

MUTACIÓN V600E DEL ONCOGÉN BRAF EN NÓDULOS TIROIDEOS EN ARGENTINA

VERÓNICA ILERA¹, RICARDO DOURISBOURE², ANTONIO COLOBRARO³,
MARÍA DEL CARMEN SILVA CROOME¹, GUSTAVO OLSTEIN⁴, ALICIA GAUNA¹

¹División Endocrinología, ²Sección Biología Molecular, División Laboratorio Central, ³División Anatomía Patológica, ⁴División Cirugía. Hospital General de Agudos José María Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina

Resumen Este estudio prospectivo analizó en una población argentina la frecuencia de la mutación V600E del oncogén BRAF en pacientes operados por nódulos tiroideos benignos y por carcinoma papilar de tiroides. En estos últimos se compararon las características clínicas y anatomopatológicas en relación a la presencia o ausencia de la mutación. Se estudiaron prospectivamente 25 pacientes consecutivos operados en nuestra institución. Se obtuvieron muestras histológicas de tejido nodular y el adyacente no nodular en fresco. Se extrajo ADN, se amplificó según técnica *amplification refractory mutation system polymerase chain reaction* (ARMS PCR). Se efectuó secuenciación directa del gen en 4 muestras. El 77% de los operados por carcinoma papilar resultaron BRAF+. Todas las muestras de tejido adyacente no tumoral y de los nódulos benignos fueron negativas para la mutación. La secuenciación directa confirmó los resultados obtenidos por ARMS PCR en las muestras en que fue efectuada. Los pacientes BRAF+ presentaron mayor edad al diagnóstico vs. aquellos BRAF- (47.7 ± 12.7 vs 24.7 ± 8.1 años, $p < 0.01$). Nueve de diez carcinomas papilares de tiroides con mutación de BRAF correspondieron a la variante histológica clásica, la cual no se observó en los tumores BRAF- ($p < 0.02$). En conclusión, comunicamos una elevada frecuencia de mutación V600E del oncogén BRAF en pacientes operados por carcinoma papilar de tiroides en Argentina. Estos resultados son acordes a lo referido en la bibliografía.

Palabras clave: nódulos tiroideos, carcinoma papilar de tiroides, BRAF, análisis molecular

Abstract *BRAF V600E mutation in thyroid nodules in Argentina.* This prospective study analyzed the frequency of V600E mutation of oncogene BRAF in patients operated for benign thyroid nodules and for papillary thyroid cancer in an Argentine population. In patients with papillary thyroid cancer we compared clinicopathological characteristics between those harboring BRAF mutation and those without it. Twenty five consecutive patients operated for benign nodules and for papillary carcinoma were prospectively included. Fresh tissue samples of thyroid nodules and of adjacent thyroid parenchyma were obtained. DNA was extracted and amplified by amplification refractory mutation system polymerase chain reaction (ARMS PCR). Direct sequencing was performed in four samples. Of those patients operated for papillary thyroid cancer, 77% harbored BRAF mutation. All samples from adjacent thyroid parenchyma and from patients operated for benign nodules tested negative for the mutation. Direct sequencing confirmed the results obtained by ARMS PCR. Patients with BRAF mutation were significantly older at the time of diagnosis (BRAF+ 47.7 ± 12.7 years vs. BRAF- 24.7 ± 8.1 years, $p < 0.01$). Nine out of ten papillary carcinomas with BRAF mutation corresponded to the classic histological subtype, which was not observed in BRAF negative tumors ($p < 0.02$). In conclusion, we found a high frequency of BRAF V600E mutation in this population of patients operated for papillary thyroid carcinoma in Argentina. These results are consistent with those reported in the literature.

