

Biología molecular del carcinoma de tiroides de estirpe folicular. Bases moleculares en la oncogénesis tiroidea

J.C. Galofré¹, A. Calleja¹, A. Panizo², J. Salvador¹

¹Departamento de Endocrinología. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

²Departamento de Anatomía Patológica. Clínica Universitaria. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra

Correspondencia:

J.C. Galofré

Departamento de Endocrinología. Clínica Universitaria

Avda. Pío XII, 36. 31008 Pamplona

(jcgalofre@unav.es)

Resumen

Existen datos que nos permiten afirmar que probablemente, en gran parte de los casos, no existe una solución de continuidad entre las diferentes neoplasias tiroideas de estirpe folicular. Cabe pensar que el proceso evolutivo comienza con una serie de alteraciones moleculares que condicionan la aparición del adenoma folicular (AF). Cambios posteriores propiciarán el desarrollo de un carcinoma folicular (CF). La aparición del carcinoma papilar (CP) tiene probablemente un itinerario similar sin que esté demostrado que tenga su origen en AF. Ulteriores cambios genéticos, tanto en el CP como en el CF encaminarán hacia la indiferenciación celular y con ello el desarrollo del carcinoma indiferenciado (CI). Esta sucesión de alteraciones moleculares condiciona un empeoramiento en el pronóstico de la neoplasia tiroidea. Por ello, las neoplasias tiroideas constituyen un excelente modelo para el estudio de la cronología de los cambios moleculares que condicionan la evolución desde la benignidad a la malignidad.

Se ha comprobado que en algunas neoplasias de tiroides existe inestabilidad genética que favorece dichos cambios moleculares. Como fenómeno inicial es frecuente observar alteraciones en los proto-oncogenes mientras que las mutaciones en los genes supresores de tumor suelen ser un evento tardío. La aparición de agresividad o invasividad de la neoplasia también se puede investigar mediante el estudio de cambios moleculares.

La aplicación clínica de dichos hallazgos comienza a ser una realidad, lo que facilitará la precisión diagnóstica y con ello una terapéutica más eficaz.

Palabras clave: Carcinoma de tiroides. Marcadores moleculares.

Introducción

En una reciente revisión Hanahan y Weinberg¹ resumen la correlación de sucesos que tienen lugar en el desarrollo de una neoplasia. Estos autores proponen que para que el proceso oncogénico tenga lugar deben alterarse seis funciones esenciales de la fisiología celular: a) autosuficiencia para gobernar las señales de crecimiento (donde tienen una misión preponderante los proto-oncogenes), b) insensibilidad hacia las señales inhibitorias del crecimiento celular (mediada especialmente por

Summary

According to current data, it seems probable that there is no interruption in the evolution of different follicular thyroid neoplasm. Probably transforming events responsible for the transition from normal to tumor cells start with molecular changes that determine the appearance of follicular adenoma. Later changes propitiate the development of follicular cancer. It is likely that the generation of papillary carcinoma follows a different pathway without passing through a previous phase of follicular adenoma. Subsequently, genetic changes render the cell prone to a failure to differentiate, culminating in the development of anaplastic cancer. Those incidental molecular changes result in a dramatic worsening in the prognosis of thyroid cancer. Research into thyroid tumors is likely to be instructive in view of the spectrum they span, from benign adenomas to poorly differentiated carcinomas.

It has been proven that molecular alterations in thyroid tumor cells are predisposed by genome instability. Usually changes of proto-oncogenes represent an early event whereas mutations of suppressant genes are usually a late phenomenon. The onset of aggressive or invasive behavior may be studied, and perhaps can be predicted in the future, by molecular changes.

The clinical application of the growing understanding of gene alterations involved in thyroidal oncogenesis is becoming a reality. Such knowledge might contribute, in the near future, to greater diagnostic accuracy and effective treatment for thyroid malignancies.

Key words: Thyroid Carcinoma. Molecular Markers.

los genes supresores de tumor), c) evasión de la muerte celular (apoptosis), d) potencial replicativo ilimitado, e) fomento sostenido de angiogénesis y f) alteraciones en la adhesividad celular que proporcionarían capacidad para la invasión tisular y la desarrollo de metástasis. Cada uno de éstos cambios puede obedecer a un conjunto de alteraciones genéticas, muchas de las cuales aún deben ser dilucidadas. Estos seis eventos generalmente tienen lugar en una célula que presenta cierto grado de inestabilidad genética. Estas alteraciones aparecen correlativamente en el tiempo, y no siempre por el mismo orden, aunque

algunas predisponen a la aparición de otras. Además de los sucesos narrados, para que se desarrolle una neoplasia, el tumor debe burlar el sistema inmune.

Entre estos rasgos cobran especial relevancia los cambios genéticos que determinan la alteración en la expresión de proteínas implicadas en la replicación celular. En este sentido destacan dos grandes grupos de genes: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumor. Los primeros condicionan la aparición de señales que conducen a la proliferación celular, mientras que los segundos desempeñan un papel opuesto. La expresión de ambos tipos de genes responde a la activación de receptores transmembrana y por tanto dependen de señales extracelulares. La mutación de proto-oncogenes dará lugar a la aparición de oncogenes con capacidad para remedar estas señales. Los genes supresores de tumor generalmente conducen a la célula hacia un estado quiescente (G0) en una situación postmitótica tras su diferenciación. Su alteración suele ser un acontecimiento tardío en la evolución del proceso oncogénico y condiciona que no se detenga el proceso de replicación celular estimulado por los oncogenes.

Clasificación del carcinoma de tiroides. Interés de los estudios moleculares

Es clásica la división morfológica de las neoplasias malignas del tiroides atendiendo a su origen celular (folicular o parafolicular) o a su diferenciación (papilar, folicular, pobremente diferenciado e indiferenciado). Cabe preguntarse si esta clasificación responde adecuadamente a la información que nos proporciona el conocimiento actual o si estamos en condiciones adentrarnos en una catalogación molecular de estas neoplasias. El avance en esta nueva clasificación de las neoplasias del tiroides puede ofrecer otras perspectivas que permitan aumentar la eficacia de los procedimientos diagnósticos y terapéuticos^{2,3}.

El proceso oncogénico es un fenómeno abierto que está sometido, por su propia naturaleza, a constantes cambios moleculares tanto de naturaleza genética como epigenética. Con toda probabilidad en cualquier tipo de carcinoma de tiroides, (CT) sea cual fuere su clasificación histológica, se sigue la colección de fenómenos oncogénicos reseñados por Hanahan y Weinberg¹. No obstante, hasta la fecha, no se han podido establecer cuales son las bases moleculares que conducen a la aparición de los diferentes fenotipos celulares, ni qué cambios genéticos pueden condicionar la evolución hacia un patrón de indiferenciación celular, si bien son notables los esfuerzos que se están haciendo en este sentido⁴⁻⁶. Los datos experimentales proporcionan señales firmes para sospechar que el viraje de una neoplasia diferenciada a indiferenciada se produce sin solución de continuidad por el acúmulo de mutaciones deletéreas.

