



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA
NORMAL Y PATOLÓGICA

**ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER
DE TIROIDES EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

María Inés Carmona López

Sevilla, 2010



**Citología e Histología Normal
y Patológica**

**Don MANUEL DE MIGUEL RODRÍGUEZ, Prof. Contratado Doctor,
Don HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD,
ADSCRITOS AL DPTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y
PATOLÓGICA y Don HUGO GALERA RUÍZ, Prof. ASOCIADO, ADSCRITO
AL DPTO DE CIRUGÍA, DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

CERTIFICAN: Que bajo su dirección y en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, se ha realizado el trabajo titulado: **“ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER DE TIROIDES EXPERIMENTAL”** presentado por Doña M^a INÉS CARMONA LÓPEZ para obtener el Grado de Doctor en Biología.

Sevilla, 13 de septiembre de 2010

A mis padres y hermanos.

A Juan.

Quiero agradecer a todas las personas que de algún modo participaron en este proyecto, no solo en su realización sino también en el apoyo que me ofrecieron durante el proceso del mismo.

Al profesor D. Hugo Galera Davidson por guiarme, confiar en mi y permitirme participar en este proyecto que para él es tan importante.

Al profesor D. Hugo Galera Ruiz por su apoyo personal.

Al profesor Manolo de Miguel por dirigir este trabajo con paciencia, animarme en los duros momentos y tenerme siempre presente como compañera y amiga.

A todos mis compañeros del Dpto. Citología e Histología Normal y Patológica: José M^a Fernández, Pepe Utrilla, Inés Martín, Ana Moreno, Carmen Garnacho, Amparo Pascual, Ana Fernández, Manolo Castrillo, Rosa Martos, Jesús, Eduardo, Flora, Rocio, José Antonio, Loli, Auxi y Ana Mayoral por toda la ayuda recibida durante este periodo. Y en especial a Mario, M^a José y Rosa por su amistad y por compartir conmigo nuevas inquietudes científicas y participar en un gran proyecto.

A la profesora M^a Teresa Vargas por sus consejos y apoyo, a Inma, Amparo, Virtudes, Tere, María Sánchez y Sara del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen Macarena, por compartir conmigo mis preocupaciones e inquietudes.

Al personal del Dpto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular.

A Juan Fernández, Delia y Marisol por su constante ayuda, apoyo, cariño y sabios consejos.

A mi abuelo Luis, porque sé que me estás viendo desde donde estés y porque nos sigues dando con tu ejemplo todo el amor, cariño y fuerza para seguir adelante. A la tía Pepa, por estar siempre ahí, a mi lado, y escucharme cuando te necesito. A José M^a Barcojo, por sus palabras que tan presentes están siempre en mi vida, las seguiré siempre.

A mis padres, Santiago y Ana, a los que les debo mucho más que esto, a los que adoro con todo mi corazón. Este trabajo es vuestro; sin el esfuerzo, la honestidad y el amor que nos dedicaís, nada de lo que hemos conseguido hubiese sido posible.

A mis hermanos, Ana y Santiago, por creer en mi y apoyarme en cada momento de mi vida.

A Juan, la persona que comparte conmigo su vida, porque sin su ayuda y paciencia nada tendría sentido y como siempre decimos los dos somos uno.

Finalmente, a todos los que no he nombrado y que han sido importantes para mi, a ellos también les doy las gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

I. INTRODUCCIÓN

1. Reseña anátomo-funcional de la glándula tiroidea.....	Págs. 7-12
2. Tumores tiroideos en humanos.....	Págs. 12-54
2.1. Adenoma folicular.....	Págs. 24-26
2.2. Carcinoma papilar.....	Págs. 26-34
2.3. Carcinoma folicular.....	Págs. 34-38
2.4. Tumores de células de oxifílicas (Hürthle).....	Págs. 38-41
2.5. Carcinomas pobremente diferenciado.....	Págs. 41,42
2.6. Carcinoma indiferenciado o anaplásico.....	Págs. 42-45
2.7. Carcinoma medular.....	Págs. 45-50
2.8. Otros carcinomas.....	Pág. 50
2.9. Tumores no epiteliales.....	Pág. 51
2.10. Linfomas malignos.....	Págs. 51,52
2.11. Sarcomas.....	Pág. 53
2.12. Tumores secundarios.....	Págs. 53,54
3. Clasificación histológica de los tumores tiroideos en rata.....	Págs. 54-82
3.1. Tumores benignos.....	Págs. 57-69
3.1.1. Adenoma folicular.....	Págs. 57-61

3.1.2. Adenoma papilar.....	Págs. 61-64
3.1.3. Adenoma sólido.....	Págs. 64-67
3.1.4. Cistadenoma de células escamosas (epidermoide).....	Págs. 68,69
3.2. Tumores malignos.....	Págs. 69-82
3.2.1. Carcinoma folicular.....	Págs. 70-74
3.2.2. Carcinoma papilar.....	Págs. 74,75
3.2.3. Carcinoma sólido.....	Págs. 75-80
3.2.4. Carcinoma escamoso (epidermoide).....	Págs. 81,82
3.2.5. Tumores mixtos (carcinosarcoma).....	Pág. 82
3.2.6. Sarcoma.....	Pág. 82
4. El cáncer y sus cambios.....	Págs. 82-97
4.1. Iniciación.....	Págs. 84-86
4.2. Promoción.....	Págs. 86-89
4.3. Progresión.....	Págs. 89-95
4.4. Comportamiento del cáncer de tiroides.....	Págs. 95-97
5. Biología molecular del cáncer de tiroides.....	Págs. 98-137
5.1. Oncogenes y transmisión de la señal por receptores de tirosina quinasa (RTK).....	Págs. 98-111
5.2. Oncogenes derivados de receptores tirosina quinasa..	Págs. 111-114
5.3. El oncogén <i>ret</i>	Págs. 114-121
5.4. El papel intrínseco del oncogén RAS en PTC y FTC....	Págs. 121-123
5.5. El oncogén BRAF como el evento genético más común y específico en PTC esporádico.....	Págs. 123-126
5.6. El papel emergente de la ruta fosfatidilinositol 3 quinasa	

(PI3K)/Akt en FTC.....	Págs. 126-132
5.7. Los reordenamientos PAX8/PPAR γ	Págs. 132,133
5.8. El mecanismo p53 en la progresión del cáncer.....	Pág. 133
5.9. Una perspectiva integrada de patogénesis del cáncer de tiroides hacia una clasificación molecular.....	Págs. 134-137
6. Animales de experimentación en patología tiroidea.....	Págs. 138-146
II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....	Págs. 147-150
III. MATERIAL MÉTODOS	
1. Carcinogénesis experimental (método del perclorato potásico).....	Págs. 151-152
2. Estudio histológico.....	Págs. 152-154
3. Métodos de valoración.....	Págs. 155,156
4. Biología molecular.....	Págs. 156-167
4.1. Extracción de ADN en material parafinado.....	Págs. 156,157
4.2. Estracción de ADN en material fresco (NBT).....	Pág. 158
4.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	Págs. 159,160
4.4. Estudio de reordenamientos RET/PTC.....	Págs. 160-167
4.3.1. Southern blot.....	Págs. 160-163
4.3.2. Construcción y análisis de genotecas parciales de regiones flanqueantes del dominio TK.....	Págs. 163-167

IV. RESULTADOS

1. Carcinogénesis experimental.....Págs. 169-180
2. PCRs y secuenciaciones de los genes estudiados.....Págs. 181-190
 - A. *B-raf*.....Págs. 181-184
 - B. *N-ras*.....Págs. 184,185
 - C. *PI3KCA*.....Págs. 186-188
 - D. Reordenamientos *ret*/PTC.....Págs. 189,190

V. DISCUSIÓN.....Págs. 191-204

VI. CONCLUSIONES.....Págs. 205-206

VII. BIBLIOGRAFIA.....Págs. 207-244

ABREVIATURAS

ATC: Anaplastic Thyroid Cancer

DIT: Diyodotirosina

EGF: Epidermical Growth Factor

FA: Follicular Adenoma

FGF: Fibroblast Growth Factor

FNA: Fine Needle Aspiration

GAP: GTPasa Activating Proteins

GDP: Guanosin Diphosphato

GNRFs: Guanine Nucleotide Release Factors

GTPasa: Guanosine TriPhosphatase

GTP: Guanosin TriPhosphato.

I¹³¹: Isótopo radiactivo 131 del yodo.

Kb: Kilobases

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MIT: Monoyodotirosina

NF1: Neorofibromin 1 (regulador negativo del gen *ras*)

NIS (NI symporter): Cotransportador de membrana sodio/potasio.

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDC: Poorly Differentiated carcinoma

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

Tg: Tiroglobulina

PKC: Protein Kinase C

PTC: Papillary Thyroid Cancer

PTCfv: PTC follicular variant

RBD: RAS binding domain

RTK: Receptor Tyrosin Kinase

TK: Tyrosin Kinasa

TNM: Classification of Malignant Tumours

TPA: éster de triforbol

TSH: Hormona tirotrópica o tirotrópina

T₄: Tiroxina

T₃: Triyodotironina

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Reseña anátomo-funcional de la glándula tiroidea.

La tiroides es una glándula endocrina de origen ectodérmico que se desarrolla precozmente en la porción cefálica del tubo digestivo. Su función consiste en sintetizar las hormonas tiroxina (T4) y triiodotironina (T3), que controlan la tasa metabólica del organismo. Se hallan en la región cervical, anterior a la laringe, y está constituida por dos lóbulos unidos por un istmo.

Esta glándula está integrada por miles de folículos tiroideos, que son pequeñas esferas que miden en el hombre de 0,2 a 0,9 mm de diámetro. Los folículos están formados por epitelio simple y su cavidad contiene una sustancia gelatinosa llamada coloide. Las células de los folículos varían de aplanadas a columnares y los folículos muestran diámetros muy variables. El aspecto de los folículos tiroideos varía en función de la región de la glándula y de su actividad funcional. En una misma glándula hallamos folículos grandes, llenos de coloide y formados por epitelio cúbico o pavimentoso, al lado de folículos más pequeños con epitelio columnar. A pesar de esta variabilidad, cuando la altura media del epitelio es baja la glándula se considera hipoactiva. En cambio, cuando hay mucha hormona tirotrópica circulante aumenta muy notablemente la altura del epitelio folicular y la glándula está hiperactiva. Esta

alteración se acompaña de un descenso de la cantidad de coloide y del diámetro de los folículos. La glándula está recubierta por una cápsula de tejido conjuntivo laxo de la que salen tabiques hacia el parénquima, los cuales se hacen gradualmente más delgados hasta llegar a los folículos, que están separados entre sí principalmente por las fibras reticulares. La glándula tiroidea es un órgano sumamente vascularizado por una extensa red de capilares sanguíneos y de vasos linfáticos que rodea a los folículos. Las células endoteliales de estos vasos capilares están fenestradas, como es frecuente también en otras glándulas endocrinas. Esta configuración facilita el transporte de sustancias entre las células endocrinas y la sangre.

Las células epiteliales de los folículos tiroideos se sustentan sobre una lámina basal y muestran todas las características de las células que simultáneamente sintetizan, secretan, absorben y digieren proteínas. Su porción basal es rica en retículo endoplasmático rugoso y contiene una cantidad moderada de mitocondrias. El núcleo es generalmente esférico y se sitúa en el centro de la célula. En la porción supranuclear hay una zona de Golgi y gránulos de secreción cuyo contenido es similar al coloide folicular. En esta región existen también lisosomas y algunas vacuolas generalmente grandes de contenido claro. La membrana plasmática de la región apical de las células contiene un número moderado de microvilli.

Otro tipo de célula, la célula parafolicular o célula C, se encuentra en el tiroides, formando pequeñas agrupaciones aisladas entre los folículos tiroideos. Poseen una pequeña cantidad de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias

alargadas y un complejo de Golgi grande. La característica más notable de estas células es la presencia de numerosos gránulos que miden 100-180nm de diámetro. Estos gránulos contienen una hormona llamada calcitonina, sintetizada por estas células y cuyo efecto principal es disminuir la concentración plasmática de calcio por medio de una inhibición de la reabsorción ósea. La secreción de calcitonina se activa al aumentar la concentración plasmática de calcio (Junqueira y Carneiro, 2005).

La glándula tiroides es la única glándula endocrina que acumula su producto de secreción en una cantidad considerable. Esta acumulación se efectúa en el coloide y se calcula que en el hombre existe dentro de los folículos una cantidad suficiente de hormona para inhibir el organismo aproximadamente tres meses. El coloide tiroideo está constituido principalmente por una glicoproteína de alto peso molecular (600 kDa), denominada tiroglobulina. La tiroglobulina es PAS-positiva debido a su elevado contenido en hidratos de carbono.

El principal mecanismo regulador del estado estructural y funcional de la glándula tiroidea es la hormona tirotrópica (TSH o tirotropina) secretada por la *pars distalis* de la hipófisis.

La membrana basal de las células de la porción basal de las células foliculares es rica en receptores para la tirotropina. La TSH estimula todas las fases de la producción de hormonas de la tiroides, las cuales, a su vez, inhiben la síntesis de TSH, creando un equilibrio que mantiene el organismo con

cantidades adecuadas de tiroxina y triyodotironina. La secreción de tirotropina aumenta con la exposición al frío y disminuye con el calor y en respuesta al estrés.

La síntesis y la acumulación de hormonas tiroideas se llevan a cabo en cuatro fases: síntesis de tiroglobulina, captación de yodo de la sangre, activación del yodo y yodación de los residuos de tirosina de la tiroglobulina.

1. La síntesis de tiroglobulina es similar a lo que acontece en otras células que exportan proteínas. Tiene lugar en el retículo endoplásmico rugoso, se añade un carbohidrato a la proteína en el interior de las cisternas del retículo y en el complejo de Golgi y el producto final, la tiroglobulina, se libera de las vesículas presentes en la porción apical de la célula hacia la luz del folículo.

2. La captación de yodo circulante se realiza en las células foliculares por medio de una proteína situada en la membrana basolateral de las células foliculares que transporta simultáneamente dos iones (es un cotransportador o *symporter*). Esta proteína, que transporta a la vez sodio y yodo, se denomina cotransportador de Na/I (NI *symporter* o NIS). El yodo circulante desempeña un papel relevante en la regulación de la función tiroidea, ya que valores bajos de yodo incrementan la cantidad de NIS, lo que aumenta así su captación y compensa la concentración más baja en el plasma.

3. La oxidación del yodo se lleva a cabo enzimáticamente por la peroxidasa de la tiroides e inmediatamente se transporta a la cavidad del folículo por un transportador de aniones llamado pendrina.

4. En el interior del coloide se produce la yodación de los radicales del tirosil de la tiroglobulina, catalizada por la peroxidasa tiroidea. De este modo se forman la T3 y la T4, aunque éstas no están aisladas, ya que forman parte de una molécula mayor, la tiroglobulina, a la que están unidas.

Cuando las células foliculares de la tiroides son estimuladas por la tirotrópica captan coloide a través de un proceso de endocitosis. Posteriormente, las enzimas lisosómicas digieren el coloide, las proteasas rompen las uniones entre los radicales yodados y la molécula de tiroglobulina y se liberan al citoplasma T4, T3, diyodotirosina (DIT) y monoyodotirosina (MIT). La T4 y T3 atraviesan libremente la membrana basolateral de la célula y difunden hasta llegar a los capilares sanguíneos. MIT y DIT no se secretan a la sangre porque su yodo se extrae enzimáticamente en el citoplasma y los productos de esta reacción enzimática –yodo y tirosina- son empleados nuevamente por las células foliculares. La T4 es más abundante, y constituye aproximadamente el 90% de la hormona circulante de la tiroides. Por su parte, la T3 tiene una acción más rápida y es más potente.

La tiroxina tiene un efecto gradual en el organismo, estimulando la fosforilación en las mitocondrias. Este efecto depende de la síntesis de ARNm. T3 y T4 aumentan el número de mitocondrias y de sus crestas. Producen

también una mayor síntesis y una menor degradación de las proteínas mitocondriales. La mayoría de los efectos de las hormonas tiroideas son consecuencia de su acción sobre la tasa metabólica basal. Aumentan la absorción de carbohidratos en el intestino y regulan el metabolismo de los lípidos. También influyen en el crecimiento corporal y en el desarrollo del sistema nervioso durante el periodo de vida fetal.

2. Tumores tiroideos en humanos.

La patología tumoral tiroidea es sumamente atractiva por ser un campo en el que la correlación clínicopatológica adquiere un gran valor y en el que se conjuga la fisiopatología endocrina, la patogénesis tumoral y la moderna biología molecular. Tradicionalmente las neoplasias se clasifican según una fórmula simplificada que facilita la exposición didáctica: primarios (epiteliales y no epiteliales) y secundarios (tabla 1, pág. 13). Entre las neoplasias primarias epiteliales, además de las lesiones benignas y malignas clásicas, existen lesiones mixtas y tumores de comportamiento biológico impredecible. Los tumores benignos epiteliales derivan del epitelio folicular y se denominan adenomas foliculares. Los tumores malignos epiteliales se clasifican en base a su histogénesis y grado de diferenciación. Los tumores no epiteliales son excepcionales. Los tumores secundarios son frecuentes hallazgos autópsicos en pacientes fallecidos por cáncer, pero tiene especial interés en patología quirúrgica porque a veces su morfología es totalmente superponible a la de

determinadas lesiones tiroideas primarias y, además, pueden manifestarse muchos años después de haber extirpado la lesión tumoral primaria.

A.- TUMORES PRIMARIOS

I.- EPITELIALES

- Benignos
 - Adenoma folicular
 - Paraganglioma
- Malignos
 - T. de células foliculares
 - Bien diferenciados
 - Carcinoma papilar
 - Carcinoma folicular
 - Carcinoma oxifílico
 - Pobrementemente diferenciados
 - Carcinoma insular
 - Indiferenciados
 - T. de células parafoliculares
 - Carcinoma medular
 - T. mixtos (medular-folicular)
 - Otros
 - Carcinoma mucoepidermoide
 - Carcinoma mucinoso
 - SETTLE
 - CASTLE

II.- NO EPITELIALES

- Benignos
 - Tumor fibroso solitario
- Malignos
 - Linfoma maligno
 - Angiosarcoma

B.- TUMORES SECUNDARIOS

Tabla 1. Clasificación de los tumores del tiroides.

El estudio anatomopatológico de las piezas quirúrgicas extirpadas como nódulos solitarios han revelados que aproximadamente el 50% de los casos corresponden a neoplasias y que sólo el 10- 20% son carcinomas. La incidencia de cáncer de tiroides en la población general es baja, oscilando entre 5-100 nuevos casos/año y por millón de habitantes, pero la mortalidad es aún relativamente más baja, ya que no sobrepasa los 9 casos/año, por millón de habitantes. Sin embargo, tanto la incidencia como la mortalidad por cáncer de tiroides, son las más altas en las glándulas endocrinas - exceptuando el

ovario si se considera como tal - e incluso más altas que las cifras totales del conjunto de las otras glándulas endocrinas. En relación con otras neoplasias, el cáncer de tiroides representa el 1.3% de todos los cánceres del organismo y el 0.4% de la mortalidad por cáncer.