Key words: thyroid nodules, papillary thyroid cancer, BRAF, molecular testing

El carcinoma diferenciado de tiroides es el tumor maligno endocrino más común, y su incidencia se incrementa en distintas partes del mundo. El carcinoma papilar es la forma más frecuente de tumor maligno tiroideo, representando más del 85% de los casos. Este aumento en la incidencia se atribuye, por lo menos en parte, a un

mayor diagnóstico de esta entidad por mejores métodos y uso rutinario de ecografías de vasos de cuello¹⁻³. En general, el carcinoma papilar de tiroides (CPT) presenta un pronóstico excelente, con una supervivencia a 10 años mayor al 90%. Sin embargo, un 20-30% de los pacientes pueden presentar recurrencia de la enfermedad hasta 30 años después del diagnóstico⁴. Un porcentaje menor desarrolla metástasis a distancia y fallece finalmente a consecuencia de ésta⁵.

En las últimas décadas hubo un gran avance en los conocimientos de las bases genéticas y moleculares involucradas en el desarrollo de los cánceres de tiroides,

Recibido: 14-IV-2015

Aceptado: 10-V-2016

Dirección postal: Dra Verónica Ilera, Hospital J. M. Ramos Mejía, Urquiza 609, 1221 Buenos Aires, Argentina

e-mail: veronicailera@gmail.com

que podrán contribuir a una identificación temprana y mejor manejo de aquellos pacientes con mayor riesgo de persistencia o recurrencia de la enfermedad.

El desarrollo del carcinoma papilar implica la activación de la vía de la proteína kinasa mitógeno activada (MAPK por sus siglas en inglés), la cual modula la expresión de genes blanco involucrados en la proliferación celular, supervivencia y apoptosis. La activación constitutiva de esta vía lleva a tumorigénesis^{6,7}. El oncogén BRAF es un fuerte activador de esta señal, y ha sido implicado en el desarrollo de numerosos carcinomas incluyendo melanoma, cáncer de colon, sarcomas⁸ y también en cáncer de tiroides. BRAF está localizado en el cromosoma 7q24 y codifica para una proteína serina-treonina kinasa. Luego de la activación por RAS, la fosforilación de BRAF gatilla una serie de activaciones a lo largo de la cascada de la MAPK⁹. Una mutación puntual de BRAF en el codón 600 del exón 15 resulta en una sustitución de valina por glutamato (V600E), que lleva a una activación constitutiva de la vía de la MAPK. La mutación BRAF V600E es la alteración genética más común en el carcinoma papilar de tiroides, y ha sido informada en 29 a 83% de estos tumores¹⁰⁻¹⁵.

En los estudios publicados hasta la fecha, la mutación BRAF (V600E) ha sido detectada solo en carcinoma papilar, carcinoma pobremente diferenciado y algunos carcinomas anaplásicos^{10, 16}. No se ha encontrado en carcinomas foliculares o neoplasias benignas de tiroides. Entre los subtipos histológicos del CPT, la mutación se ha descrito en la variante convencional y en la variante de células altas, encontrándose con mucha menor frecuencia en la variante folicular. La alta frecuencia y especificidad de la mutación BRAF sugiere que jugaría un papel fundamental en la iniciación de la tumorigénesis del carcinoma papilar¹⁷.

Los carcinomas papilares con mutación de BRAF presentan características fenotípicas y biológicas diferentes. Parecen tener un comportamiento más agresivo y acarrear un peor pronóstico^{6, 7, 12}. El carcinoma tiroideo de células altas, una variante agresiva de carcinoma papilar, frecuentemente exhibe mutación de BRAF^{10, 16}. La presencia de mutación de BRAF en carcinoma papilar se asocia con edad más avanzada de los pacientes, extensión extratiroidea del tumor, multicentricidad y metástasis en ganglios linfáticos^{18, 19}. Algunos autores encontraron también una mayor incidencia de recurrencia locorregional y una disminución de la respuesta del tumor recurrente al tratamiento con yodo radiactivo^{18, 20, 21}. Se ha demostrado también una asociación entre mutación de BRAF V600E y una menor supervivencia²².

