **4)** dNTPs 100 mM (Fermentas, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a una concentración de 0,2 mM. Son los nucleótidos adenina, guanina, citosina y timina que va incorporando la enzima al replicar el ADN molde por lo que la concentración de los cuatro debe estar equilibrada; **5)** ADN polimerasa Taq 1U/µL (Biotools, B&M Labs, España) cataliza la formación las nuevas cadenas de ADN y su concentración óptima es de 40 mU/µL; **6)** dilución de uno de los ADN madre, buscando una concentración óptima de 20-50 ng/µl; **7)** agua libre de nucleasas (InvitrogenTM AmbionTM Nuclease-Free Water - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), hasta alcanzar el volumen final de 30 µl.

En cada PCR se incluyen dos controles negativos para asegurar la ausencia de contaminaciones en el proceso. Contienen todos los elementos del resto de muestras excepto el ADN. El primer control se cierra antes de cargar los ADNs y el segundo tras cerrar todos los tubos, una vez adicionado el ADN de las muestras, sin limpiar los guantes durante el cierre. La amplificación de ADN en el primer control indica la contaminación de alguno de los reactivos y, en el segundo la contaminación cruzada entre los tubos [Ver ejemplo de PCR en Figura-2 Anexo-3]. En Tabla-1 Anexo-3 se incluyen las condiciones de PCR de cada una de las regiones del genoma amplificadas en este estudio.

4.2.4.- GRADIENTE DE OPTIMIZACIÓN DE PCRS

Los gradientes se realizan para establecer las condiciones óptimas de amplificación de la zona del genoma que queremos estudiar con los cebadores diseñados para ello. Consiste en la amplificación por PCR de una muestra de ADN en diferentes condiciones, resultado de la combinación de: **1)** concentraciones crecientes de MgCl₂, desde 1,5 mM hasta 4,0 mM (en búsqueda de la mejor para la polimerasa Taq); **2)** temperatura de anillamiento, desde 55°C hasta 67°C (para favorecer el anillamiento de los cebadores al ADN); **3)** concentración de los cebadores, desde 0,20 µM hasta 0,50µM (buscando la cantidad suficiente, pero sin saturar la reacción). Se selecciona la combinación con mejores productos [Ver ejemplo en Figura-3 Anexo-3].

4.2.5.- SSCP (SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM)

Esta técnica se basa en el principio de que la movilidad electroforética de cualquier partícula en un gel es sensible tanto a su tamaño como a su forma. En condiciones no desnaturizantes, una cadena sencilla de ADN, en base a las interacciones de las moléculas de su secuencia, adquiere una conformación estructural que junto a su tamaño determinan su movilidad electroforética. Cambios de un único nucleótido de la secuencia provocan alteraciones en la estructura secundaria y, por tanto, en la movilidad. El protocolo para detectar mutaciones por SSCP consiste en: **1)** Cuantificación y estimación visual del volumen de PCR que se va a utilizar en la SSCP; **2)** Desnaturalización de 30-40ng de producto de PCR, calentándolo 5 minutos a 95°C en presencia de 2,5 volúmenes de “stop solution” (100% formamida, 5.0M NaOH, 1% azul de bromofenol y 1% xilen-cianol); **3)** Enfriamiento en hielo de las muestras, provocando la formación de estructuras tridimensionales de cadena sencilla cuyo patrón de migración, en gel no desnaturizante de acrilamida, depende de la secuencia primaria de ADN; **4)** Cargado de las muestras en un gel de MDE (Mutation Detection Enhancement gel matrix, Lonza, ME, USA), con una fórmula similar a la acrilamida muy sensible para la detección de cambios conformacionales en el ADN. La concentración de MDE se establece para cada región del genoma a estudiar y se determina comparando el patrón de migración entre una muestra *wild type* y una mutada, a diferentes temperaturas y voltajes; **5)** Electroforesis con unos parámetros de concentración de MDE, voltaje, temperatura y tiempo específicos para cada región del genoma; **6)** Tinción de los geles en oscuridad con SYBR Gold (SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain 10,000X Concentrated in DMSO – Invitrogen, Thermo Scientific, MA, USA) diluido 1:10000 en TE 1X (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA pH 7.5), para visualizar en el equipo Gel DocTM XR (BioRad Laboratories, CA, USA) la migración de los confórmeros presentes en las muestras; **7)** Corte de las bandas con una migración diferente al patrón *wild type* y resuspensión de las mismas en TE 1X; **8)** Amplificación por PCR del ADN contenido en las bandas cortadas seguido de purificación y secuenciación directa tipo Sanger de los productos de PCR resultantes [Ver ejemplo en Figura-4 Anexo-3].

4.2.6.- PURIFICACIÓN DEL ADN

El proceso se realiza con un kit comercial (Illustra™ GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburg, PA, USA). Consta de varios pasos: **1)** Mezcla de la muestra de PCR con el buffer de unión (fundamentalmente isopropanol) del ADN a la membrana de la columna y transferencia a la columna del kit; **2)** Lavado del ADN unido a la membrana con el buffer de lavado (etanol) eliminando todo aquello presente en la PCR no unido a la membrana (dNTPs, cebadores, sales...); **3)** Recuperación del ADN unido a la membrana, añadiendo, en función de la calidad del producto amplificado, una cantidad de buffer de elución; **4)** Verificación de la eficiencia y calidad de la purificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% como paso previo a la estimación del volumen de ADN necesario para la secuenciación Sanger. Si el producto de PCR a purificar presenta bandas inespecíficas, hay que cargar todo el volumen restante de PCR en un gel de agarosa al 2%; cortar, en un transiluminador de luz UV, la banda con el material genético de interés, una vez se haya separado de las bandas inespecíficas; disolver la banda de agarosa con el ADN en el buffer de unión del ADN a la membrana de la columna, utilizando un bloque seco (Grant QBD2, Grant Instruments, Cambridge, England) a 60°C 30 min; transferir la mezcla a la columna del kit y seguir con los pasos 2), 3) y 4) descritos previamente [Ver ejemplo en Figura-5 Anexo-3].

4.2.7.- SECUENCIACIÓN DIRECTA MEDIANTE EL MÉTODO ENZIMÁTICO DE SANGER

Se basa en la polimerización del ADN. Emplea dideoxinucleótidos marcados con fluoróforos, carentes del grupo -OH en el carbono 3', que provocan el fin de la elongación de la cadena de ADN al ser incorporados por la polimerasa. El proceso se repite aleatoriamente muchas veces, obteniéndose secuencias complementarias a la de interés de todas las longitudes posibles, terminando siempre con un nucleótido marcado, que, por medio de electroforesis capilar, nos revela la secuencia de interés. Por motivos de coste del kit "ABI Prism BigDye Terminator" (PerkinElmer) no es posible realizarla en el IBGM. Se envían los productos purificados y el correspondiente cebador (Forward o Reverse) a la empresa StabVida que realiza la reacción de secuenciación y corre los fragmentos en un analizador genético ABI Prism 3700 (PerkinElmer). Los cromatogramas resultantes de la secuenciación se analizaron con el software informático Finch TV (Geospiza Inc.). Todos los resultados fueron confirmados con al menos 2 secuencias de 2 productos de PCR distintos.

5.- RESULTADOS

5.1.- VARIANTES GENÉTICAS IDENTIFICAS POR GENOTIPADO GEOGRÁFICO DE Pts Y MUESTREO MULTIRREGIONAL DE MDs

De los 4 genes investigados en este estudio sólo *KIT* resultó estar mutado (1/4 → 25%) en uno de los 12 casos analizados (1/12 → prevalencia mutaciones *KIT* 8,3%). No se observaron mutaciones en regiones codificantes que activaran *MED12* o que inactivaran *TP53*. Tampoco se encontraron mutaciones en la región 5'UTR de *TBC1D12*, que pudieran disminuir su expresión.

La mutación somática encontrada en el proto-oncogén *KIT* se localiza en el dominio yuxtamembrana del gen, concretamente en el exón 11. Es una mutación missense, de tipo transición en la que se ha sustituido una base púrica como la guanina por otra base púrica como la adenina en el nucleótido 1676 de la secuencia codificante del gen [c.1676 G>A]. Esa mutación puntual conlleva un cambio de aminoácido en la proteína, concretamente el aminoácido valina, propio de la secuencia wild type / salvaje, en el triplete o codón 559 es remplazado por el aminoácido isoleucina [GTT>ATT → **Val 559 Ile**]. Para estimar la patogenicidad o el impacto funcional de la mutación usamos 2 algoritmos conocidos: **1)** "FATHMM (Functional Analysis Through Hidden Markov Models)", que distingue entre mutaciones promotoras de cáncer ("driver mutations") y polimorfismos pasajeros, sin repercusión funcional ("passenger polymorphisms") [<http://fathmm.biocompute.org.uk/cancer.html>]; **2)** CScape Cancer Variant predictor", que predice la probabilidad de que las mutaciones somáticas sean causantes del cáncer ("oncogenic drivers") [<http://cscape.biocompute.org.uk/>]. El algoritmo FATHMM reveló que la mutación V559I es una mutación patogénica (probabilidad FATHMM de 0,94 en la web COSMIC → Catalog of Somatic Mutations in Cancer), asociada con el cáncer ("cancer promoting/ driver mutation") con una probabilidad de -5,06 [especificidad y sensibilidad de la predicción de 0,94 y 0,80 respectivamente, aplicando un umbral de predicción de asociación a cáncer estricto de -1,5). El algoritmo CScape también reveló que la mutación V559I es una mutación oncogénica con una probabilidad de 0,80 [puntuaciones superiores a 0,5 indican que la mutación se comporta como oncogénica, promotora de cáncer. Cuanto más próxima a 1 sea la puntuación mayor es la confianza en la predicción]. La mutación únicamente estaba presente en una de las 5 áreas (4 áreas de Pt → 1A, 1B, 1C, 1D y 1 área de DM→1F) analizadas en el caso, concretamente en el área 1F, correspondiente a una metástasis ósea, lo que indica que se trata de una mutación "de novo", originada en la DM, que no ha segregado desde el Pt que es WT (Figura-5).