Etiopatogenia

La idea de que el bocio endémico predispone a carcinoma de tiroides ha sido objeto de controversia durante muchos años. En los países donde se lleva a cabo la profilaxis del agua con yodo no se ha advertido una reducción sustancial en la incidencia de cáncer de tiroides; sin embargo, sí se ha apreciado un cambio cualitativo en su tipo histológico, ya que el carcinoma folicular, variedad predominante en las áreas de bocio endémico, va cediendo paso al carcinoma papilar. Este último es la forma más frecuente de cáncer de tiroides en las áreas normoyodadas y ricas en yodo.

En carcinogénesis experimental el mantenimiento prolongado de niveles altos de TSH mediante perclorato potásico, fármacos antitiroideos (tiouracilo o carbimazol) o radiaciones conduce al desarrollo progresivo de hiperplasia, adenomas y carcinomas. Esta secuencia que indica la progresión tumoral, no tiene su equivalente claramente identificado en patología humana si excluimos los excepcionales ejemplos de carcinomas foliculares descritos en pacientes con bocio dishormonogénico de larga evolución.

El efecto de las radiaciones ionizantes sobre el tiroides es un hecho bien conocido desde hace mucho tiempo. Se ha señalado que el 25 % de los niños sometidos a irradiación del cuello por procesos benignos presentaron, al cabo de los 20-25 años, neoplasias tiroideas, y que el 80% de los pacientes con carcinomas tiroideos han sido irradiados en la infancia. En el adulto, el tiroides parece ser más resistente, puesto que sólo el 6% de la población japonesa expuesta durante la explosión atómica desarrolló carcinoma de tiroides. El incremento de riesgo se relaciona con dosis altas de irradiación, edad temprana de exposición y sexo femenino. Las dosis terapéuticas de yodo radiactivo utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Graves causan atrofia folicular y aparición de células con núcleos atípicos, pero no inducen transformación neoplásica. En la literatura existen numerosas referencias sobre el desarrollo de hiperplasias y carcinomas papilares en niños después del desastre de Chernobil. Estos carcinomas papilares suelen ser de la variedad folicular y sólida y se asocian a una alta incidencia de metástasis linfáticas regionales, invasión venosa y extensión extraglandular.

Otros factores etiopatogénicos implicados en la génesis del cáncer de tiroides son: la raza, la herencia y las enfermedades predisponentes. En Hawai, donde existe una gran variedad de etnias, se ha observado que el carcinoma papilar es mucho más frecuente en la población de raza china. La herencia es un factor importante en el carcinoma medular, ya que se estima que el 20% de estos tumores son familiares. No obstante, esporádicamente se refieren también casos familiares de carcinoma folicular y carcinoma papilar (microcarcinomas multicéntricos); mientras que los primeros tienen la

morfología habitual y se describen en asociación al síndrome de Cowden, los segundos suelen mostrar un patrón cribiforme y se asocian a poliposis familiar del colon. Aunque se ha señalado que diversas enfermedades tiroideas tienen tendencia a asociarse con cáncer, ésta relación sólo se ha encontrado de modo significativo entre la tiroiditis de Hashimoto y el linfoma maligno tipo MALT.

Biología molecular

Existen datos suficientes para sugerir el origen genético del carcinoma de tiroides y para elaborar un esquema secuencial de acontecimientos, con participación progresiva de diversos oncogenes y genes supresores en la génesis y progresión de los carcinomas desarrollados a partir de células foliculares y de células parafoliculares (Figura 1, pág. 17). Es de destacar que, hasta la fecha, el carcinoma de tiroides es la única neoplasia epitelial del adulto en la que se han identificado reordenamientos cromosómicos específicos: *ret*/PTC, NTRK1/TPR y PAX8/PPAR α .

Adenomas y carcinomas foliculares.

En adenomas funcionantes se han descrito mutaciones activadoras en los genes que codifican el receptor TSH (TSHr) y en la subunidad alfa de la proteína G (G α). En adenomas no funcionantes y carcinomas también se ha referido ocasionalmente la mutación de G α pero no la del receptor. En los adenomas foliculares existe expresión normal de TSHr; en cambio, en

carcinomas existe un silenciamiento del gen por hipermetilación del promotor del gen.

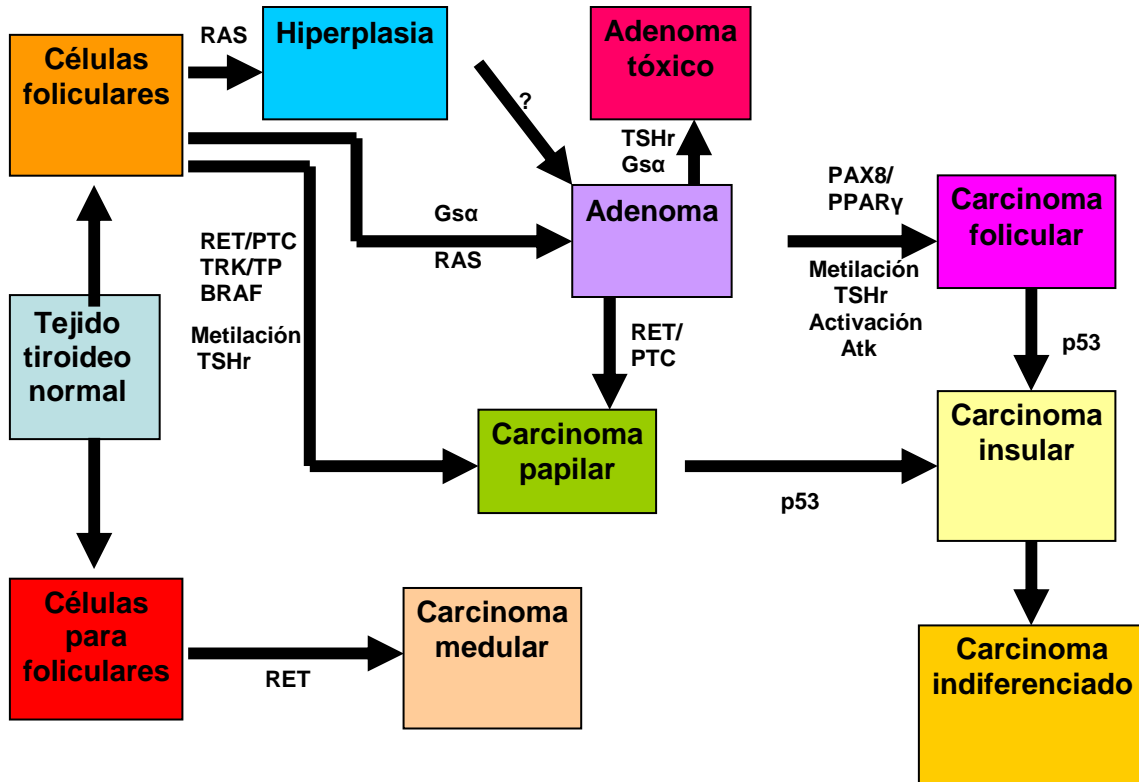


Figura 1. Oncogenes y genes supresores en el desarrollo de los tumores de células foliculares y para-foliculares del tiroides.

Esta observación puede tener interés diagnóstico, ya que la metilación del promotor se observa exclusivamente en carcinomas (59% carcinomas papilares, 47% carcinomas foliculares). Se han descrito mutaciones del oncogén *ras* en algunas hiperplasias, adenomas foliculares y carcinomas foliculares pero son raras en carcinomas papilares.

Recientemente se ha descrito una translocación cromosómica característica del carcinoma folicular, que no está presente ni en los adenomas foliculares ni en los carcinomas papilares, y que consiste en la fusión del gen

del factor de transcripción PAX8 y el gen PPAR γ ,t(2;3)(q13;p25),(PAX/PPAR γ). El impacto funcional de esta nueva proteína aún no está del todo aclarado, pero parece ser que causa efecto inhibitorio sobre la expresión normal del gen PPAR. Esto es interesante puesto que la proteína PPR normal induce diferenciación terminal y suprime el crecimiento en los preadipocitos, pero no hay datos que permitan sugerir que tiene este efecto sobre las células foliculares.

Debido a que en algunos pacientes con síndrome de Cowden (hamartomas múltiples) presentan también adenomas foliculares y carcinomas foliculares del tiroides, se ha investigado la expresión del gen PTEN en la línea somática de los tumores espontáneos. Aunque se han descrito pérdidas de heterocigosidad en el segmento 10q22-24 (lugar donde se localiza el gen PTEN) en el 25% de los carcinomas foliculares, las mutaciones en el gen PTEN son excepcionales; no obstante, estos estudios han permitido conocer que la vía que regula el PTEN presenta activación constitutiva de serina treonina quinasa Atk, lo que conduce a un bloqueo de la apoptosis y a un estímulo de la proliferación celular. Por tanto, como en la mayoría de los carcinomas foliculares no existen mutaciones en el gen PTEN se supone que la activación de la Atk, que desempeña un papel en la patogénesis o progresión de los carcinomas foliculares, puede conseguirse mediante otros mecanismos, aún no identificados.

Carcinomas papilares.

El oncogén *ret*/PTC hasta la fecha se considera como específico del carcinoma papilar. Representa un grupo de reordenamientos del gen *ret* con actividad continua tirosín quinasa y translocación al citoplasma de la proteína de fusión resultante. En las células foliculares normales no existe expresión de *ret*. Expresión aberrante, en forma de proteínas quiméricas, se observa exclusivamente en el carcinoma papilar. Hasta la fecha se han descrito 5 proteínas de fusión, cada una de las cuales es el resultado de la fusión de un gen celular con el dominio tirosínquinasa del *ret* (RET TK). La inversión paracéntrica del cromosoma 10 causa la yuxtaposición del gen *h4* (RET/PTC-1) o del *ele-1* (RET/PTC-3,-4) al dominio RET TK. El RET/PTC-2 es el resultado de la fusión del gen de la subunidad R_i de la proteína quinasa A dependiente de cAMP, situado en el cromosoma 17, con el dominio RET TK. El RET/PT- 5 ha sido descrito en dos pacientes con carcinoma de tiroides resultante del escape radiactivo de la central nuclear de Chernobil. Todos los miembros de la familia *ret*/PTC se considera que intervienen en los estadios iniciales del carcinoma papilar. El oncogén *ret*/PTC-1 es el más comúnmente expresado, seguido del RET/PTC-2 y RET/PTC-4. El RET/PTC-3 es particularmente frecuente en las variantes sólidas y de células altas de carcinoma papilar, y también entre los tumores inducidos mediante radiación, especialmente entre los niños afectados por el accidente de Chrenobil.

Se ha descrito la expresión de reordenamientos del *ret* en el 2.6-34% de los carcinomas papilares de los adultos y en casi la totalidad de los carcinomas

de los niños y en cánceres relacionados con exposición a radiaciones ionizantes. Diversos estudios han demostrado que el oncogén *ret*/PTC desempeña un papel crítico en la fase precoz del desarrollo del carcinoma papilar. En este sentido, la expresión de RET/PTC-1 es más común en las formas incipientes de carcinoma (microcarcinoma) que en las lesiones clínicamente evidentes; de igual modo, también se ha descrito expresión focal de RET/PTC-1 en nódulos hiperplásicos y adenomas con áreas focales de carcinoma papilar. Además, en pacientes con tiroiditis de Hashimoto existe expresión muy marcada (95% de los casos) de los oncogenes RET/PTC-1 y RET/PTC-3 sin evidencias morfológicas de carcinoma papilar. Estos hallazgos sugieren que en la tiroiditis de Hashimoto existe riesgo alto de carcinoma papilar o bien que en su seno coexisten tumores pero que debido a sus dimensiones reducidas permanecen ocultos por la tiroiditis. En resumen, parece ser que el reordenamiento *ret*/PTC es un acontecimiento importante y precoz en el desarrollo del carcinoma papilar pero su papel en la progresión tumoral está aún por definir.

Por último, es de destacar que reordenamientos del oncogén *ret* también se han descrito en el 45% de los adenomas de pacientes expuestos a radiaciones, en comparación con el 84% de carcinomas papilares inducidos por radiación, y en el 50% tumores de células de Hürthle, a pesar de la concepción ampliamente aceptada de que los tumores de células de Hürthle se parecen más a tumores foliculares que a carcinomas papilares. En pacientes con poliposis familiar múltiple, las mutaciones en el gen *fap* que se traducen en pérdida de función de la proteína APC, probablemente confieren susceptibilidad

para el desarrollo del carcinoma papilar. En estos pacientes frecuentemente se advierte el reordenamiento *ret*/PTC.

El descubrimiento de alteraciones en el dominio interno del RET responsables, al parecer, del inicio de las neoplasias, ha abierto nuevos campos en la investigación terapéutica. En este sentido, y al igual que en la leucemia mieloide crónica y en tumores estromales del tubo digestivo, estudios preliminares han señalado que el imatinib y drogas análogas, pueden inhibir el crecimiento celular al bloquear la fosforilización continua del dominio interno del receptor.

Recientemente se han descrito mutaciones en el gen *B-raf*, una isoforma del RAF (miembro de la señal de transducción iniciada en las tirosín quinasa: SHC-RAS-RAF-MEK), en el 35% de los carcinomas papilares y no en carcinomas foliculares. Este hallazgo es interesante porque no existe solapamiento con mutaciones en otros genes de la cascada de activación (*ret*/PTC o *ras*). Los tres genes aparecen afectados de modo independiente y exclusivo en el 66% de los carcinomas foliculares.

Como consecuencia de la activación del *ret*, *ras* y *B-raf* existe sobreexpresión de la proteína MET, bien por potenciación de la transcripción del gen *met* o bien por mecanismos postranslacionales. Esta observación ha dado pie a la posibilidad de que la desregulación de la proteína MET pudiera ser el punto de confluencia de diferentes vías moleculares capaces de inducir la transformación de las células foliculares, de tal modo que la sobreexpresión

citoplásmica pudiera constituir un marcador de diferenciación de carcinoma papilar. La sobreexpresión del *met* causa activación del gen del factor de crecimiento hepatocitario (*hgf*), que, a su vez, potencia la movilidad celular y la atracción de células dendríticas al foco lesional. Estos hallazgos están en consonancia con la observación clínica de metástasis ganglionares cervicales precoces y con las descripciones histológicas de frecuentes infiltrados inflamatorios acompañantes.

Mucho menos frecuentes que las alteraciones señaladas son las translocaciones intracromosómicas que interesan al gen *trk* (1q23-24). En condiciones normales, este gen codifica el receptor del factor de crecimiento neural. En el carcinoma papilar se ha descrito la translocación del *trk* con tres genes diferentes (*ntrk1/trp*, *ntrk1/tpm3*, *ntrk1/tag*), dando lugar a tres proteínas híbridas.

Carcinomas medulares

Se han descrito mutaciones puntuales del protooncogén *ret*, tanto en la forma familiar como esporádica, que interesan a los dominios internos (codones 13, 14, 16) y externos (codones 10 y 11) (figura 1, pág. 17). En los casos familiares (asociados o no a MEN) las mutaciones se encuentran presentes en la línea germinal, pueden identificarse en todas las células del organismo y, por tanto, detectarse en sangre periférica. En cambio, en los casos esporádicos las mutaciones son somáticas y sólo se detectan en el tumor. Estos hallazgos han permitido que el diagnóstico precoz familiar se

pueda realizar de forma más precisa, al identificar a los portadores con riesgo de padecer carcinoma medular de tiroides o feocromocitoma, antes de que se eleven los niveles séricos de calcitonina o catecolaminas, respectivamente.

Adicionalmente, se ha podido observar que la sobreexpresión del oncogén *N-myc* supone mayor agresividad en los carcinomas medulares.

Carcinomas poco diferenciados.

Las mutaciones puntiformes inactivadoras de la p53 son excepcionales en tumores diferenciados de células foliculares pero, en cambio, son muy frecuentes en los carcinomas pobremente diferenciados y carcinomas indiferenciados.

Pronóstico

El pronóstico del carcinoma de tiroides habitualmente se relaciona con el estadio de diseminación, tipo histológico, sexo, edad del paciente y patrón de ploidía nuclear.

Los carcinomas bien diferenciados tienen un comportamiento biológico indolente y un pronóstico excelente, con supervivencias a los 5 años superiores al 90% en los varones y del 94% en las mujeres. Los tumores indiferenciados se presentan en personas mayores y tienen un curso rápidamente progresivo; menos del 5% de los pacientes están vivos al cabo del año.

En general, los enfermos con curso clínico más favorable son aquellos menores de 40 años, con sexo femenino, carcinoma papilar bien diferenciado o carcinoma folicular mínimamente invasivo, localizados en la glándula y con patrón nuclear diploide.

2.1 Adenoma folicular

Tumor epitelial benigno encapsulado con diferenciación folicular. Generalmente se manifiesta como una lesión solitaria de crecimiento lento. En raras ocasiones se acompaña de síntomas compresivos o de hiperfunción.

Macroscópicamente, se encuentra delimitado por una cápsula completa y gruesa, tiene coloración amarillo-marrón y causa compresión del parénquima adyacente (Figura 2A, pág. 25). Con frecuencia presenta cambios degenerativos en la región central, tales como hemorragia, edema, fibrosis, calcificación, quistificación y, más raramente, osificación.

Histológicamente es una lesión hipercelular con escasas o ausentes figuras de mitosis cuya arquitectura y celularidad difieren considerablemente de la del parénquima circundante (figura 2 B, pág. 25). Puede presentar una gran variedad de patrones arquitecturales (macro o microfolicular, trabecular) y citológicos (célula de Hürthler, célula clara, etc), aislados o en asociación, que prácticamente carecen de significado clínico. Especial interés presentan las variedades de adenoma de células de Hürthle, adenoma tóxico, adenoma atípico y adenoma trabecular hialinizante. El adenoma de célula de Hürthle se tratará más adelante en la sección de tumores oncocíticos.

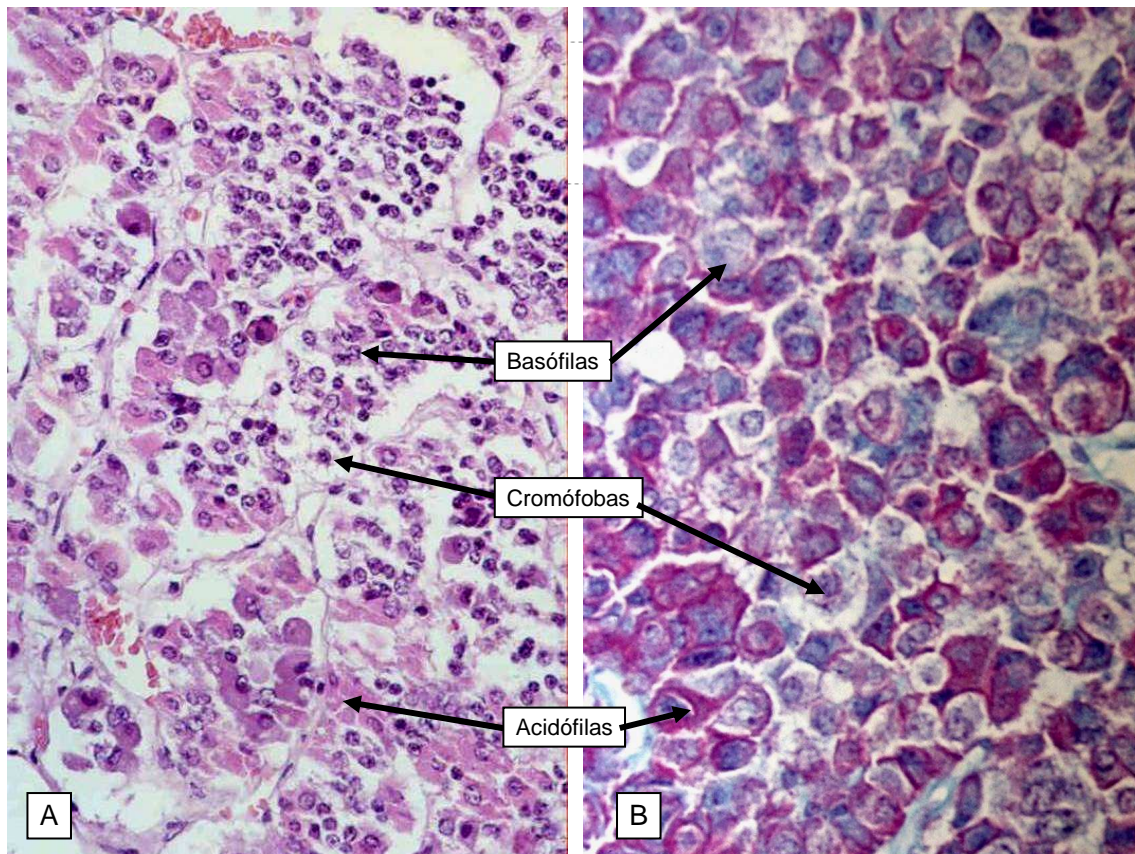


Figura 2. Adenoma folicular de tiroides. **A.** Lesión nodular única bien delimitada, de coloración amarillenta y hemorragia central que contrasta notablemente con el parénquima tiroideo adyacente. **B.-** Proliferación de células foliculares dispuestas en un patrón normofolicular delimitadas por una cápsula fibrosa densa.