La frecuencia de mutación BRAF en carcinoma papilar de tiroides varía según la región geográfica analizada. No se han comunicado hasta el momento estudios de la misma en la Argentina. En este estudio analizamos en forma prospectiva en la Argentina, la frecuencia de la mutación del oncogén BRAF en tejido tumoral y no tumo-

ral de pacientes operados por CPT y nódulos tiroideos benignos. En los pacientes con CPT, se evaluaron las características clínicas y anatomopatológicas en relación a la presencia o ausencia de la mutación.

Materiales y métodos

Se estudiaron en forma prospectiva 25 pacientes consecutivos tratados con cirugía de tiroides por nódulos benignos o malignos en el Hospital Ramos Mejía entre noviembre de 2011 y noviembre de 2012. Todos eran mayores de 18 años. A partir de la pieza quirúrgica, se obtuvo un fragmento fresco de tejido tumoral de hasta 0.5 × 0.5 × 0.5 cm, que se colocó en un tubo con solución fisiológica. Se procedió de la misma manera con una muestra de tejido circundante sano. Los tubos se mantuvieron en heladera durante 24 h o en *freezer* a -20 °C hasta el procesamiento.

Cada muestra de tejido, sano y tumoral, se disgregó a temperatura ambiente con bisturí y luego se digirió con proteínasa K y dodecilsulfato de sodio (SDS) a 56°C para liberar en solución los ácidos nucleicos. Se extrajo el ADN con fenol alcalino/cloroformo y se precipitó con acetato de sodio 0.3 M/etanol absoluto. Se eliminaron las sales con etanol 75%, se dejó secar a temperatura ambiente y se re-suspendió en buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM).

El ADN obtenido se corrió en un gel de agarosa 1% para observar integridad. Las muestras se amplificaron por PCR para detectar la mutación. Se desarrolló una técnica de ARMS PCR para detectar el alelo normal GTG (valina) y el alelo mutado con el cambio por GAG (glutamato) en el codón 600 del exón 15. Esta técnica permite visualizar tanto la secuencia normal como la secuencia mutada con un alto grado de sensibilidad (se considera aproximadamente 0.1%)²³⁻²⁵. El producto amplificado se corrió en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio para analizar el patrón de bandas y se fotografió posteriormente. Al momento de realizar los estudios genéticos el operador desconocía el resultado anatomopatológico de las muestras.

En cuatro muestras se realizó además secuenciación directa del exón 15 del gen, a fin de comparar estos resultados con los obtenidos por ARMS PCR.

En cuanto al análisis estadístico, los datos se expresaron como porcentaje, media, desvío estándar, mediana y rango. En los pacientes con carcinoma papilar de tiroides, se aplicó el test exacto de Fischer para la comparación de las características clínicas y anatomopatológicas en relación a la presencia o ausencia de la mutación de BRAF. Para la comparación de las variables cuantitativas se utilizó el test T para datos no apareados con corrección de Welch. Se consideró significativa una $p < 0.05$.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital y se obtuvo consentimiento informado de los pacientes.

Resultados

Se analizó un total de 46 muestras obtenidas de 25 pacientes. Las características de la población en estudio, así como el diagnóstico anatomopatológico final se presentan en la Tabla 1.

Se incluyeron un total de 25 pacientes operados, 21 mujeres y 4 hombres. La edad promedio fue de 48.9 años, con una mediana de 53 y un rango de 19 a 74 años. Doce pacientes, todas mujeres, fueron operadas por nódulos

TABLA 1.— Características clínicas de la población y diagnóstico anatomo-patológico

Población en estudio	
N	25
Sexo	
Mujeres (%)	21 (84)
Hombres (%)	4 (16)
Edad (años) Media \pm DS (rango)	48.9 \pm 15.5 (19-74)
Nódulos benignos n (%)	12 (48)
Tipo histológico (%)	Hiperplasia nodular coloide (100)
Nódulos malignos n (%)	13 (52)
Tipo histológico (%)	Carcinoma papilar (100)
Variante histológica (n)	Clásica (9)
	Folicular (2)
	Esclerosante difuso (1)
	Cribiforme (1)
Estadificación TNM* (n)	
Estadio I	8
Estadio II	4
Estadio III	1

