

ANÁLISIS DE MUTACIONES BRAF Y NRAS DE TUMORES TIROIDEOS EN PACIENTES DE ARGENTINA

ESTEBAN M. REPETTO¹, LUCÍA FERNANDEZ¹, ROBERTO LAMBERTINI¹, ANA DEL VALLE JAEN¹,
VERÓNICA RUDA VEGA², SOFÍA MOLDES², RUBEN LUTFI², CLAUDIO ARANDA¹,
EDUARDO FAURE², ADRIANA ONETO¹

¹Centro de Diagnóstico Tomografía Computada Buenos Aires (TCBA),

²Hospital Churruca-Visca, Buenos Aires, Argentina

Dirección postal: Esteban M. Repetto, CONICET - Universidad de Buenos Aires, Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO), Laboratorio de Endocrinología Molecular (LEM), Paraguay 2155 5°, 1121 Buenos Aires, Argentina

E-mail: erepetto@fmed.uba.ar

Recibido: 6-X-2022

Aceptado: 27-III-2023

Resumen

Introducción: Se ha descrito que alteraciones moleculares de las células foliculares tiroideas en el gen BRAF o en NRAS están asociadas con el proceso de carcinogénesis. Nuestro objetivo fue conocer la frecuencia mutacional de BRAF y NRAS a partir de muestras de punción aspirativa con aguja fina (PAAF) en nuestra población.

Métodos: Se analizó por qPCR el estado mutacional de BRAF (codón 600) y NRAS (codón 61) de 193 muestras obtenidas por PAAF de nódulos sospechosos y se comparó con los datos de la anatomía patológica de 115 pacientes.

Resultados: La mutación BRAF se identificó en 40 muestras (74.1%) de las punciones categorizadas como Bethesda VI (n = 54). En las muestras que se correspondieron con carcinoma papilar de tiroides (CPT) variante clásica por histología (n = 47), el 70% presentó la mutación, mientras que en los otros subtipos la prevalencia fue más baja (p = 0.013). En muestras de lesión folicular (n = 36), el 50% de los carcinomas foliculares resultaron positivos para NRAS pero solo el 6.7% de los adenomas presentaron esta variación. La presencia de mutación BRAF y CPT se asociaron con metástasis en los ganglios linfáticos (p = 0.014) y mayor riesgo relativo de recurrencia según el Consenso Argentino Intersocietario (RR = 6.77, p = 0.022). No hubo diferencias significativas entre la mutación de BRAF y otras características de agresividad en CPT.

Conclusión: La mutación de BRAF y NRAS se observa en un número significativo de CPT y carcinoma folicular, respectivamente, en nuestra población. La mutación BRAF se correlaciona significativamente con metástasis en los ganglios linfáticos.

Palabras clave: BRAF, NRAS, carcinoma papilar, carcinoma folicular, tiroides

Abstract

Analysis of BRAF and NRAS mutations in thyroid tumors in patients from Argentina

Introduction: Molecular alterations in follicular cells in the BRAF or NRAS genes have been reported to be associated with the process of carcinogenesis. Our aim was to determine the mutational frequency of BRAF and NRAS in fine-needle aspiration (FNA) specimens in our population.

Methods: The mutational status of BRAF (codon 600) and NRAS (codon 61) was analysed by qPCR in 193 FNA specimens from suspicious nodules and compared with pathological data of 115 patients.

Results: BRAF mutation was identified in 40 samples (74.1%) of FNAs classified as Bethesda VI (n = 54). In samples histologically diagnosed as classic papillary thyroid carcinoma (cPTC, n = 47), mutation was observed

in 70% of cases, while in other subtypes the prevalence was lower ($p = 0.013$). In FNA specimens of follicular lesions ($n = 36$), positivity for NRAS was found in 50% of the follicular carcinomas (FTCs), but only in 6.7% of adenomas. Finally, there was a significant correlation between BRAF and PTC with lymph-node metastasis ($p = 0.014$) and increased relative risk of recurrence based on the Argentine Intersociety Consensus ($RR = 6.77$, $p = 0.022$). No significant differences were found between BRAF mutation and other features of aggressiveness in PTC.

Conclusion: BRAF and NRAS mutations are observed in a significant number of PTCs and FTCs, in our population. There is a significant correlation between BRAF mutation and lymph-node metastasis.

Key words: BRAF, NRAS, papillary carcinoma, follicular carcinoma, thyroid

PUNTOS CLAVE

- El análisis citológico mediante PAAF es el paso inicial en el diagnóstico de nódulos tiroideos que son sospechosos de cáncer.
- Se ha descrito que alteraciones moleculares de las células foliculares tiroideas en el gen BRAF o en NRAS están asociadas con el proceso de carcinogénesis.
- En los pacientes estudiados las mutaciones en BRAF V600 y NRAS Q61 se observan en un número significativo de carcinomas papilares y foliculares de tiroides, respectivamente.
- La mutación BRAF V600 se asocia significativamente con metástasis en los ganglios linfáticos y con las categorías de riesgo de recurrencia intermedio/alto según el Consenso Intersocietario Argentino.