Actualmente se está comenzando a estudiar mediante técnicas de *microarrays* especímenes de CT con objeto de buscar la asociación entre un patrón de expresión genética y los diferentes perfiles oncológicos de las células foliculares. Recientemente se ha estudiado el perfil de expresión genética en el tejido de CF, así como en sus metástasis cerebrales⁷. Se ha observado que en el tejido metastásico existía una sobreexpresión de 18 genes y una disminución de la expresión en 40. Los genes que mostraban expresión alterada tenían relación con el

proceso de la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN, la angiogénesis, la adhesión, movilidad e invasividad celular, así como con la respuesta inmune. Dichos autores observaron que el patrón de expresión génica en el tumor primario y en la metástasis era diferente.

Oncogénesis y mutaciones en el carcinoma de tiroides

Generalidades

Algunos CT parecen caracterizarse por la existencia de inestabilidad (hipermutabilidad) genética, lo cual propicia el acúmulo de mutaciones o cambios en el ADN que dará lugar a las diferentes neoplasias⁸⁻¹¹. Igualmente se especula que el cambio en el patrón de metilación del ADN puede ser un evento temprano en la carcinogénesis y ello puede contribuir, entre otras cosas, a dicha inestabilidad genética⁸. A su vez, esta alteración ayudaría a explicar la progresión desde el carcinoma diferenciado al CI¹².

De forma específica, en el CT se ven involucradas lesiones genéticas como reagrupamientos y translocaciones cromosómicas, aspectos excepcionales en muchos otros tumores epiteliales¹³. Así, se han descrito algunos reagrupamientos como *ret/PTC* (propio de las neoplasias papilares), *NTRK* y *Pax-8/PPARG*, siendo este último característico del CF ya que se encuentra hasta en el 62% de estos tumores, sin que esté presente en el CP¹⁴. Como observación empírica está descrito que en el CP existe una alteración en el mecanismo de reparación del DNA, lo que dará lugar a la presencia de inestabilidad de microsatélites, aspecto que contribuye al desarrollo y progresión tumoral¹⁵. Igualmente, también se ha observado que existen variados fenómenos epigenéticos como la desaminación de los dinucleótidos CpG en los carcinomas pobremente diferenciados, lo que se asocia a progresión tumoral, o metilaciones en el gen *p16* hasta en 33% de los casos¹⁶.

En el desarrollo de las neoplasias tiroideas también concurren otras alteraciones que condicionan la síntesis de proteínas defectuosas, sin que ello suponga la existencia de una mutación en el gen correspondiente. Así, se ha observado el desarrollo de *splicing* alternativos en algunos genes supresores como *FHIT* (*Fragile histidine triad gene*) y *TSG 101* (*Tumor supresor gene 101*)¹⁷. Dicha alteración conlleva una agrupación diferente de los codones que conforman los diferentes exones e intrones y por ello un mRNA distinto, cuya traducción condicionará la síntesis de una proteína modificada. Sin embargo, no se han podido establecer con precisión las consecuencias provocadas por los *splicing* alternativos, aunque no parece que tengan relación con el estadio, ni con el grado de diferenciación de estos tumores. El hecho de que estas alteraciones se encuentren tanto en las neoplasias benignas como malignas indica que pueden constituir un suceso temprano en el desarrollo de las neoplasias tiroideas.

Se conoce poco sobre los cambios genéticos que condicionan el comienzo del desarrollo del adenoma y el paso de éste a carcinoma. Se ha observado que en algunos casos ocurre inicialmente la activación, mutación o expresión de *novos* de algunos oncogenes o factores de crecimiento como *ras*, *ret*, *TRK*, *met* y *PTEN* o del receptor de TSH (TSH-R), a la vez que pueden aparecer mutaciones de genes supresores^{18,19} (Tablas 1, 2 y 3). Como se ha reseñado, el cortejo de mutaciones que

Tabla 1. Cambios genéticos detectados en el carcinoma de tiroides de estirpe folicular

| Gen | Clase de gen o función | Alteración | Tipo de Neoplasia | Momento |
|--------------------------------------|---|---|--------------------------------------|------------|
| <i>TSH-R</i> | Receptor TSH | Mutación | Adenoma y carcinoma hiperfuncionante | |
| <i>Activina A-R</i> | Receptor de Activina A | Infraexpresión | CP | |
| <i>TGFβ-R</i> | Receptor de TGF- β | Infraexpresión | CP | |
| <i>ADN mitocondrial</i> | | Mutación | CP y de células de Hürthle | |
| <i>Fas-L</i> | Receptor apoptosis | Sobreexpresión | CP, CF y de células de Hürthle | |
| <i>Fas</i> | Pro-apoptótica | Infraexpresión | CP, CF y de células de Hürthle | |
| <i>ICAM-1</i> | Molécula de adhesión | Sobreexpresión | Carcinoma | |
| <i>cateninas a, b, g</i> | Molécula de adhesión | Infraexpresión | Adenomas y carcinomas | Tardío |
| | | Mutación | Carcinoma | |
| <i>E cadherina</i> | Molécula de adhesión | Infraexpresión | | |
| <i>Galectina 3</i> | Molécula de adhesión | Sobreexpresión en citoplasma | Carcinoma | |
| <i>CD44v6</i> | Molécula de adhesión | Infraexpresión (?) | Carcinoma | |
| <i>VEGF</i> | Factor angiogénico | Sobreexpresión | Carcinoma | |
| <i>EGF</i> | Factor de crecimiento | Sobreexpresión | Carcinoma | |
| <i>NIS</i> | Transporte de yodo | Infraexpresión. Cambios epigenéticos | Carcinoma | Tardío |
| <i>Pendrina</i> | Transporte de yodo | Infraexpresión | CI | |
| <i>Tiroglobulina</i> | Soporte de síntesis de hormonas tiroideas | Infraexpresión | CI | Tardío |
| <i>TTF-1</i> | Factor de transcripción | Infraexpresión | CP, CF y CI | Tardío |
| <i>TTF-2</i> | Factor de transcripción | Infraexpresión | CI | Tardío |
| <i>Pax-8</i> | Factor de transcripción | Infraexpresión | CP, CF y CI | Tardío |
| <i>Pax-8-PPARγ</i> | Agrupamiento de factor de transcripción | Infraexpresión | AF, CF y CI | Intermedio |
| <i>nm23-H1</i> | gen supresor de metástasis | Infraexpresión | CF | |
| <i>BAX</i> | Molécula proapoptótica | Sobreexpresión | CP | |

AF: adenoma folicular. CP: carcinoma papilar. CF: carcinoma folicular. CI: carcinoma indiferenciado.

contribuyen al desarrollo de la neoplasia no se limita a los proto-oncogenes o genes supresores. Cualquier fenómeno que esté relacionado con la proliferación entra dentro del ámbito de la oncogénesis. Así, por ejemplo, se sabe que TGF- β y Activina A son, probablemente, los inhibidores más importantes del crecimiento de la célula folicular normal²⁰. Por ello no es extraño que esté descrita la resistencia de las células tumorales a la acción de estos elementos²¹. De hecho, se ha encontrado que los tirocitos del CP tienen una menor expresión de los receptores para TGF- β ²², e igualmente se han encontrado cambios en la expresión del receptor de Activina A²¹.