Figura 5. Muestra el único caso mutado de toda la serie (1/12→8,3%). Presenta una mutación somática puntual en el dominio no catalítico yuxtamembrana (exón 11) del proto-oncogén *KIT*, que conlleva la sustitución en el codón 559 del aminoácido Valina por el aminoácido Isoleucina (**V559I**), lo que determina la activación constitutiva, independiente del ligando SCF (factor de crecimiento de células madre), del receptor tirosina quinasa, para el que codifica el gen *KIT*. Es una mutación que no segrega desde el Pt, que es WT en las 4 áreas analizadas (1A,1B,1C,1D). Se origina “*de novo*” en una de las áreas de DM investigadas (1F). A la izda. aparecen las diferentes áreas, separadas en el espacio, genotipadas en el Pt y en las DMs. A la dcha. aparecen segmentos de cromatogramas del exón 11 correspondientes a la secuencia WT encontrada en las diferentes áreas de Pt y a la secuencia mutada presente en el área de DM 1F. El área de DM 1E no pudo analizarse por haberse agotado el ADN.

En el caso de *TP53* se observó una sustitución puntual de un solo nucleótido en el intrón 6, concretamente diecisiete nucleótidos antes del comienzo del exón 7 [c.673-17 C>T]. El algoritmo FATHMM para variantes no codificantes reveló que se trataba de un cambio neutral, benigno, no patogénico con una probabilidad de 0,05. En el algoritmo FATHMM para variantes no codificantes los valores de *p* oscilan entre 0 y 1. Valores > 0,5 y próximos a 1 indican que es una variante deletérea. Valores <0,5 y próximos a 0 indican que se trata de una variante neutral / benigna.

Ver en Anexo-4 Tabla-1 los resultados del análisis de mutaciones en *KIT*, *MED12*, *TP53* y *TBC1D12* en las 50 áreas genotipadas de Pt y DMs, en 12 pacientes con PTCs.

Al no haber encontrado mutaciones en *MED12*, *TP53* y *TBC1D12* y una única mutación en *KIT* en una sola área de un caso, los objetivos 2, 3, 4 y 5 de este TFG, que se plantearon en base a los resultados de un estudio previo de mutaciones en 7 genes en la misma serie, carecen de significado, no tienen validez. Los términos clonalidad /subclonalidad, heterogeneidad genética intratumoral, cambios dinámicos espacio-temporales en el patrón de mutaciones no tienen aplicación en este estudio.

5.2.- COMPARACIÓN CON LA PREVALENCIA DE MUTACIONES ENCONTRADAS EN OTROS GENES [*RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, *EIF1AX* Y *TERTp*] ANALIZADOS PREVIAMENTE EN LA MISMA SERIE

A diferencia de este estudio, en el estudio previo en la misma serie de tumores, en el que he colaborado puntualmente desde mi incorporación al laboratorio en Junio de 2018 (ver comunicaciones a congresos Anexo-5), encontramos mutaciones activantes en 6 de los 7 genes analizados. Se evidenció que los AS-PTCs presentaban una densidad de mutaciones mucho mayor que los CL-PTCs y FV-PTCs de riesgo bajo o intermedio. El promedio de mutaciones por caso era de 2,4. La carga mutacional media de los Pts y DMs era de 1,6 y 2,2 mutaciones no sinónimas por caso respectivamente. El 92% de los casos presentaban mutaciones en al menos uno de los genes analizados [*TERTp* 69%, *BRAF* 54%, *KRAS* 23%, *NRAS* 23%, *HRAS* 15,4%, *PIK3CA* 15,4%]. La heterogeneidad genética intratumoral era evidente. El 67% de los casos mutados presentaban mutaciones activantes en más de un gen. En el 62,5% de los casos con heterogeneidad genética intratumoral coexistían mutaciones en tres genes diferentes. En aquellos casos en los que se genotipó más de un área de Pt y/o más de un área de DM se observó que la subclonalidad de los eventos genéticos era más común en los Pts que en las DMs. El status clonal evolucionaba con la

progresión tumoral y la metastatización. En la Figura-1 de Anexo-4 se incluyen dos de los casos mutados en dicho estudio como ejemplo de heterogeneidad genética intratumoral, clonalidad / subclonalidad de los eventos genéticos, segregación de mutaciones con las células metastásicas y cambios dinámicos espacio-temporales en el patrón de mutaciones. Enmarcado en rojo aparece el único caso encontrado mutado en el protooncogén *KIT* en este TFG. En la Figura-2 de Anexo-4 se muestran más en detalle las diferentes alteraciones genéticas encontradas en ambos estudios, en el único caso mutado en este TFG.

5.3.- RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE Pt Y SUS DMs

Mientras que en el estudio previo, en la misma serie de tumores, se utilizó el patrón heterogéneo de mutaciones somáticas presentes en algunos Pts y la distribución espacio-temporal de los clones de células cancerosas resultantes para dilucidar el orden relativo de adquisición de las mutaciones encontradas y construir árboles evolutivos [phylogenetic trees] que permitiesen inferir la filogenia del tumor, en este estudio al haber encontrado una sola mutación en el protooncogén *KIT*, en un área de DMs, en un único caso [caso #1], sólo era posible incorporar ese resultado al screening previo de mutaciones en dicho caso [ver mutaciones caso #1 en figuras 1 y 2 en Anexo-4] y colegir el correspondiente árbol filogenético con la nueva mutación (Figura-6).

Antes de ubicar las mutaciones encontradas en cualquier árbol es necesario subdividir las en tres clases para así poder determinar su papel en la tumorigénesis temprana o tardía: **1)** mutaciones troncales / ubicuas / públicas / universales; **2)** mutaciones compartidas / ramificadas / pervasivas, cuasi generalizadas; y **3)** mutaciones privadas / únicas / regionales / selectivas. Las mutaciones troncales son aquellas que están presentes en todas las áreas genotipadas (clonales). En consecuencia, se considera que surgen durante las primeras etapas de la tumorigénesis. Las mutaciones compartidas / ramificadas / pervasivas son aquellas que están presentes en “cuasi” todo el Pt pero no son dominantes y, por lo tanto, están ausentes en algunas de las áreas genotipadas (subclonales). Posiblemente, estas mutaciones subyacen a los procesos celulares que controlan el mantenimiento y la progresión del tumor. Este tipo de mutaciones se pueden detectar mediante secuenciación sistematizada, multirregional del tumor. El genotipado de una sola biopsia / área tumoral puede perderlas. Las mutaciones privadas / únicas son aquellas que están presentes sólo en una de las áreas tumorales.

El caso #1 mostro un patrón de árbol filogenético ramificado, no lineal (ver Figura-6). Presentaba tres mutaciones compartidas / ramificadas / pervasivas [clon **P3** con la mutación truncada Q609Stop en *BRAF*; clon **P4** con la mutación T599I en *BRAF* y clon **P5** con la mutación sinónima T58T en *HRAS*] con origen en un clon ancestral común **P1** portador de la mutación troncal Q61R en *HRAS*, que, en el transcurso de la evolución tumoral, adquirió una mutación troncal adicional en *TERTp* (C228T - población **P2**). Las dos áreas genotipadas de la misma DM en hueso (DM-1E y DM-1F) evidenciaron un patrón de siembra policlonal, parcialmente compartida, lo que significa que varios clones del Pt cooperaron en la colonización y siembra en la DM en hueso. Mientras que la DM-1F fue colonizada por grupos de células cancerosas con las mutaciones Q61R en *HRAS*, C228T en *TERTp* y T599I en *BRAF*, la DM-1E fue colonizada por grupos de células cancerosas con las mutaciones Q61R en *HRAS*, C228T en *TERTp* y T58T en *HRAS*. La DM-1F al evolucionar en el tiempo desarrolló, además, una mutación privada / única / regional / “de novo” en *KIT* (V559I – población **P6**). Aunque la mutación compartida / ramificada / pervasiva, “cuasi” generalizada Q609Stop en *BRAF* no se observó en ninguna de las áreas analizadas de DM, no podemos excluir su participación, dado su

impacto funcional, en otras áreas metastásicas no investigadas, a varios centímetros de las incluidas en el estudio.

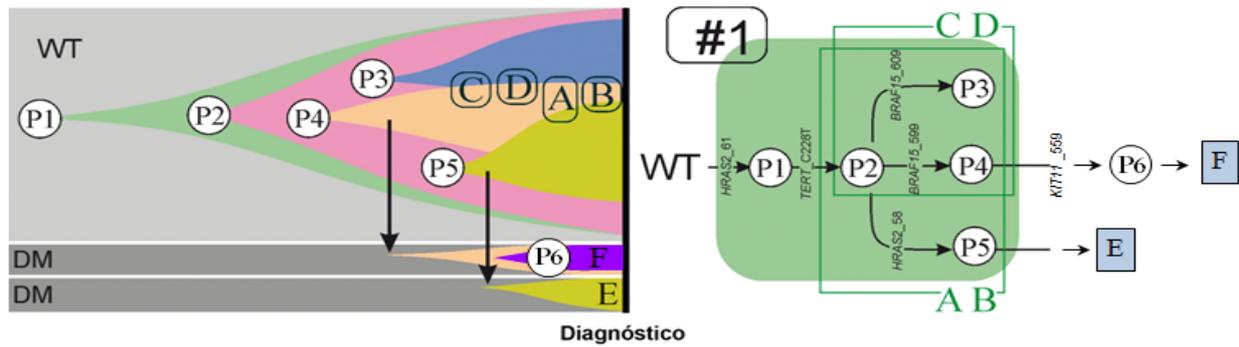


Figura 6. Árbol filogenético del único caso mutado en este estudio [caso #1]. Muestra el orden relativo de adquisición de las mutaciones encontradas en el caso, la trayectoria evolutiva y relación entre los diferentes subclones / poblaciones presentes en el Pt, así como el origen / raíz de las DMs.