El *adenoma tóxico* (enfermedad de Plummer) se presenta con un cuadro de hipertiroidismo sin exoftalmos e histológicamente muestra signos de hiperactividad con estructurasseudopapilares tapizadas por células foliculares altas y vacuolas de reabsorción; esta lesión no debe ser confundida con el carcinoma papilar.

El *adenoma atípico* es una lesión muy celular y con distribución arquitectural irregular que citológicamente recuerda a un carcinoma folicular pero que carece de los signos invasivos necesarios para el diagnóstico de carcinoma folicular.

El *adenoma trabecular hialinizante* es una lesión benigna peculiar que arquitecturalmente se asemeja a un carcinoma medular o un paraganglioma y citológicamente recuerda a un carcinoma papilar. Puesto que se han descrito casos de carcinomas con características citológicas y arquitecturales totalmente superponibles, casos híbridos con carcinoma papilar, y la translocación característica RET/PTC en algunos casos, algunos autores consideran que esta entidad podría representar una forma encapsulada y benigna de carcinoma papilar, pero esta consideración no tiene aceptación universal.

Durante muchos años se ha prestado especial atención a la diferenciación entre nódulo hiperplásico y adenoma y se ha hecho énfasis en el carácter único del adenoma y en el estado normal de su parénquima adyacente. En la actualidad, con la demostración de clonalidad en el 70% de los nódulos hiperplásicos, la definición de adenoma se ha ampliado, admitiéndose la posibilidad de lesiones múltiples y que el parénquima adyacente pueda ser normal, hiperplásico o inflamatorio. La encapsulación total y las características citológicas y arquitecturales del crecimiento tumoral (que son diferentes a las del tejido circundante), constituyen los hallazgos histológicos diferenciales principales.

2.2 Carcinoma papilar

Es un tumor epitelial maligno con diferenciación hacia células foliculares, que presenta estructuras papilares y/o foliculares y cambios nucleares

característicos. El hallazgo diagnóstico clave lo constituyen los cambios nucleares. Aunque puede diagnosticarse en cualquier edad, su incidencia es máxima durante la tercera y cuarta décadas de la vida. Representa la forma más común de carcinoma de tiroides (60-80%), tanto en adultos como en niños, y es tres veces más frecuente en la mujer que en el hombre.

Morfología

En general, son lesiones que oscilan entre menos de 1 a 5 cm de diámetro, de contorno irregular, consistencia firme y coloración blanquecina (Figura 3, pág. 28); en el 10% de los casos existe encapsulación total y en otro 10% se observa transformación quística. Los tumores con mayores dimensiones son más comunes entre las mujeres.

En el estudio histológico el carcinoma papilar puede presentar tres patrones de crecimiento bien definidos: 1.- Puro papilar, constituido por proyecciones ramificadas y mal orientadas, centradas por un eje conectivo vascular fino y revestidas por epitelio pseudoestratificado (figura 4A, pág. 29); 2.- Puro folicular, que puede ser microfolicular, macrofolicular o mixto; 3.- Mixto, combinando áreas papilares y foliculares. De acuerdo con la OMS, el diagnóstico histológico del carcinoma papilar descansa exclusivamente en el reconocimiento de los cambios nucleares característicos y no del patrón arquitectural de crecimiento o de la existencia de signos de invasión.

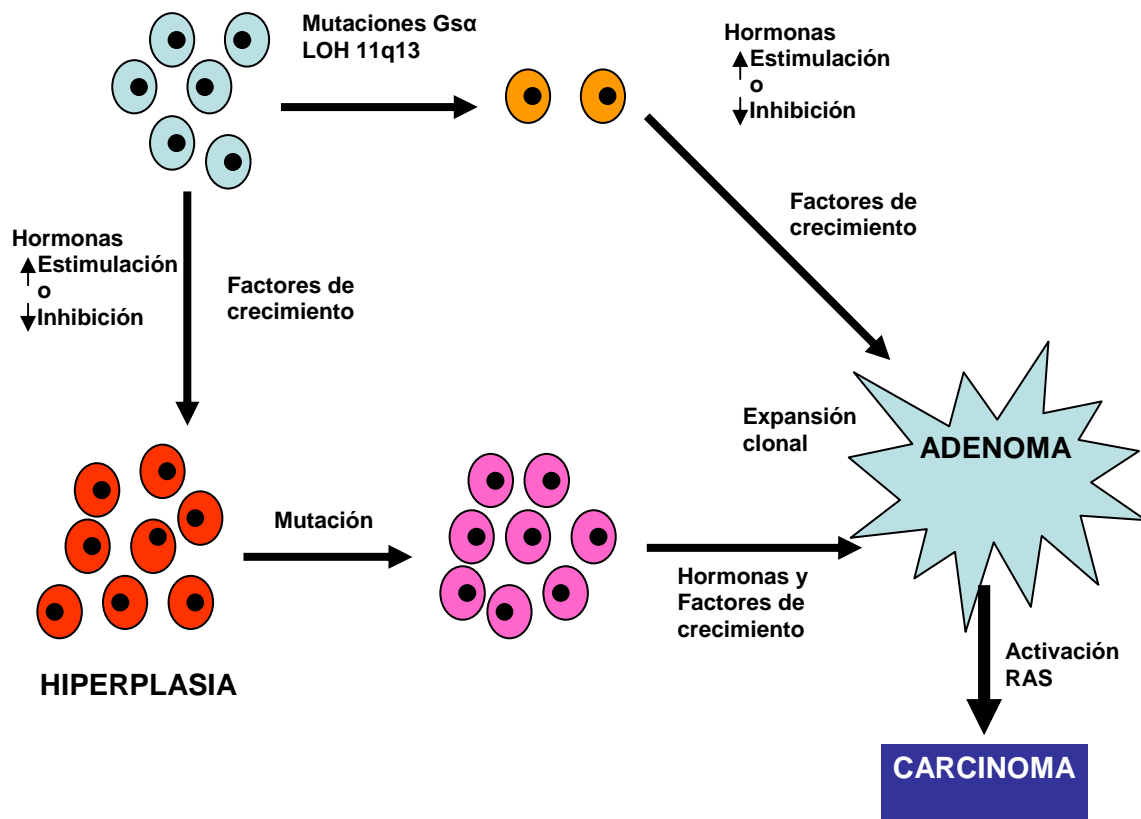


Figura 3. Forma clásica de carcinoma papilar. Lesión blanquecina y compacta con márgenes estrellados en el seno de uno de los lóbulos tiroideos.

Las células del carcinoma papilar son cilíndricas y contienen núcleos grandes, frecuentemente superpuestos, de contorno irregular y generalmente angulado, cromatina clara o de aspecto esmerilado, nucléolo poco evidente y membrana nuclear gruesa (figura 4B, pág. 29). Debido al aclaramiento de la cromatina en las regiones centrales y a la prominencia de la membrana han sido comparados con los ojos de la “huérfana Annie”. Los otros hallazgos nucleares característicos son las pseudoinclusiones nucleares y los pliegues o surcos longitudinales por plegadura de la membrana nuclear. Mientras que las pseudoinclusiones y los pliegues nucleares son cambios permanentes, el aclaramiento nuclear es un artefacto que se observa sólo en los cortes incluidos en parafina. Los hallazgos nucleares son muy importantes

para el diagnóstico pero en algunos tumores pueden estar presentes sólo en un número reducido de células.

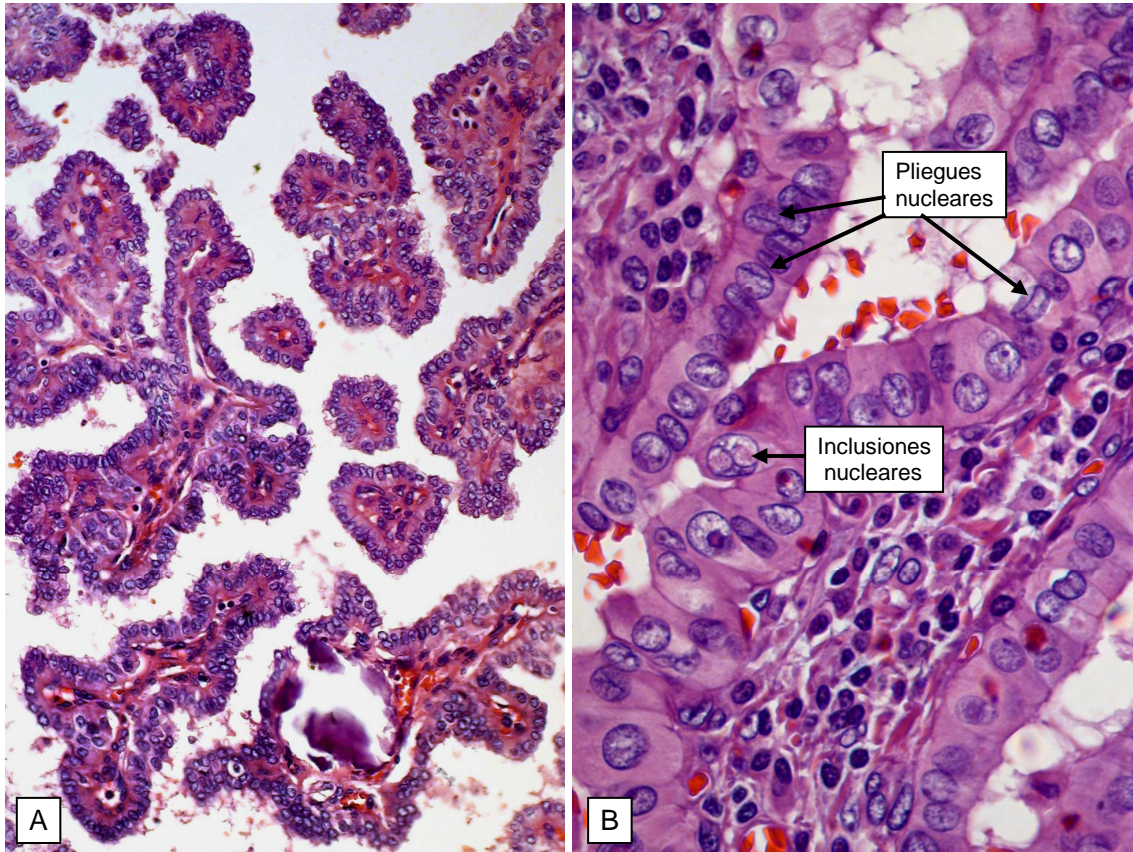


Figura 4. Carcinoma papilar. A. Proliferación epitelial con marcada tendencia a la formación de estructuras papilares centradas por un fino eje conectivo vascular. En el seno de una de ellas se advierten calcificaciones(cuerpos de psammoma)(flecha) B. Detalle de las características citológicas del carcinoma papilar. Los núcleos, frecuentemente superpuestos, presentan un contorno irregular, membrana gruesa y cromatina clara; con frecuencia muestran seudoinclusiones intranucleares (flecha) y pliegues longitudinales (flecha).

Otras características histológicas menos frecuentes son: cuerpos de psamoma, patrón de crecimiento trabecular o sólido, infiltración linfocitaria focal, metaplasia escamosa, reacción desmoplásica del estroma, diseminación linfática intraglandular y bajo índice de mitosis. Los cuerpos de psamoma son calcificaciones distróficas concéntricas dispuestas sobre papilas necrosadas,

se observan en aproximadamente en el 50% de los tumores y se consideran hallazgos casi patognomónicos (figura 4 A, pág.29).

El citoplasma de las células del carcinoma papilar habitualmente es anfófilo y muestra inmunotinción para muy diversos marcadores, entre los que destacan la tiroglobulina, vimentina y citoqueratina de alto y bajo peso molecular. La citoqueratina 19 (alto peso molecular) puede ser particularmente útil en el diagnóstico diferencial con hiperplasias papilares, adenomas foliculares y carcinomas foliculares, ya que habitualmente todas estas lesiones no la expresan; no obstante, hasta la fecha no se ha identificado un marcador exclusivo del carcinoma papilar, por lo que la morfología continúa siendo la mejor herramienta diagnóstica.

En la Tabla 2 se recogen las variedades histológicas de carcinoma papilar en relación con su comportamiento biológico.

Pronóstico habitual	Pronóstico favorable	Pronóstico adverso	Pronóstico controvertido
Forma clásica	Microcarcinoma	Células altas	Esclerosante difuso
Variante Folicular	Encapsulado	Células columnares	Sólido
Variante Cribiforme	Quístico	Trabecular	Oncocítico
Tipo Warthin		Variante folicular difuso	
Tipo estroma fascitis nodular			

Tabla 2. Variedades histológicas de carcinoma papilar en función de su pronóstico.

El *microcarcinoma* o carcinoma papilar oculto es una lesión ≤ 1 cm, que puede aparecer como una cicatriz estrellada (carcinoma esclerosante oculto) o como una lesión encapsulada. La incidencia de microcarcinoma varía considerablemente en función del método de estudio y de la distribución geográfica, siendo máxima en Finlandia y Japón y mínima en Estados Unidos y Colombia. El 15% de los casos se manifiestan con una adenopatía cervical metastásica, pero, en cambio, es excepcional la diseminación sistémica; esta forma de presentación es la que realmente corresponde al denominado carcinoma papilar oculto. Debido a que las metástasis linfáticas se asocian casi exclusivamente a tumores multicéntricos y bilaterales, algunos autores han señalado que la lobotomía puede ser tratamiento suficiente en los microcarcinomas sin metástasis linfáticas, por ser unifocales.

El *carcinoma papilar encapsulado* muy rara vez produce siembras sistémicas, pero debido a que no hay criterios morfológicos para diferenciar los tumores papilares que dan metástasis de los que no lo hacen, es aconsejable evitar el término adenoma papilar.

La *variante folicular (tumor de Lindsay)* es el subtipo más común de carcinoma papilar después de la forma clásica. Está compuesta totalmente o casi en su totalidad por folículos (grandes, pequeños o mixtos) tapizados por células con características nucleares de carcinoma papilar. Con frecuencia presentan encapsulación parcial o total. Debido a que los cambios nucleares propios del carcinoma papilar pueden ser hallazgos focales, estas lesiones han sido confundidas fácilmente con adenomas y nódulos hiperplásicos. Existe una

variante difusa, no encapsulada y de peor pronóstico, que interesa a la totalidad de la glándula, que frecuentemente se acompaña de metástasis linfáticas y hemáticas.

La *variante esclerosante difusa* es muy poco habitual, y se observa preferentemente en niños y adolescente. Afectan a uno o ambos lóbulos, de forma casi masiva, y presentan marcada esclerosis, numerosos cuerpos de psammoma, metaplasia escamosa e infiltración linfocitaria. Aunque en la mayoría de los pacientes existen metástasis linfáticas, e incluso en el 25% metástasis pulmonares, la mortalidad es totalmente superponible a la del carcinoma papilar con patrón clásico.

Las *variantes de células oxifílicas, de células altas y de células columnares* son formas tumorales excepcionales que generalmente se observan en personas mayores. La variante oxifílica, caracterizada por la presencia de núcleos característicos de carcinoma papilar en células con citoplasma muy rico en mitocondrias, no debe confundirse con los adenomas oxifílicos que frecuentemente presentan macropapilas y calcificación del coloide pero que carecen de los hallazgos nucleares característicos.

La *variante sólida*, descrita en los tumores inducidos por radiación en Chernobil, no está bien caracterizada ni es admitida por todos los autores.

Evolución clínica

Clínicamente puede manifestarse como nódulo tiroideo solitario (67%), nódulo tiroideo asociado a adenopatía cervical (13%) o simplemente como adenopatía cervical (20%). El carcinoma papilar se disemina directamente hacia los tejidos blandos del cuello, por vía linfática y, menos comúnmente, por vía hemática. La diseminación linfática intraglandular puede ser la causa de la presentación multicéntrica, pero no la única, ya que estudios de biología molecular han revelado distintos perfiles de RET/PTC en los diferentes focos tumores multicéntricos. Metástasis en ganglios linfáticos regionales se describen entre el 42-90% de los pacientes. La diseminación por vía hemática se advierte en el 7% de los casos y se lleva a cabo principalmente hacia pulmón, hueso y sistema nervioso central. Es de destacar que la presencia de invasión ganglionar regional no empeora el pronóstico.

El pronóstico del carcinoma papilar clásico depende de numerosos factores. Se consideran hallazgos adversos los siguientes: mayor de 3 cm, presencia de linfangitis carcinomatosa, patrón aneuploide, extensión extratiroidea y presencia de metástasis a distancia.

La supervivencia media para lesiones localizadas en la glándula (estadios I y II), a los cinco años, es del 98%, mientras que para las lesiones con extensión a los tejidos blandos o con metástasis ganglionares o sistémicas (estadio III y IV) se reduce al 70%.

Aunque existen controversias respecto al tratamiento del carcinoma papilar de tiroides, la modalidad más utilizada es la tiroidectomía total con extirpación de los ganglios linfáticos palpables seguida de ablación con yodo radiactivo.

2.3 Carcinoma folicular

Tumor maligno epitelial con diferenciación folicular que carece de los hallazgos nucleares diagnósticos del carcinoma papilar. Es más frecuente en mujeres, entre la 4ª- 6ª décadas de la vida y, en contraposición al carcinoma papilar, es excepcional durante la infancia. Representa el 5-15% del total de los carcinomas de tiroides en las áreas no bociogénicas y el 35-45% en las de bocio endémico. Las cifras más elevadas referidas en la literatura antigua probablemente están en relación con la inclusión de la variante folicular de carcinoma papilar dentro de esta categoría.