También se ha llegado a detectar la presencia de mutaciones somáticas del ADN mitocondrial en células del CP y del carcinoma de células de Hürthle, lo que indica que dicha alteración puede estar presente en el desarrollo de éste tipo de neoplasias y puede condicionar la progresión de dichos tumores²³, si bien el alcance de estos hallazgos en la actualidad todavía permanece esquivo.

Una característica de toda neoplasia es su pericia para evadir la vigilancia inmune. Dicha propiedad está en relación, entre otros mecanismos, con la capacidad de las células tumorales para expresar Fas-L y así lograr activar el receptor Fas (CD 95) de

las células inmunológicas, induciendo la apoptosis de las mismas. Se ha observado la presencia de este ligando tanto en las células del CP como en las del CF²⁴. Por el contrario, su expresión es débil, o no se halla, en las células del carcinoma medular. Además se observa que las células tumorales se protegen de una posible acción "fratricida" al expresar débilmente Fas²⁴.

La proteína de membrana CD 97 o GR1 se expresa generalmente en los linfocitos activados, uniéndose a CD 55 o DAF: factor de aceleramiento del deterioro celular. Recientemente se le ha asignado a CD 97 un papel como marcador de diferenciación celular. Esta molécula no se expresa en la glándula tiroidea normal, sin embargo se detecta en neoplasias sin tener una clara correlación con el estadio tumoral²⁵.

Del mismo modo se ha logrado establecer una conexión entre la actividad de la desyodasa tipo 1 y la diferenciación celular ya que su actividad es alta en el tejido tiroideo sano mientras que es baja en el CF diferenciado y prácticamente indetectable en el CI²⁶.

De entre todas éstas alteraciones cobran importancia capital los cambios que acontecen en los proto-oncogenes y genes supresores de tumor, por su trascendencia en la regulación de la replicación celular.

Tabla 2. Alteraciones y cambios de expresión de proto-oncogenes en el carcinoma de tiroides de estirpe folicular

| Gen | Clase de gen | Función | Alteración más frecuente | Tipo de Neoplasia | Momento |
|--------------------|---------------|-------------------------------------|--|--|----------|
| <i>K-ras</i> | Proto-oncogen | Señal intracelular | Mutaciones. Sobreexpresión | AF, CP, CF y CI | Inicial |
| <i>H-ras</i> | Proto-oncogen | Señal intracelular | Mutaciones. Sobreexpresión. Amplificaciones | AF, CP, CF y CI | Inicial |
| <i>N-ras</i> | Proto-oncogen | Señal intracelular | Mutaciones. Sobreexpresión | AF, CP, CF y CI | Inicial |
| <i>CCND1</i> | Proto-oncogen | | Sobreexpresión | Adenomas y carcinomas | Temprano |
| <i>erbB</i> | Proto-oncogen | Homología con factor de crecimiento | Sobreexpresión. Raramente mutado Infraexpresión | CP ¿específico? CF y CI | Tardío |
| <i>myc</i> | Proto-oncogen | Factor de transcripción | ¿Sobreexpresión? | CP, CF y CI | |
| <i>HGF</i> | Proto-oncogen | | Sobreexpresión | AF y CP | |
| <i>HGF-R (met)</i> | Proto-oncogen | Receptor tirosin-quinasa | Sobreexpresión | CP y enfermedad autoinmune (T. Hashimoto y E. de Graves) | |
| <i>TRK</i> | Proto-oncogen | Receptor tirosin-quinasa | Reagrupamientos | CP | Temprano |
| <i>ret/PTC</i> | Proto-oncogen | Receptor tirosin-quinasa | Reagrupamientos | Específico de CP | Temprano |
| <i>fos</i> | Proto-oncogen | Factor de transcripción | Sobreexpresión | CP, CF y CI | |

CP: carcinoma papilar. CF: carcinoma folicular. CI: carcinoma indiferenciado.

Tabla 3. Alteraciones y cambios de expresión de genes supresores en el carcinoma de tiroides de estirpe folicular

| Gen | Clase de gen | Alteración | Tipo de Neoplasia | Momento |
|----------------|--------------|------------------------------|----------------------------------|----------|
| <i>p53</i> | Gen supresor | Sobreexpresión y Mutaciones | CP, CF y CI | Tardío |
| <i>PTEN</i> | Gen supresor | Infraexpresión | Carcinomas | Tardío |
| <i>Rb</i> | Gen supresor | Mutaciones | Carcinomas | Tardío |
| <i>FHIT</i> | Gen supresor | <i>Splicing</i> alternativos | Benigno y maligno | Temprano |
| <i>TSG 101</i> | Gen supresor | <i>Splicing</i> alternativos | Benigno y maligno | Temprano |
| <i>APC</i> | Gen supresor | Mutaciones | CP asociado a S. de Gardner y CI | |

CP: carcinoma papilar. CF: carcinoma folicular. CI: carcinoma indiferenciado.

Mutaciones de proto-oncogenes. Un fenómeno precoz

La presencia de mutaciones del proto-oncogen ras se ha implicado en las fases iniciales de desarrollo de diversos tipos tumorales y tiene lugar aproximadamente en el 10-15% de todos los carcinomas humanos. Existen tres tipos de proto-oncogenes ras (*H-ras*, *K-ras* y *N-ras*). Probablemente la mutación activadora del ras es un fenómeno temprano en la evolución de las neoplasias tiroideas^{9,27}. Experimentalmente se ha observado que dicha alteración desestabiliza el genoma de la línea celular tiroidea PCCL3, lo que es coherente con el inicio del proceso neoplásico, ya que funcionalmente este proto-oncogen promueve la progresión fenotípica²⁸. Un fallo en su función propicia la predisposición de anomalías genómicas a gran escala. Se ha visto que existe cierta correlación entre la presencia de la mutación del ras y la edad de presentación, pues son raras en las neoplasias tiroideas que asientan en la población joven, mientras que su prevalencia aumenta conforme avanza la edad²⁹. Dicha mutación es más frecuente si ha existido el antecedente de radiación²⁷. La información de que se dispone es coherente con la hipótesis de que inicialmente la mutación del ras condicionaría el desarrollo del AF y posteriormente el de otras neoplasias¹⁰ (Tabla 2).

Se observa que entre el 5-20% de los CP presentan dicha mutación, si bien también existe un aumento de la expresión de este proto-oncogen en este tipo tumoral. Entre el 24-53% de los CF tienen mutaciones en este proto-oncogen y su expresión puede estar aumentada hasta en el 53% los casos. Además, se ha visto que las mutaciones del proto-oncogen *ras* son más comunes en los CF que presentan metástasis. La prevalencia de las mutaciones en los CI oscila entre el 20-60% y su expresión está aumentada hasta en el 60% de estos tumores.