El cáncer de tiroides es el tumor endocrino más prevalente. Si bien las tasas de incidencia varían a nivel internacional, diversos estudios demuestran que la prevalencia ha aumentado tres veces en los últimos treinta años con un cambio en los perfiles histológicos y genéticos a lo largo de este tiempo¹. Los datos más recientes indican una incidencia en EE. UU. de 15.7 nuevos casos/100 000 habitantes/año según el Instituto Nacional del Cáncer durante el período 2013-2017². En cuanto a Latinoamérica, se han informado 14.9 casos/100 000 mujeres y

3.9 casos/100 000 hombres en San Pablo (Brasil) durante los años 1998-2002³. En la Argentina se encuentran pocos estudios estadísticos, como el de Faure y col., con 6.51 casos /100 000 habitantes/año (2003-2011)⁴, y el realizado en la provincia de Neuquén durante los años 2001-2012 en el cual se encontró una incidencia de 4.7 nuevos casos/100 000 habitantes/año⁵. El carcinoma papilar de tiroides (CPT) es la variante histológica más prevalente (aproximadamente 90%), seguido por el carcinoma folicular (CFT, 7%) y el carcinoma anaplásico (2%), mientras que en nuestra población el carcinoma medular de tiroides comprende alrededor del 1% de todos los casos de cáncer reportados en esta glándula⁴.

Es sabido que la iniciación y progresión del cáncer de tiroides ocurre como resultado de la acumulación gradual de alteraciones genéticas y epigenéticas a nivel celular. Se ha descrito que un gran número de mutaciones asociadas a esta enfermedad están presentes en genes que codifican para proteínas de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), específicamente los genes homólogo del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf B1 (BRAF) y RAS, además de la vía PI3K/Akt, entre otras. Los CPT que albergan la mutación BRAF generalmente se caracterizan por una mutación puntual T1799A que da como resultado un cambio de valina por glutamato en el codón 600 (BRAF V600E)⁶.

Por otro lado, mutaciones en la familia de genes RAS (NRAS, KRAS y HRAS) y otros eventos, como el rearrreglo PAX8/PPAR γ son característicos del CFT y otras lesiones foliculares^{6,7}, siendo la mutación NRAS en el codón 61 (NRAS Q61) la más frecuente de todas las mutaciones RAS en los distintos tipos de cáncer de tiroides derivados de células foliculares⁸⁻¹⁰ y mutaciones en este gen se encuentran en los tumores clasificados como RAS-like a partir del estudio TCGA (patrón folicular)^{1,7}.

El objetivo del presente estudio fue determinar el desempeño diagnóstico y la frecuencia de los cambios moleculares de BRAF y NRAS a partir de muestras de punción aspirativa con aguja fina (PAAF) de una cohorte de pacientes que asisten a nuestro centro y correlacionar los hallazgos con diversas características clínico-patológicas de aquellos de los que, tras la tiroidectomía, se contó con los datos de la anatomía patológica.

Materiales y métodos

Muestras tiroideas: este estudio fue llevado a cabo entre 2016 al 2019. Un total de 193 muestras fueron obtenidas para el estudio molecular a partir del material remanente de la PAAF, procedimiento realizado para el estudio citológico de nódulos tiroideos sospechosos (38 hombres y 155 mujeres). De estos pacientes con nódulos biopsiados, un total de 115 se sometieron a cirugía después de los hallazgos citológicos o por síntomas compresivos, entre otras razones, según criterio médico. Se recolectaron datos demográficos de edad, sexo y motivo de punción junto con otros datos clínicos de relevancia al momento del ingreso al servicio. La mediana de edad de los pacientes al momento del diagnóstico fue de 57 años (rango: 20-77 años). Adicionalmente se analizaron los datos del estudio anatómo-patológico de la biopsia de aquellos en los que se le ha practicado la cirugía correspondiente según evaluación médica.

Extracción de ADN genómico: se procedió a partir del lavado de aguja en solución estabilizante para ácidos nucleicos del material residual de la punción, conservándose a -20°C hasta su procesamiento. El DNA genómico fue extraído usando MagMAX Total Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