Morfología

Es muy variable, pudiendo observarse folículos bien constituidos con coloide, y patrones trabecular, sólido, cribiforme o insular. El citoplasma de las células foliculares presenta inmunoreactividad específica a anticuerpos contra la tiroglobulina y citoqueratina de bajo peso molecular, pero no contra la queratina del alto peso molecular (citoqueratina epidérmica, citoqueratina 19). Los criterios de malignidad en el carcinoma folicular descansan en el reconocimiento de invasión capsular y vascular. El patrón arquitectural

irregular, atipia citológica y actividad mitótica elevada, no son hallazgos absolutos de malignidad, ya que pueden encontrarse en lesiones benignas, como el adenoma atípico. En función de la extensión de la invasión se distinguen dos variedades anatomoclínicas con valor pronóstico:

El *carcinoma folicular mínimamente invasivo* es una lesión encapsulada semejante al adenoma, tanto en su presentación clínica como en su aspecto macro y microscópico, que se diferencia sólo en la presencia de invasión vascular o capsular.

Por invasión capsular se entiende la disrupción total de la cápsula con salida de células tumorales hacia el parénquima circundante no tumoral (Figura 5 A, pág. 36). La invasión de los vasos capsulares se reconoce por la presencia de trombos de células tumorales adheridos a la pared o bien masas de células tumorales tapizadas por endotelio (figura 5 B y C, pág. 36). A veces, para identificar estos signos de invasión es necesario estudiar múltiples secciones de la cápsula.

El *carcinoma folicular ampliamente invasivo* se caracteriza por mostrar marcada invasión vascular y de los tejidos tiroideos adyacentes. En general, son menos frecuentes que las formas mínimamente invasivas e inciden en personas de mayor edad. Casi siempre se manifiestan por un aumento de tamaño, en un periodo de tiempo relativamente corto, de un bocio de larga duración.

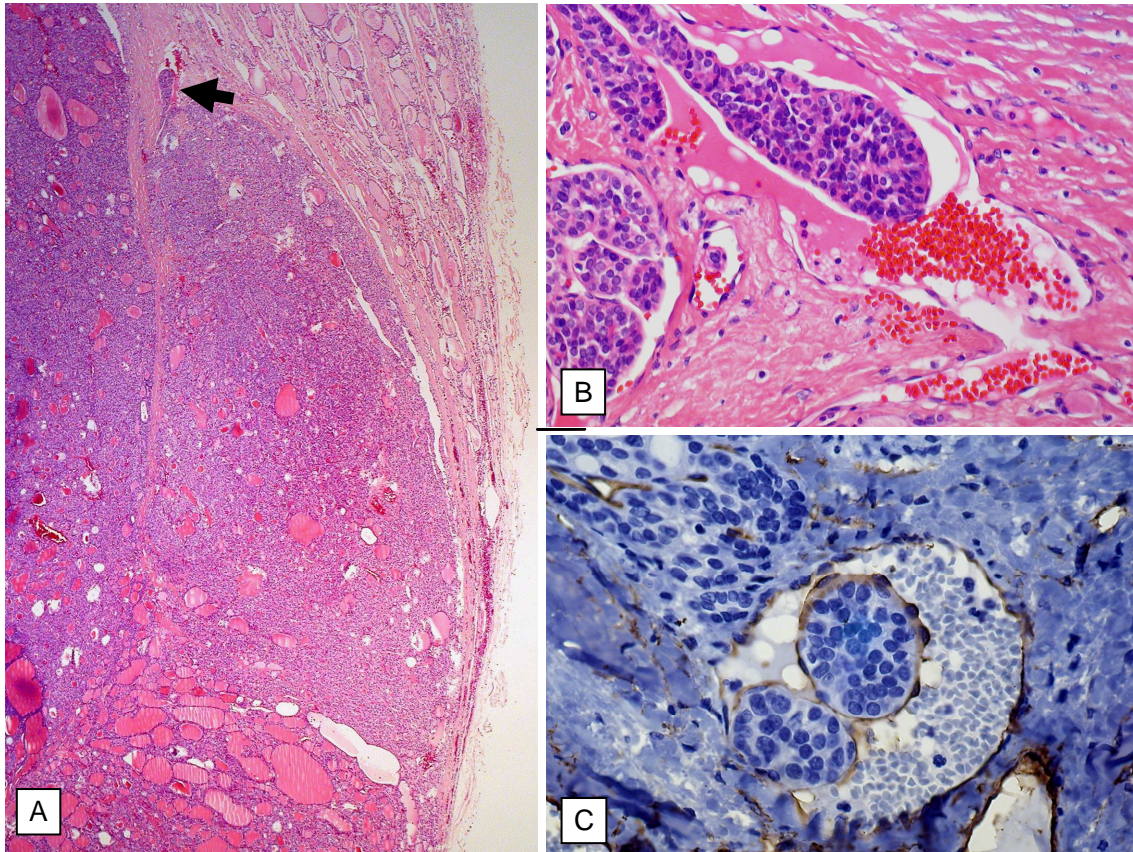


Figura 5. Carcinoma folicular mínimamente invasivo. A. Disrupción total de la cápsula con crecimiento tumoral externo en forma de hongo. Advértase en uno de los extremos la invasión vascular (flecha). B. Detalle de la imagen anterior donde se advierte una luz vascular ocluida por un crecimiento sólido de células foliculares. C. Tinción inmunohistoquímica para poner de relieve las células endoteliales de los vasos (antígeno CD 34). Se puede advertir que el trombo tumoral se encuentra endotelizado en el interior del espacio vascular.

Macroscópicamente, son lesiones grandes y mal delimitadas (Figura 6, pág. 37). Las figuras de mitosis suelen ser habituales y, a veces, se observan focos de necrosis.

Existen ciertas evidencias que sugieren que el carcinoma mínimamente invasivo es la lesión precursora, ya que se presenta por término medio 10 años antes que la forma ampliamente invasiva y se encuentran restos de encapsulación en más de 25% de los carcinomas ampliamente invasivos.



Figura 6. Carcinoma folicular ampliamente invasivo. Crecimiento multinodular masivo de aspecto carnososo.

En cualquiera de las dos formas anatomoclínicas ha sido habitual distinguir dos variedades citológicas bien definidas: oxifílica (células de Hürthle) y de células claras. Actualmente se prefiere incluir a los tumores de células de Hürthle como una categoría especial, de modo que sólo se considera como subtipo especial la variante de células claras, cuyo interés principal reside en su fácil confusión con otras lesiones no tiroideas de células claras, como tumores paratiroideos y metástasis de carcinomas renales de células claras.

Evolución clínica

La presentación característica del carcinoma folicular es la propia del nódulo frío solitario. El tumor crece lentamente y se disemina por vía hemática,

presentándose metástasis pulmonares y óseas (cintura escapular, cráneo, esternón y hueso ilíaco). En algunos casos, la metástasis a distancia puede constituir el primer signo de enfermedad. El carcinoma folicular carece de multifocalidad y no se disemina por vía linfática, siendo las metástasis ganglionares muy raras en la variante mínimamente invasiva. De ahí que algunos cirujanos recomienden sólo la lobectomía del lóbulo afecto.

Se estima que alrededor del 70% de los pacientes con carcinoma ampliamente invasivo presenta metástasis hematógena en el momento del diagnóstico. En cambio, en los carcinomas mínimamente invasivos, sólo están presentes en el 5% de los tumores con invasión vascular y en 1 % de los que sólo tienen invasión capsular. La supervivencia media al cabo de los 10 años en el carcinoma mínimamente invasivo es del 70%, mientras que para los ampliamente invasivos es del 25-40%. El seguimiento clínico de los pacientes con carcinoma folicular debe ser muy prolongado, pues es frecuente descubrir metástasis tardías, 20-25 años después de la tumorectomía.

2.4 Tumores de células de oxifílicas (Hürthle)

Los tumores de células de Hürthle son raros, pero constituyen un grupo interesante de neoplasias por sus características morfológicas, evolución clínica y respuesta al tratamiento. Los estudios recientes de biología molecular han revelado la existencia de alteraciones genéticas, diferentes a las encontradas en los adenomas y carcinomas foliculares habituales, que permiten sugerir que estamos ante entidades diferentes. En este sentido, se ha

señalado que la mayoría de los adenomas y carcinomas de células de Hürthle tienen reordenamientos RET/PTC y muestran inmunotinción al RET. Además también se ha descrito un mayor porcentaje de mutaciones en el oncogén *ras*, de alteraciones alélicas, y mayor expresión de TGF β 1, TGF β 2, IGF-1 y N-myc.

Morfología

Macroscópicamente son lesiones solitarias, encapsuladas, de color caoba (Figura 7, pág. 39). Cuando las lesiones son >4-5 cm deben buscarse con insistencia los signos histológicos de malignidad, ya que estadísticamente el tamaño se correlaciona con la agresividad. En las lesiones que previamente han sido puncionadas con aguja fina no infrecuentemente se advierte necrosis parcial o total del tumor.

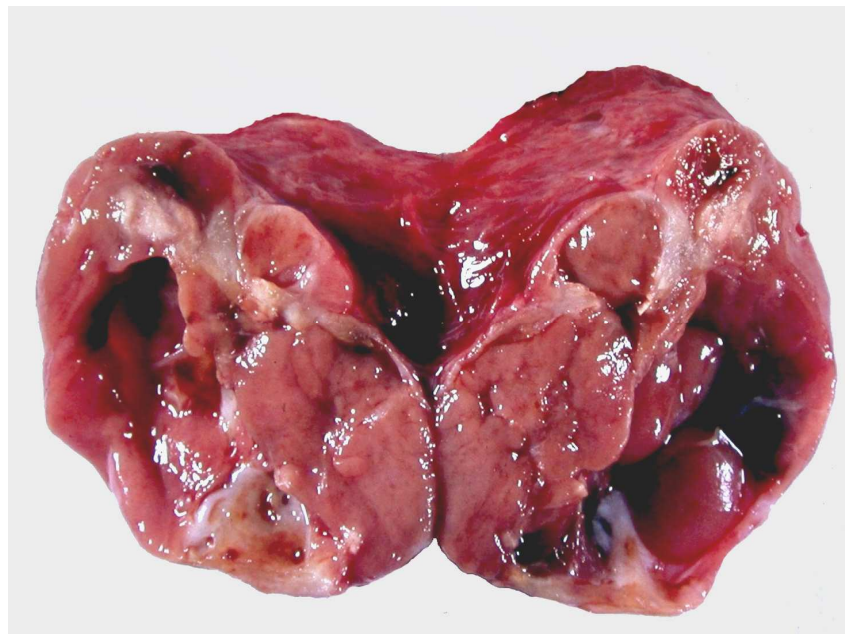


Figura 7. Adenoma de células de Hürthle. Lesión encapsulada de color marrón caoba con áreas centrales con degeneración quística. El paciente había sido sometido a punción aspiración varios meses atrás.

Histológicamente el diagnóstico de benignidad o malignidad descansa exclusivamente en los mismos criterios indicados para el adenoma folicular y el carcinoma folicular. La presencia de atipia nuclear, mitosis y necrosis no son signos de malignidad, al igual que sucede en los adenomas foliculares (Figura 8 A y B).

Con las técnicas de inmunohistoquímica, tanto los adenomas de células de Hürthle como los carcinomas presentan inmunorreactividad específica a la tiroglobulina, aunque con menor intensidad a la encontrada en las lesiones foliculares habituales, y al CEA, y negatividad a la citoqueratina 19.

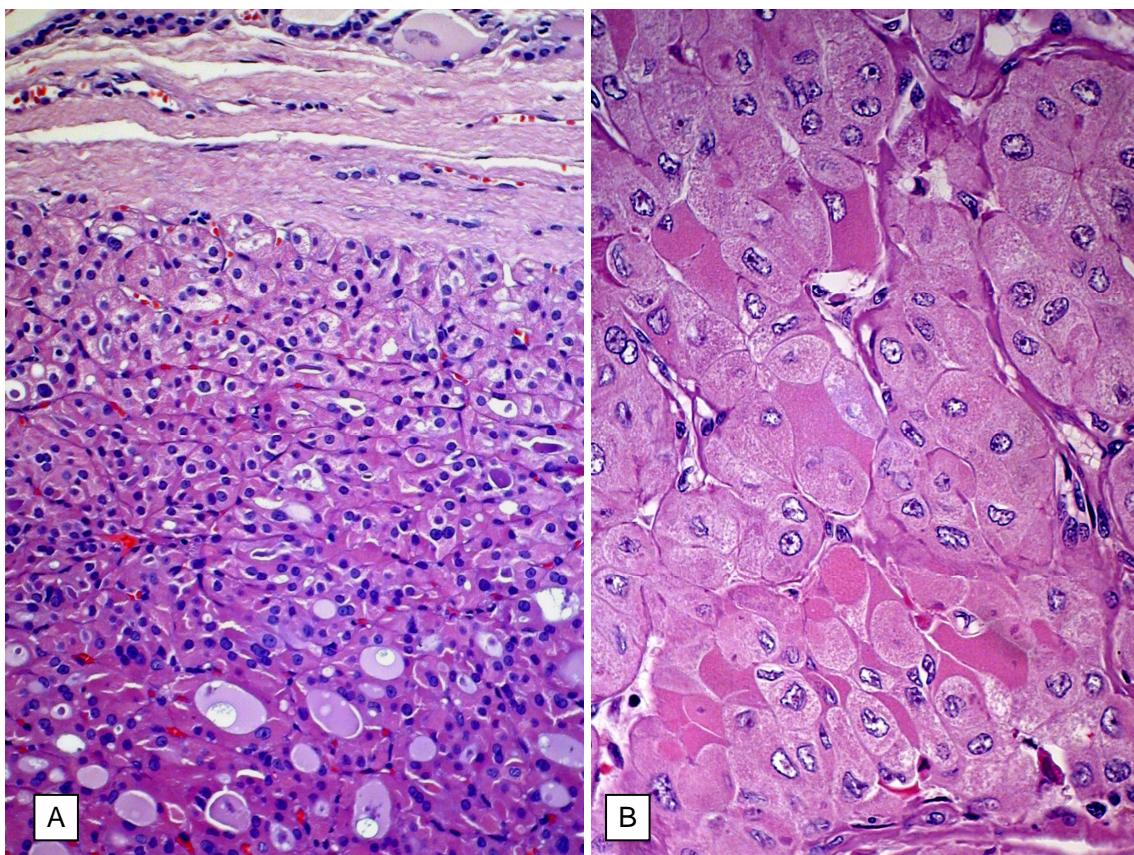


Figura 8. Adenoma de células de Hürthle. A. Lesión encapsulada con tendencia a la formación de estructuras foliculares tapizadas por células grandes eosinófilas y granulares. B. Detalle de las características citológicas donde se advierte los amplios citoplasmas granulares y los núcleos hiper cromáticos y bizarros.

Evolución clínica

Los carcinomas de células de Hürthle inciden preferentemente en el grupo poblacional de mayor edad y tienen menor afinidad por el sexo femenino. Un porcentaje importante (35%) de tumores de células de Hürthle tiene comportamiento agresivo. Esta cifra es superior a la encontrada en los tumores foliculares habituales, que es alrededor del 5%.

Las metástasis linfáticas regionales son más frecuentes que en el carcinoma folicular pero menos que en el carcinoma papilar y se ha apuntado que son más comunes en los pacientes con tumores que expresan RET/PTC. Debido a la dificultad que tienen las células de Hürthle para captar yodo radiactivo estos tumores presentan mayores dificultades terapéuticas.

2.5 Carcinoma pobremente diferenciado

Grupo de neoplasias foliculares malignas cuyo comportamiento biológico se encuentra entre el de los carcinomas diferenciados (carcinoma papilar y carcinoma folicular) y el carcinoma indiferenciado. En la literatura se ha utilizado este término de modo indiscriminado para señalar muy distintos patrones histológicos, muchas de ellos con características clínicopatológicas bien definidas (i.e. carcinoma de células altas, carcinoma de células columnares, etc) o bien carcinomas bien diferenciados que presentan áreas de dediferenciación con patrón sólido o trabecular, presencia de figuras de mitosis, muchas de ellas de morfología anómala, y áreas de necrosis. Cuando

la extensión de estas áreas es >10% el pronóstico es significativamente más adverso.

También se incluye dentro de esta categoría el denominado *carcinoma insular*. La incidencia de esta neoplasia varía mucho en función de la zona geográfica, mientras que en Italia representa el 5% de los carcinomas, en EEUU es muy ocasional. Generalmente se presenta en personas mayores con una relación mujer-hombre de 2:1. Macroscópicamente son lesiones grandes con frecuentes áreas de necrosis. En el estudio histológico, las células tumorales son pequeñas, redondas, con aspecto monomorfo, y se disponen en nidos separados por una marcada trama vascular. Las mitosis, los focos de necrosis con conservación de células entorno a los vasos formando islotes, y la invasión vascular son hallazgos característicos y casi constantes. Con cierta frecuencia se advierten áreas donde las células muestran las características nucleares propias del carcinoma papilar, indicando la posibilidad de una progresión tumoral. Las células expresan de modo difuso tiroglobulina, hecho que ayuda a la diferenciación con el carcinoma medular.

2.6 Carcinoma indiferenciado o anaplásico

El carcinoma indiferenciado o anaplásico es una de las neoplasias más agresiva del organismo y representa aproximadamente el 5-10% de todos los carcinomas de la glándula. Aunque se asocia con antecedentes de irradiación en el cuello, es mucho más frecuente en zonas de bocio endémico. Se observa preferentemente en adultos mayores de 50 años, siendo excepcional en

menores de 40 años. La enfermedad afecta preferentemente a mujeres en una proporción 4:1. Por lo general, se manifiesta con un nódulo de crecimiento rápido, desarrollado sobre un bocio previo de larga evolución, que se acompaña de disnea, disfagia y disfonía (Figura 9).



Figura 9. Carcinoma indiferenciado de tiroides. Nódulos firmes desarrollados en muy corto espacio de tiempo en el seno de una glándula con hiperplasia nodular. El paciente consultó por acompañarse la lesión de signos compresivos (disfagia y ronquera).

Morfología

Macroscópicamente es una lesión voluminosa, de aspecto hemorrágico y friable, que tiende a presentar adherencias firmes a los tejidos adyacentes. El cuadro histológico es el de una neoplasia de crecimiento rápido con abundante celularidad, marcadas atípicas nucleares, frecuentes figuras de mitosis, extensas áreas de necrosis y vasos con infiltración parietal y trombosis mural. Habitualmente se reconocen tres tipos básicos de células: fusiformes, gigantes y escamoides, que con frecuencia se encuentran combinadas (Figura 10, pág. 44). En el 20-30% de los casos el tumor presenta diferenciación epitelial evidente y recuerda al carcinoma de células grandes de pulmón; en el 70-80%

restante predomina el patrón sarcomatoide, que remeda a muy distintos tipos de sarcomas (fibrosarcoma, fibrohistiocitoma maligno pleomórfico, angiosarcoma, rabdomiosarcoma, etc). Los tumores con diferenciación heteróloga también han sido denominados carcinosarcomas, pero hoy se recomienda el abandono de ese término.