A pesar de que algunos autores no han podido establecer una relación clara entre la presencia de mutaciones de ras y la agresividad del tumor, otros han conseguido correlacionar la existencia de mutaciones en el codón 61 de *N-ras* con la diferenciación del CT. Esta mutación no se suele encontrar en los carcinomas medulares³⁰.

CCND1, *erbB2* y *myc* son tres proto-oncogenes que se hallan alterados con frecuencia en neoplasias sólidas. Se ha estudiado la expresión de estos genes en especímenes tisulares de CT, observándose que la frecuencia de su expresión es variable³¹. Algunos autores apuntan que *c-erbB2* se encuentra sobrepresado en los CP, pero raramente está mutado en este

tipo de neoplasias, y por otro lado, se ha visto que en los CF y CI existe una expresión pobre de *erbB2*³². Sin embargo, *CCND1* está sobreexpresado tanto en las neoplasias malignas como en las de naturaleza benigna. Los datos sobre el aumento de expresión de *myc* son contradictorios. El conjunto de estos resultados indica que en el desarrollo del CT las mutaciones de *CCND1* pueden tener un papel temprano mientras que *erbB2* se alteraría de forma tardía³¹.

El estudio del proto-oncogen *HGF* (*hepatocyte growth factor*) y su receptor HGF-R (o *c-met*) ayuda a explicar algunos de los sucesos que conforman la historia natural de las neoplasias tiroideas. Dicho proto-oncogen está sobreexpresado, pero no mutado, en los AF y CP³³. No obstante esta situación puede ser fruto de mutaciones previas ya que se ha visto que el aumento de actividad de *ras* y *ret* pueden condicionar la acumulación del ARN de MET. Dicho con otras palabras, la falta de regulación de *met* puede ser el resultado final de diferentes caminos moleculares capaces de inducir la transformación de la célula tiroidea. Las células con expresión aumentada de *met* pueden producir HGF y activarlo. Es interesante señalar que no se ha encontrado expresión de HGF o de *c-met* ni en el CF ni en el CI. Dicha carencia se relaciona que la pérdida de material genético del cromosoma 7q ya que esta ausencia no se halla en AF ni en los CP con buena evolución, estando presente en los de mal pronóstico^{12,34}.

El proto-oncogen *TRK* codifica una tirosinquinasa de membrana que actúa como receptor del factor de crecimiento neuronal. Se ha visto también que en el CP está a menudo activado *N-TRK1* (también conocido como *TRKA*, ubicado en 1q22). Como en el caso del proto-oncogen *ret*, la activación de este gen esta causada por reagrupamientos en los que por lo menos están implicados tres genes³⁵⁻³⁷.

El *ret*: un proto-oncogen emblemático del tiroides

La activación del proto-oncogen *ret* se ha relacionado tanto con el desarrollo del CP (estirpe folicular) como del carcinoma medular (célula C), pero su contribución al desarrollo de ambas neoplasias tiene lugar de manera diferente. En el CP existen reagrupamientos somáticos del *ret*, con variedad de genes activados que contribuye a la expresión de las oncoproteínas quiméricas RET/PTC, mientras que en los tumores de estirpe medular existen mutaciones en la línea germinal, frecuentemente puntuales, que conducen a la activación constitucional de la función de la tirosinquinasa RET, responsable fundamental en el desarrollo de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN-2)³⁸.

Los reagrupamientos del proto-oncogen *ret* (10q11.2) son probablemente los cambios genéticos somáticos más frecuentemente hallados (10-40%) en los CP de tiroides³⁹. Hasta la fecha se han descrito 8 tipos de reagrupamientos (inversiones y translocaciones) de *ret*, identificadas como RET/PTC1 a RET/PTC8⁴⁰⁻⁴⁶. A su vez, se ha tratado de asociar determinadas mutaciones del RET/PTC con diversos factores como exposición a radiaciones, edad e incluso a las variantes histológicas del CP, sin lograr establecer conclusiones firmes⁴⁷. No hay consenso sobre la presencia de la mutación, y su relación con el comportamiento biológico de la neoplasia o su respuesta al tratamiento, y por el momento dichas supuestas relaciones carecen de implicaciones prácticas^{48,49}. En este intento de

correlacionar el pronóstico del CP con la presencia de los reagrupamientos RET/PTC se ha visto que la mitad de los CP muestran RET-TK (RET con dominio tirosinquinasa), de los que sólo una pequeña parte se explica por el reagrupamiento de los RET/PTC. Por el contrario, la expresión de *wild-type ret* se ha detectado en el 45% de los tumores RET-TK positivos y su expresión fue un factor de riesgo independiente de CP agresivo⁵⁰. En este sentido, también cabe reseñar que algunos autores han observado que el reagrupamiento RET/PTC1 se asocia a un curso clínico más agresivo en los adultos⁵¹. Dicha reagrupación es más frecuente en pacientes que son sometidos a radiación externa⁵² y parece que la exposición prolongada a radiaciones se asocia con un cambio de RET/PTC3 a RET/PTC1⁵³. Recientemente se han identificado dos nuevas fusiones de genes que implican a *ret*^{54,55}. Estas son ELKS y PCM-1. Es de notar que no se han descrito reagrupamientos del RET en CI ni en el CF (Tablas 2 y 4).

Mutaciones del gen supresor *p53*. Un evento tardío

La acción de la proteína P53 no sólo es determinante en el proceso de proliferación celular, sino que se le atribuyen otras propiedades fundamentales, como la organización de la reparación de los errores en la replicación del ADN. Se comprende que el fallo de éste mecanismo puede condicionar de forma decisiva el desarrollo de la neoplasia (Tablas 3 y 4).

Se ha comprobado que en los CT el gen supresor *p53* es hipermutable¹⁶. El porcentaje de las diferentes mutaciones halladas orienta a pensar que tienen lugar al azar. Dichas mutaciones parecen ser un evento tardío en la patogénesis multipaso del desarrollo de la neoplasia, por lo que constituye un rasgo indicativo de tumores pobremente diferenciados o de CI.

La expresión de *p53* está aumentada en el 11% de los CP, en el 14% de los CF, en el 25-41% de los carcinomas pobremente diferenciados y entre 64% y el 71% de los CI^{56,57}. Este aumento de la expresión acontece sin que ello signifique la existencia de mutaciones en el correspondiente gen. Antes bien, dicho aumento de expresión puede indicar dos fenómenos. En primer lugar la existencia de probables alteraciones o mutaciones de genes que codifican proteínas que condicionen, por diversos mecanismos, el aumento de expresión de P53. También puede ocurrir que las alteraciones tengan lugar en la síntesis de alguna de las proteínas de la cadena metabólica que es activada por este gen supresor fundamental; ello condicionaría la impotencia en la función de P53 y por ende, su correspondiente acúmulo intracelular.

Como queda dicho, existe una clara correlación entre la presencia de mutaciones o cambios en este gen y la agresividad del tumor, lo cual es coherente con la pérdida de la función biológica del gen supresor *p53*. Al carecer del mecanismo de control adecuado que regula la corrección de errores en el proceso de síntesis y reparación del ADN, se abre la probabilidad de que se produzcan nuevas mutaciones tras cada división celular. Dicha probabilidad se ve aumentada si, como ocurre en las neoplasias, existe un incremento en la proliferación celular. Esta alteración también puede condicionar el que a partir de una neoplasia con un mismo origen clonal, se desarrollen nuevos clones con mutaciones específicas y diversas en comparación con otras que se pueden estar desarrollando en el mismo tumor.