PCR cuantitativa y análisis de curvas de *melting*: las mutaciones en BRAF codón 600 (mutaciones V600E/K/D/R) y NRAS codón 61 (mutaciones Q61R/K/L/H/P/E), se detectaron mediante PCR LightCycler 2.0 en tiempo real (Roche, Suiza) y análisis de curva de *melting* por fluorescencia como se describió previamente^{11, 12}. Brevemente, para cada mutación, se diseñaron un par de *primers* y dos sondas de hibridación (según Nikiforov YE y col.¹¹) y la amplificación se realizó usando 5-50 ng de templado en 5 μl con 15 μl de la mezcla de reacción conteniendo, en concentración final, 4 μM de cada primer, 0.75 nM de cada sonda de hibridación, 4 mM de Cl_2Mg , DMSO 1% y enzima 1X según LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit (Roche, Suiza). La mezcla de reacción se sometió a 40 ciclos de amplificación por PCR que consiste en desnaturalización a 95°C durante 5 s, *annealing* a 54°C durante 20 s y extensión a 72°C durante 12 s. El análisis de la curva de *melting* de fluorescencia posterior a la amplificación se realizó mediante calentamiento gradual de las muestras a una velocidad de 0.1°C/s de 45°C a 95°C .

Se identificaron pares coincidentes de PAAF nodular preoperatoria y biopsias tiroideas con hallazgos benignos (por ejemplo, hiperplasia nodular, tiroiditis). Este conjunto de muestras sirvió como control negativo para el ensayo de PCR. Para cada análisis mutacional, el ADN de

uno o más tumores portadores de una mutación específica confirmada por secuenciación se utilizó como control positivo.

Análisis estadístico

Para cada categoría diagnóstica de la clasificación de Bethesda, se calculó el riesgo de malignidad según la siguiente fórmula: riesgo de malignidad (%) = n casos de anatomía patológica maligna $\times 100 / n$ total de casos, correspondiente a cada categoría citológica. Además, se calculó la sensibilidad (%) como la tasa de verdaderos positivos/total de casos de la correspondiente categoría histológica y la especificidad (%) se estimó como la tasa de verdaderos negativos/total de casos según la anatomía patológica. Los indicadores de diagnóstico de la clasificación Bethesda se calcularon como método para identificar malignidad (resultados de las categorías V y VI se categorizaron como verdadero positivo si el resultado histológico fue maligno mientras que para el resto de las categorías se consideró verdadero positivo si el resultado histológico fue benigno).

Todo análisis estadístico fue realizado usando el software GraphPad Prism versión 8.2 (GraphPad Software Inc, EE.UU.). Para determinar la asociación de las mutaciones de BRAF o NRAS con las distintas variables se realizó el test exacto de Fisher. Considerando que los valores esperados deben ser mayores a 1 para poder realizar el cálculo, se evitó el problema combinando dos o más variables según se indique en cada tabla. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado significativo.

Responsabilidades éticas

Todos los procedimientos en este estudio se realizaron de acuerdo con los estándares éticos de la Declaración de Helsinki de 1964 de la Asociación Médica Mundial y sus enmiendas posteriores o estándares éticos comparables, y tras la obtención del consentimiento informado correspondiente. Las autoridades de TCba aprobaron este protocolo de estudio cumpliendo con nuestras directrices nacionales.

Resultados

En este trabajo se incluyeron un total de 193 muestras de la PAAF, que en la mayoría de los casos (61.1%) se corresponden con las categorías citológicas Bethesda II (32.1% de las muestras, $n = 62$) y Bethesda VI (29.0%, $n = 56$). El resto de los hallazgos citológicos obtenidos en el presente estudio fueron: 8.3% de atipia de significado incierto o lesión folicular de significado incier-

to (Bethesda III, n = 16); el 24.9% de los casos, correspondió a muestras reportadas como neoplasma folicular o sospechas de neoplasma folicular (Bethesda IV, n = 48); mientras que en el 4.7% de los casos restantes, correspondió a muestras reportadas como sospechoso de malignidad (Bethesda V, 4.7%, n = 9). Solo en 2 casos (1.0%) se consideró insatisfactorio o Bethesda I. Con respecto a la mutación de BRAF, el estudio molecular pudo realizarse en el 96.9% de las muestras adecuadas para el estudio citológico ya que en algunas, el contenido de ADN fue insuficiente. El 74.1% de las muestras correspondiente a la categoría Bethesda VI, resultó positiva para mutaciones en este gen, siendo un 44.4%, 4.3% y 6.2% para las categorías V, IV y III, respectivamente. En las muestras que involucraron enfermedades tiroideas benignas, no se encontró en ningún caso BRAF mutado (Tabla 1).

De los 115 individuos sometidos a tiroidectomía, 41 casos (el 35.6%) correspondieron a patología benigna (tiroiditis, hiperplasia nodular o adenoma folicular), 67 casos (58.3%) correspondieron a CPT (47 casos variante clásica, 15 variante folicular, 2 casos con variante esclerosante, 2 con oncocítica mientras que en 1 caso no se especificó), 6 casos (5.1%) a CFT (5 mínimamente invasor y 1 oncocítico) y solo un caso fue diagnosticado histológicamente como carcinoma medular.