6.- DISCUSIÓN

La información disponible a día de hoy sobre perfiles moleculares en ATA-high risk PTCs con DMs es muy escasa y en muchos casos sesgada por el diseño inicial del estudio, pues, en la gran mayoría de las casuísticas investigadas únicamente se analizan las alteraciones en muestras de tejido del Pt (14-18), se mezclan muestras de Pt y DM no pareadas, de diferentes pacientes (27-29) o bien se incluyen en un mismo grupo de análisis PTCs y PDTs (27,28,30) que son tumores muy diferentes desde el punto de vista morfológico y clínico. Incluso el estudio de la Red de Investigación del Atlas del Genoma del Cáncer [Cancer Genome Atlas Research Network] solo caracterizó, en su día, muestras de Pt, identificando zonas calientes de mutación o genes promotores de cáncer en Pts pero no en DMs.(31) Se desconoce si las DMs albergan alteraciones genéticas distintas más allá de las observadas en Pts. Poco se sabe sobre la contribución de la heterogeneidad molecular intratumoral a las DMs. Tampoco se ha analizado la existencia de cambios dinámicos en la distribución de mutaciones a través del espacio y el tiempo.

En un intento de complementar un estudio previo con 7 genes en la misma serie y, al mismo tiempo, arrojar algo de luz en este campo de investigación en la carcinogénesis folicular tiroidea, en este estudio, analizamos la prevalencia de mutaciones en 4 genes (*TP53*, *KIT*, *MED12* y región 5'UTR de *TBC1D12*) que se han asociado con progresión y agresividad tumoral en carcinomas de tiroides y otros cánceres.(6,15,16,20,22,27-33)

La prevalencia de mutaciones encontrada en este estudio en el oncogén *KIT* (8,3%) es considerablemente inferior a la reseñada por Gandolfi y cols. en muestras genotipadas de Pt procedentes de PTCs con DMs (20,5%),⁽¹⁶⁾ sin embargo se aproxima bastante a la reportada por Sohn y cols. en 10 casos analizados de PTCs y muestras pareadas de DMs (10%).⁽²⁰⁾ Como en nuestro caso, las 3 mutaciones descrita por Sohn y cols. [G565R, L576F y W582*] son mutaciones en el dominio no catalítico yuxtamembrana (exón 11), que surgen *de novo* en una DM sincrona de un paciente con un FV-PTC. [ver en Anexo-2 relevancia de este dominio en la función del gen]. La mutación encontrada, V559I, aparece reportada en 9 ocasiones en la base de datos COSMIC en 8 tipos diferentes de tumores malignos. Recientemente se ha observado que mutaciones en codones contiguos 557-558 favorecen el desarrollo de metástasis hepáticas en pacientes con tumores del estroma gastrointestinal (GIST).⁽³⁴⁾ Ueda y cols. han demostrado, en estudios *in vitro*, que se puede revertir la activación constitutiva de *KIT*, por una mutación en el mismo codón encontrado mutado en

este estudio (codón 559), administrando inhibidores tirosina quinasa como STI571 (Imatinib, Gleevec) y AG1296.⁽³⁵⁾ Se han observado efectos similares en pacientes con GIST mutados en esos codones tratados Imatinib.⁽³⁶⁾

La ausencia de mutaciones en *MED12*, en PTCs con DMs, parece indicar que, en realidad, *MED12* no es un biomarcador de virulencia útil en la carcinogénesis folicular tiroidea, capaz de prever la progresión metastásica de los PTCs y, por ende, capaz de mejorar la estratificación de los pacientes, en fases tempranas de la enfermedad, en base al riesgo de metastatización. Otros autores, que han genotipado también muestras pareadas de Pt y DM^(22,23,28) tampoco han encontrado mutaciones en *MED12*. Igualmente, el hecho de no haber encontrado mutaciones de *MED12* en una casuística muy numerosa de PDCs y ATCs analizada en nuestro grupo (datos no publicados) parece también apoyar los resultados observados en PTCs con DMs. En los estudios publicados por Ibrahimagic y cols.⁽³⁰⁾ y De biase y cols.,⁽¹⁵⁾ en los que se genotiparon únicamente muestras de Pt procedentes de PTCs con DMs, la prevalencia de mutaciones en *MED12* es, no obstante, muy superior (11% y 7% respectivamente). Ibrahimagic y cols. llegan incluso a sugerir que se trata de mutaciones oncogénicas, activantes, que pueden jugar un papel en la virulencia tumoral. Las discrepancias entre estudios no parecen justificarse ni por el tamaño muestral, ni por las variantes de PTC investigadas en los mismos. Para clarificar, pues, si *MED12* desempeña o no un papel relevante en la carcinogénesis folicular tiroidea y el desarrollo DMs sería necesario analizar casuísticas mucho más amplias de PTCs con DMs e investigar más en profundidad la función de las mutaciones que pudieran aparecer.

Teniendo en cuenta que la proteína P53 desempeña un papel clave en el control de toda una serie eventos muy importantes en el desarrollo de DMs (angiogénesis y linfangiogenesis tumoral, motilidad e invasividad celular, supervivencia celular, remodelado tisular, regulación del microambiente inflamatorio tumoral, evasión de las defensas naturales de nuestro organismo...) esperábamos encontrar mutaciones capaces de conferir a las células del Pt propiedades metastásicas o de capacitar a las células de las DMs para sobrevivir y escapar a la respuesta inmune. Sin embargo, no se encontró ni una sola mutación en las 50 muestras analizadas de Pt y DMs. Si revisamos la literatura encontramos estudios de PTCs con DMs en los que tampoco se han encontrado mutaciones de *TP53*^(15,19,23,30) y estudios en los que la prevalencia de mutaciones en *TP53* oscila entre 5-14%.^(18,20,22,29) Las discrepancias no parecen justificarse ni por el tamaño muestral, ni por las variantes de PTC investigadas en los diferente estudios. Nuestros resultados parecen sugerir que la inactivación de *TP53* es un evento genético evolutivamente tardío en la tumorigénesis de los PTCs agresivos, presumiblemente posterior a la visualización de la invasión y metastatización.

Aunque Mularoni y cols. describen una mutación en la región 5'UTR de *TBC1D12* en un paciente con cáncer de tiroides igual a la descrita en carcinomas de vejiga y mama [Chr 10: 96162368 C>T]⁽³⁷⁻³⁹⁾ en nuestra serie de PTCs con DMs no hemos encontrado ninguna mutación en la secuencia Kozak de *TBC1D12*. Al igual que ocurre en muchos otros tumores analizados por Son y cols.,⁽⁴⁰⁾ las mutaciones en la región 5'UTR de *TBC1D12* no se podrían considerar como mutaciones no codificantes promotoras de cáncer de tiroides. La sobreexpresión de Rab11 asociada a una pérdida de función *TBC1D12* como resultado de mutaciones en la secuencia Kozak no podría favorecer la migración, invasividad de las células cancerosas y desarrollo de DMs regulada por exosomas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Weinberg RA. The biology of Cancer. Edited by Garland Science, Taylor & Francis Group, 2007.
2. Muñoz A. Cancer: Genes y Nuevas Terapias. Editorial Helice 1997; 6-280.
3. Rosai J, DeLellis RA, Carcangiu ML, Frable WJ, Tallini G 2014 Tumors of the thyroid and parathyroid glands. Atlas of Tumor Pathology (4th Series, fascicle 21). Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. Edited by American registry of Pathology, MD, 2014.
4. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):292-306.
5. Davies L, Welch HG. Current thyroid cancer trends in the United States. *JAMA Otolaryngology Head and Neck surgery*. 2014; 140:317-322.
6. La Vecchia C, Negri. Thyroid cancer: The thyroid cancer epidemic – overdiagnosis or a real increase?. *Nat Rev Endocrinol*. 2017; 13:318-319.
7. Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlander N, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National Cancer Statistics. *Cancer*, 2018, 124:2785-2800.
8. Xing M. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(3):184-99.
9. Sampson E, Brierley JD, Le LW, Rotstein L, Tsanf RW. Clinical management and outcome of papillary and follicular (differentiated) thyroid cancer presenting with distant metastasis at diagnosis. *Cancer*. 2007; 110:1451-1456.
10. Lim H, Devesa SS, Sosa JA, Check D, Kitahara CM. Trends in thyroid cancer incidence and mortality in the United States, 1974-2013. *JAMA*. 2017; 317:1338-1348.
11. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, et al. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016; 26:1-133.
12. Tumino D, Frasca F, Newbold K. Updates on the Management of Advanced, Metastatic, and Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017, 8: 312.
13. Lin JD, Hsueh C, Chao TC. Long-Term Follow-Up of the Therapeutic Outcomes for Papillary Thyroid Carcinoma with Distant Metastasis. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94: e1063.
14. Xu B, Tuttle RM, Sabra MM, Ganly I, Ghossein R. Primary Thyroid Carcinoma with Low-Risk Histology and Distant Metastases: Clinicopathologic and Molecular Characteristics. *Thyroid*. 2017; 27(5):632-40.
15. de Biase D, Torricelli F, Ragazzi M, Donati B, Kuhn E, Visani M, et al. Not the same thing: metastatic PTCs have a different background than ATCs. *Endocr Connect*. 2018; 7(12):1370-9.
16. Gandolfi G, Biase D de, Sancisi V, Ragazzi M, Acquaviva G, Pession A, et al. Deep sequencing of KIT, MET, PIK3CA, and PTEN hotspots in papillary thyroid carcinomas with distant metastases. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21(5):L23-6.
17. Gandolfi G, Ragazzi M, Frasoldati A, Piana S, Ciarrocchi A, Sancisi V. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2015;172:403-413.
18. Gandolfi G, Ragazzi M, de Biase D, Visani M, Zanetti E, Torricelli F, et al. Genome-wide profiling identifies the THYT1 signature as a distinctive feature of widely metastatic Papillary Thyroid Carcinomas. *Oncotarget*. 2017; 9:1813-1825.
19. Lan X, Bao H, Ge X, Cao J, Fan X, Zhang Q, et al. Genomic landscape of metastatic papillary thyroid carcinoma and novel biomarkers for predicting distant metastasis. *Cancer Sci*. 2020; March 18. doi: 10.1111/cas.14389.
20. Sohn SY, Park WY, Shin HT, Bae JS, Ki CS, Oh YL, et al. Highly Concordant Key Genetic Alterations in Primary Tumors and Matched Distant Metastases in Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016; 26:672-682.
21. Melo M, Gaspar da Rocha A, Batista R, Vinagre J, Martins MJ, Costa G, et al. TERT, BRAF and NRAS in Primary Thyroid Cancer and Metastatic Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017; 102:1898-1907.
22. Masoodi T, Siraj AK, Siraj S, Azam S, Qadri Z, Albalawy WN, et al. Whole-Exome Sequencing of Matched Primary and Metastatic Papillary Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2020; 30(1):42-56.