Tabla 4. Protagonismo de diferentes genes en los diferentes tipos de neoplasias

| Gen | Adenoma | Carcinoma Papilar | Carcinoma Folicular | Carcinoma Anaplásico |
|-------------------------|----------------------|--|---|--|
| <i>ret</i> | | Reagrupamientos (10-40%) | | |
| <i>TRK</i> | | Reagrupamientos | | |
| <i>met</i> | | Sobreexpresión sin Mutaciones | | |
| <i>TSH-R</i> | | Mutaciones | Mutaciones | Infraexpresión |
| <i>TGF-b-R</i> | | Infraexpresión | | |
| <i>ADN mitocondrial</i> | | Mutación | | |
| <i>Fas-L</i> | | Sobreexpresión | Sobreexpresión | |
| <i>Fas</i> | | Infraexpresión | Infraexpresión | |
| <i>ras</i> | Mutado (14-50%) | Mutado (5-20%) Sobreexpresión (0-60%) | Mutado (24-53%) Sobreexpresión (0-53%) | Mutado (20-60%) Sobreexpresión (0-60%) |
| <i>erbB</i> | | Sobreexpresión | Infraexpresión | Infraexpresión |
| <i>CCND1</i> | Sobreexpresión | Sobreexpresión | Sobreexpresión | Sobreexpresión |
| <i>HGF</i> | Sobreexpresión | Sobreexpresión | No se expresa | No se expresa |
| <i>HGF-R (met)</i> | Sobreexpresión | Sobreexpresión | No se expresa | No se expresa |
| <i>p53</i> | | Sobreexpresión (11%) Mutado (<5%) | Sobreexpresión (14%) Mutado (<5%) | Sobreexpresión (64-71%) Mutado (75%) |
| <i>PTEN</i> | Sobreexpresión | Infraexpresión (5-21%) Mutado (2-3%) | Infraexpresión (7-30%) Mutado (8%) | Infraexpresión (35-59%) |
| <i>Catenina a</i> | Infraexpresión | Infraexpresión | Infraexpresión | Infraexpresión |
| <i>Catenina b</i> | Infraexpresión (66%) | Infraexpresión (100%) | Infraexpresión (100%) | Infraexpresión (100%). Expresión heterotópica nuclear. Mutaciones (61%) |
| <i>Catenina g</i> | Infraexpresión | Infraexpresión | Infraexpresión | Infraexpresión |
| <i>Galectina 3</i> | Expresión pobre | Sobreexpresión | Sobreexpresión | |
| <i>CD44v6</i> | | Expresión pobre | | |
| <i>EGF</i> | Sobreexpresión | Infraexpresión | Sobreexpresión | |
| <i>P16</i> | | Puede estar mutado Metilación (33%) | | |
| <i>PPARg</i> | | | Reagrupamientos con PAX8 (62%) | |

También es de reseñar que se ha encontrado pérdida de heterocigosidad de *p53* en muestras de la variante de células altas de CP, pero no en las muestras de CP clásico, lo que se relaciona con el peor pronóstico de aquel subtipo tumoral⁵⁸. Igualmente se han encontrado mutaciones de *p53* hasta en el 38% de los CP con componente insular que, como es conocido, se asocian a un pronóstico más sombrío. Y de forma inquietante se comprueba que en más del 75% de los CI se encuentran mutaciones del *p53*^{27,59,60}, por lo que dicha alteración juega un papel importante en el comportamiento clínico-patológico del CT⁶¹.

Diez años después del accidente de Chernobyl se estudió la presencia de mutaciones de *p53* en las muestras de CT de los sujetos que estuvieron sometidos a la radiación. Los resultados sugirieron que las mutaciones en los codones 167 y 183 podían desempeñar un papel importante en la patogénesis de este subtipo de CP secundario a radiación⁶². Sin embargo, otros autores son reacios a admitir que la radiación desempeñe un papel en el aumento de la tasa de mutaciones de *p53*¹⁶. No obstante, se ha especulado que el tratamiento con I¹³¹ en los

enfermos que presentan mutaciones en *p53* puede causar cambios evolutivos en los tumores diferenciados favoreciendo su transformación en indiferenciados⁶³.

Otras mutaciones de genes supresores

Se ha visto que el fenotipo altamente maligno de CI tiene un carácter recesivo, es decir, parece que el desarrollo del CI se debe, en mayor medida, al fallo de los genes supresores de tumor (que tienen carácter recesivo), que a la activación de los oncogenes cuya expresión siguen las reglas de los caracteres dominantes⁶⁴ (Tablas 3 y 4).

PTEN es un gen supresor de tumor que codifica la expresión de una fosfatasa. La pérdida de heterocigosidad de 10q23 (el locus de *PTEN*) se encuentra en 5-21% de los CP, 7-30% de los CF, y 35-59% de los CI, lo cual se correlaciona de forma negativa con la expresión de la proteína PTEN⁶⁵. Por tanto, suele estar infraexpresado en estas neoplasias. Raramente se encuentran mutaciones⁶⁶. También se ha visto que la expresión de *PTEN* puede actuar como un supresor de la carcinogénesis,

ya que la re-expresión del gen en líneas celulares inhibe el crecimiento tumoral. Además se ha descrito una estrecha relación entre la expresión de *PTEN* y la del inhibidor de la quinasa ciclín-dependiente p27-*kip1*. De lo anterior se concluye que la inactivación de *PTEN* puede tener un papel en el desarrollo del CT espontáneo⁶⁶, especialmente del CF donde se encuentran mutaciones de *PTEN* en el 8% de estos carcinomas⁶⁵. Es interesante recordar que este gen supresor presenta un protagonismo fundamental en la enfermedad de Cowden, donde frecuentemente coexisten neoplasias benignas del tiroides con hamartomas múltiples y neoplasias de mama.

También se ha visto que la alteración en el gen supresor *Rb* se asocia a un proceso tardío, y por tanto a los tipos más agresivos e indiferenciados de cáncer¹⁸.

Papel de la TSH en el control morfológico y funcional de los tirocitos

Está abierta la controversia sobre la contribución a la oncogénesis tiroidea de las mutaciones en el receptor de la TSH. Algunos autores no encuentran que tenga un papel en el desarrollo de carcinoma diferenciado, mientras que otros afirman que mutaciones puntuales en el TSH-R y *Gs-α* resultan oncogénicas⁶⁷⁻⁷¹. De forma aislada se han encontrado mutaciones de TSH-R en CP hiperfuncionantes⁷². También se ha descrito una mutación somática TSH-R en tejido de CF, lo que puede explicar la rareza de la presencia de hiperfunción tiroidea asociada a éstos tumores⁷³. No obstante, en general, parece que hay consenso en asociar estas mutaciones sobre todo al desarrollo de adenomas tiroideos hiperfuncionantes^{67,68,74}.