En la población estudiada, el riesgo de malignidad de las categorías Bethesda III a V fue del 38.5%, 33.3% y 87.5%, respectivamente, al comparar el resultado citológico con el estudio anatomopatológico, como se detalla en la Tabla 2.

De los 54 casos estudiados histológicamente que se categorizaron los PAAF como citologías categorías III, IV y V, se observaron 16 casos de CPT de los cuales 7 se correspondieron con BRAF

Tabla 1 | Estado mutacional de BRAF V600 en 193 muestras de PAAF en relación con la categoría citopatológica correspondiente

Categoría Bethesda	Estatus mutacional del gen BRAF		
	Positivo, n (%)	Negativo, n (%)	No determinado
I- Insatisfactorio/otro	0 (0.0)	0 (0.0)	2
II-Benigno	0 (0.0)	60 (100.0)	2
III-AUS/FLUS	1 (6.2)	15 (93.8)	0
IV-NF/SNF	2 (4.3)	46 (95.7)	0
V-SM	4 (44.4)	5 (55.6)	0
VI-Maligno	40 (74.1)	14 (25.9)	2
Total	47 (24.4)	140 (72.5)	6 (3.1)

AUS/FLUS: atipia de significado incierto o lesión folicular de significado incierto; NF/SNF: neoplasma folicular o sospechoso de neoplasma folicular; SM: sospechoso de malignidad

Tabla 2 | Resultados citológicos e histológicos de los 115 nódulos tiroideos estudiados

Categoría Bethesda	Anatomía patológica		Total	Riesgo (%) malignidad	Riesgo (%) reportado ³⁰	S (%)	E (%)
	Maligna	Benigna					
II-Benigno	0	10	10	0.0	0-3	24.4	100.0
III-AUS/FLUS	5	8	13	38.5	10-30	19.5	93.2
IV-NF/SNF	11	22	33	33.3	25-40	53.7	85.1
V-SM	7	1	8	87.5	50-75	9.5	97.6
VI-Maligno	51	0	51	100.0	97-99	68.9	100.0
Total	74	41	115				

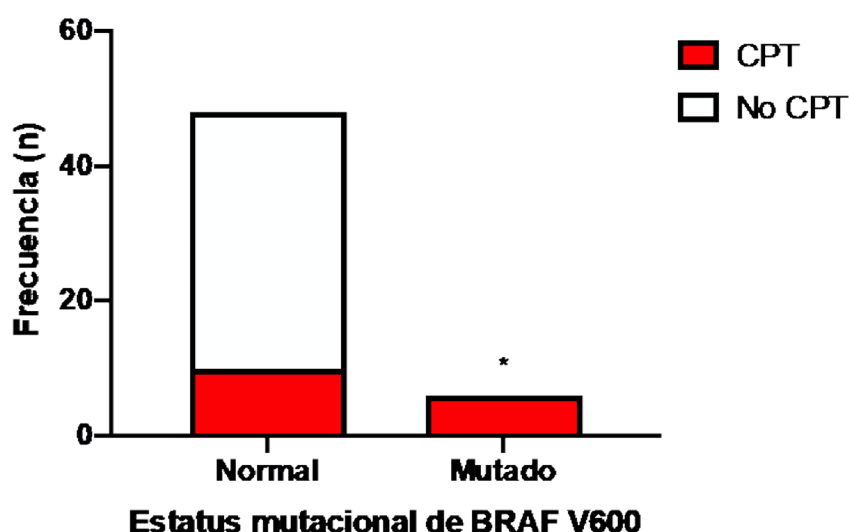
AUS/FLUS: atipia de significado incierto o lesión folicular de significado incierto; NF/SNF: neoplasma folicular o sospechoso de neoplasma folicular; SM: sospechoso de malignidad; S: sensibilidad; E: especificidad

mutado, mientras que sólo el 19.1% fueron CPT de los casos que no presentaron la mutación (9/47 casos), como se muestra en la Figura 1. El valor predictivo negativo de BRAF V600 mutado para CPT en estas categorías citológicas fue del 79.2% (IC95%: 65.7-88.3) y el positivo del 100.0% (IC95%: 61.0-100.0). Además, se obtuvo un riesgo relativo de BRAF para CPT de 4.8 (IC95%: 2.5-5.6) en estas categorías.

De las 115 muestras analizadas histológicamente, en 44 biopsias de las 67 correspondientes a CPT por anatomía patológica (65.7%) se correspondió con el hallazgo de la mutación en BRAF en el ADN_g extraído en el PAAF. En el resto de las variantes histológicas (CFT, medular o lesiones benignas) no se halló mutaciones en BRAF V600 (48/115 muestras de PAAF). La mayor prevalencia de mutaciones en BRAF en nuestra población se correspondió al CPT variante clásica (70.2%), mientras que el CPT variante folicular u otras, la prevalencia fue significativamente más baja, 40.0% y 20.0% respectivamente ($p = 0.0132$, CPT variante clásica vs. el resto de las variantes, test exacto de Fisher). Un resultado BRAF V600 mutado en PAAF aumentó en un 59.1% el riesgo de presentar CPT variante clásica en la anatomía patológica (riesgo relativo 1.59, IC95%: 1.13 a 2.47).