23. Song E, Song DE, Ahn J, Kim TY, Kim WB, Shong YK, et al. Genetic profile of advanced thyroid cancers in relation to distant metastasis. *Endocr Relat Cancer*. 2020; March 1. pii: ERC-19-0452.R1. doi: 10.1530/ERC-19-0452.
24. Tuttle M, Morris LF, Haugen B, Shah J, Sosa JA, Rohren E, et al. Thyroid differentiated and anaplastic carcinoma. In: Amin MB, Edge SB, Greene F, Byrd D, Brookland RK, Washington MK, et al. (eds) *AJCC Cancer Staging Manual*. Eighth edition. Springer International Publishing, New York, NY, 2017.
25. Ivanova R, Soares P, Castro P, Sobrinho-Simões M. Diffuse (or multinodular) follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of ten cases of an aggressive form of differentiated thyroid carcinoma. *Virchows Arch.*, 2002, 440:418-424.
26. Baloch ZW, LiVolsi VA. Encapsulated follicular variant of papillary thyroid carcinoma with bone metastases. *Mod Pathol.*, 2000, 13:861-865.
27. Yoo SK, Song YS, Lee EK, Hwang J, Kim HH, Jung G, et al. Integrative analysis of genomic and transcriptomic characteristics associated with progression of aggressive thyroid cancer. *Nat Commun* 2019; 10(1): 2764
28. Jung CK, Jung SH, Jeon S, Jeong YM, Kim Y, Lee S, et al. Risk stratification using a novel genetic classifier including PLEKHS1 promoter mutations for differentiated thyroid cancer with distant metastasis. *Thyroid*. 2020; Apr 23. doi: 10.1089/thy.2019.0459.
29. Pozdeyev N, Gay LM, Sokol ES, Hartmaier R, Deaver KE, Davis S, et al. Genetic Analysis of 779 Advanced Differentiated and Anaplastic Thyroid Cancers. *Clin Cancer Res*. 2018; 24(13):3059-3068.
30. Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, et al. Genomic Alterations in Fatal Forms of Non-Anaplastic Thyroid Cancer: Identification of *MED12* and *RBM10* as Novel Thyroid Cancer Genes Associated with Tumor Virulence. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(19):5970-5980.
31. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-90.
32. Li AS, Reuter JA, Cenik C, Synder MP. . Investigating the functional significance of novel, recurrent noncoding mutations of TBC1D12 in bladder cancer. *Cancer Res* 2017;77(13 Suppl):Abstract 2457
33. Mularoni L, Sabarinathan R, Deu-Pons J, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. OncodriveFML: a general framework to identify coding and non-coding regions with cancer driver mutations. *Genome Biol*. 2016; 17(1):128
34. Wang HC, Li TY, Chao YJ, Hou YC, Hsueh YS, Hsu KH, et al. KIT Exon 11 Codons 557-558 Deletion Mutation Promotes Liver Metastasis Through the CXCL12/CXCR4 Axis in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Clin Cancer Res*. 2016;22(14):3477-87.
35. Ueda S, Ikeda H, Mizuki M, Ishiko J, Matsumura I, Tanaka H, et al. Constitutive activation of c-kit by the juxtamembrane but not the catalytic domain mutations is inhibited selectively by tyrosine kinase inhibitors STI571 and AG1296. *Int J Hematol*. 2002;76(5):427-35.
36. Okamura T, Kanda T, Hirota S, Nishimura A, Kawahara M, Nikkuni K. Imatinib therapy for a patient with metastasis of colonic gastrointestinal stromal tumor: report of a case. *Clin J Gastroenterol*. 2013;6(2):116-21.
37. Mularoni L, Sabarinathan R, Deu-Pons J, González-Pérez A, Lopez-Bigas N. OncodriveFML: a general framework to identify coding and non-coding regions with cancer driver mutations. *Genome Biology* 2016; 17:128
38. Araya CL, Cenik C, Reuter JA, Kiss G, Pande VS, Snyder MP, et al. Identification of Significantly Mutated Regions Across Cancer Types Highlights a Rich Landscape of Functional Molecular Alterations. *Nat Genet*. 2016; 48(2):117-25.
39. Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, Tiao G, Engreitz JM, Kim J, et al. Recurrent and Functional Regulatory Mutations in Breast Cancer. *Nature*. 2017; 547(7661):55-60.
40. Son HJ, Kim MS, Yoo NJ, Lee SH. Absence of Promoter Mutation in TBC1D12 Gene in Solid and Hematologic Neoplasia. *Pathol Oncol Res*. 2019; 25(4):1675-6.

ANEXOS – MATERIAL SUPLEMENTARIO

ANEXO 1 – ABREVIATURAS

ABRO-1	Hermano Abraxas 1	MAPK	Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	MC	Carcinomas Medulares
AJCC	Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer	MDE	Acrilamida de mayor sensibilidad en la detección de mutaciones
AKT	Homólogo del oncogén viral del timoma murino V-Akt que codifica para una proteína serina /treonina quinasa	MDM	Proteína Murina Doble Minuto
ARN	Ácido Ribonucleico	ME	Maine, USA
AS-PTC	PTC en Estadios Avanzados	MED12	Subunidad 12 del Complejo Mediador
ATA	Sociedad Americana de Tiroides	MEN2B	Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2B
ATC	Carcinomas Anaplásicos de Tiroides	Mx-PTC	PTC Mixto
AWD	Vivo Con Enfermedad	MYC	Oncogén homólogo de la Mielocitomatosis
BCL2	Linfoma de células B	NH	New Hampshire, USA
Bp	Pares de Bases	onco-miR	MicroARN oncogénico
BRAF	Homólogo del oncogén viral del sarcoma murino V-Raf que codifica para una proteína serina / treonina quinasa	OMS	Organización Mundial de la Salud
CA	California, USA	P53	Proteína de masa molecular aparente de 53 kDa
CD	Grupo de Diferenciación	PA	Pensilvania, USA
CDK4	Quinasa Dependiente de Ciclina 4	PATZ1	Proteína que contiene un dominio POZ de interacción proteína-proteína, un dominio de unión al ADN en gancho A-T y dominio de unión al ADN en dedo de zinc
Chr	Cromosoma	PAX8	Gen 8 de la Caja Emparejada
CK19	Citoqueratina-19	PBF	Factor de Unión PTTG1
CL-PTC	Variante Clásica de PTC	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Cols.	Colaboradores	PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato Quinasa 3, Subunidad Catalítica Alfa
COSMIC	Catálogo De Mutaciones Somáticas En Cáncer	PDTC	Carcinomas Pobremente Diferenciados de Tiroides
DE	Delaware, USA	Pt	Tumor Primario
dNTP	Desoxirribonucleótido Trifosfato	PTC	Carcinoma Papilar de Tiroides
DOD	Muerto Por la Enfermedad	Rab	Proteína GTPasa de la superfamilia de RAS
DM	Metástasis a Distancia	RAS	Homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten que codifica par una proteína de la superfamilia GTPasa
EDTA	Ácido Etilendiaminetetraacético	RET	Protooncogén reorganizado durante la transfección que codifica para una proteína receptora de membrana tirosina quinasa
EFV-PTC	FV-PTC Encapsulado	Rpm	Revoluciones Por Minuto
EIF1AX	Factor 1A de Iniciación de la Traducción Eucariota, ligado a X	SCF	Factor de Crecimiento de Células Madre
EMT	Trasformación Epitelio Mesenquimal	SFK	Quinasa de la familia SRC
FATHMM	Análisis Funcional a través de los Modelos Ocultos de Markov	SSCP	Polimorfismos conformacionales de cadena sencilla
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentación	STAT	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción
FFPE	Fijado en Formol y Embebido en Parafina	Taq	Thermus aquaticus
FTC	Carcinoma Foliculares de Tiroides	TBC1D12	Miembro 12 de la Familia del Dominio 1 Tre-2/Bub2/Cdc16
FV-PTC	Variante Folicular de PTC	TBE	Disolución de Tris, Borato y EDTA
Gal-3	Galectina-3	TE	Disolución de Tris y EDTA
GAP	Proteína Activadora de la GTPasa	TERTp	Promotor de la Telomerasa Transcritpasa Inversa
GIST	Tumores del estroma gastrointestinal	TFG	Trabajo de Fin de Grado
GRB	Receptor Obligado de Factor de Crecimiento	Tg	Tiroglobulina
HGMA1	Grupo 1 de Proteínas de Alta Movilidad	TP53	Gen codificante de la proteína supresora tumoral P53
HIPK2	Proteína Quinasa 2 de Interacción con un Homeodominio	TPO	Peroxidasa Tiroidea
H&E	Tinción Hematoxilina-Eosina	TTF	Factor de Transcripción Tiroidea
HUWE1	Proteína ubiquitina-ligasa E3 que contiene los dominios HECT, UBA y WWE	UK	Reino Unido
IBGM	Instituto de Biología y Genética Molecular	USA	Estados Unidos de América
Ig	Inmunoglobulina	UTR	Región No Traducida
JAK	Quinasa Janus	UV	Ultravioleta
KIT	Homólogo del oncogén viral del sarcoma felino Hardy-Zuckerman V-Kit, que codifica para un receptor de membrana tirosina quinasa	WIP1	Proteína de Interacción con el Dominio WPP
LNM	Metástasis en Ganglio Linfático	WT	Wild Type (tipo silvestre)
MA	Massachusetts, USA		