Alteraciones en las moléculas de adhesión: indicadores de agresividad

Normalmente, la expresión de la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) no se detecta en el tirocito. Dicha expresión puede ser estimulada por una gran variedad de factores que interaccionan con el sistema inmune como las citoquinas proinflamatorias interferón- γ (IFN- γ), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina-1 (IL-1) y ácido retinoico. ICAM-1 se encuentra sobrepresada en las neoplasias tiroideas, lo que se especula que contribuye a que el tumor eluda la acción del sistema inmune⁷⁵.

Las cateninas ($-\alpha$, $-\beta$, y $-\gamma$) son un grupo de proteínas citoplasmáticas, cuya expresión es ubicua, a las que se atribuye un papel crucial en la adhesión célula-célula mediada por E-cadherina^{76,77}. De forma específica estas proteínas unen el citoesqueleto con el sistema de adhesión extracelular. Es conocido que la reducción de la expresión de E-cadherina ensombrece el pronóstico del CT, si bien parece que la falta de expresión de las cateninas refleja mejor la futura evolución de la neoplasia⁷⁸. Se ha visto que en los carcinomas tiroideos la expresión de estas tres proteínas está disminuida⁷⁹. Igualmente, se han establecido relaciones entre rasgos que condicionan el pronóstico de los tumores con la expresión de estas moléculas⁷⁹. Así, se ha observado que existe una correlación entre la disminución de expresión de las cateninas $-\alpha$ y $-\beta$ con el aumento de la edad del diagnóstico y el estadio TNM. El tamaño del tumor se ha relacionado con la reducción de la expresión de catenina- β y $-\gamma$. Hay una relación entre las metástasis ganglio-

nares y la reducción de catenina- α , mientras que las metástasis a distancia son más frecuentes si disminuye la expresión de $-\beta$ y $-\gamma$. La recurrencia tumoral está en sintonía con una menor presencia de catenina- α , mientras que la mortalidad es mayor en los tumores que presentaban disminuida la expresión de $-\beta$. Estos hallazgos hacen recomendable la estimación de la expresión de catenina- α como indicador pronóstico⁷⁹. Se piensa que la catenina- β puede actuar, además, como un oncogen en los CT. Dicha suposición se ve avalada por el hallazgo, en las neoplasias, de la expresión nuclear heterotópica. La localización de catenina- β intranuclear esta restringida a los tumores pobremente diferenciados (25%) o indiferenciados (66%), por lo que la expresión pobre de catenina- β en la membrana así como la localización nuclear se asocia con un mal pronóstico, independientemente de que concurren otros marcadores de pronóstico excepto el de la diferenciación tumoral. El análisis de esta característica puede resultar útil como marcador para catalogar el subtipo de neoplasia tiroidea y predecir la evolución⁸⁰. Además, como se ha reseñado, se ha visto que la expresión de catenina- β esta disminuida en el 66% de los adenomas y en el 100% de los CT. Esta disminución en la expresión se correlaciona con el aumento de la agresividad y la progresión del tumor hacia estadios de indiferenciación. La presencia de mutaciones de éstas moléculas ocurre en el 61% de las neoplasias malignas del tiroides⁸¹ (Tabla 1).

Son especialmente interesantes los hallazgos de los cambios que acontecen con respecto a la Galectina 3. Es bien conocido que el tirocito normal no expresa las moléculas de adhesión CD44v6 ni Galectina 3. Sin embargo, éstas moléculas se hallan invariablemente presentes en las proliferaciones tiroideas. Parece por tanto que la expresión de Galectina 3 es un rasgo que orienta con bastante especificidad hacia la malignidad de la lesión^{82,83}, si bien algunos autores también han constatado su expresión en focos inflamatorios del tejido tiroideo normal⁸⁴. La Galectina-3 juega un papel importante en la adhesión intercelular y en la interacción de la matriz celular. La expresión de esta proteína en las células neoplásicas es citoplasmática. Aún cuando puede detectarse su expresión en algunos adenomas, la intensidad es diferente, ya que se ha visto que su expresión está aumentada en los CF y aún con mayor intensidad en los CP. Además, en los CP, presenta una relación directa entre el número de metástasis y su nivel de expresión, si bien ésta es menor en los ganglios metastáticos que en los tumores primarios⁸⁵.

La falta de expresión de CD44v6 esta asociada a una peor evolución del CT, especialmente en el CP. Además se ha correlacionado la falta de expresión de CD44 con varios factores de mal pronóstico como una edad mayor de 60 años, presencia de metástasis a distancia y TMN avanzado, así como la recurrencia del tumor y la mortalidad relacionada con el cáncer⁸⁶. No obstante, existe controversia al respecto ya que otros autores relacionan la expresión de CD44 con el peor pronóstico de los tumores de tiroides⁸⁷.

Factores angiogénicos y factores de crecimiento

Los tirocitos del CT producen el factor angiogénico VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). Parece que la realización de tinciones inmunohistoquímicas del tejido tiroideo para detectar la presencia VEGF puede ser un buen marcador pronósti-

co de la capacidad de invasión y metástasis de los carcinomas diferenciados. El aumento de la expresión se asocia con patrones más agresivos de la enfermedad⁸⁸. Algunos autores, incluso, han correlacionado la expresión de VEGF con la indiferenciación del tumor^{89,90}, si bien otros autores⁹¹ no han encontrado un aumento de la expresión de VEGF en ganglios y metástasis pulmonares comparados con el tumor primario. Probablemente este marcador puede llegar a predecir los tumores papilares que presentan mayor tendencia a evolucionar desfavorablemente por tener aumentado el riesgo de desarrollar metástasis (Tabla 1).

Otro factor de crecimiento, EGF (*Epidermal growth factor*), además de promocionar la proliferación celular en el tiroides, también actúa inhibiendo funciones tiroideas específicas como el transporte de yodo y su organificación, así como la síntesis de peroxidasa y tiroglobulina. Es decir, promueve la proliferación de la célula tiroidea, pero no su diferenciación. Por ello al EGF se le atribuye un papel en el crecimiento tumoral. Normalmente interacciona con receptores de la membrana celular y posteriormente se internaliza el complejo ligando-receptor, para presentar una segunda acción en el núcleo. Es conocido que TGF α (*Tumor growth factor α*) también interacciona con el receptor de EGF (EGF-R), lo que contribuye al estímulo de la acción proliferativa. La expresión en el núcleo de EGF y EGF-R es un rasgo que se observa tanto en el adenoma como en el CF. Dicha expresión también se ha detectado en tejido tiroideo de pacientes afectados de Enfermedad de Graves. Sorprendentemente se aprecia una disminución de la expresión de EGF en el núcleo de las células de los CP, aunque que se halla presente en el citoplasma⁹².