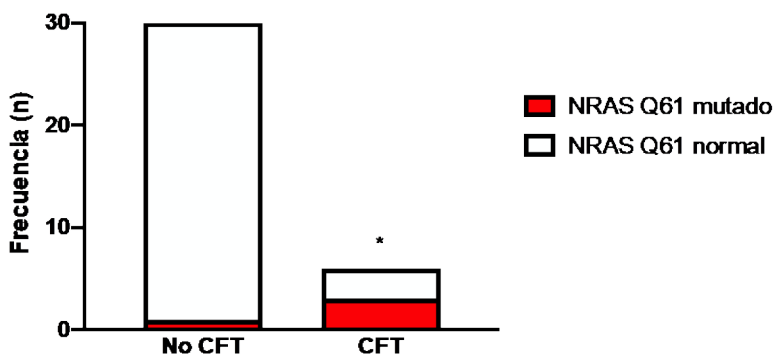
Teniendo en cuenta que las mutaciones en NRAS son más prevalentes en lesiones tiroideas con patrón folicular (Ras-like) y que además son mutuamente excluyentes con BRAF, decidimos evaluar retrospectivamente el estatus mutacional de este marcador en las muestras de PAAF correspondientes a lesiones foliculares malignas y benignas según anatomía patológica, como ser el adenoma folicular ($n = 15$), el CFT ($n = 6$) y el CPT variante folicular ($n = 15$). Como control de especificidad del marcador, muestras de CPT variante clásica ($n = 30$) fueron incluidas. Los pacientes con CPT variante clásica fueron negativos para NRAS (siendo 24 BRAF positivos y 6 negativos para la mutación de este gen) y también las muestras correspondientes a los individuos con CPT variante folicular. De los pacientes con adenoma folicular, solo uno resultó positivo para NRAS de los casos evaluados. Los pacientes con CFT (que les corresponde una categoría Bethesda IV o V a las muestras en el análisis citológico del PAAF), presentaron una frecuencia de mutación para NRAS significativamente mayor (3 de 6 muestras CFT vs. 1 de 30 casos No CFT, $p = 0.0104$, test exacto de Fisher) y un riesgo relativo de 8.0 como se indica en la Figura 2. El valor predictivo negativo de NRAS Q61 mutado para CFT en estas muestras analizadas fue del

Figura 1 | Utilidad del marcador BRAF V600 para carcinoma papilar de tiroides (CPT) en categorías citológicas III, IV y V



En la figura se indica la frecuencia (n de casos) según el resultado del estudio mutacional de las muestras de punción con aguja fina (PAAF). El estado mutacional de BRAF V600 se determinó en muestras de PAAF malignas y benignas según anatomía patológica, siendo No CPT ($n = 38$, que incluye lesiones benignas como así también malignas, como ser carcinoma folicular y carcinoma medular de tiroides) y CPT ($n = 16$), * $p = 0.0003$ según test exacto de Fisher.

Figura 2 | Estado mutacional de NRAS en punción con aguja fina (PAAF) y su relación con el tipo de lesión neoplásica folicular



El estado mutacional de NRAS Q61 se determinó en muestras de PAAF malignas y benignas según anatomía patológica, siendo CFT: carcinoma folicular de tiroides ($n = 6$) y No CFT: adenoma folicular ($n = 15$) y carcinoma papilar de tiroides variante folicular ($n=15$). El valor de riesgo relativo de NRAS para CFT fue de 8.0 (IC95%: 2.2-25.1), $*p = 0.01$ según test exacto de Fisher

90.6% (IC95%: 75.8-96.8) y el positivo del 75.0% (IC95%: 30.1-98.7).

Finalmente, se determinó el desempeño diagnóstico considerando ambos marcadores moleculares en las muestras correspondientes a las citologías III, IV y V. Para los marcadores BRAF V600 más NRAS Q61 se obtuvo una sensibilidad del 43.5% (IC95%: 25.6-63.2), especificidad del 96.8% (IC95%: 83.8-99.8), valor predictivo positivo del 90.9% (IC95%:62.3-99.5) y un valor predictivo negativo del 69.8% (IC95%: 54.9-81.4), considerando las lesiones benignas o malignas según la anatomía patológica. Para estas categorías citológicas, el riesgo relativo de los marcadores BRAF V600 y NRAS Q61 fue de 3.01 (IC95%: 1.78-4.99, $p = 0.0004$, test exacto de Fisher). Además, se calculó el riesgo de malignidad post-test molecular que resultó en 100%, 75% y 100% para las categorías III, IV y V respectivamente si el resultado es positivo (mutado) para BRAF V600 o NRAS Q61.