ANEXO 2 – BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GENES ANALIZADOS: función en las células normales y neoplásicas, mecanismos de activación o inactivación y dominios funcionales de la proteína

TP53

TP53 es un gen supresor tumoral localizado en el cromosoma 17p13 que, cuando reconoce daño en el ADN, induce la detención del ciclo celular (en el paso de la fase G1 a S) a través de la regulación positiva del gen *p21* y activa genes de reparación del ADN. Paralelamente, al detectar daño en el ADN activa también la transcripción de microARNs de la familia miR34 que inhiben la traducción de genes antiapoptóticos (*BCL2*) y de genes promotores del crecimiento (ej. *MYC*, *CDK4*). Cuando no logra reparar el daño y mantener la integridad y estabilidad genómica induce la apoptosis o senescencia previniendo la replicación de células dañadas. El gen *TP53* consta de 11 exones, de los cuales el 1 y el 11 no se traducen. Codifica para una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos, que actúa como un factor de transcripción que reconoce una secuencia específica del ADN y se une a ella en un intento de frenar la transformación maligna y progresión tumoral. La proteína p53 consta de 5 dominios: **1)** Dominio de transactivación (TAD) o de activación de la transcripción de genes diana en el extremo amino terminal (aminoácidos 1-42; 43-63); **2)** Dominio con secuencia rica en prolina (PRD) necesario para la completa actividad supresora e inductor de la apoptosis (aminoácidos 64-91); **3)** Dominio de unión a secuencia específica del ADN (DBD) (aminoácidos 100-300). Las mutaciones en este dominio interfieren en la función supresora, particularmente cuando afectan a puntos calientes necesarios para la unión de la proteína al ADN (codones 248 y 273) o necesarios para la estabilidad de la proteína (codones 175, 249 y 282). La mayor parte de las mutaciones asociadas a cáncer asientan en este dominio (88%); **4)** Dominio de Tetramerización (TD) (aminoácidos 334-356). Cuando está dañado se produce una inactivación funcional; **5)** Dominio Regulador negativo, básico o alcalino, en el extremo carboxilo terminal, esencial en la regulación de la actividad de p53 (aminoácidos 364-396). La pérdida de función de p53 provoca inestabilidad genómica, por la imprecisión del sistema de reparación, ocasionando la progresión tumoral. La inactivación de p53 en el cáncer de tiroides se produce por: **A)** mutación puntual, principalmente en los exones 5-8, genera una proteína truncada, inestable o afuncional (aparece en el 0-5% de los PTC y en el 65-90% de los ATC, lo que sugiere que su presencia favorece la dediferenciación, provocando el paso de un carcinoma indolente a letal);⁽¹⁾ **B)** sobreexpresión de *HGMA1* y disminución de la expresión de *PATZ1* (impiden que p53 se una al ADN); **C)** disminución de la expresión de *ABRO-1* y sobreexpresión de *PBF* (disminuyen la estabilidad de p53 y median su degradación por ubiquitinación); **D)** disminución de la expresión de la ubiquitina E3 ligasa *HUWE1* con la consiguiente sobreexpresión de *MDM-S*, *MDM4-211* y *MDM-2* (provoca la ubiquitinación de p53 e impide su unión al ADN); **E)** sobreexpresión de *WIP1* y disminución de la expresión de *HIPK2* (disminuye los niveles de p53, aumentando los de *Gal-3*, reduciendo la sensibilidad apoptótica).⁽²⁾

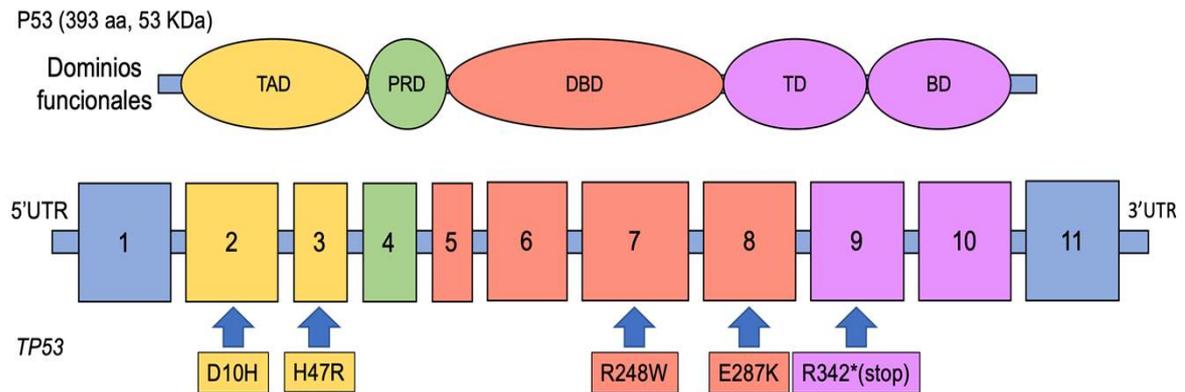


Figura 1. El gen *TP53*, la proteína P53 y sus dominios funcionales. Los exones 1 y 11 son no codificantes. Los colores correlacionan los exones con su dominio funcional. TAD: Dominio de activación de la transcripción; PRD: Dominio con secuencia rica en prolina; DBD: Dominio de unión a secuencia específica del ADN; TD: Dominio de tetramerización; BD: Dominio básico o alcalino. Se señalan las mutaciones descritas en PTC con DM. Fuente: Elaboración propia.

C-KIT

C-KIT es un protooncogén localizado en el cromosoma 4q11-4q13, que codifica una proteína transmembrana glucosilada con actividad de tirosinquinasa (CD117). Para su activación, requiere la unión de su ligando, el factor de crecimiento de células madre (SCF).⁽³⁾ Participa en vías de señalización (MAPK, PIK3CA, AKT, RAS, GRB, JAK, STAT, SFK y fosfolipasa C γ) que regulan la proliferación celular, apoptosis, adhesión, quimiotaxis, hematopoyesis, melanogénesis y fertilidad. En las neoplasias tiroideas se ha observado que la expresión de *c-Kit* se asocia con el nivel de diferenciación de las mismas y el control del crecimiento / proliferación de los tireocitos, detectándose mayor expresión de *c-Kit* en tumores benignos, que en los carcinomas con una tasa de proliferación mayor, particularmente los histotipos menos diferenciados como los PDTCs y ATCs. Algunos autores han asociado la sobreexpresión de *c-Kit* con progresión tumoral⁽⁴⁾, adquisición por parte de las células de rasgos mesenquimatosos (transformación epitelio mesenquimal – EMT) a través de la inducción de factores de transcripción reguladores de EMT y mayor capacidad de migración, invasión y metástasis.^(5,6) El gen *c-Kit* consta de 21 exones y codifica para una proteína de 979 aminoácidos. Los exones 1 a 10 codifican para el dominio extracelular Ig-like compuesto a su vez por 5 subdominios Ig-like. El exón 11 codifica para el dominio citosólico, no-catalítico yuxtamembrana. Los exones 12 a 20 codifican para los dominios tirosina quinasa intracelular (dominio proximal, de inserción y distal). El exón 21 codifica el extremo C-terminal. La mayoría de las mutaciones descritas en tiroides y otros tumores se sitúan en los exones 9 (alberga el 10-20%), 11 (70%) y 13 (estudiados en este trabajo). La mutación del exón 11, dominio citosólico, no catalítico yuxtamembrana, induce la dimerización del receptor en ausencia de ligando, provocando la autofosforilación intracelular de los dominios tirosina quinasa, comenzando la señalización intracelular.⁽³⁾ En células normales el dominio yuxtamembrana funciona como una región reguladora autoinhibitoria del dominio quinasa de *KIT*. Se ha comprobado que mutaciones en dicho dominio interfieren en su estabilidad y en la interacción intramolecular con el lóbulo quinasa N-terminal del dominio quinasa provocando una activación más rápida del receptor y la transmisión de estímulos mitogénicos. Al transfectar células mutadas en *KIT* con un péptido yuxtamembrana se inhibe el crecimiento / proliferación celular.⁽⁷⁾

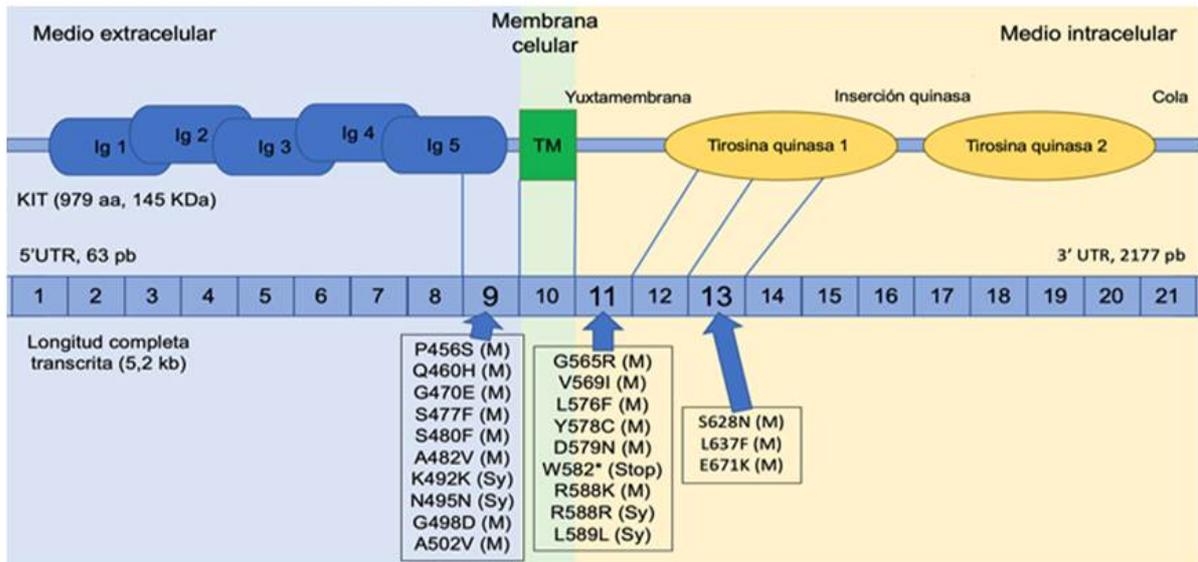


Figura 2. Estructura del gen y proteína *c-KIT*, señalándose las mutaciones descritas en la literatura en PTC con DM. M: missense; Sy: synonymous. Fuente: Elaboración propia.