*Sistema TNM según la American Joint Committee on Cancer 7^o edición²⁶.

benignos. En todos los casos el resultado anatomopatológico fue de hiperplasia nodular coloide. A todas se les practicó tiroidectomía total, excepto a un caso en que se realizó hemitiroidectomía. En los restantes 13 (9 mujeres y 4 hombres) el diagnóstico fue de carcinoma papilar de tiroides. A todos se les realizó tiroidectomía total. Según la estadificación propuesta por la *American Joint Committee on Cancer*²⁶, 8 pacientes correspondieron a un estadio I, 4 a estadio II y 1 a estadio III.

Se realizó detección de mutación V600E del oncogén BRAF en 46 muestras, 24 de las cuales provinieron de pacientes operados por carcinoma papilar de tiroides (13 muestras se obtuvieron del tejido tumoral y 11 muestras del tejido adyacente no tumoral). Veintidós muestras correspondieron a las pacientes operadas por nódulos benignos (12 obtenidas del tejido nodular y 10 del parénquima adyacente no nodular). La mutación estuvo presente en 10 de las 13 muestras de carcinoma papilar, mientras que sólo 3 no presentaron dicha mutación. La mutación estuvo ausente en todas las muestras de tejido adyacente no tumoral respectivo y en todas las muestras obtenidas de nódulos benignos.

Se realizó secuenciación directa del gen en 4 casos: 3 operadas por carcinoma papilar (dos positivas y una negativa para BRAF por ARMS) y una por hiperplasia nodular coloide. En todos ellos, el resultado de la secuenciación confirmó el obtenido por ARMS PCR; es

decir, se detectó la mutación en 2 con carcinoma papilar que habían sido detectados por ARMS PCR, mientras que la mutación estuvo ausente en la paciente operada por nódulos benignos y en otra con carcinoma papilar, en que la técnica de ARMS PCR arrojó un resultado negativo para la mutación del BRAF. Los resultados de la secuenciación directa y de la corrida electroforética del producto amplificado por ARMS PCR de los pacientes mencionados anteriormente se observan en las Figs. 1 y 2.

Se compararon posteriormente las características clínicas y anatomo-patológicas de los pacientes operados por carcinoma papilar según presentaran o no la mutación de BRAF. Los pacientes con BRAF mutado tenían mayor edad al diagnóstico de CPT con respecto a aquellos con ausencia de la mutación (47.7 \pm 12.7 vs. 24.7 \pm 8.1 años, $p < 0.01$). Nueve de los 10 con carcinoma papilar y mutación de BRAF correspondieron a la variante histológica clásica del tumor, mientras que no se observó esta variante en ninguno de los tres casos de carcinoma papilar en que la mutación de BRAF resultó negativa ($p < 0.02$). El tamaño tumoral fue significativamente mayor en los pacientes con ausencia de la mutación ($p < 0.001$). No hubo diferencias en cuanto a sexo, extensión extratiroidea, multifocalidad, metástasis ganglionares o estadificación en relación a la presencia o ausencia de la mutación (Tabla 2).