Dado que las variantes moleculares a nivel de DNA podrían asociarse con diferentes características de agresividad, realizamos un estudio de asociación entre el estatus mutacional de BRAF con diferentes características clínico-patológicas de los pacientes con CPT, que se listan en la Tabla 3. El análisis estadístico dio un valor significativo de asociación entre la presencia de la mutación con metástasis en los ganglios linfáticos (riesgo relativo de 3.47, IC95%: 1.26-10.52, $p = 0.014$, test exacto de Fisher) y con las categorías de riesgo de recurrencia intermedio/alto según el consenso argentino (riesgo relativo

de 6.77, IC95%: 1.28-39.90, $p = 0.022$, test exacto de Fisher), aunque no según las categorías ATA 2015 (riesgo relativo de 3.69, IC95%: 1.07-14.13, $p=0.059$, test exacto de Fisher). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas en el resto de las características detalladas en la tabla 3.

Discusión

Según Jung CK y col. el aumento en la incidencia de cáncer de tiroides en las últimas cuatro décadas está fuertemente relacionado con el aumento de la mutación BRAF en CPT clásico y el aumento de la mutación RAS en la variante folicular. En contraste, la frecuencia de reordenamientos cromosómicos específicos del cáncer de tiroides está disminuyendo¹³. En este contexto, estudiamos la frecuencia mutacional de BRAF y NRAS en cáncer de tiroides en muestras de PAAF de nuestra población.

La prevalencia de la mutación BRAF en CPT se ha informado en diferentes estudios con un rango de 29% a 83%, siendo mayor en Asia que en países occidentales como Estados Unidos, Italia o España^{14, 15}. En este trabajo estamos reportando una frecuencia del 65.7% de la mutación en muestras de PAAF por qPCR de los pacientes con CPT.

Encontramos una concordancia estricta entre el estado de mutación BRAF y el diagnóstico histológico final de CPT, principalmente variante clásica, hallándose diferencias significativas con los otros subtipos histológicos. Dado que en el resto de las variantes histológicas (CFT o lesio-

Tabla 3 | Correlación entre las características clínico-patológicas y la mutación BRAF en carcinoma papilar de tiroides

Característica clinicopatológica	BRAF V600 mutado/total (%)	Riesgo relativo (IC 95%)	p
Edad al diagnóstico			
≤ 45 años	18/25 (72.0)	1.35 (0.91-1.96)	> 0.05
> 45 años	23/43 (53.5)		
Género			
Masculino	8/13 (61.5)	1.03 (0.57-1.52)	> 0.05
Femenino	41/68 (60.0)		
Tamaño			
≥ a 10 mm	35/52 (67.3)	1.31 (0.99-1.87)	0.07
< 10 mm	6/15 (40.0)		
Extensión extratiroidea			
Si	6/8 (75.0)	1.95 (0.50-8.12)	> 0.05
No	34/58 (58.6)		
Multicentricidad			
Si	9/16 (56.3)	0.82 (0.36-1.91)	> 0.05
No	32/51 (62.8)		
Bilateralidad			
Si	14/22 (63.6)	1.11 (0.56-2.31)	> 0.05
No	27/45 (60.0)		
Invasión vascular			
Si	3/4 (75.0)	1.88 (0.29-12.8)	> 0.05
No	37/61 (60.7)		
Metástasis ganglionar			
Si	16/19 (84.2)	3.47 (1.26-10.52)	0.014
No	24/47 (51.1)		
Estadio TNM - AJCC			
III/IV	6/9 (66.7)	1.28 (0.39-4.39)	> 0.05
I/II	30/50 (60.0)		
Riesgo recurrencia -ATA 2015			
Intermedio/alto	12/14 (85.7)	3.69 (1.07-14.13)	0.059
Bajo	27/49 (55.1)		
Riesgo recurrencia -CIS 2014			
Intermedio/alto	11/12 (91.7)	6.77 (1.28-39.9)	0.022
Muy bajo/bajo	28/51 (54.9)		

nes benignas) no se encontró mutación en BRAF, este marcador fue altamente específico en nuestra población para el CPT, similar con lo publicado en otros trabajos^{6,16}.

Los 54 nódulos compatible con citología categorías III a V y mutación BRAF V600 positiva fueron CPT en comparación con el 19.1% de los nódulos que dieron negativo (Fig. 1). Limita el análisis de estos resultados el hecho de que la positividad para la mutación en dichas categorías fue en un número reducido de casos, aunque la diferencia fue estadísticamente significativa.