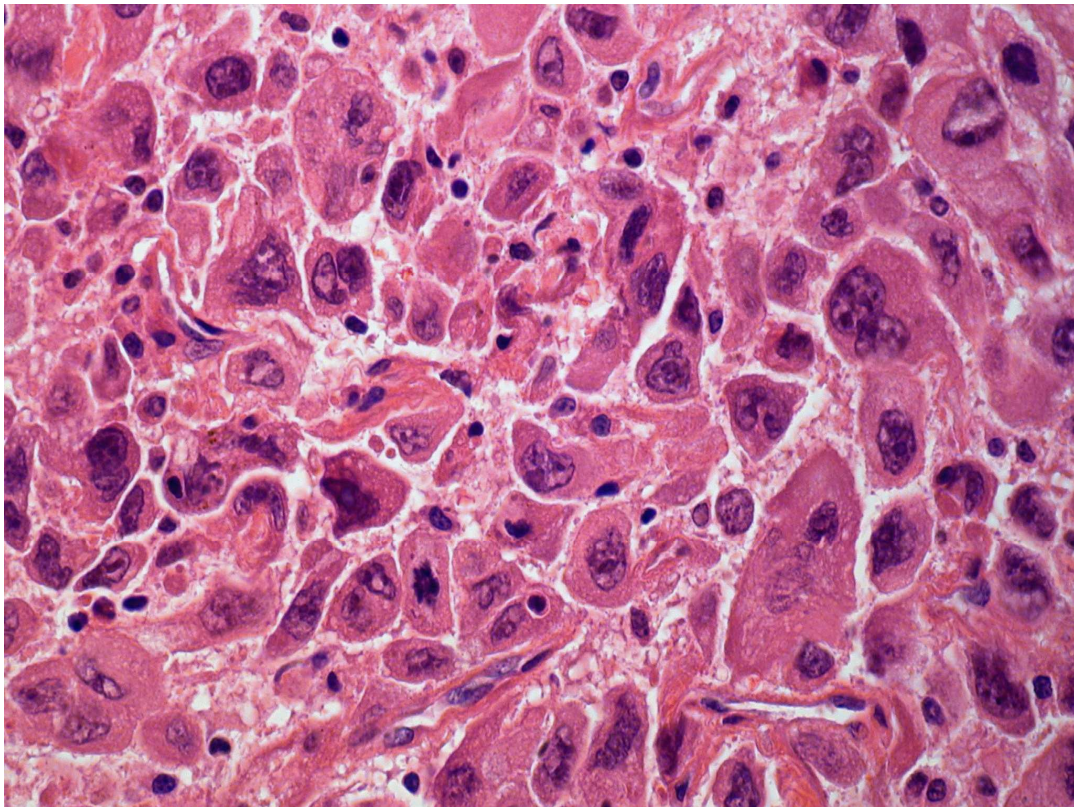


Figura 10. Carcinoma indiferenciado de tiroides. Proliferación de células gigantes y fusiformes con marcado pleomorfismo y atipias nucleares.

En ocasiones es posible encontrar áreas de carcinoma folicular o de carcinoma papilar en la periferia de la lesión, indicando una progresión tumoral de un tumor diferenciado. Se ha descrito también una forma paucicelular con amplias áreas de esclerosis y necrosis que alternan con otras hipercelulares y fusiformes. Esta variante puede simular una tiroiditis de Hashimoto o de Riedel.

Con las técnicas de inmunohistoquímica la expresión de citoqueratina confirma la naturaleza epitelial. Eventualmente, puede identificarse inmunotinción positiva a la tiroglobulina en algunas células aisladas.

Evolución clínica

El carcinoma indiferenciado es un tumor de crecimiento rápido que causa infiltración local de la tráquea, laringe, esófago y nervio recurrente, y produce siembras a distancia por vía hemática y linfática. Casi el 100% de los pacientes presentan metástasis en el momento del diagnóstico y suelen fallecer antes de los 6 meses de realizarse el diagnóstico. Los casos excepcionales con supervivencia más prolongada están en relación con lesiones pequeñas, por lo general en el seno de un carcinoma diferenciado, y sin extensión extratiroidea.

2.7 Carcinoma medular

Es un tumor epitelial maligno que muestra diferenciación propia de células parafoliculares. Característicamente segrega calcitonina pero también puede producir otros péptidos, aminas y derivados lipídicos (ACTH, -endorfina, prostaglandinas, bradiquinina, katalcalcina, bombesina, somatostatina, prolactina RH, serotonina, gonadotropina coriónica). Representa el 5-10% de todos los carcinomas primarios. En el 80-90% de los casos la lesión es solitaria, afectando preferentemente a adultos entre la quinta y sexta década de vida (edad media cincuenta años) y sobre todo a mujeres (proporción 1,5: 1). En el 10-20% restante la tumoración es multicéntrica, afecta por igual a ambos

sexos, se presenta en adultos más jóvenes y niños (edad media 20 años), y se transmite con herencia autosómica dominante; un número considerable de estos casos familiares se asocia a otras neoplasias o hiperplasias endocrinas, constituyendo los denominados síndromes de neoplasia endocrina múltiple (MEN IIA y MEN IIB).

La mayoría de los pacientes consultan por un nódulo solitario en el cuello (88%), gammagráficamente frío, que se acompaña en el 21% de los casos de adenopatía cervical satélite, de invasión de los tejidos blandos en el 47% y de metástasis sistémicas (pulmón, hueso o hígado) en el 12%. A veces, se presentan signos de hipersecreción hormonal, tales como diarrea intratable y síndrome de Cushing. En los casos con síndrome MEN II, el cuadro clínico se puede complementar con hipertensión arterial y litiasis renal, neuromas mucosos y un hábito fenotípico peculiar.

Morfología

Las lesiones solitarias y esporádicas aparecen como nódulos bien delimitados situados en los dos tercios superiores de los lóbulos laterales, de consistencia firme y coloración blancogrisácea o amarillenta. Las formas familiares suelen ser multicéntricas con nódulos de distintas dimensiones diseminados por toda la glándula.

Histológicamente no existen diferencias en el patrón arquitectural o tipo de celularidad entre las formas esporádicas y familiares. El tumor suele estar

constituido por cúmulos sólidos de células poligonales o fusiformes, con citoplasma granular anfófilo y núcleo redondo u oval con moderado pleomorfismo, y reducido índice de mitosis. Los cúmulos de células se hallan separados por septos conectivos hialinos con depósito de material amiloide (Figura 11, pág. 48). Las células tumorales presentan argirofilia e inmunorreactividad específica a los marcadores neuroendocrinos (cromogranina y sinaptofisina, principalmente), antígeno carcinoembrionario (CEA), calcitonina y a una gran variedad de péptidos y aminos. Sobre el cuadro morfológico básico se han descrito numerosos patrones arquitecturales y citológicos, que pueden inducir a la confusión con otros carcinomas tiroideos. Los tumores con inmunorreactividad negativa a la calcitonina se denominan *tumores neuroendocrinos pobremente diferenciados*.

En las formas familiares, además de los nódulos tumorales, se observan focos de células C hiperplásicas distribuidas de modo disperso o formando nódulos en las regiones centrales de los lóbulos laterales de la glándula. Estos grupos de células se consideran la lesión precursora del carcinoma y son los responsables de los valores séricos elevados de calcitonina y CEA en los familiares portadores asintomáticos. La hiperplasia de células C se define, de modo arbitrario, por la existencia de >50 células C /campo de pequeño aumento (10X) en secciones teñidas con el método inmunoperoxidásico con anticuerpos anticalcitonina. Este hallazgo, que es muy propio de las formas familiares de carcinoma medular, también puede encontrarse, de modo esporádico y sin las connotaciones de progresión tumoral, en niños y ancianos, en la vecindad de

tumores foliculares, en glándulas con tiroiditis de Hashimoto y en asociación a procesos extratiroideos (hiperparatiroidismo, hipergastrinemia).

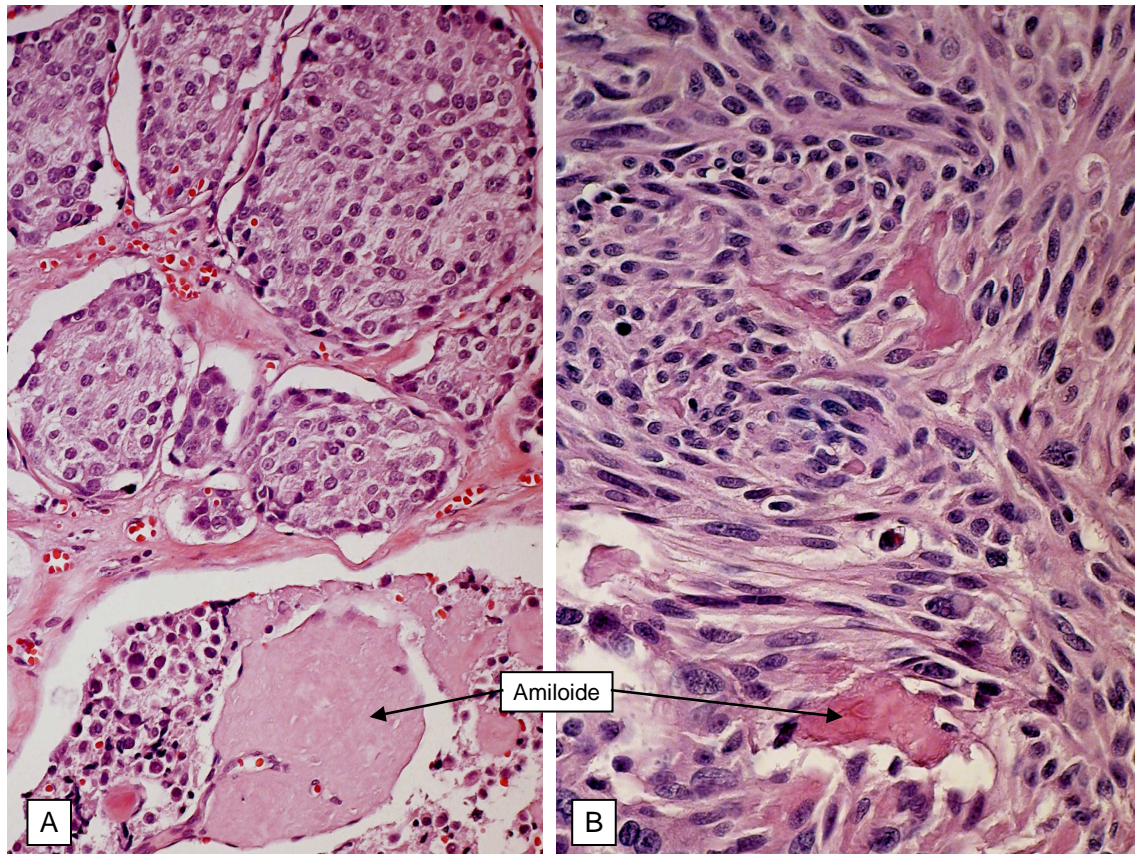


Figura 11. Carcinoma medular de tiroides. La celularidad del carcinoma medular varía notablemente de unos casos a otros e incluso dentro de la misma lesión de unos territorios a otros. En la imagen de la izquierda (A) las células son poligonales; en la de la derecha (B) son elongadas. En ambas se observan agregados amorfos de material eosinófilo correspondiente a amiloide (flecha).

También se ha descrito una variedad de carcinoma medular denominada *carcinoma mixto medular-folicular*, que se caracteriza por la coexistencia de hallazgos morfológicos e inmunohistoquímicos de ambas variedades tumorales íntimamente mezcladas. Las células tumorales expresan conjuntamente tiroglobulina y calcitonina. Estas lesiones son excepcionales y no deben considerarse como tales aquellos carcinomas medulares que presentan solamente inmunorreactividad focal para la tiroglobulina. Los

denominados *carcinomas compuestos* se diferencian de los carcinomas mixtos en que están constituidos por áreas bien definidas: morfológica e inmunohistoquímicamente, de carcinoma medular y carcinoma papilar.

Evolución clínica

El carcinoma medular infiltra localmente los tejidos blandos del cuello y se disemina por vía hemática y linfática. La forma esporádica puede diagnosticarse como un nódulo tiroideo palpable pero, a veces, se presenta con un cuadro clínico de disfagia, ronquera, tos u otros signos de invasión local; de manera más ocasional la sintomatología inicial es la de un síndrome paraneoplásico dependiente de su actividad secretora (por ejemplo, cuadro diarreico por secreción de VIP). Las metástasis linfáticas son frecuentes, advirtiéndose en más del 50% de los casos afectación de los ganglios cervicales y mediastínicos. Las recidivas locales se presentan en el 33% de los casos después del tratamiento. Las siembras hemáticas se producen posteriormente y asientan preferentemente en el pulmón, hueso, hígado y suprarrenales; no obstante, pueden encontrarse en el 8% de los casos en el momento del diagnóstico de la enfermedad.

En la actualidad las formas familiares suelen ser asintomáticas cuando se descubren por estudio sistemático de miembros de la familia de un paciente. Este estudio se sigue basando en demostrar niveles séricos elevados de calcitonina, basales o después de la administración de pentagastrina. No obstante, como ya se ha indicado, a propósito de la etiopatogenia de los

tumores del tiroides, la moderna biología molecular pone al servicio del diagnóstico, la posible detección, en células sanguíneas periféricas, de la mutación del protooncogén *ret* vinculada a la línea germinal.

La agresividad de los carcinomas medulares varía ampliamente, siendo la supervivencia media, a los diez años, del 40-60%. Los factores pronósticos que mejor se relacionan con la evolución son el estadio de diseminación, la edad, forma de presentación (esporádica versus familiar) y forma del diagnóstico (clínico o por diagnóstico precoz). La forma familiar no asociada a MEN y la asociada a MEN IIA suelen ser las menos agresivas, con una supervivencia del 90% a los 10 años. En el otro extremo, los tumores esporádicos son los más agresivos, con una supervivencia del 30-50% a los diez años; agresividad similar muestran los carcinomas medulares asociados a MEN IIB.

2.8 Otros carcinomas

Bajo este epígrafe se incluyen una serie de carcinomas muy poco frecuentes, presumiblemente de origen folicular, que pueden presentar diferenciación mixta escamosa y mucosecretora (carcinoma mucoepidermoide), mucosa (carcinoma mucoso) o escamosa (carcinoma epidermoide). Así mismo también se incluyen los excepcionales tumores relacionados con el timo y bolsas branquiales, tales como timoma intratiroideo, el tumor epitelial fusocelular con diferenciación tímica (SETTLE) y el carcinoma con diferenciación tímica o tipo linfoepitelioma (CASTLE).

2.9 Tumores no epiteliales

En el tiroides los tumores primarios no epiteliales son excepcionales, entre las lesiones benignas se cita al tumor fibroso solitario y el paraganglioma y entre las malignas los linfomas malignos y el hemangioendotelioma maligno como los más frecuentes. De todos ellos, por su interés clínico y epidemiológico merecen un comentario especial las formas malignas.

2.10 Linfoma maligno

La afectación linfomatosa del tiroides puede ser consecuencia de un crecimiento primario o secundario. El linfoma tiroideo primario representa el 13,5% de los tumores primarios malignos del tiroides. Ocurre sobre todo en mujeres mayores de 50 años y en más del 25 % de los diagnosticados existe una tiroiditis de Hashimoto asociada. Clínicamente se manifiesta por una masa en el cuello de crecimiento rápido que se acompaña de disfonía y adenopatías cervicales.

Macroscópicamente son lesiones nodulares blanquecinas de consistencia elástica (Figura 12 A, pág. 52). El parénquima tiroideo se halla infiltrado por un crecimiento en sábana de células linfoides que tiende a invadir y destruir los folículos tiroideos y a infiltrar las paredes vasculares. Prácticamente el 100% de los linfomas primarios corresponden a linfomas no Hodgkin y el 95% son de células B. Citológicamente, el 70-80% son de grado alto de malignidad, de tipo células grandes e inmunoblástico; el 5-10% de

grado intermedio y el 10-15% de grado bajo. En la actualidad se considera que la mayoría de los linfomas primarios de tiroides pertenecen al grupo de linfomas originados en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), por lo que no es infrecuente encontrarlos relacionados, de modo sincrónico o metacrónico, con linfomas en otras localizaciones (tubo digestivo, mama o glándula salivar) (figura 12 B y C, pág. 52).

El pronóstico en las formas localizadas de bajo grado suele ser bastante favorable, con supervivencias a los 5 años del 75-100% de los casos.

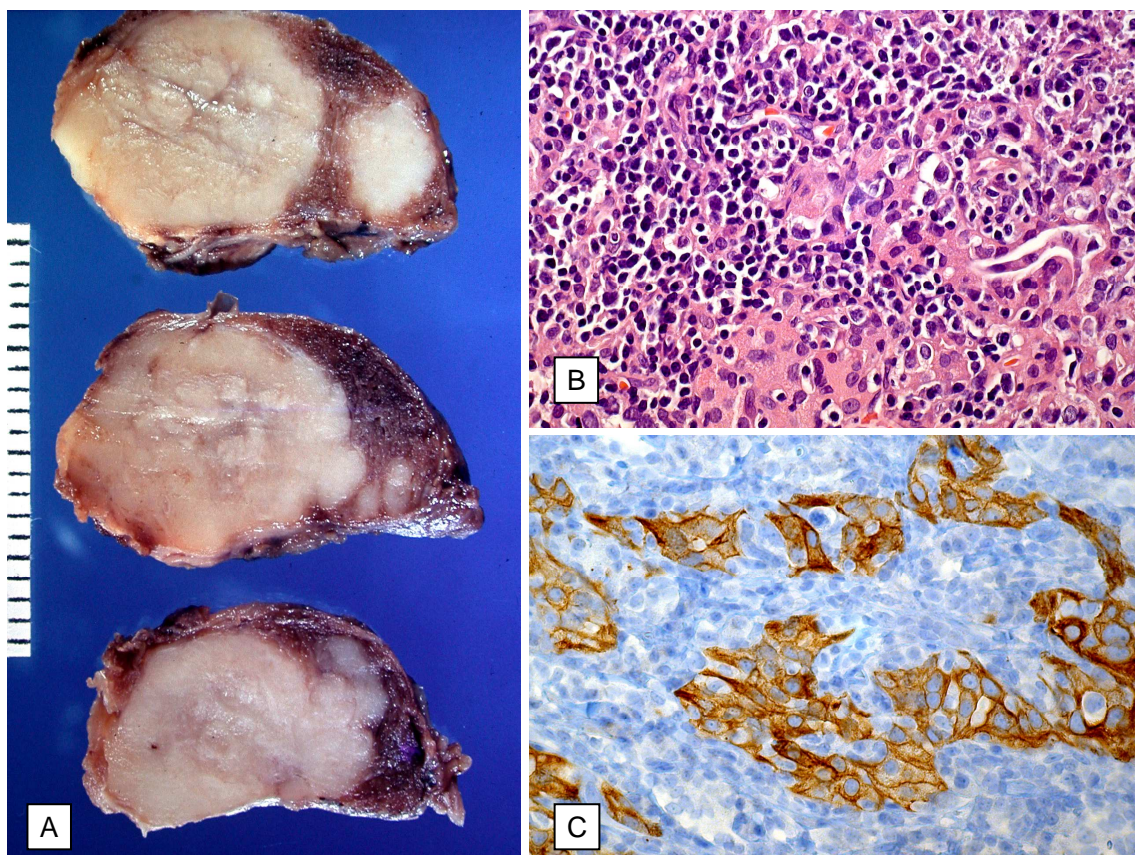


Figura 12. Linfoma de tiroides. A. Lesión nodular, blanquecina, aparentemente bien delimitada, en el seno del tejido tiroideo. B.- Detalle histológico donde se advierte un crecimiento en sábana de células linfoides que oblitera y destruye la arquitectura habitual de la glándula. C. Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anticitoqueratina para poner en evidencia las células foliculares atrapadas en el crecimiento linfomatoso. Adviértase como las células linfoides han destruido a los folículos linfoides.