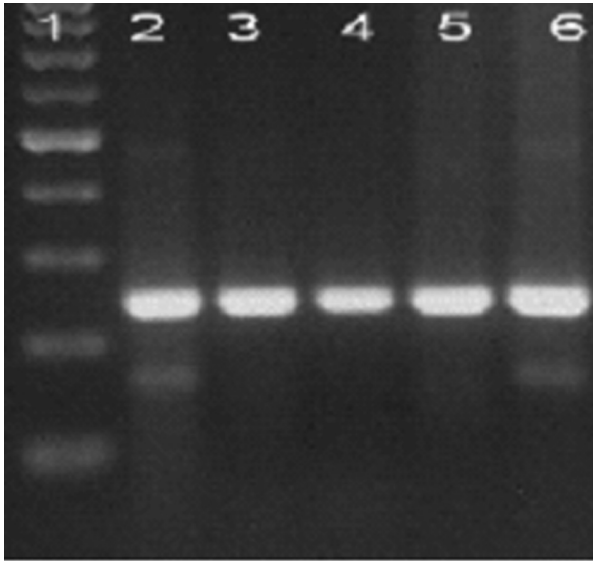


Fig. 1.— Electroforesis en gel de agarosa del producto amplificado por ARMS PCR. Calle 1: marcador de peso molecular (banda intensa de 500 pb); calle 2: paciente A; calle 3: paciente B; calle 4: paciente C; calle 5: control negativo; calle 6: paciente D. La banda intensa de 245 pb corresponde al control de amplificación que debe dar positivo en todas las muestras. La banda de 179 pb corresponde a la amplificación específica del alelo mutado del gen BRAF. Se observa solamente amplificación del alelo mutado en los pacientes A y D, los demás son negativos.

Discusión

En este estudio analizamos en una población de pacientes operados por nódulos tiroideos benignos y malignos en la Argentina, la presencia de la mutación V600E del oncogén BRAF en la anatomía patológica y su relación con las características clínicas.

Esta mutación fue detectada en 10 de 13, es decir el 77%, de los casos de carcinoma papilar de tiroides estudiados en este trabajo. La mutación V600E de BRAF constituye la alteración genética más común del carcinoma papilar de tiroides, estimándose la prevalencia global mundial en un 45%, con variaciones referidas según distintos estudios entre el 29 y el 83%^{6, 10, 27}. Esta diferencia puede ser debida a diferentes metodologías y poblaciones. En algunos países, como Corea, la prevalencia llega hasta el 90% de los carcinomas papilares²⁸. Existen pocos datos con respecto a la frecuencia de esta alteración genética en Sudamérica. En Brasil, Oler y col. encontraron la mutación en 58 de 120 pacientes (48%)²⁹. Recientemente en Chile, Osorio y col. comunicaron la presencia de la mutación en el 69.6% de un total de 56 muestras analizadas (Osorio F, Pineda P, Cabané P, et al. Alta frecuencia de mutación de BRAFV600E en cáncer papilar de tiroides, asociación con marcadores de diferenciación celular y factores pronósticos clínicos e