Las mutaciones en RAS representan la segunda alteración genética más comúnmente identificada en cáncer de tiroides, principalmente en tumores con patrones foliculares, como adenoma o CFT, y la variante folicular del CPT. Hay algunas evidencias de que el estado de mutación RAS tendría utilidad diagnóstica para las lesiones con citología indeterminada, para las cuales la detección de RAS puede tener un impacto en la toma de decisión para el seguimiento del paciente^{8,17}, aunque el valor diagnóstico de este marcador es heterogéneo entre los diferentes es-

tudios¹⁸ principalmente porque se ha detectado en muestras de adenoma. En nuestro estudio solo analizamos el gen mutado más frecuentemente de la familia de genes RAS, NRAS. La frecuencia de las mutaciones de NRAS fue concordante con la informada anteriormente, especialmente en CFT^{9, 19} aunque una limitación de este estudio es el pequeño número de pacientes con CFT, dada la baja prevalencia de este carcinoma en nuestra población⁴. Tolaba y col. observaron una frecuencia del 10.3% en adenoma folicular y del 66.6% en CFT de NRAS mutado (en categorías III y IV estudiadas)²⁰, de manera similar a lo observado en este trabajo (6.7% y 50.0%, respectivamente). Si bien las mutaciones NRAS en los tumores de tiroides se asociaron previamente con un mayor riesgo de metástasis a distancia⁹ nuestros limitados datos no permitieron establecer esta asociación.

En nuestro estudio, la combinación de análisis molecular y examen citológico en categorías III, IV y V que presentó una tasa mutacional baja (7 muestras presentaron BRAF V600 mutado y 4 NRAS Q61 mutado de 54 muestras con diagnóstico histológico), el valor predictivo positivo fue alto (90.9%) mientras que el valor predictivo negativo fue del 69.8% a expensas de una alta especificidad de BRAF V600 mutado para CPT y, en menor medida por NRAS Q61 mutado para CFT, dado que este marcador dio positivo en el 6.7% de los casos de AF, además de verse afectado este cálculo por la proporción en estas categorías citológicas de lesiones malignas y benignas. Estos resultados fueron consistentes con estudios previos donde se analizan un marcador o un panel de marcadores con mutaciones puntuales que incluyen a BRAF y NRAS^{10, 11, 20-23}.

Conocer si existen asociaciones entre algún marcador molecular preoperatorio con características clinicopatológicas de mal pronóstico es relevante dado que permite tomar de-

cisiones clínicas importantes. En este sentido BRAF V600E se ha asociado con marcadores de agresividad clínica (tumores más grandes, edad avanzada, extensión extratiroidea, metástasis en los ganglios linfáticos y mayor riesgo de recurrencia)²⁴⁻²⁷. En nuestro estudio, sin embargo, esta asociación no pudo establecerse de manera inequívoca. Incluso, no pudo predecir el riesgo de recurrencia según ATA 2015 aunque sí considerando el Consenso Intersocietario Argentino. Además, la asociación hallada entre BRAF mutado con N1 concuerda con lo observado por otros autores por lo que podría estar involucrado en el proceso de metástasis local dentro del entorno del CPT. Sin embargo, Kurtulmus N y col.²⁸ observaron que la prevalencia de la mutación BRAF V600E en el tumor no mostró una correspondencia uno a uno con el estudio molecular en los ganglios linfáticos metastásicos, por lo que seguramente otras características del tumor y de su microambiente serían determinantes en este proceso. Incluso algunos autores han propuesto reconsiderar la relevancia clínica como marcador pronóstico de la mutación BRAF V600E en CPT²⁹.

Este estudio preliminar muestra que la mutación BRAF V600E solo estaba presente en pacientes con CPT (con una alta frecuencia) aunque no pudimos establecer una correlación estricta con características de peor pronóstico del tumor en nuestra población, mientras que la mutación en NRAS Q61, por lo general asociada con lesiones tiroideas con patrón folicular, se encontró en un 50% de los pacientes con CFT. Estudios adicionales serían necesarios con otros marcadores de valor pronóstico (como ser el caso de mutaciones en el promotor del gen *TERT* o *TP53*) además de NRAS y BRAF.

Conflicto de intereses: Ninguno para declarar

Bibliografía

1. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014; 159: 676-90
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020. En: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/; consultado septiembre 2022.
3. Veiga LHS, Neta G, Aschebrook-Kilfoy B, Ron E, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in Sao Paulo, Brazil, and the U.S. SEER program, 1997-2008. *Thyroid* 2013; 23: 748-57.
4. Faure EN, Soutelo MJ, Faraj G, Lutfi RJ, Juvenal GJ.