2.11 Sarcomas

Actualmente se considera que la mayoría de los casos diagnosticados en el pasado de sarcomas primarios de tiroides corresponden a carcinomas indiferenciados. El diagnóstico de sarcoma debe basarse en la ausencia de signos de diferenciación epitelial y en la presencia de hallazgos histológicos específicos de diferenciación sarcomatosa.

El *hemangioendotelioma maligno* es un tumor excepcional, que prácticamente se presenta con exclusividad en las regiones montañosas de Europa central. Macroscópicamente es semejante al carcinoma indiferenciado e histológicamente está compuesto en su totalidad por canales vasculares anastomosantes que presentan evidente diferenciación endotelial, con abundantes cuerpos de Weibel Palade e inmunorreactividad específica para el factor VIII.

2.12 Tumores secundarios

Aunque en autopsias de enfermos con cáncer diseminado la afectación tiroidea es frecuente, en raras ocasiones las metástasis causan manifestaciones clínicas. Las células tumorales pueden alcanzar la glándula por extensión directa, como se advierte en el curso de carcinomas de laringe, esófago y tráquea; por vía hematógena lo pueden hacer el melanoma y los carcinomas de mama, pulmón y riñón.

La metástasis de carcinoma renal es muy peculiar ya que, por un lado, es muy común confundirla histológicamente con un carcinoma folicular de células claras y, por otro, su presentación clínica puede ser tan aberrante que simule un tumor primario, bien por ser la primera manifestación de la enfermedad, o bien por ser una metástasis tardía después de muchos años de período libre de enfermedad. Estas lesiones suelen ser múltiples y en el estudio histológico la presencia de numerosos capilares sinusoidales favorece el diagnóstico de carcinoma renal metastásico. Abunda más en la dificultad del diagnóstico diferencial el que la inmunorreactividad para la tiroglobulina en el carcinoma de células claras del tiroides es muy débil.

3. Tumores tiroideos en la rata.

Esta clasificación cubre todos los tumores tiroideos de rata que han sido descritos en la literatura, inducidos experimentalmente o espontáneos. Ciertos autores han usado una terminología diferente a la adoptada aquí; lo cual será mencionado posteriormente. Esta clasificación tampoco incluye entidades tales como teratoma, hemangioma, leiomioma, linfoma, tumor neurogénico y otras neoplasias que han sido observadas en humanos y en varias especies animales además de la rata.

De las características y patrones histológicos predominantes observados en nódulos epiteliales neoplásicos, los tres más generales (folicular, sólido y

epidermoide) fueron seleccionados para designar las principales categorías de tumores. Como primera mención, la proliferación de células epiteliales de rata en agregados sólidos puede ser considerada como un rasgo normal. Además, el origen de las células propias del tiroides de la lámina precordial explica la posibilidad de desarrollo de estructuras epidermoides en el epitelio folicular.

Así, ni la apariencia de patrones de crecimiento sólido ni la presencia de estructuras epidermoides pueden ser vistas "*per se*" como manifestaciones de desdiferenciación debidas a transformación tumoral. Por lo tanto, no hay una razón válida para incluir en la clasificación categorías vagas tales como tumores pobremente diferenciados y anaplásicos o indiferenciados. Su inclusión en la nomenclatura de tumores tiroides humanos puede estar justificada en el terreno terapéutico y pronóstico. En el caso de tumores de rata, tales consideraciones son secundariamente importantes, y los principios histológicos de la clasificación pueden ser seguidos más estrictamente.

Además de definiciones descriptivas de algunas propiedades histológicas (tamaño de los folículos, presencia de papilas, tipo de células, etc.), son usados en la clasificación de los tumores, para designar la subdivisión comúnmente observada de los tres tipos principales de adenomas y carcinomas, designaciones tales como fetales, embrionarias, atípicas, anaplásico, etc. Esta terminología, resultado de comparaciones de la estructura tumoral con estructuras del tejido tiroideo normal en diferentes estadios de la ontogénesis, ha sido intencionalmente evitada para no caer en equivocaciones. En conclusión, estas pautas generales en la clasificación propuesta pueden ser

tenidas en cuenta, ya que, en realidad, es muy raro encontrar cualquiera de los tumores listados anteriormente en su forma morfológica pura.

La mayoría de los tumores tiroideos de rata representan variaciones transicionales diferentes entre estas entidades separadas artificialmente. La inmensa mayoría de las neoplasias foliculares siempre contienen numerosos focos solitarios de células de crecimiento sólido, y es raro que el tumor sólido no muestre áreas de estructura folicular o folículos solitarios esparcidos aquí o allá en el nódulo. Esto sucede también en las características citológicas de tumores tiroideos de rata. Por ejemplo, algunas células claras pueden dar lugar a neoplasias sólidas o foliculares, y viceversa, tumores compuestos predominantemente de células claras pueden contener adenómeros alineados con epitelio folicular convencional.

Es obvio que al referir células claras no se está contemplando la terminología tradicional que las interpreta como células parafoliculares, sino que se entiende que son foliculares, más claras que las restantes, que a menudo forman patrones sólidos.

Tanto en el tiroides normal como en tumores tiroideos existen numerosas formas transicionales entre las células típicas del folículo y las células claras, así como entre estos elementos y los representantes de la población celular interfolicular.

Así, prácticamente todos los tumores benignos y malignos encontrados en el tiroides de rata pueden ser designados como una entidad en cualquier

clasificación, sólo de acuerdo con el predominio de una u otra estructura histológica. El introducir todas las subdivisiones que puedan cubrir incluso las formas transicionales más frecuentes de tumores, haría la clasificación impracticable.

La apariencia del tejido tiroideo normal y tumoral está en ambos gobernada por la correlación de la intensidad de al menos tres procesos, por ejemplo: división celular, secreción y reabsorción de coloide. El intento de clasificar las últimas variedades de las características histológicas producidas por cada cambio fisiológico en esta correlación está plenamente justificado (Meissner y cols., 1969).

3.1. Tumores benignos.

Casi la mitad de los tumores tiroideos de rata espontáneos o inducidos experimentalmente son benignos. La inmensa mayoría de ellos tienen predominantemente una estructura folicular y constituye el grupo de adenomas foliculares. Por ejemplo, en una serie de experimentos de largo plazo con 6-Metilouracilo, 28 de 44 tumores tiroideos eran adenomas y casi el 85% de ellos pudieron considerarse adenomas foliculares (Napalkov, 1971).

3.1.1. Adenoma folicular.

El tipo de tumor más común en este grupo es el adenoma polimorfofolicular. Desde el punto de vista morfológico y de conducta se asemeja

estrechamente a tumores tiroideos humanos llamados usualmente adenomas macrofoliculares, adenoma coloidal (UICC, 1969) o adenoma simple (Meissner y cols., 1969). El tamaño de los tumores de este tipo varía muy significativamente (de 1-2 mm a 12-14 mm de diámetro mayor). Ellos están bien circunscritos, encapsulados, y su crecimiento extensivo produce compresión y atrofia del parénquima tiroideo adyacente. Los rasgos más característicos de estos tumores son, la extrema variedad de tamaño y forma de sus folículos y la diversidad en la celularidad y características morfológicas del epitelio folicular. Usualmente, el número de células por folículo es significativamente más alto que en los folículos normales. Las células están tan estrechamente empaquetadas que sus núcleos, incluso en secciones delgadas, se superponen unos sobre otros dando la impresión de hiperchromatismo. Esta celularidad alta se ve en el adenoma por la intensa tinción de su epitelio folicular.

La altura de las células epiteliales puede variar muy significativamente en diferentes partes de los nódulos tumorales e incluso dentro de los límites del mismo folículo. Las características de tinción del coloidal y el grado de reabsorción y acumulación pueden ser bastante diferentes en los folículos vecinos al tumor y en el resto de la glándula. Sin embargo, muy a menudo los folículos y el coloidal contenido son parecidos al tiroides normal.

A veces, pueden observarse pequeños focos de proliferaciones sólidas de células epiteliales con escasa diferenciación, en una o varias partes del nódulo tumoral.

Es característica de muchos adenomas polimorfo-foliculares la abundante vascularización que presentan y la aparición frecuente de trastornos circulatorios, tales como trombosis, necrosis focal, hemorragias y fibrosis secundaria. Debido al carácter expansivo del crecimiento, los adenomas dan lugar a atrofia del parénquima tiroideo adyacente por compresión del mismo.

El tejido conectivo interfolicular e interlobular de las porciones comprimidas y atrofiadas se refuerza y forma una cápsula alrededor del crecimiento tumoral. En casos de células adenomatosas donde la producción del coloide está aumentada o descendida del nivel normal, pero su reabsorción está descendida significativamente, se desarrolla un tipo especial de adenoma polimorfo-folicular. Junto a folículos pequeños, medianos y grandes con formas bizarras, estos tumores contienen cavidades gigantes llenas de coloide de diferente densidad y propiedades tintoriales. En el nódulo tumoral, una o más de tales cavidades pueden aparecer tapizada por un epitelio plano o cúbico simple. Es frecuente la existencia de una amplia cavidad central subdividida en varias cámaras con pliegues invaginados o duplicatura del epitelio con tejido conectivo subyacente. A veces, rodean a estos septos folículos secundarios o quistes. Cuando existe un predominio de cavidades quísticas, designamos a esta variedad de adenoma polimorfo-folicular como cistoadenoma.

Otro tipo de adenoma folicular que es importante mencionar, especialmente en la observación del tiroides de rata, es el adenoma trabecular. Este tumor también se asemeja a tumores tiroideos humanos, que se describen con el mismo término o son referidos como un adenoma embrionario. En el

tiroides de rata, los adenomas trabeculares son menos comunes que otras variedades de neoplasias foliculares benignas. Consisten en bandas o columnas de células epiteliales de formas irregulares y fuertemente empaquetadas. Estas bandas forman haces paralelos, entre los cuales, están esparcidos pequeños folículos solitarios. Las figuras mitóticas son raras y el estroma es escaso en los adenomas trabeculares. Sin embargo, se ven con frecuencia finas fibras entre las bandas celulares, usualmente envolviendo dos columnas de células adyacentes. Esto también hace sospechar que las estructuras fibrilares son membranas basales comprimidas, que limitan los folículos elongados y desprovistos de luz.

Los adenomas trabeculares están más estrechamente relacionados con otras variantes de tumores foliculares, por ejemplo, el llamado adenoma tubular. Este último ha sido considerado por muchos autores como una forma aparte (Bielschowsky, 1953), pero su desarrollo a partir del adenoma polimorfofolicular, como resultado de compresión interna es bastante obvio.

El tercer tipo de tumor folicular, el adenoma microfolicular, ha sido frecuentemente observado en inducción experimental. Su principal rasgo morfológico está implícito en su designación. Como toda neoplasia benigna, los adenomas microfoliculares son encapsulados, de crecimiento expansivo y más bien uniforme, pero con aparente histología típica. En patología humana el tumor equivalente es conocido por el mismo nombre o también puede denominarse con el término de adenoma fetal (Meissner y cols., 1969 y UICC, 1969). Este último término también ha sido usado para designar adenomas

microfoliculares inducidos experimentalmente en tiroides de rata. El gran volumen del tumor está compuesto por microfóliculos, donde en cortes transversales pueden contarse escasamente 10 células por fólculo.

Las células se parecen bastante a las del epitelio normal folicular, y es la disposición muy compacta de innumerables fólculos la que hace que tales nódulos tumorales parezcan hiper cromáticos. Pueden encontrarse fólculos más grandes de lo normal, regulares o elongados, en diferentes partes del nódulo, pero principalmente relacionados con la periferia. Los fólculos más grandes están llenos de coloide, pero los microfólculos están exentos de ello, y no tienen luz distinguible, conteniendo gotas aisladas de material mal teñido rodeado de varias células epiteliales. A pesar de la rapidez de crecimiento aparente del tumor, las figuras mitóticas son escasas. En este tipo de adenoma es muy común la vascularización abundante y la aparición frecuente de septos de estroma edematoso que subdividen los nódulos en varios lóbulos.

3.1.2. Adenoma papilar.

Los adenomas papilares son observados en ratas generalmente en forma quística y con frecuencia son algo parecidos a los tumores tiroideos humanos, que han sido designados con el mismo término (Meissner y cols., 1969). Tanto en la rata como en el hombre (Willis, 1964), la presencia de estructuras papilares en tumores foliculares de tiroides puede ser considerada como un rasgo altamente indicativo de malignidad (Lindsay, 1969). Muy ocasionalmente, los tumores papilares en rata son encapsulados, con

crecimiento expansivo, y no invaden los vasos sanguíneos; considerándose como adenomas benignos. La actividad mitótica de células epiteliales en tales raros adenomas papilares, es baja, o al menos, no más alta que en adenomas polimorfo-foliculares. Los últimos, en efecto, muestran muchos rasgos en común con adenomas papilares, especialmente con esas variedades que están constituidas principalmente por folículos pleomórficos. La inmensa mayoría de los adenomas papilares de tiroides están representados por nódulos con estructura predominantemente quística. Entre los quistes puede haber áreas de patrón folicular separadas de los quistes por septos de tejido conectivo. Estos septos parten de la cápsula que rodea a los nódulos. Generalmente, la variante quística de adenoma papilar se encuentra en ratas viejas que han sido expuestas a influencias tumorigénicas por un período suficientemente largo.

Los quistes grandes pueden medir más de 5 mm de diámetro y casi en todas partes de su pared epitelial forman papilas. A veces, la intensa proliferación de elementos estromales y la fibrosis acompañante cambia significativamente la apariencia convencional de los elementos foliculares y quísticos de los adenomas papilares. Las figuras mitóticas son raras en adenomas papilares, sin embargo, la densidad celular es muy diferente en varias partes del tumor. Algunas papilas están recubiertas por un epitelio simple de celularidad extremadamente abundante, mientras que otras están recubiertas por escasos elementos aplanados o elongados.

El centro de cada papila está constituido por un tallo de tejido conectivo vascularizado, el cual soporta el epitelio que crece proyectándose dentro de la luz de un quiste o folículo.

Si las papilas son numerosas, el interior del quiste asume una apariencia plegada, mientras más pequeño es el folículo su forma se hace más irregular y estrellada. En casos de fibrosis o abundante proliferación estromal, el tejido conectivo de los tallos se hace delgado y corto, predominando en los quistes contornos interiores dentados. Con frecuencia se puede observar la formación de numerosas papilas secundarias y folículos que brotan del epitelio que cubre el original crecimiento hacia fuera.

Esta ramificación de las papilas primarias le da la característica forma de tejido epitelial ramificado y conectivo flotando separadamente en el coloide. Este aspecto es observado claramente en secciones transversales de tales quistes.

Los cuerpos de Psammoma, hallados por Follis (1965) en tiroides hiperplásico de rata, y típicamente presentes en tumores papilares malignos humanos, no son comunes en adenomas papilares de tiroides de rata. Los tumores con esta estructura son raramente observados en ratas expuestas a radiaciones ionizantes (Lindsay, 1969) o en ratas tratadas con drogas antitiroideas (Napalkov, 1971) y hoy día se interpretan como tumores malignos o al menos de comportamiento biológico incierto. Hay pocas dudas acerca de la histogénesis de cualquiera de los tipos de adenomas papilar y folicular de

rata mencionados. Sus principales componentes celulares se originan de aquellas células epiteliales del epitelio tiroideo que limita los folículos o forma pequeños islotes interfoliculares en el parénquima glandular normal.

3.1.3. Adenoma sólido.

Estos tumores benignos del tiroides de rata, algunos de los cuales aparecen espontáneamente, no representan un grupo homogéneo. Pueden ser subclasificados en dos categorías: adenomas sólidos simples y adenomas sólidos de células claras. Para justificar el diagnóstico de adenoma sólido, el tumor debe ser completamente encapsulado y no presentar signos de invasión capsular o vascular en el examen cuidadoso. Es necesario mencionar, que en tiroides de rata, pocos tumores sólidos presentan estos criterios. La inmensa mayoría de ellos muestran un crecimiento invasivo. Así, verdaderas neoplasias sólidas benignas son más raras en ratas que en humanos. Los tumores designados aquí son adenomas sólidos simples. No se producen espontáneamente, sino en ratas tratadas durante un largo periodo de tiempo con drogas antitiroideas. Adenomas con las mismas características han sido descritos en experimentos con dieta baja en yodo o radiaciones ionizantes.

El término adenoma sólido simple se usa para distinguir este tumor de los adenomas sólidos de células claras, que son más frecuentes, y a la vez para subrayar su origen a partir de las células tiroideas, células epiteliales tiroideas propias. Esta designación parece preferible al término de adenoma atípico, porque la capacidad para crecer en forma de conglomerados sólidos es

una propiedad intrínseca y típica del epitelio normal tiroideo. Sin embargo, adenomas tiroideos atípicos en humanos, como los descritos por Meissner y Warren (1969) muestran una muy estrecha relación con los adenomas sólidos simples de tiroides de rata.

El mayor rasgo característico del adenoma sólido simple es la proliferación focal de células epiteliales formando folículos absortivos solitarios. El pleomorfismo celular puede ser predominante en muchos casos, pero usualmente las células son más o menos uniformes, alargadas, y con núcleo oval o casi esférico.

La mayoría de los núcleos son algo más grandes que los de las células foliculares normales y su cromatina es finamente granular. El citoplasma es detectable en zonas donde la densidad celular es alta, conteniendo gránulos redondos eosinófilos, en aquellas células que están dispuestas en patrón folicular. No son muy comunes las células bizarras o con forma alargada, y se encuentran principalmente en áreas de alta celularidad. Las figuras de mitosis son raras, al igual que en todos los adenomas tiroideos de rata. El estroma es generalmente escaso, sin embargo la vascularización puede ser extremadamente abundante en tumores grandes de crecimiento expansivo.

Los adenomas sólidos de células claras son también comparables en humanos a los tumores tiroideos de rata. Su origen, como corresponde a una neoplasia maligna, puede ser atribuido a transformación tumoral de células

claras normales o de células de Askanazy/Hürthle con similar morfología, si bien no representan una entidad distinta.

Una descripción detallada del adenoma sólido de células claras ha sido hecha por Axelrad y Leblond (1955) que denominan a esta neoplasia tipo Gamma-1. Este tumor aparece espontáneamente en ratas; irradiadas, animales viejos no tratados, animales sometidos a restricción de yodo, o bien a bociógenos, siendo su frecuencia de aparición muy baja. Como en otros adenomas, la presencia de una cápsula que separe los tejidos tumorales del parénquima tiroideo adyacente comprimido, es un criterio morfológico obligatorio para considerar una proliferación de este tipo celular como una verdadera neoplasia de células claras. Se insiste que en descripciones clásicas, esta célula clara sigue siendo folicular.

Los focos no encapsulados de células claras son mucho más frecuente, sin embargo, tales proliferaciones, o bien no muestran características de crecimiento neoplásico o son tumores malignos invasivos, independientemente de su tamaño, que puede variar de pocas micras a varios milímetros. En esta descripción concreta, la interpretación actual es que corresponden a focos de hiperplasia o tumores malignos de células parafoliculares, que se producen espontáneamente y que son equivalentes al carcinoma medular humano.

Los tumores sólidos de células claras bien encapsulados deben ser también cuidadosamente examinados y descartar la existencia de invasión vascular, y particularmente linfática.