MED12

MED12 es un gen localizado en el cromosoma Xq13.1, que codifica para una de las 25 subunidades del complejo proteico macromolecular que actúa como mediador de la transcripción de la subunidad 12 de la ARN polimerasa II. Tras la unión a factores de transcripción, el complejo mediador actúa como quinasa capaz de modular e iniciar la transcripción de ADN por medio de la interacción con la ARN polimerasa II, lo que modificará el crecimiento, migración y diferenciación celular. *MED12* es esencial para el ensamblaje y activación del módulo quinasa del complejo mediador, por lo que su mutación puede ocasionar ganancia o pérdida de la actividad quinasa, actuando como promotor o supresor de la tumorigénesis en función de la actividad biológica que la quinasa desempeñe en cada tejido.^(8,9) El papel de *MED12* en el ensamblaje y activación del módulo quinasa del complejo mediador lo convierte en una atractiva diana terapéutica. Su versatilidad, no obstante, para actuar tanto como activador o como represor de la transcripción, dependiendo del contexto tisular, hace que, antes de inhibirlo, siempre sea necesario tener en mente su rol como promotor o supresor tumoral. Recientemente, Ibrahimovic y cols. han observado que, en los carcinomas agresivos de tiroides no ATC [“fatal forms of non-anaplastic thyroid cancer”], las mutaciones de *MED12* no se asocian ni con mutaciones en el promotor de *TERT* ni con mutaciones en *BRAF* o *RAS*, que son genes por excelencia asociados con progresión tumoral y agresividad en la carcinogénesis folicular tiroidea. La no coexistencia de mutaciones en *MED12* y otros genes deletéreos y el hecho de observar siempre una misma mutación puntual en *MED12*, que afecta a aminoácidos evolutivamente altamente conservados, en una zona caliente del gen, como es el exón 2, lleva a Ibrahimovic y cols. a sugerir que la mutación encontrada, G44C, es una mutación activante, oncogénica y que *MED12* puede jugar un papel relevante en la agresividad tumoral.⁽⁸⁾ El gen *MED12* consta de 45 exones y codifica para una proteína de 2177 aminoácidos que consta de 4 dominios en función de los aminoácidos predominante (L: dominio rico en Leucina; LS: dominio rico en Leucina y Serina; PQL: dominio rico en Prolina, Glutamina y Leucina; OPA: dominio apareado opuesto).

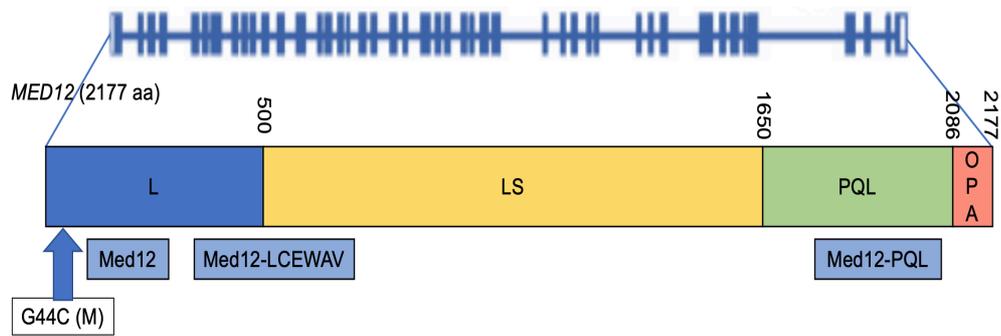


Figura 4. Estructura del gen *MED12* y de su proteína con los 4 dominios. Los dominios proteicos conservados se indican debajo (recuadros azul claro). Se señalan las mutaciones descritas en la literatura en PTC con MD. Fuente: Elaboración propia.

TBC1D12

TBC1D12 (Tre-2/Bub2/Cdc16 1 Domain Family Member 12) es un gen localizado en el cromosoma 10q23.33, que codifica para una proteína GAP [GTPase activating protein] de 775 aminoácidos, que participa en el reciclaje del endosoma y es dependiente de la interacción con *Rab11*, que establece a través de su región media, promoviendo la actividad GTPasa intrínseca de *Rab11* (interviene en el transporte de membrana e intracelular y la transducción de señales). A diferencia de otras proteínas TBC asociadas con cáncer (ej. *TBC1D1*, *TBC1D3*, *TBC1D7*, *TBC1D8*...) la función biológica de *TBC1D12* y su implicación en la carcinogénesis no están completamente esclarecidas.^(10,11) Se han descrito recientemente mutaciones somáticas en la secuencia regulatoria Kozak (-1 y -3 nucleótidos aguas arriba del punto de iniciación de la traducción proteica - región del cromosoma 10: 96162368–96162370) en pacientes con cáncer de vejiga (15-25%) y cáncer de mama (4%).⁽¹²⁻¹⁴⁾ Al aplicar el método OncodriveFML a las mutaciones encontradas en diferentes cohortes de cáncer (mama, vejiga, tiroides...) incluidas en el estudio de todo el genoma “WG-505 dataset”, Mularoni y cols. encontraron la misma mutación 10: 96162368 C>T en un paciente con cáncer de tiroides (1/34 →3%).⁽¹⁵⁾ Al ser mutaciones muy próximas al codón de iniciación podría verse afectada la traducción proteica. Mientras que en el cáncer mama se ha observado que las mutaciones de *TBC1D12* disminuyen su expresión, sugiriendo una pérdida de sus funciones, en el cáncer de vejiga no se produce esa disminución en la expresión.^(13,14) La sobreexpresión de *Rab11* asociada a una pérdida de función *TBC1D12* como resultado de mutaciones en la secuencia Kozak podría favorecer la migración, invasividad de las células cancerosas y desarrollo de DMs regulada por exosomas.⁽¹⁶⁾

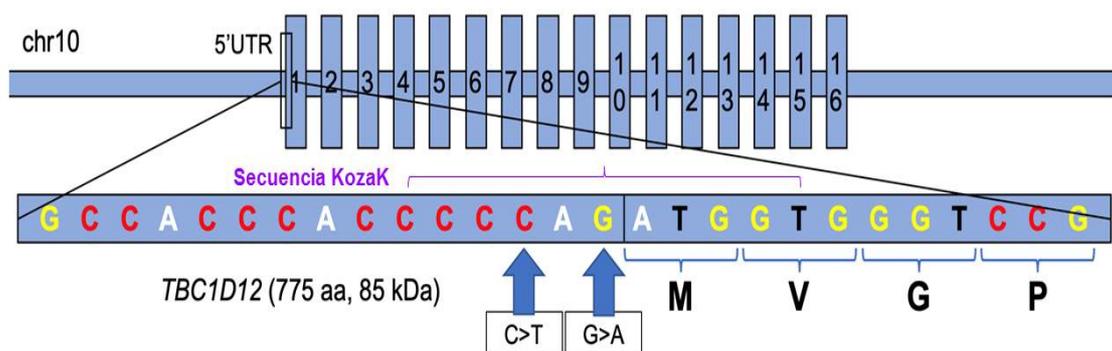


Figura 3. Estructura del gen *TBC1D12* (con sus exones) y de su región 5'UTR, señalándose las mutaciones descritas en la literatura en cáncer de mama, vejiga y tiroides. Fuente: Elaboración propia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):292-306.
2. Manzella L, Stella S, Pennisi MS, Tirrò E, Massimino M, Romano C, et al. New Insights in Thyroid Cancer and p53 Family Proteins. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
3. Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, et al. Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J*. 1988; 7(4):1003-11.
4. Franceschi S, Lessi F, Panebianco F, Tantillo E, La Ferla M, Menicagli M, et al. Loss of c-KIT expression in thyroid cancer cells. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173913
5. Gavert N, Shvab A, Sheffer M, Ben-Shmuel A, Haase G, Bakos E, et al. c-Kit is suppressed in human colon cancer tissue and contributes to L1-mediated metastasis. *Cancer Res*. 2013;73(18):5754-63.
6. Tang YL, Fan YL, Jiang J, Li KD, Zheng M, Chen W, et al. C-kit induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to salivary adenoid cystic cancer progression. *Oncotarget*. 2014; 5(6):1491-501.
7. Chan PM, Ilangumaran S, La Rose J, Chakrabarty A, Rottapel R. Autoinhibition of the kit receptor tyrosine kinase by the cytosolic juxtamembrane region. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(9):3067-78.
8. Ibrahimasic T, Xu B, Landa I, Dogan S, Middha S, Seshan V, et al. Genomic alterations in fatal forms of non-anaplastic thyroid cancer: Identification of MED12 and RBM10 as novel thyroid cancer genes associated with tumor virulence. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(19):5970-80.
9. de Biase D, Torricelli F, Ragazzi M, Donati B, Kuhn E, Visani M, et al. Not the same thing: metastatic PTCs have a different background than ATCs. *Endocr Connect*. 2018; 7(12):1370-9.
10. Fukuda M. TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab?. *Biosc Rep*. 2011; 31(3):159-68.
11. Oguchi ME, Noguchi K, Fukuda M. TBC1D12 is a novel Rab11-binding protein that modulates neurite outgrowth of PC12 cells. *PLoS ONE* 2020; 12(4): e0174883.
12. Araya CL, Cenik C, Reuter JA, Kiss G, Pande VS, Snyder MP, et al. Identification of Significantly Mutated Regions Across Cancer Types Highlights a Rich Landscape of Functional Molecular Alterations. *Nat Genet*. 2016; 48(2):117-25.
13. Jeeta RR, Gordon NS, Baxter L, Goel A, Noyvert B, Ott S et al. Non-Coding Mutations in Urothelial Bladder Cancer: Biological and Clinical Relevance and Potential Utility as Biomarkers. *Bladder Cancer* 2019; 5:263-272.
14. Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, Tiao G, Engreitz JM, Kim J, et al. Recurrent and Functional Regulatory Mutations in Breast Cancer. *Nature*. 2017; 547(7661):55-60.
15. Mularoni L, Sabarinathan R, Deu-Pons J, González-Pérez A, Lopez-Bigas N. OncodriveFML: a general framework to identify coding and non-coding regions with cancer driver mutations. *Genome Biology* 2016; 17:128
16. Tzeng HT, Wang Y. Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *J Biomed Sci* 2016; 23:70