- Estimación de la incidencia de cáncer de tiroides en Capital Federal y el gran Buenos Aires (período 2003-2011). *Rev Argent Endocrinol Metab* 2012; 41: 20-4.
5. Cohen Sabban MA, Palmero C, Bertrand B, et al. Incidencia de cáncer de tiroides en la provincia de Neuquén, período 2001- 2012. *Endocrinol y Nutr* 2014; 61: 455-9.
 6. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 30: 569-80.
 7. Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020; 11:1 02.
 8. Howell GM, Hodak SP, Yip L. RAS Mutations in Thyroid Cancer. *Oncologist* 2013; 18: 926-32.
 9. Jang EK, Song DE, Sim SY, et al. NRAS codon 61 mutation is associated with distant metastasis in patients with follicular thyroid carcinoma. *Thyroid* 2014; 24: 1275-81.
 10. Bae J-S, Choi SK, Jeon S, et al. Impact of NRAS Mutations on the Diagnosis of Follicular Neoplasm of the Thyroid. *Int J Endocrinol* 2014 ; 2014: 289834.
 11. Nikiforov YE, Steward DL, Robinson-Smith TM, et al. Molecular testing for mutations in improving the fine-needle aspiration diagnosis of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 2092-8.
 12. Sassolas G, Hafdi-Nejjari Z, Ferraro A, et al. Oncogenic alterations in papillary thyroid cancers of young patients. *Thyroid* 2012; 22: 17-26.
 13. Jung CK, Little MP, Lubin JH, et al. The increase in thyroid cancer incidence during the last four decades is accompanied by a high frequency of BRAF mutations and a sharp increase in RAS mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 276-85.
 14. Song YS, Lim JA, Park YJ. Mutation Profile of Well-Differentiated Thyroid Cancer in Asians. *Endocrinol Metab* 2015; 30: 252-62.
 15. Kim SK, Song K-H, Lim SD, et al. Clinical and Pathological Features and the BRAF V600E Mutation in Patients with Papillary Thyroid Carcinoma with and without Concurrent Hashimoto Thyroiditis. *Thyroid* 2009; 19: 137-41.
 16. Fnais N, Soobiah C, Al-Qahtani K, et al. Diagnostic value of fine needle aspiration BRAF(V600E) mutation analysis in papillary thyroid cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol* 2015; 46: 1443-54.
 17. An JH, Song K-H, Kim SK, et al. RAS mutations in indeterminate thyroid nodules are predictive of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 82: 760-6.
 18. Nabhan F, Porter K, Lupo MA, Randolph GW, Patel KN, Kloos RT. Heterogeneity in Positive Predictive Value of RAS Mutations in Cytologically Indeterminate Thyroid Nodules. *Thyroid* 2018; 28: 729-38.
 19. Boufraqech M, Nilubol N. Multi-omics Signatures and Translational Potential to Improve Thyroid Cancer Patient Outcome. *Cancers (Basel)* 2019; 11: 1988.
 20. Tolaba N, Spedaletti Y, Bazzoni P, et al. Testeo de mutaciones en nódulos tiroideos con citología indeterminada: estudio prospectivo de 112 pacientes en Argentina. *Endocrinol Diabetes y Nutr* 2022; 69: 122-30.
 21. Mohammadi-Asi J, Larijani B, Khorgami Z, Tavangar SM, Haghpanah V, Mehdipour P. Prevalence of BRAFV600E Mutation in Iranian Patients with Papillary Thyroid Carcinoma: A Single-Center Study. *J Appl Sci* 2009; 9: 3593-7.
 22. Lee KH, Kim HS, Han BK, Ko EY, Ki CS, Shin JH. Incidence and predictive factors of inadequate fine-needle aspirates for BRAFV600E mutation analysis in thyroid nodules. *Am J Roentgenol* 2014; 202: 391-6.
 23. Decaussin-Petrucci M, Descotes F, Depaape L, et al. Molecular testing of BRAF, RAS and TERT on thyroid FNAs with indeterminate cytology improves diagnostic accuracy. *Cytopathology* 2017; 28: 482-7.
 24. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and recurrence of papillary thyroid cancer. *J Clin Oncol* 2015; 33: 42-50.
 25. Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAFV600E mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: A meta-analysis. *Cancer* 2012; 118: 1764-73.
 26. Melo M, Da Rocha AG, Batista R, et al. TERT, BRAF, and NRAS in primary thyroid cancer and metastatic disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102:1898-1907.
 27. Özçelik S, Bircan R, Sarıkaya Ş, et al. BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer is correlated with adverse clinicopathological features but not with iodine exposure. *Endokrynol Pol* 2019; 70: 401-8.
 28. Kurtulmus N, Ertas B, Saglican Y, Kaya H, Ince U, Duren M. BRAFV600E Mutation: Has It a Role in Cervical Lymph Node Metastasis of Papillary Thyroid Cancer? *Eur Thyroid J* 2016; 5: 195-200.
 29. Gandolfi G, Sancisi V, Piana S, Ciarrocchi A. Time to re-consider the meaning of BRAF V600E mutation in papillary thyroid carcinoma. *Int J Cancer* 2015; 137: 1001-11.
 30. Cibas ES, Ali SZ. The 2017 Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. *J Am Soc Cytopathol* 2017; 6: 217-22.