Mientras que la infiltración capsular es rara, el estudio de varias secciones de un nódulo aparentemente benigno, a menudo hace posible detectar penetración de células tumorales dentro de las paredes de los vasos. La cápsula que rodea el adenoma sólido de células claras consisten en bandas finas de fibras de reticulina y deriva de la membrana basal de los folículos que se han atrofiado dando lugar a compresión por crecimiento expansivo del nódulo tumoral. La cápsula es generalmente delgada, pero el tejido tiroideo adyacente comprimido está a menudo infiltrado por linfocitos y células plasmáticas. Los adenomas sólidos de células claras presentan tinción pálida, con un tinte basófilo tenue, y forma nódulos bien circunscritos fácilmente discernibles en contraste con un fondo de tejido tiroideo normal o bocio. Las estructuras solitarias como folículos llenos de material homogéneo pálido eosinófilo pueden ser escasas en cualquier parte del tumor. Tales estructuras están generalmente parcial o totalmente desprovistas de membrana basal y sus células son morfológicamente muy similares a aquellas células no polarizadas grandes, pálidas, del resto del nódulo, que las células del epitelio folicular. El gran volumen de los adenomas consiste en células grandes ovoides o poligonales con distintos bordes. Núcleo grande pálido, oval, a menudo vacuolizado y contiene grandes grumos de cromatina dispersa de forma esparcida o concentrada cerca de la membrana. Citoplasma basófilo con gránulos finos distribuidos alrededor del núcleo o vacuolas transparentes solitarias de varios tamaños. En comparación con el adenoma sólido simple o adenoma folicular, los tumores benignos de células claras están pobremente vascularizados y tienen escaso estroma. Las figuras mitóticas son extremadamente raras en los adenomas sólidos de células claras.

3.1.4. Cistadenoma de células escamosas (epidermoide).

La última categoría de proliferaciones que son consideradas como tumores benignos, a veces, en tiroides de rata, han sido designadas como cistadenomas de células escamosas (epidermoide). De acuerdo con Van Dyke (1944) los cistadenomas de células escamosas ocurren espontáneamente en rata originados a partir del cuerpo ultimobranquial. La frecuencia de tales quistes está aumentada por una dieta deficiente en vitamina A en rata (Van Dyke, 1955). La embriogénesis del cuerpo ultimobranquial, su incorporación dentro del tiroides de rata durante el desarrollo prenatal y su relación con el sistema de células C (célula parafolicular) se discute en conexión con la organización estructural de la glándula normal.

De acuerdo con la literatura, en la embriogénesis del tiroides y cuerpo ultimobranquial, no hay un terreno adecuado para observar la aparición de cualquier estructura epitelial estratificada en tiroides de rata como evidencia de tumor de células escamosas tumorales metaplásicas.

Además la naturaleza neoplásica de los conglomerados de quistes de 2-3 cavidades cerradas adyacentes entre sí son a menudo vistas en porciones centrales de los lóbulos tiroideos de rata. Estas estructuras nunca muestran mucha evidencia de un crecimiento progresivo expansivo que podría resultar en compresión del parénquima tiroideo adyacente y desarrollo de una cápsula. El rango de crecimiento de tales quistes, ya sea en solitario o en conglomerados es lento, y el tamaño de las cavidades incrementa con el

acumulo de material laminado queratinizado y detritus en la luz. Así, los quistes epidermoides aparecidos en tiroides de rata se han clasificado seguramente de cistadenoma, pero ello es erróneo, pues corresponden al desarrollo aberrante del cuerpo últimobranquial.

Finalmente, es preciso mencionar que los adenomas espontáneos de tiroides de rata son generalmente tumores solitarios, mientras que las neoplasias benignas inducidas surgen multicéntricamente y numerosos nódulos entremezclados de diferentes patrones pueden ser observados ocupando prácticamente la totalidad de la glándula.

3.2. Tumores malignos.

Muchas de las características de las neoplasias benignas descritas anteriormente han sido observadas por varios investigadores en tumores malignos de tiroides de rata. Los carcinomas de tiroides de rata son a menudo bien diferenciados y relacionados con adenomas e incluso nódulos hiperplásicos, cuyo diagnóstico de malignidad está basado en evidencia distinta de crecimiento invasor y los hallazgos de metástasis a distancia más que su apariencia histológica. Por otro lado, incluso un tumor con una inusual apariencia histológica maligna no puede ser considerado canceroso a menos que haya metástasis o por lo menos signos de invasión local demostrados.

3.2.1. Carcinoma folicular.

Como en el caso de tumores benignos, las neoplasias predominantemente foliculares son las más frecuentes entre las inducidas mediante varias técnicas experimentales.

Los carcinomas polimorfo-foliculares son raros. Sus patrones microscópicos son comparables a aquellos adenomas polimorfo-foliculares descritos anteriormente. Carcinomas de este tipo son muy similares a aquellos designados como adenocarcinomas alveolares o foliculares (UICC, 1969) o como carcinomas foliculares (Meissner y cols., 1969) en patología humana.

Los carcinomas polimorfo-foliculares muestran generalmente pleomorfismo celular y estructural muy limitado y moderado o incluso bajo índice mitótico.

Las características especiales que distinguen tipos análogos de tumores benignos es su invasividad. En ratas estas características pueden ser reveladas sólo microscópicamente, y la invasión celular tumoral de vasos sanguíneos o linfáticos es la prueba más convincente de malignidad más que el crecimiento de células tumorales en el interior de la cápsula de la glándula o nódulo o dentro del tejido tiroideo adyacente.

En los cortes histológicos, la invasión en la zona periférica, resulta a menudo difícil de interpretar y puede dar lugar a falsos positivos. Estos son

más comunes cuando el diagnóstico no se basa en la evidencia de invasión linfática o sanguínea. Incluso la invasión masiva y profunda de células tumorales dentro de la cápsula glandular en casos de carcinomas muy malignos y muy metastizantes seguramente se acompaña de la completa penetración de la cápsula y crecimiento del tumor hacia el interior de los tejidos y órganos adyacentes.

Los ganglios linfáticos cervicales y los pulmonares son los lugares más comunes de metástasis de carcinomas polimorfo-foliculares, al igual que ocurre con otros tumores tiroideos malignos.

La estructura histológica de las metástasis se parece mucho al tumor primario, y generalmente hablando, las metástasis de carcinomas polimorfo-foliculares tienen apariencia de nódulos benignos de tejido tiroideo. Los carcinomas polimorfo-foliculares puros son tan infrecuentes como los adenomas puros del mismo tipo y pueden observarse también patrones mezclados de otro tipo tumoral. En algunos folículos grandes el epitelio a menudo aparece plegado y casi seudoestratificado. Variedades de carcinomas polimorfo-foliculares atípicos o pobremente diferenciados son muy raras en ratas, y su diagnóstico no presenta serias dificultades porque hay signos obvios de malignidad histológica y la casi invariable presencia de metástasis pulmonares. En muchos carcinomas polimorfo-foliculares se observan grupos o incluso pequeños nódulos de células grandes con citoplasma abundante y núcleo picnótico hipercromático. Algunas de estas células forman pseudofolículos, mientras que otras están dispuestas anárquicamente. Es difícil decir como los

cambios en estas células se corresponden a hallazgos similares en carcinomas foliculares humanos o cual es la clase de cambios que hay en la conducta tumoral que ellos reflejan.

Al igual que en los adenomas existe una variante de carcinoma polimorfo-folicular que se caracteriza por la presencia de numerosos folículos dilatados, cavidades grandes, y quistes limitados por un epitelio plegado o pseudoestratificado. Muy a menudo las papilas crecen hacia el interior o incluso hay proliferaciones sólidas de células epiteliales que se extienden desde la pared de dichas cavidades dentro de la luz. Muchas cavidades, debido al carácter plegado de la pared y la longitud de las ramas papilares asemejan quistes multicavitarios. La variedad de carcinoma polimorfo-folicular descrita anteriormente podría ser designada como cistadenoma, pero tal entidad tendría lógicamente que ser subdividida en diferentes tipos morfológicos. Un pequeño avance podría obtenerse en la práctica, con esta subdivisión, porque no hay una correlación evidente entre la conducta tumoral, grado de formación folicular y acúmulo de coloide en neoplasias polimorfo-foliculares de tiroides de rata con crecimiento invasivo.

Una característica del cistoadenoma es el crecimiento invasivo de células tumorales dentro de la cápsula del tumor y la invasión de los vasos sanguíneos atravesando su pared, de masas sólidas de proliferación folicular que se extiende dentro de la luz. Por último podemos decir que existe un "coloide" semejante al del tiroides normal, pero con propiedades tintoriales diferentes. En la luz de las cavidades de un carcinoma polimorfo-folicular de

tipo quístico, usualmente se pueden encontrar numerosas células tumorales descamadas de origen epitelial, macrófagos y otros elementos de la sangre o hemosiderina proveniente de hemorragias previas. Algunos tumores pueden alcanzar proporciones gigantes, pero raramente metastatizan. Las metástasis generalmente presentan características de carcinomas polimorfo-foliculares y hay un excesivo acúmulo de material semejante al coloide en sus cavidades.

Como en el caso del adenoma folicular, puede mencionarse, mientras se clasifique como una entidad separada, una variedad de carcinoma folicular referida como carcinoma microfolicular. Este tumor, que es relativamente frecuente, está compuesto principalmente por pequeños folículos esféricos u ovoides. Algunos de los folículos son alargados debido a la compresión que surge de la intensa proliferación de células neoplásicas y conectivo tisular.

La marcada reacción estromal que da lugar a la aparición de grandes áreas de fibrosis en el centro del nódulo tumoral es el rasgo más característico de los carcinomas microfoliculares en la rata. En algunos tumores, gran parte del nódulo es sustituido por bandas densas de tejido conectivo hialinizado que se extiende radialmente hacia la periferia del tumor. En el estroma hiperplásico hay microfoliculos solitarios o cordones de células epiteliales con poca actividad. A veces las células neoplásicas proliferan intensamente e invaden el tejido tiroideo adyacente. Es una zona hipercromática circulante compuesta de pequeños folículos, la que rodea al tejido conectivo denso, que da su apariencia característica al carcinoma microfolicular.

Los carcinomas microfoliulares de rata muy raramente infiltran más allá de la cápsula tiroidea e invade tejidos blandos de alrededor de la tráquea. Sin embargo, la alta frecuencia de la invasión de vasos sanguíneos es responsable del frecuente desarrollo de metástasis pulmonares con el mismo patrón que la lesión primaria.

3.2.2. Carcinoma papilar.

El carcinoma papilar es la segunda variedad de tumores malignos del tiroides más frecuente, después del carcinoma folicular. Las características microscópicas de este tumor son también parecidas al adenoma papilar. Los carcinomas papilares muy a menudo tienen una cápsula perfectamente completa, difusa o localmente invadida por células neoplásicas. El tumor se disemina principalmente dentro de los lóbulos tiroideos por vía linfática, y estas metástasis intratiroides crean la impresión de origen multifocal del crecimiento tumoral. Los carcinomas papilares del tiroides de rata muy raramente difunden a través de la cápsula glandular e invade tejidos adyacentes y órganos. La diseminación linfática da lugar a metástasis extratiroides en la región cervical y ganglios linfáticos mediastínicos. La invasión de vasos sanguíneos es infrecuente y las metástasis pulmonares del carcinoma papilar no son muy comunes.

Las estructuras papilares son generalmente más simples en este tumor que en los adenomas del mismo tipo. El epitelio monoestratificado está dispuesto en cortos ejes fibrovasculares proyectándose dentro de la luz de

folículos bizarros polimórficos. No hay pleomorfismo celular, y las figuras mitóticas son raras. Los cuerpos de Psammoma que son característicos del carcinoma papilar humano pueden ser hallados sólo ocasionalmente. Es importante mencionar también que el carcinoma papilar puro en ratas es extremadamente raro. Una observación muy importante es que el carcinoma folicular del tiroides de rata presenta estructuras papilares pero estas no son iguales a las del carcinoma humano. Además en los tumores de ratas están ausentes las características citológicas del carcinoma papilar humano, las cuales son definitorias.

Usualmente pueden verse múltiples focos con patrón sólido, quístico o alveolar en tales neoplasias, mientras que pueden observarse áreas limitadas de estructura papilar en carcinomas caracterizados por uno u otro patrón histológico predominante.

3.2.3. Carcinoma sólido.

En contraste con los carcinomas foliculares, los carcinomas sólidos no representan un grupo histológicamente homogéneo; esto se refleja en su morfología y comportamiento biológico que permite subdividirlos en varias entidades.

Los carcinomas sólidos de células pequeñas aparecen generalmente como nódulos con crecimiento invasor, compuesto de pequeñas células unidas

en paquetes con escaso citoplasma. El pleomorfismo celular se pone de manifiesto principalmente en las diferentes formas y tamaños de los núcleos.

La actividad mitótica de las células es moderada, las células crecen en cordones, o sin disposición especial, pero ocasionalmente forman estructuras redondeadas e incluso formando folículos normales. La invasión venosa y el desarrollo de metástasis pulmonares son usuales en tumores de este tipo, y muy a menudo el agrupamiento de células foliculares es más prominente en nódulos metastásicos que en la neoplasia primaria.

Parece ser que el carcinoma sólido de células pequeñas se origina de la transformación maligna de las células epiteliales foliculares.

Los carcinomas sólidos de células polimorfas son raros en ratas; en varios cientos de tiroides de ratas afectados de crecimiento tumoral solo se han detectado dos de tales carcinomas. En patología humana existen varios términos para designar este carcinoma de tiroides indiferenciado y altamente maligno. De acuerdo con la prevalencia de ciertos tipos celulares, puede ser referido como carcinoma de células gigantes, carcinoma de células fusiformes, tumor de células polimorfas, carcinosarcoma, carcinoma anaplásico etc. (Meissner y cols., 1969). De las ilustraciones en publicaciones de tumores tiroideos experimentales, parece, ser que el término de carcinoma sólido de células polimorfas es el más apropiado para describir estos hallazgos morfológicos en la rata.

El tumor se compone de células grandes, irregulares, poliédricas, redondas, ovals o alargadas con relación núcleo citoplasma variable. Las propiedades de tinción del citoplasma, su vacuolización y la presencia de inclusiones son también variables. Pueden observarse numerosas figuras de mitosis, la mayoría anormales.

Porciones del tumor que consisten principalmente en células alargadas comprimidas, folículos solitarios o estructuras irregulares pueden inducir a error diagnóstico por confundirse con un carcinosarcoma o sarcoma de células alargadas. Sin embargo, no hay otra indicación de que la neoplasia sea de origen mesenquimal. Por el contrario, sus metástasis pulmonares pueden indicar estructura de origen epitelial, y los focos de células claras dispuestas en el nódulo primario son evidencia del carácter carcinomatoso del tumor. El carcinoma sólido de células pleomórficas de rata es un tumor que crece destruyendo, y al tiempo de morir el animal, ha reemplazado casi por completo el tiroides. Invade tejidos blandos y tráquea, y metastatiza el pulmón.

La presencia ocasional de estructuras semejantes a folículos en este carcinoma anaplásico sugiere que el tumor resulta de la transformación maligna de células del epitelio folicular. Está clara la correspondencia entre este tipo tumoral de la rata y el carcinoma indiferenciado o anaplásico humano.

Existe una clasificación en base a la histogénesis y morfología de estas tumoraciones malignas tiroideas que ocurren espontáneamente en ratas siendo designadas como neoplasias timo Gamma-2 (Axelrad y cols., 1955), carcinoma

alveolar (Lindsay y cols., 1957), o carcinoma medular (Lindsay, 1968b y Lindsay, 1969). La última designación fue sugerida por sus grandes analogías entre este tumor de rata y su homólogo en humanos. Sin embargo, es difícil decir si el carcinoma medular humano es realmente análogo a las variedades más frecuentes de tumores sólidos de células claras que aparecen en ratas.

De acuerdo con la definición de carcinoma medular humano, este es un tumor de células que crecen en grupos sólidos rodeados de estroma denso. El estroma contiene características amiloide (Meissner y cols., 1969). El carcinoma medular tiroideo con amiloide en el hombre, se caracteriza también por tener una alta concentración de calcitonina, lo cual sostiene la sugerencia de que las células C (parafoliculares) originan este tumor (Williams, 1966).

Ciertos carcinomas de rata se caracterizan por el pronunciado desarrollo del estroma hialinizado que contiene amiloide, el cual separa células de grupos irregulares, cordones y conglomerados sólidos de células neoplásicas de origen epitelial.

Así, tales tumores se asemejan mucho a carcinomas medulares humanos y han sido designados aquí como carcinomas sólidos con amiloidosis estromal. Su similitud con carcinomas medulares y su origen a partir de las células parafoliculares en rata ha sido apoyada por los hallazgos de microscopía electrónica (Boorman y cols., 1972). No obstante, los rasgos morfológicos generales de tales carcinomas sólidos con amiloidosis estromal en ratas, no corresponden completamente al típico patrón de carcinoma

medular como se describe en humanos (Hazard, 1964). Los carcinomas sólidos con estroma poco desarrollado con los más frecuentes en la rata, y no muestran amiloidosis estromal. Estos tumores solo pueden considerarse análogos a los carcinomas medulares humanos, cuando se demuestra inmunoreacción positiva para calcitonina o gránulos secretores típicos con hematoxilina-eosina.

El tumor está constituido por células poligonales o alargadas dispuestas compactamente. El tamaño de las células varía mucho más significativamente que en adenomas de células claras, y pueden verse elementos celulares estrellados y claros entremezclados con otros redondos basófilos y pequeños. También es prominente el pleomorfismo nuclear, todas las variantes pueden ser observadas, núcleos gigantes hipercromáticos, bizarros, ovales y vesiculares, con cromatina tosca esparcida en grumos. Las figuras mitóticas, a menudo anormales, carcinomatosas contienen finos gránulos y a menudo está vacuolado. El crecimiento tumoral invade y destruye el tejido adyacente. Las células neoplásicas infiltran entre los folículos, y éstos aparecen atrapados por el crecimiento tumoral, o más a menudo destruye parte de la membrana basal del folículo, invadiendo la luz y multiplicándose dentro de ella.

Como resultado del crecimiento infiltrante el epitelio normal de los folículos circundantes desaparece y el resto de la membrana basal envuelve grupos de células neoplásicas poligonales o alargadas. Los contornos de estos folículos son reconocibles debido a este agrupamiento del nódulo tumoral. Estos rasgos característicos sirvieron a Lindsay y colaboradores (1957) para

designar esta variedad de carcinoma sólido tiroideo en ratas como carcinoma alveolar. Cuando las células neoplásicas infiltran entre folículos, se sitúan paralelas formando bandas o haces entremezclados.

Como resultado del rápido crecimiento infiltrativo y destructivo de este tumor con escaso desarrollo del estroma, el parénquima tiroideo puede estar casi totalmente reemplazado por tejido tumoral sólido, sin embargo, la extensión del tumor dentro de estructuras adyacentes a la glándula no ha sido observada. Por otro lado, es frecuente la producción de metástasis vía linfática, y el crecimiento secundario en el lóbulo contralateral, así como las metástasis cervicales.

La clasificación hecha aquí distingue carcinomas sólidos de células claras de los carcinomas con amiloidosis estromal, distinción histológica que fue también propuesta con respecto a las neoplasias humanas correspondientes (Smirnova, 1971). Así, los carcinomas sólidos con grandes células claras y sin amiloidosis son considerados como resultado de la transformación maligna y crecimiento de célula de Askanazy/Hürthle. Los distintos tumores sólidos malignos originados de las células tiroideas y los descritos anteriormente muestran incremento en la frecuencia en ratas sometidas a drogas antitiroideas o dieta baja en yodo, comparada con otros animales control. La frecuencia de estas neoplasias aparece según la edad, siendo extremadamente alta en ratas viejas de ciertas especies.