ANEXO 3 – FIGURAS METODOLOGÍA

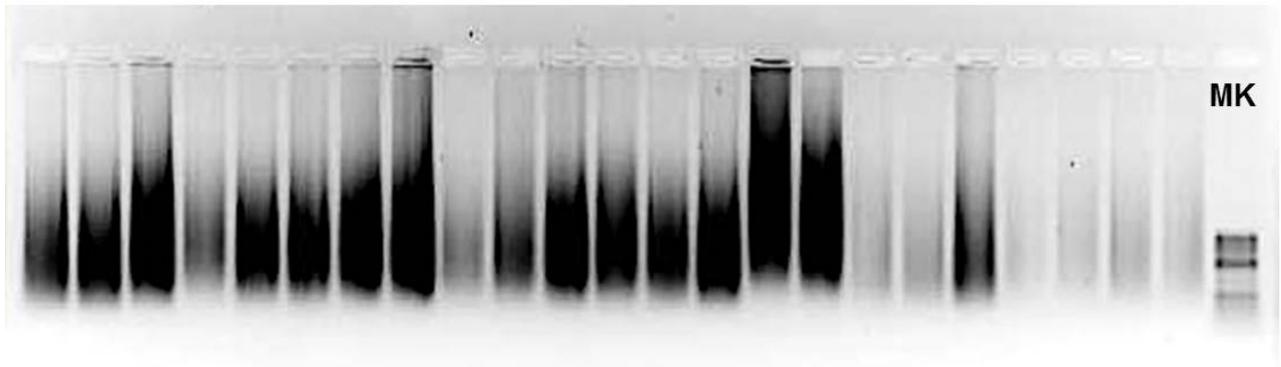


Figura-1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar la calidad y grado de degradación del ADN genómico. MK: patrón de tamaños moleculares.

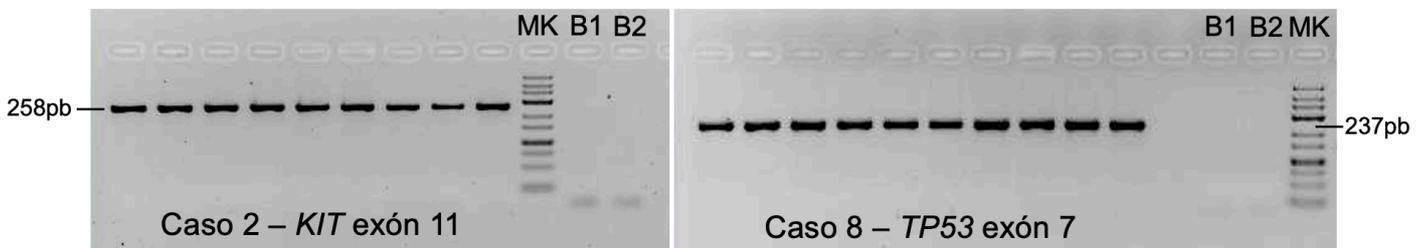


Figura-2. Ejemplo de PCR en dos de los genes investigados. B: blanco.

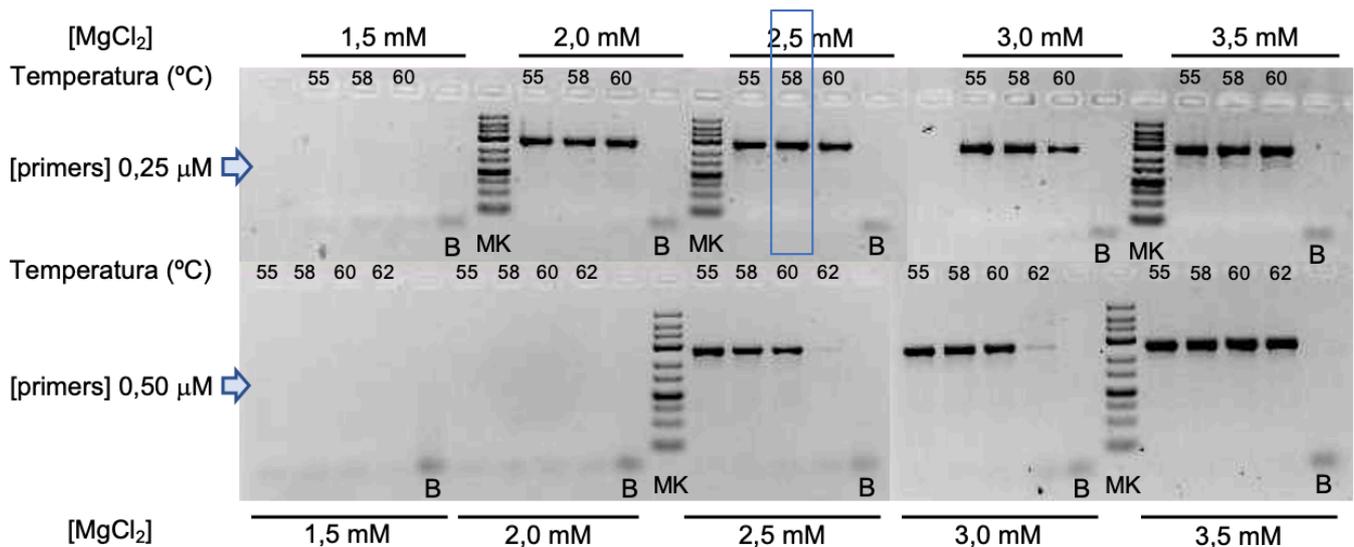


Figura-3. Gradiente de Optimización de PCR de *KIT* exón 11. El recuadro señala las condiciones de PCR seleccionadas.

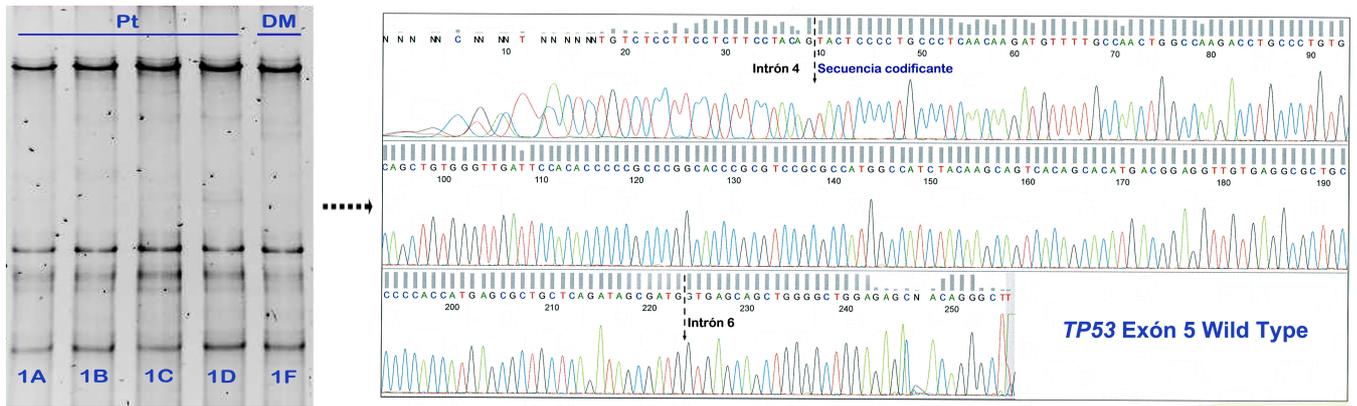


Figura-4. Ejemplo de SSCP (Singel Strand Conformation Polymorphism) en *TP53* exón 5.



Figura-5. Ejemplo de Gel de Agarosa al 3% con productos de PCR purificados por columnas [Illustra™ GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification kit].

Tabla-1: Condiciones de PCR de cada una de las regiones del genoma amplificadas en este estudio					
Gen y región	Secuencia de los primers	Tamaño Amplicón pb*	Tª de anillamiento °C	[primers] µM	[MgCl ₂] mM
<i>TP53</i> Exón 5	[+] 5' -CCGTCTTCCAGTTGCTTTAT- 3' [-] 5' -AGCCCTGTCGTCTCTCCA- 3'	288	58	0,5	1,75
<i>TP53</i> Exón 6	[+] 5' -GGGCTGGTTGCCAGGGT- 3' [-] 5' -AGTTGCAAACCAGACCTCA- 3'	307	60	0,5	1,75
<i>TP53</i> Exón 7	[+] 5' -CTTGCCACAGGTCTCCCCAA- 3' [-] 5' -AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA- 3'	237	60	0,4	1,5
<i>TP53</i> Exón 8	[+] 5' -GGTTGGGAGTAGATGGAGCC- 3' [-] 5' -TGAGGCATAACTGCACCCCTT-3'	285	60	0,5	3
<i>TP53</i> Exón 9	[+] 5' -CCTTTCTTGCCTCTTTCT- 3' [-] 5' -CCCCAATTGCAGGTAACA- 3'	190	58	0,25	2,5
<i>KIT</i> Exón 11	[+] 5' -CCCCACAGAAACCCATGTAT- 3' [-] 5' -ACCCAAAAGGTGACATGGA- 3'	258	58	0,25	2,5
<i>KIT</i> Exón 13	[+] 5' -CATCAGTTTGCCAGTTGTGC- 3' [-] 5' -ACACGGCTTTACCTCCAATG- 3'	174	60	0,25	3
<i>MED12</i>	[+] 5' -GTAACGATCTGTTCTACACGG- 3' [-] 5' -TGGCAGAGTTGTCTCACCTT- 3'	254	60	0,25	2
<i>TBC1D12</i>	[+] 5' -CGCCCTCAAGCAACTGTC- 3' [-] 5' -AGCAACTGGGGTTTCTTCC- 3'	211	58	0,5	2,5

*PB: pares de bases

ANEXO 4 – TABLA Y FIGURAS COMPLEMENTARIAS A LOS RESULTADOS

Tabla con los resultados del análisis de mutaciones en *KIT*, *MED12*, *TP53* y *TBC1D12* en las 50 áreas genotipadas de Pt y DMs, en 12 pacientes con PTCs.