La pérdida de heterocigosidad

Existe cierta relación con la frecuencia de la pérdida de heterocigosidad y el pronóstico del carcinoma del tiroides. Así, se ha visto que es más frecuente en el CF que en el CP⁹³ y ambos se ven superados por el CI ya que se encuentra una pérdida de heterocigosidad en 19p hasta en el 36% de los casos^{12,41}. En el CI también se ha observado que con frecuencia existen pérdidas localizadas en el brazo corto del cromosoma 16, lo que indicaría la probable ausencia de un gen supresor en esta localización⁹⁴. Esta observación se ve avalada por el hecho de que se ha visto que líneas celulares de CI presentan frecuentemente pérdidas de 16p con respecto a líneas celulares de carcinoma diferenciado, lo que sugiere existencia de algún gen en esta localización que puede asociarse a la transformación desde carcinoma bien diferenciado a indiferenciado⁹⁵.

Conclusión

Los métodos actuales de diagnóstico de las neoplasias de tiroides han avanzado notablemente en los últimos años, si bien en la actualidad no pueden predecir, en muchos casos, la evolución clínica precisa, ni indicar la terapéutica más adecuada para cada neoplasia o se muestran incapaces de revelar la habilidad del tumor para desarrollar metástasis locales o a distancia. El estudio citológico tampoco puede discriminar con un consistente grado de certeza entre la benignidad o malignidad de algunas neoplasias.

Cabe esperar que la aplicación clínica de los avances en biología molecular proporcionen, en un futuro no muy lejano, conocimientos y herramientas que permitan dar un salto cualitativo en el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias de tiroides y con ello superar las limitaciones actuales, tanto en el ámbito del diagnóstico como del tratamiento.

Existe todavía un largo trecho por recorrer, sabiendo que todo nuevo avance responde a una pregunta, pero formula otras muchas nuevas. No obstante, se vislumbran modernas tecnologías que ofrecen nuevas perspectivas en el manejo clásico de las neoplasias de tiroides lo que supondrá, indudablemente, un notable beneficio para el manejo clínico de los pacientes afectados por esta enfermedad.

Bibliografía

- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.
- Learoyd DL, Messina M, Zedenius J, Robinson BG. Molecular genetics of thyroid tumors and surgical decision-making. *World J Surg* 2000;24:923-33.
- He YD, Friend SH. Microarrays-the 21st century divining rod? *Nature Med* 2001;6:658-9.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.
- Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-48.
- Khan J, Wei JS, Ringner M, Saal LH, et al. Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;6:73-9.
- Chen KT, Lin JD, Chao TC, et al. Identifying differentially expressed genes associated with metastasis of follicular thyroid cancer by cDNA expression array. *Thyroid* 2001;11:41-46.
- Fagin JA. Molecular genetics of thyroid follicular cells. En: Braverman LE, Utiger RD, eds. *The thyroid*. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2000;886-898.
- Gimm O. Thyroid cancer. *Cancer Lett* 2001;163:143-56.
- Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol* 1999;50:529-35.
- Ros P, Rossi D, Acebrón A, Santisteban P. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie* 1999;81:389-96.
- Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Ito K, Emi M. Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: frequent allelic losses on 1q, 9p, 11, 17, 19p, and 22q. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; 27:244-51.
- Santoro M, Thomas GA, Vecchio G, et al. Gene rearrangement and Chernobyl related thyroid cancers. *Br J Cancer* 2000; 82:315-22.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, PAX8-PPARGgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2000;289:1474.
- Dobosz T, Lukieniczuk T, Sasiadek M, Kuczynska A, Jankowska E. Microsatellite instability in thyroid papillary carcinoma and multinodular hyperplasia. *N Clin Oncology* 2000;58:305-10.

16. Shahedian B, Shi Y, Zou M, Farid NR. Thyroid carcinoma is characterized by genomic instability: evidence from *p53* mutations. *Mol Genet Metab* 2001;72:155-63.
17. Zou M, Shi Y, Farid NR, al-Sedairy ST, Paterson MC. FHIT gene abnormalities in both benign and malignant thyroid tumours. *Eur J Cancer* 1999;35:467-72.
18. Moretti F, Nanni S, Pontecorvi A. Molecular pathogenesis of thyroid nodules and cancer. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14:517-39.
19. Yeh JJ, Marsh DJ, Zedenius J, et al. Fine-structure deletion mapping of 10q22-24 identifies regions of loss of heterozygosity and suggests that sporadic follicular thyroid adenomas and follicular thyroid carcinomas develop along distinct neoplastic pathways. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;26:322-8.
20. Luisi S, Florio P, Reis FM, Petraglia F. Expression and secretion of activin A: a possible physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 2001;145:225-236.
21. Schulte KM, Jonas C, Krebs R, Roher HD. Activin A and activin receptors in thyroid cancer. *Thyroid* 2001;11:3-14.
22. Matoba H, Sugano S, Yamaguchi N, Miyachi Y. Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma. *Horm Metab Res* 1998;30:624-8.
23. Yeh JJ, Lunetta KL, van Orsouw NJ, et al. Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene* 2000;19:2060-6.
24. Mitsiades N, Poulaki V, Mastorakos G, et al. Fas ligand expression in thyroid carcinomas: a potential mechanism of immune evasion. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2924-32.
25. Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, et al. Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1104-9.
26. Köhrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: The deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol* 1999;151:103-19.
27. Farid NR, Shi Y, Zou M. Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 1994;15:202-32.
28. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* 2000;19:3948-54.
29. Fenton C, Anderson J, Lukes Y, Dinuer CA, Tuttle RM, Francis GL. Ras mutations are uncommon in sporadic thyroid cancer in children and young adults. *J Endocrinol Invest* 1999;22:781-9.
30. Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* 2000;10:19-23.
31. Bieche I, Franc B, Vidaud D, Vidaud M, Lidereau R. Analyses of MYC, ERBB2, and CCND1 genes in benign and malignant thyroid follicular cell tumors by real-time polymerase chain reaction. *Thyroid* 2001;11:147-52.
32. Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Cytoplasmic staining of erbB-2 but not mRNA levels correlates with differentiation in human thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol* 1998;49:629-37.
33. Ramirez R, Hsu D, Patel A, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol* 2000;53:635-44.
34. Trovato M, Frassetto F, Villari D, et al. Loss of heterozygosity of the long arm of chromosome 7 in follicular and anaplastic thyroid cancer, but not in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3235-40.
35. Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Cariani CT, Mondellini P, Calderone C. Cytogenetic and molecular genetic characterization of papillary thyroid carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:212-8.
36. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992;7:237-42.
37. Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M. The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Mol Cell Biol* 1995;15:6118-27.
38. Jhiang SM. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 2000;20:19:5590-7.
39. Sugg SL, Ezzat S, Zheng L, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Oncogene profile of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 1999;125:46-52.
40. Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Melillo RM, Donghi R, Bongarzone I. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 1990;60:557-63.
41. Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Borrello MG, Blutti MG, Pilotti S. A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;9:244-50.
42. Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M. Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 1994;9:509-16.
43. Fugazzola L, Pierotti MA, Viganò E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I. Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Oncogene* 1996;13:1093-7.
44. Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. Detection of a novel type of RET rearrangement (PTC5) in thyroid carcinomas after Chernobyl and analysis of the involved RET-fused gene RFG5. *Cancer Res* 1998;58:198-203.
45. Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 1999;18:4388-93.
46. Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer AM, Bauchinger M. Translocation t(10;14) (q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 2000;60:2786-9.
47. Elisei R, Romei C, Vorontsova T, et al. RET/PTC rearrangements in thyroid nodules: studies in irradiated and not irradiated, malignant and benign thyroid lesions in children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3211-6.