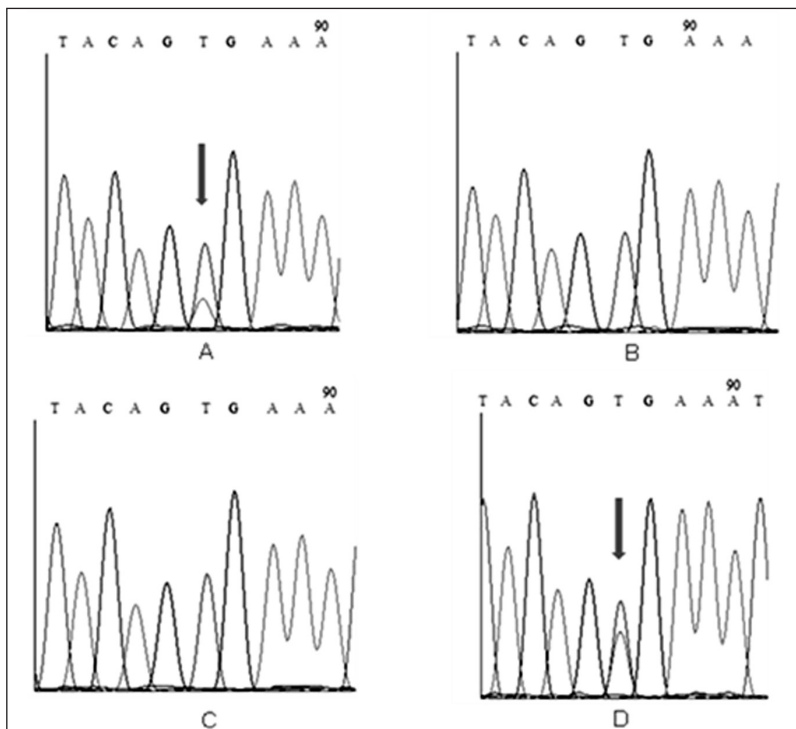


Fig. 2.— Resultados de la secuenciación directa de los mismos casos anteriores. A: carcinoma papilar de tiroides (CPT) BRAF positivo. B: hiperplasia nodular colóide. C: CPT BRAF negativo. D: CPT BRAF positivo. Las flechas indican el sitio de mutación, donde cambia timina por adenina, lo que determina la sustitución del aminoácido valina por glutamato (V600E).

TABLA 2.— Características clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con carcinoma papilar de tiroides (CPT) en relación a la presencia o ausencia de mutación de BRAF

Características	BRAF positivo n = 10	BRAF negativo n = 3	p
Edad, media ± DS (años)	47.7 ± 12.7	24.7 ± 8.1	< 0.01
Sexo F/M	6/4	3/0	ns
Variante histológica			
Clásica	9/10	0/3	< 0.02
Otras	1/10	3/3	
Tamaño tumoral (cm) X ± DS	2.2 ± 0.9	3.7 ± 0.2	< 0.001
Extensión extratiroidea (n)	2	0	ns
Multifocalidad	1	2	ns
MTS ganglionares	3	2	ns
Estadificación			ns
Estadio I	5	3	
Estadio II	4	0	
Estadio III	1	0	

MTS: metástasis; X ± DS: media ± desvío estándar; ns: no significativo

histológicos. *Abstract* presentado en el XXIII Congreso de la Sociedad Chilena de Endocrinología y Diabetes, 2012). Nuestros resultados son acordes a la alta prevalencia encontrada en la región.

En este trabajo, de los diez casos de carcinoma papilar que presentaron la mutación V600E, nueve correspondieron a la variante clásica o convencional y solo uno a la variante folicular. La mutación estuvo ausente en las pacientes con variante cribiforme y esclerosante difusa. Estos hallazgos son acordes a lo referido en cuanto a la prevalencia de la mutación según los diferentes subtipos del carcinoma papilar. Se ha comunicado una mayor frecuencia en la variante de células altas (80-83%), seguida de la variante clásica o convencional (60-67%), mientras que se la detecta con menor frecuencia en la variante folicular (12-18%)^{6, 10}. Respecto de los otros subtipos de carcinoma papilar de tiroides poco frecuentes, la mutación V600E de BRAF no ha sido habitualmente estudiada. Trovisco y col.³⁰ detectaron la misma en algunos casos de carcinoma papilar variante oncocítica y símil Warthin, mientras que fue negativa en esclerosante difuso, columnar y mucoepidermoide. Otros autores tampoco la han encontrado en la variante cribiforme³¹.

No detectamos la mutación en ninguna de las muestras obtenidas de nódulos benignos o de tejido tiroideo adyacente normal, acorde a lo referido en la bibliografía. Un metaanálisis basado en estudios que informaron el análisis de la mutación en más de 5000 muestras obtenidas por punción con aguja fina señaló que la presencia de la mutación confiere un riesgo de cáncer tiroideo > 99% en la anatomía patológica³². Solo existen seis casos

comunicados de resultados falsos positivos, pero que fueron estudiados en material obtenido por punción con aguja fina, en los que no se encontró cáncer luego de la cirugía^{6, 33}. Es aceptado que el hallazgo de mutación de BRAF en el estudio de los nódulos tiroideos confiere una altísima especificidad para cáncer tiroideo.