Tabla-1: Genotipado espacio-temporal de *P53*, *KIT*, *MED12* y promotor de *TBC1D12* en 12 pacientes con PTC y muestras pareadas de metástasis vía sanguínea (DMs)

Diagnóstico Histológico	Caso			<i>P53</i> status					<i>KIT</i> status		<i>MED12</i> status	<i>TBC1D12</i> status
	ID	Áreas Analizadas	Patrón de crecimiento	Exón 5	Exón 6	Exón 7	Exón 8	Exón 9	Exón 13	Exón 15	Exón 2	5' UTR
FV-PTC ψ	1	1A Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		1B Pt	HGPD-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		1C Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		1D Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		1E DM	FV-PTC									
		1F DM	FV-PTC							c.1675 G>A GTT>ATT V559	WT	WT
FV-PTC ψ	2	2A DM	CL-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2B DM	CL-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2C Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2D Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2E Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2F Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2G Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2H Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		2I Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC	4	4A Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		4B Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		4C DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC ψ	5	5 DM	CL-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	
FV-PTC ψ	6	6A Pt	FV-PTC η	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		6B DM	HGPD-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		6C DM	HGPD-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		6E Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC	7	7 DM	Mx-PTC (FV)	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	
FV-PTC ψ	8	8A Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8B Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8C Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8D DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8E DM	HGPD-PTC $\#$	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8F DM	FV-PTC η	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8G DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8H DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8I DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		8J DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC	9	9A Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		9B Pt	FV-PTC η	WT	WT	C.673 - 17 C>T	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		9C LNM	CL-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		9D DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
Mx-PTC mayoritariamente FV-PTC	10	10A Pt	Mx-PTC (FV)	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		10B Pt	Mx-PTC (FV)	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		10C LNM	Mx-PTC (FV)	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		10D LNM	Mx-PTC (FV)	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		10E LNM	Mx-PTC (FV)	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		10F DM	CL-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC	11	11A Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		11B DM	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC	12	12A Pt	FV-PTC η	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		12B DM	HGPD-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
FV-PTC	13	13A Pt	FV-PTC	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
		13B DM	HGPD-PTC $\#$	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Abreviaturas: WT, wild type; Pt, tumor primario; LNM, Metástasis en Ganglios Linfáticos; DM, Metástasis a Distancia; HGPD-PTC, Carcinoma Papilar de Tiroides pobremente diferenciado de alto grado / " High-Grade Poorly Differentiated Papillary Thyroid Carcinoma" de acuerdo con los criterios histológicos descritos en Atlas of Tumor Pathology : Tumors of the Thyroid Gland, 3rd series, AFIP; Mx-PTC (FV), Carcinoma Papilar Mixto con discreto predominio del patrón de crecimiento variante folicular de PTC.

¶ Foco microscópico en esta área del tumor de HGPD-PTC.

Foco microscópico en esta área del tumor de FV-PTC.

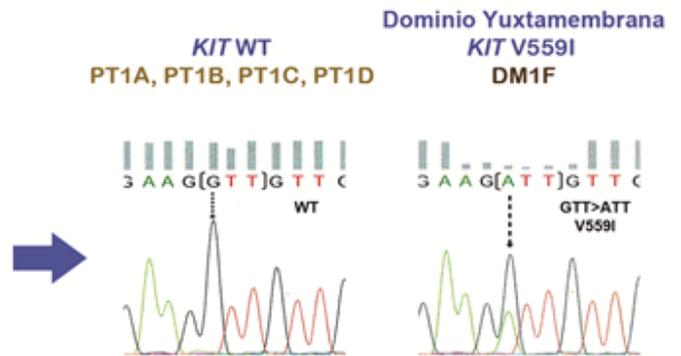
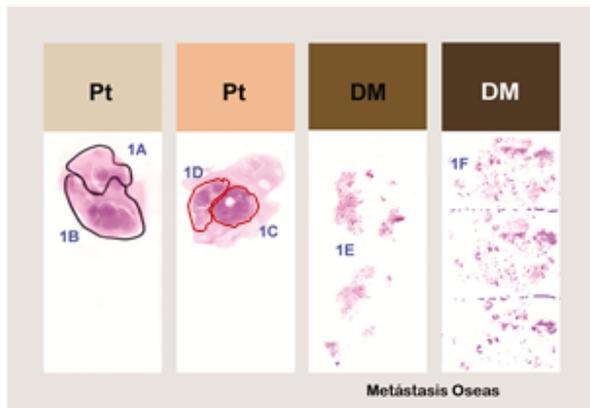
ψ algún foco / agrupación microscópica de células altas.

Figura-1: Estudio previo en la misma serie de tumores, en el que colaborado puntualmente desde mi incorporación al laboratorio en Junio de 2018, y a diferencia de este estudio se encontraron mutaciones activantes en 6 de los 7 genes analizados. Se incluyen dos de los casos mutados en dicho estudio como ejemplo de heterogeneidad genética intratumoral, clonalidad / subclonalidad de los eventos genéticos, segregación de mutaciones con células metastásicas y cambios dinámicos espacio-temporales en el patrón de mutaciones. Enmarcado en rojo el único caso encontrado mutado en este TFG.

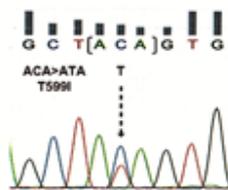


Figura-2. Se muestran más en detalle las diferentes alteraciones genéticas encontradas en ambos estudios, en el único caso mutado en este TFG.

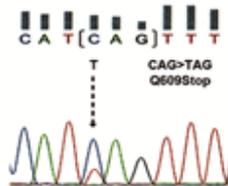
**Clonalidad de mutaciones en *TERTp* y *HRAS*
Subclonalidad de mutaciones en *BRAF*
Mutación de novo de *KIT* en DM**



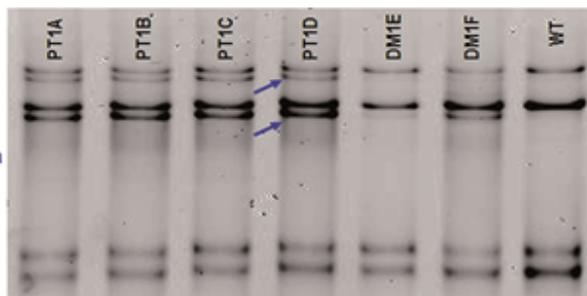
***BRAF* T599I - Dominio Kinasa**
PT1A, PT1B, PT1C, PT1D
DM1F



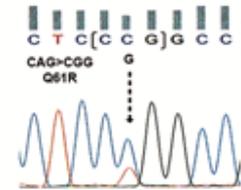
***BRAF* Q609Stop - Dominio Kinasa**
PT1A, PT1BB, PT1C, PT1D



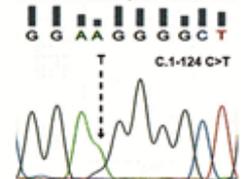
SSCP de *HRAS*



***HRAS* Q61R - Dominio GTPasa**
PT1A, PT1B, PT1C, PT1D
DM1E, DM1F



***TERT* C228T - Promotor**
PT1A, PT1B, PT1C, PT1D
DM1E, DM1F



ANEXO 5 – COMUNICACIONES A CONGRESOS

Comunicaciones a Congresos con resultados de estudio previo de mutaciones en 7 genes en la misma serie. Estudio en el que he participado puntualmente desde el verano de 2018 tras mi incorporación al grupo de Patobiología del Cáncer con una beca de investigación de la AECC de Valladolid y posteriormente como alumno interno de Anatomía Patológica.

1. **AUTORES/AS:** Gil-Bernabé S, Feás Rodríguez N, Vega Herrero M, **Estébanez García JJ**, Soto de Prado D, Fra Rodríguez J, García-Rostán G.

TÍTULO: Spatiotemporal intratumor genetic heterogeneity and clonal evolution in PTCs and paired DM.

CONGRESO: 44th Congress of the European Society for Medical Oncology (ESMO).

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster – Oral Discussion Ref. 1864

PUBLICACIÓN: Annals of Oncology, 30, Suppl. 5, pp757-757, October 2019

IF year publication: 14.196 WOS -JCR-2019

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdz267.002>

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona, Spain

AÑO: 2019

2. **AUTORES/AS:** Gil-Bernabé S, Feás Rodríguez N, Vega Herrero M, **Estébanez García JJ**; García – Rostán G.

TÍTULO: Spatio-temporal genetic heterogeneity and clonal evolution in advanced papillary thyroid carcinomas and matched distant metastases

CONGRESO: 110TH Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR).

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Poster Ref. 2770 - Session Expression Profiling and Biomarkers of Tumor Progression and Metastasis

PUBLICACIÓN: Cancer Research, 79(13) Suppl., July 2019

IF year publication: 8.378 WOS -JCR-2019

https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/13_Supplement/2770

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Atlanta, Georgia, USA

AÑO: 2019

3. **AUTORES/AS:** Gil-Bernabé S, Feás Rodríguez N, Vega Herrero M, **Estébanez García JJ**, Fra J, García-Rostán G.

TÍTULO: Dissection of spatio-temporal dynamic changes in subclonal mutational architecture in primary papillary thyroid carcinomas and matching distant metastases.

CONGRESO: XXIX National Congress of the Spanish Pathology Society and IAP

TIPO DE PARTICIPACIÓN: Oral – Platform-219 - Immunohistochemistry and Molecular Pathology sesión [24-5-19]

https://www.seap2019granada.es/Com_Granada.pdf

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Granada, Spain

AÑO: 2019