48. Pacini F, Elisei R, Romei C, Pinchera A. RET proto-oncogene mutations in thyroid carcinomas: clinical relevance *J Endocrinol Invest* 2000;23:328-38.
49. Basolo F, Molinaro E, Agate L, *et al.* RET protein expression has no prognosis impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol* 2001;145:599-604.
50. Kjellman P, Learoyd DL, Messina M, *et al.* Expression of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinoma and its correlation with clinical outcome. *J Br J Surg* 2001;88:557-63.
51. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1170-5.
52. Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S, Nagamura H, Shinohara T, Koyama K. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene* 2000;19:438-43.
53. Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demidchik EP. Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer* 1999;80:32-8.
54. Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S. Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25:97-103.
55. Corvi R, Berger N, Balczon R, Romeo G. RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 2000;19:4236-42.
56. Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, Mernyei M, Mori M, Oyama T. Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1993;17:375-81.
57. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Della Porta G, Pierotti MA. Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 1993;91:1753-60.
58. Filie AC, Chiesa A, Bryant BR, Merino MJ, Sobel ME, Abati A. The Tall cell variant of papillary carcinoma of the thyroid: cytologic features and loss of heterozygosity of metastatic and/or recurrent neoplasms and primary neoplasms. *Cancer* 1999;87:238-42.
59. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993;91:179-84.
60. Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi Y, Dohi K. Genetic alterations in thyroid tumor progression: association with p53 gene mutations. *Jpn. J Cancer Res* 1993;84:526-31.
61. Takeuchi Y, Daa T, Kashima K, Yokoyama S, Nakayama I, Noguchi S. Mutations of p53 in thyroid carcinoma with an insular component. *Thyroid* 1999;9:377-81.
62. Pisarchik AV, Ermak G, Kartel NA, Figge J. Molecular alterations involving p53 codons 167 and 183 in papillary thyroid carcinomas from Chernobyl-contaminated regions of Belarus. *Thyroid* 2000;10:25-30.
63. Sera N, Ashizawa K, Ando T, *et al.* Anaplastic changes associated with p53 gene mutation in differentiated thyroid carcinoma after insufficient radioactive iodine (131I) therapy. *Thyroid* 2000;10:975-9.
64. Martelli ML, Miano MG, Battaglia C, Trapasso F, Stella A, Iuliano R. The highly malignant phenotype of anaplastic thyroid carcinoma cell lines is recessive. *Eur J Endocrinol* 2000;143:515-21.
65. Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* 2000;156:1693-700.
66. Bruni P, Boccia A, Baldassarre G, *et al.* PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN-growth suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. *Oncogene* 2000;19:3146-55.
67. Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J, Vassart G. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 1993;365:649-51.
68. Porcellini A, Ciullo I, Laviola L, Amabile G, Fenzi G, Avvedimento VE. Novel mutations of thyrotropin receptor gene in thyroid hyperfunctioning adenomas. Rapid identification by fine needle aspiration biopsy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:657-61.
69. Michiels FM, Caillou B, Talbot M, *et al.* Oncogenic potential of guanine nucleotide stimulatory factor alpha subunit in thyroid glands of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10488-92.
70. Matsuo K, Friedman E, Gejman PV, Fagin JA. The thyrotropin receptor (TSH-R) is not an oncogene for thyroid tumors: structural studies of the TSH-R and the alpha-subunit of Gs in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1446-51.
71. Cetani F, Tonacchera M, Pinchera A, *et al.* Genetic analysis of the TSH receptor gene in differentiated human thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* 1999;22:273-8.
72. Mircescu H, Parma J, Huot C, *et al.* Hyperfunctioning malignant thyroid nodule in an 11-year-old girl: pathologic and molecular studies. *J Pediatr* 2000;137:585-7.
73. Camacho P, Gordon D, Chiefari E, *et al.* A Phe 486 thyrotropin receptor mutation in an autonomously functioning follicular carcinoma that was causing hyperthyroidism. *Thyroid* 2000;10:1009-12.
74. Corvillain B, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. Somatic and germline mutations of the TSH receptor and thyroid diseases. *Clin Endocrinol* 2001;55:143-58.
75. Bassi V, Vitale M, Feliciello A, De Riu S, Rossi G, Fenzi G. Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1129-35.
76. Pötter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev* 1999;20:207-239.
77. Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, *et al.* E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 1993;53:4987-93.
78. Von Wasielewski R, Rhein A, Werner M, *et al.* Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997;57:2501-7.
79. Böhm J, Niskanen L, Kiraly K, *et al.* Expression and prognostic value of α , β , and γ Catenins in differentiated thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4806-11.
80. Garcia-Rostan G, Camp RL, Herrero A, Carcangiu ML, Rimm DL, Tallini G. beta-Catenin dysregulation in thyroid neoplasms:

- down-regulation, aberrant nuclear expression, and ctnnb1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol* 2001;158:987-96.
81. Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59:1811-5
82. Gasbarri A, Martegani MP, Del Prete F, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol* 1999;17:3494-502.
83. Saggiorato E, Cappia S, de Giuli P, *et al.* Galectin-3 as a presurgical immunocytodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86: 5152-8.
84. Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, *et al.* Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997;181:80-6.
85. Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, *et al.* Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol* 2000;31:428-33.
86. Böhm JP, Niskanen LK, Pirinen RT, *et al.* Reduced CD44 standard expression is associated with tumour recurrence and unfavourable outcome in differentiated thyroid carcinoma. *J Pathol* 2000;192:321-7.
87. Takano T, Sumizaki H, Amino N. Detection of CD44 variants in fine needle aspiration biopsies of thyroid tumor by RT-PCR. *J Exp Clin Cancer Res* 1997;16:267-71.
88. Klein M, Vignaud JM, Hennequin V, *et al.* Increased expression of the vascular endothelial growth factor is a pejorative prognosis marker in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:656-8.
89. Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, *et al.* Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 1995;11:1569-79.
90. Katoh R, Miyagi E, Kawaio A, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid neoplasms. *Hum Pathol* 1999;30:891-7.
91. Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3741-7.
92. Marti U, Ruchti C, Kampf J, *et al.* Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid* 2001;11:137-45.
93. Gillespie JW, Nasir A, Kaiser HE Loss of heterozygosity in papillary and follicular thyroid carcinoma: a mini review. *In Vivo* 2000;14:139-40.
94. Kadota M, Tamaki Y, Sakita I, *et al.* Identification of a 7-cM region of frequent allelic loss on chromosome band 16p13.3 that is specifically associated with anaplastic thyroid carcinoma. *Oncol Rep* 2000;7:529-533.
95. Komoike Y, Tamaki Y, Sakita I, *et al.* Comparative genomic hybridization defines frequent loss on 16p in human anaplastic thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 1999;14:1157-62.