Diversos estudios investigaron la relación entre la mutación de BRAF y las características clínico patológicas del carcinoma papilar de tiroides. Si bien los resultados no son completamente consistentes, en la mayoría de los trabajos, de diferente origen geográfico y étnico, se demostró una asociación significativa entre la mutación V600E del oncogén BRAF con uno o más marcadores clínico patológicos de mayor agresividad como extensión extratiroidea, metástasis ganglionares, invasión capsular y vascular, enfermedad más avanzada al momento del diagnóstico y mayor edad^{7, 18-20, 27, 34}. En contraposición, en nuestro trabajo encontramos que el tamaño tumoral fue significativamente mayor en pacientes con ausencia de la mutación. Pero cabe destacar que dos de estos tres pacientes correspondieron a las variantes histológicas esclerosante difuso y cribiforme, asociadas a mayor agresividad. No hubo diferencias significativas en las otras variables clínicas y patológicas analizadas según la mutación estuviera o no presente. No puede excluirse un error estadístico tipo alfa, dado el bajo número de pacientes del estudio. Nuestros pacientes con BRAF mutado tuvieron una edad significativamente mayor al momento del diagnóstico. Este hallazgo puede tener implicancias pronósticas. En un estudio de Howell y col. los pacientes BRAF positivo con edad más avanzada tuvieron tasas

de recurrencia más altas³⁵. Recientemente, Xing y col. encontraron una interacción aditiva significativa entre la edad mayor a 45 años y la positividad para la mutación con respecto a la mortalidad por carcinoma papilar³⁶.

La limitación de este estudio es el número acotado de pacientes. Consideramos como fortaleza que fue realizado en una población argentina, según nuestro conocimiento sin datos de referencia previos y que los pacientes se reclutaron en forma prospectiva y consecutiva, evitando posibles sesgos.

En conclusión, comunicamos en una población argentina una frecuencia elevada de mutación V600E del oncogén BRAF en pacientes operados por carcinoma papilar de tiroides. A su vez, la mutación estuvo ausente en todos los casos de nódulos tiroideos benignos y en las muestras obtenidas de tejido adyacente no tumoral. Nuestros hallazgos están en concordancia con lo reportado en la bibliografía.

Conflictos de intereses: Ninguno para declarar.

Bibliografía

- Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA* 2006; 295: 2164-7.
- Albores-Saavedra J, Henson DE, Glazer E, Schwartz AM. Changing patterns in the incidence and survival of thyroid cancer with follicular phenotype—papillary, follicular, and anaplastic: a morphological and epidemiological study. *Endocr Pathol* 2007; 18: 1-7.
- Leenhardt L, Grosclaude P, Cherie-Challine L. Increased incidence of thyroid carcinoma in France: a true epidemic or thyroid nodule management effects? Report from the French Thyroid Cancer Committee. *Thyroid* 2004; 14: 1056-60.
- Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97: 418-28.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; 64: 9-29.
- Melck AL, Yip L, Carty SE. The utility of BRAF testing in the management of papillary thyroid cancer. *Oncologist* 2010; 15: 1285-93.
- Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 2007; 28: 742-62.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
- Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 385-94.
- Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 245-62.
- Lee JH, Lee ES, Kim YS. Clinicopathologic significance of BRAF V600E mutation in papillary carcinomas of the thyroid: A meta-analysis. *Cancer* 2007; 110: 38-46.
- Cohen Y, Xing M, Mambo E, et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 625-7.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1454-7.
- Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 2003; 22: 6455-7.
- Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 4561-7.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 5399-404.
- Nikiforov YE. Molecular diagnosis of thyroid tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 569-77.
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, et al. BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6373-9.
- Lupi C, Giannini R, Ugolini C, et al. Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4085-90.
- Kebebew E, Weng J, Bauer J, et al. The prevalence and prognostic value of BRAF mutation in thyroid cancer. *Ann Surg* 2007; 246: 466-70.
- Riesco-Eizaguirre G, Gutierrez-Martinez P, Garcia-Cabezas MA, Nistal M, Santisteban P. The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na⁺/I⁻ targeting to the membrane. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 257-69.
- Elisei R, Ugolini C, Viola D, et al. BRAF (V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: A 15-year median follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3943-9.
- Board RE, Ellison G, Orr MCM, et al. Detection of BRAF mutations in the tumor and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study. *Br J Cancer* 2009; 101: 1724-30.
- Ellison G, Donald E, McWalter G, et al. A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 132.
- Huang T, Zhuge J, Zhang WW. Sensitive detection of BRAF V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR. *Biomark Res* 2013; 1: 3.
- AJCC: Thyroid. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, p 87-96.
- Tufano RP, Teixeira GV, Bishop J, Carson KA, Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer and its value in tailoring initial treatment. *Medicine* 2012; 91: 274-86.
- Jeong D, Jeong Y, Park JH, et al. BRAFV600E mutation analysis in papillary thyroid carcinomas by peptide nucleic acid clamp Real-time PCR. *Ann Surg Oncol* 2013; 20: 759-66.
- Oler G, Cerutti JM. High prevalence of BRAF mutation in a Brazilian cohort of patients with sporadic papillary thyroid carcinoma: correlation with more aggressive phenotype and decreased expression of iodide-metabolizing genes. *Cancer* 2009; 115: 972-80.
- Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, et al. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 2004; 202: 247-51.
- Schuetze D, Hoschar AP, Seethala RR, Assaad A, Zhang X, Hunt JL. The T1799A BRAF mutation is absent in

- cribiform-morular variant of papillary carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 803-5.
32. Nikiforov YE, Nikiforova MN. Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2011; 7: 569-80.
 33. Kim SW, Lee JI, Kim JW, et al. BRAFV600E mutation analysis in fine-needle aspiration cytology specimens for evaluation of thyroid nodule: a large series in a BRAFV600E-prevalent population. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3693-700.
 34. Kim TH, Park YJ, Lim JA, et al. The association of the BRAF (V600E) mutation with prognostic factors and poor clinical outcome in papillary thyroid cancer: a meta-analysis. *Cancer* 2012; 118: 1764-73.
 35. Howell GM, Carty SE, Armstrong MJ, et al. Both BRAF V600E mutation and older age (≥ 65 years) are associated with recurrent papillary thyroid cancer. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3566-71.
 36. Xing M, Alzahrani AS, Carson KA, et al. Association between BRAF V600E mutation and mortality in patients with papillary thyroid cancer. *JAMA* 2013; 309: 1493-501.

Sobre Cervantes

Cervantes muere en Madrid el 22 de abril de 1616. Tres días antes aún tuvo tiempo de escribir su última carta a Don Pedro Fernández de Castro, conde de Lemos. En ella dice "El tiempo es breve, las ansias crecen, las esperanzas menguan, y con todo esto, llevo la vida sobre el deseo que tengo de vivir"

En: [HYPERLINK "http://meta.gipuzkoakultura.net/bitstream/10690/71817/1/AM_317618.pdf"](http://meta.gipuzkoakultura.net/bitstream/10690/71817/1/AM_317618.pdf) \t "_blank" meta.gipuzkoakultura.net/bitstream/10690/71817/1/AM_317618.pdf

La medicina preventiva en Don Quijote

"Yo, señor, soy médico y estoy asalariado en esta ínsula para serlo de los gobernadores della, y miro por su salud mucho más que por la mía, estudiando de noche y de día y tanteando la complexión del gobernador, para acertar a curarle cuando cayere enfermo"

Miguel de Cervantes Saavedra. Alcalá de Henares, 1547-Madrid, 1616

En: <http://cvc.cervantes.es/literatura/clasicos/quijote/edicion/parte2/cap47/default.htm>