3.2.4. Carcinoma escamoso (epidermoide).

El carcinoma escamoso de tiroides en ratas es tan raro como en el hombre. El carcinoma escamoso primario constituye menos del 1% de los tumores tiroideos malignos espontáneos o inducidos por diversos métodos. El tumor tiene estructura típica de carcinoma epidermoide, y este patrón histológico es reproducido completamente en metástasis pulmonares.

Las metástasis pulmonares son relativamente frecuentes, y así Napalkov (1987) refiere que de 7 casos de carcinoma escamoso, 3 de ellos presentaban metástasis pulmonares. La apariencia multiestratificada queratinizada en el foco tumoral da carácter multicéntrico.

No se observa relación anatómica entre estas estructuras del cuerpo ultimobronquial que pudiera ser considerada como posible origen de carcinoma epidermoide en tiroides de rata. En todos los casos referidos en la literatura, los carcinomas epidermoides son bien diferenciados, con abundante queratinización y formación de perlas.

Finalmente, es conveniente mencionar, que la proliferación escamosa puede observarse en lesiones benignas de tiroides de rata. La participación de células de la lámina precordial en la embriogénesis del tiroides fácilmente explica la aparición de estructuras epiteliales estratificadas en esta glándula bajo diferentes condiciones. Sin embargo, un carcinoma epidermoide de rata debe ser considerado como tumor primario cuando no se encuentran

neoplasias similares en otra parte del organismo pudiendo excluirse así las metástasis.

3.2.5. Tumores mixtos (carcinosarcoma).

Aunque posiblemente sea una teoría, la aparición de tumores mixtos tiroideos en rata, por ejemplo, carcinosarcoma, no ha sido todavía demostrada convincentemente. Usualmente este diagnóstico es erróneamente aplicado a carcinomas sólidos de células pequeñas o polimorfas con áreas de células fusiformes que recuerdan al fibrosarcoma o formas bizarras atípicas que recuerdan al rhabdomiosarcoma.

3.2.6. Sarcoma.

Los sarcomas de tiroides en ratas son extremadamente raros. Todo lo que ha sido dicho acerca de los sarcomas tiroideos humanos (Meissner y cols., 1969) podría ser repetido aquí y aplicable a la rata. En la literatura sólo aparece recogido un caso de este tipo tumoral inducido por inyección de metilcolantreno en la glándula (Esmarch, 1942).

4. El cáncer y sus cambios.

El desarrollo tumoral en humanos es un proceso muy lento, que puede durar varios de años. Durante este tiempo es posible detectar la presencia de zonas focales de proliferación que dan lugar a lesiones benignas y en algunos casos reversibles. Estos neoplasmas benignos tienden a evolucionar hacia la malignidad. Estas observaciones clínicas se correlacionan perfectamente con los datos obtenidos en sistemas animales de carcinogénesis experimental, en los que se definieron las fases de iniciación, promoción y progresión. La Figura 13 presenta un resumen de los diferentes estadios y los agentes participantes en el desarrollo tumoral.

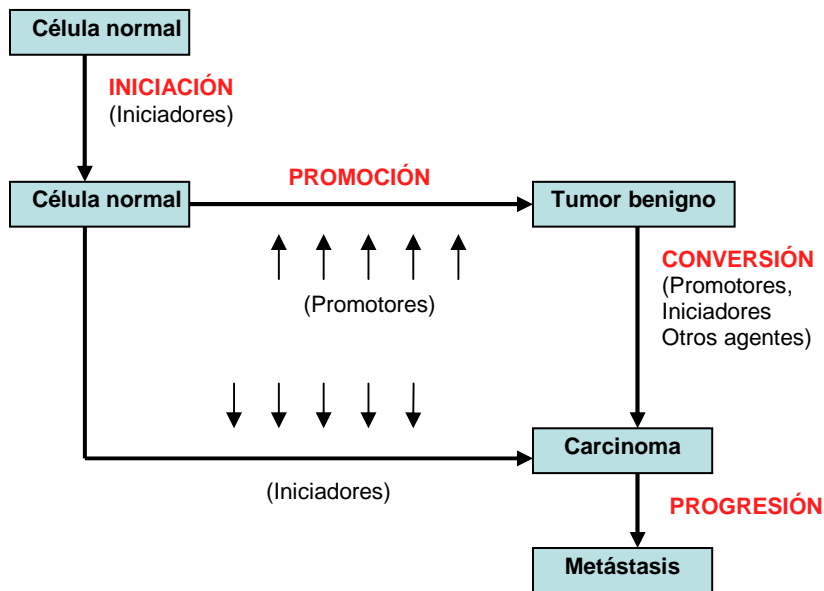


Figura 13. Estadios y agentes que participan en el desarrollo tumoral.

4.1. Iniciación.

La exposición de las células al agente carcinogénico iniciador no origina la aparición de células fenotípicamente neoplásicas, sino la adquisición por parte de ciertas células de la capacidad de ser estimuladas a proliferar en presencia de estímulos apropiados. Las células iniciadas no se distinguen del resto de la población celular expuesta al carcinógeno. Solamente su reexposición al mismo u otro carcinógeno, o a agentes no carcinogénicos capaces de actuar como promotores tumorales permite su detección a posteriori como foco de proliferación en expansión. La iniciación es un evento irreversible que acontece como consecuencia de una única exposición a un carcinógeno. Siguiendo a Farber y colaboradores (1980), la iniciación podría definirse como “una alteración en el tejido u órgano diana provocada por la exposición a un carcinógeno que puede ser inducida a desarrollar focos de proliferación, uno y más de los cuales pueden actuar como sitio de origen del proceso maligno ulterior”. El proceso de iniciación incluye dos escalones en sí mismo, (a) la inducción de una o más alteraciones bioquímicas o genéticas y, (b) una fase posterior de proliferación celular.

La interacción del carcinógeno con las células *per se* no es suficiente para iniciar el proceso tumoral en ausencia de un ciclo de proliferación celular. Sin embargo, no está establecido el mecanismo por el que la proliferación participa en la iniciación tumoral. Datos obtenidos en el análisis de modelos animales de cáncer de piel y de hígado parecen indicar que la población de células iniciadas constituye una subpoblación grande dentro del tejido diana, y

que suelen aparecer como focos con alta capacidad proliferativa dentro de un compartimento del tejido en que, en ausencia del tratamiento carcinogénico, abundarían células en proceso de diferenciación terminal (Kawamura y cols., 1985).

En otros sistemas el fenotipo de células iniciadas se caracteriza por una mayor resistencia a agentes citotóxicos o una menor dependencia de factores de crecimiento que las que presentan las células no iniciadas del mismo tejido. El proceso de iniciación, por tanto, implica la alteración en el patrón de respuesta celular a estímulos de diferenciación, a factores de crecimiento, o de resistencia a agentes citotóxicos, proporcionando a la célula iniciada una ventaja, en términos de proliferación, con respecto a las células normales que las rodean. Esta propiedad de las células iniciadas ha sido utilizada como base experimental para sugerir que el desarrollo tumoral no es sino el resultado de mecanismos celulares de adaptación o protección frente a perturbaciones del ambiente intra o extracelular (Farber y cols., 1991). Otra propiedad del estado “iniciado” de las células es su persistencia o carácter irreversible. Por ejemplo, en modelos de cáncer de piel en ratones es posible aislar focos de células iniciadas hasta diez semanas después del tratamiento iniciador (Kawamura y cols., 1985). Se calcula que la frecuencia del evento iniciador en este sistema es del orden de 10^{-5} a 10^{-6} , un rasgo compatible con un mecanismo mutacional que afecte o bien a un *locus* grande o, más probablemente, a múltiples *loci*. Aunque el análisis de otros sistemas experimentales, como la conversión maligna de células mamarias de rata *in vivo* por radiación, sugieren que en el proceso de iniciación tumoral, también pueden estar implicados mecanismos

no mutagénicos, la elevada frecuencia de aparición del fenotipo “iniciado” parece ser más consistente con la existencia de múltiples dianas, “*hot-spots*” que acumulan mutaciones de manera preferente, o alteraciones genéticas a nivel cromosómico (Boyd y cols., 1990). La naturaleza genética del proceso de iniciación se acepta de forma general por especialistas en el campo de carcinogénesis experimental (Harris, 1991).

4.2. Promoción.

Mecánicamente hablando, promoción es la fase en que las células en las que se indujo el fenotipo iniciado por el tratamiento carcinogénico original expresan su potencial de proliferación, estableciendo poblaciones celulares masivas localizadas (nódulos, papilomas, pólipos, etc.) de carácter benigno. De nuevo, utilizando la definición de Farber y colaboradores (1982), “promoción es el proceso por el que en un tejido y órgano iniciado se desarrollan focos de proliferación, uno o más de los cuales puede actuar como precursor de escalones subsiguientes en el proceso carcinogénico”. Definido de esta manera el proceso de promoción aparece como un fenómeno biológico cuantificable mediante el empleo de parámetros como el número, el tamaño y la velocidad de aparición de los focos de proliferación celular. La presencia del agente promotor proporciona un ambiente que favorece la supervivencia (inmortalización) y/o la estimulación selectiva de la proliferación de las células iniciadas en el tejido y órgano dado, respecto a las células normales.

El análisis celular y molecular de varios sistemas experimentales animales *in vitro* e *in vivo* ha indicado que, en general, los promotores tumorales poseen frecuentemente actividad citostática o citocida sobre las células normales, mientras que las células iniciadas son resistentes a tales efectos. En otros casos se ha observado que los promotores tumorales poseen actividad mitogénica sobre las células del tejido u órgano diana, y que las células iniciadas son más sensibles a dicha acción que las células normales dentro del mismo tejido. Estos datos están de acuerdo con los tres mecanismos propuestos para explicar el carácter selectivo del proceso de promoción (Farber, 1982). La proliferación de focos de células iniciadas puede ser debida a que el promotor tumoral causa la inhibición diferencial del crecimiento de las células normales o la estimulación diferencial de las células iniciadas. También es posible que, aunque el efecto del promotor sobre células iniciadas y normales sea el mismo, la proliferación de las primeras resulte de un proceso de recuperación diferencial después del tratamiento en que las células iniciadas no retornan al estadio de reposo, o lo hacen más lentamente que las normales. De un modo u otro, la subpoblación celular seleccionada por la acción del promotor tumoral presenta una mayor probabilidad de convertirse al estado maligno durante exposiciones posteriores al mismo u otros agentes carcinogénicos.

Muchas de las propiedades del proceso de promoción se han establecido mediante el estudio del mecanismo de acción de los ésteres de forbol, y en particular del denominado éster de triforbol (TPA) (Blumberg, 1980, Diamond y cols., 1980 y Slaga, 1983). En general, el proceso de promoción es

reversible cuando las células se exponen al promotor tumoral una sola vez; y se requieren varios tratamientos sucesivos para que el proceso de proliferación focal llegue a hacerse irreversible (Fig. 13, pág. 83). Es precisamente sobre la base de estas características por lo que se acepta, de forma general, que el mecanismo de promoción tumoral es de tipo epigenético. La proteína quinasa C ocupa un papel central en el proceso de promoción tumoral porque funciona como un receptor no sólo para los ésteres de forbol, sino también para otros agentes de promoción que no pertenecen a dicha familia (Castagna y cols., 1982 y Arcoleo y cols., 1985). El hecho de que la proteína quinasa C es un conocido segundo mensajero que participa en el modo de acción de varias hormonas, factores de crecimiento y otros estímulos externos que se transmiten al interior celular a través de receptores de membrana, sugiere la existencia de un mecanismo molecular común para varias clases de promotores tumorales. Aparentemente, los dos tipos de respuesta celular al tratamiento con agentes promotores tumorales (modificación de la diferenciación celular y estimulación celular) podrían estar mediados por la alteración en la expresión de unas y otras de las diversas formas moleculares de la proteína quinasa C presentes en las células diana.

Aunque es preponderante la evidencia a favor de un mecanismo epigenético como responsable del proceso de promoción, es importante tener en cuenta que los promotores tumorales también pueden provocar alteraciones genéticas, a pesar de carecer de actividad mutagénica. Los ésteres de forbol provocan roturas bicatenarias en el DNA, intercambios de material genético entre cromátidas homólogas, y otras aberraciones cromosómicas. Estas

alteraciones genéticas están mediadas aparentemente por la inducción de la liberación de radicales de oxígeno en las células diana (Cerutti, 1985). La inducción de radicales de oxígeno por los ésteres de forbol podría ser responsable de la producción de alteraciones en expresión genética a nivel de transcripción. Además, la actividad citotóxica de los radicales de oxígeno podría colaborar indirectamente en el proceso de promoción tumoral. Las diferencias a nivel estructural o funcional en los genes susceptibles a la acción de los promotores tumorales podrían justificar la diversidad de respuesta a dichos agentes observable en distintos tipos celulares, y en especies diferentes, en particular por lo que se refiere a la inducción del fenotipo neoplásico (Colburn, 1987).

4.3. Progresión.

La tercera y última fase del desarrollo tumoral comienza cuando, una vez establecido de forma irreversible el modelo focal de proliferación celular típico durante en la fase de promoción, uno o más de esos focos preneoplásicos sufre alteraciones adicionales que resultan en la expresión del fenotipo maligno. Las células malignas presentan una sucesión temporal de fenotipos neoplásicos que aparecen paralelamente a la adquisición secuencial de propiedades más agresivas. Las alteraciones de tipo genético son muy importantes en esta fase. Las células presentan una inestabilidad genómica intrínseca que se manifiesta en alteraciones del número y/o estructura de sus cromosomas, amplificación genética y cambios a nivel de expresión genética (Harris, 1991; Nowell, 1976, 1986). Típicamente, las células tumorales en la

fase de progresión son aneuploides. La inestabilidad genética de las células neoplásicas puede ser debida a las mutaciones adquiridas en las fases anteriores (Poste y cols., 1981), a errores genéticos hereditarios (Yunis y cols., 1984) o a factores extracelulares como la exposición a otros carcinógenos químicos, radiación, factores de crecimiento, hormonas, etc. (Klein y cols., 1985). Otros factores generales como la edad, sexo, hábitos nutricionales y estado general de la salud del paciente, e incluso la naturaleza del protocolo de tratamiento del tumor, pueden afectar la aparición de focos de proliferación más malignos y el crecimiento tumoral (Poste y cols., 1981 y Nowell, 1986).

La adquisición por las células neoplásicas de la capacidad de invadir el resto del tejido diana e incluso metastatizarse a otros tejidos u órganos, es la característica del proceso de progresión tumoral con mayor impacto a nivel clínico (Slaga, 1983). Por otra parte, durante la progresión tumoral hay un incremento en la proporción de células en el tumor incipiente que se divide activamente, aunque mantiene los parámetros típicos de su ciclo celular, tiempo de generación, etc. En la mayoría de los casos el incremento consecuente en la velocidad de crecimiento del tumor suele ir acompañado por un proceso de desdiferenciación celular, una reducción de su capacidad antigénica, la adquisición de resistencia a agentes quimioterapéuticos, la expresión de antígenos tumorales y de otras proteínas inadecuadas cualitativa o temporalmente para el tipo celular o tejido en que se desarrolla el tumor (Sager, 1985).

Las células poseen una serie de mecanismos para garantizar, durante la división celular, la fidelidad en la duplicación de su DNA y su distribución equitativa entre las células hijas. Los pasos metabólicos que participan en esos mecanismos, junto a los que intervienen en el control de modificaciones reguladoras del DNA, desempeñan las “funciones de estabilidad genómica”. Se ha propuesto que el incremento en la inestabilidad genómica que ocurre durante la fase de progresión tumoral es causado por mutaciones en genes implicados en dichas funciones, o por interferencias exteriores en su funcionamiento normal (Cheng y cols., 1993). Cada mutación en los genes con funciones de estabilidad genética actuaría en cascada favoreciendo la acumulación de nuevas mutaciones y errores metabólicos. Este concepto de progresión tumoral como la acumulación secuencial de mutaciones en los genes de estabilidad genómica es consistente con los datos epidemiológicos y moleculares sobre el desarrollo del cáncer en humanos. Por una parte, la incidencia de tumores aumenta con la edad y es mayor en personas que sufren síndromes caracterizados como de inestabilidad cromosómica, y por otra, se ha demostrado que los tumores humanos contienen múltiples alteraciones genéticas (Fearon y cols., 1992). Considerando estos datos y teniendo en cuenta la frecuencia de mutaciones espontáneas en células humanas (alrededor de 1.5×10^{-10} mutaciones por par de bases del DNA, por división celular), Loeb (1991) propuso la necesidad de un “fenotipo mutador” como un requerimiento para el desarrollo multiescalonado de los tumores. De hecho, tal hipótesis ha sido confirmada recientemente al describirse la existencia de genes “mutadores” en tumores humanos (Ionov y cols., 1993, Peltomäki y cols., 1993 y Thibodeau, 1993).

Entre los procesos celulares implicados en funciones de mantenimiento de la estabilidad genómica cuya alteración puede favorecer el desarrollo tumoral habría que incluir mecanismos que garantizan (a) el mantenimiento de la secuencia del DNA durante su replicación, reparación y recombinación, o el control del ciclo celular, etc., (b) el mantenimiento de la dotación cromosómica normal y su apropiada segregación en la división celular, y (c) la programación epigenética adecuada en lo referente a diferenciación celular y a la respuesta a cambios ambientales. La alteración de la función de los genes implicados en misiones de estabilidad genómica puede ser causada y/o resultar en procesos de (a) amplificación genética, (b) inserción, delección, sustitución, inversión, recombinación y translocación cromosómica, (c) pérdida o ganancia en el número de cromosomas, y (d) alteraciones epigenéticas en el nivel de la expresión y/o la pérdida de función de determinados genes (Cheng y cols., 1993).

La probabilidad y el impacto de las alteraciones genéticas que favorecen la inestabilidad genómica pueden estar condicionados por diversos factores intrínsecos de las células que constituyen el tumor en desarrollo. Entre estos factores cabe considerar (a) el tamaño celular, (b) la frecuencia de muerte celular, (c) la fase de desarrollo tumoral, (d) el estado mitótico del tumor, y (e) la naturaleza de la alteración genómica misma.

En primer lugar, es obvio que, cuanto menor sea el tamaño de las células de un tumor, mayor será el número de células necesario para alcanzar una determinada masa tumoral; en consecuencia, la probabilidad estadística de

aparición de nuevos errores genéticos es siempre mayor en tumores de células pequeñas; de hecho, los tumores de células pequeñas tales como los carcinomas de células pequeñas de pulmón suelen tener peor pronóstico que los que afectan a células de mayor tamaño. Del mismo modo, los tumores con alta frecuencia de mutaciones letales o con vascularización limitada tardarán más tiempo en alcanzar una determinada masa tumoral, y al aumentar la escala temporal de crecimiento tumoral aumenta también la probabilidad de acumulación de errores genéticos. Por otra parte, si las alteraciones en los genes de estabilidad genómica tienen lugar al principio del desarrollo tumoral, cuando las células poseen su máxima capacidad proliferativa, parece obvio que tengan mayor impacto que si ocurren en fases tardías del crecimiento neoplásico, cuando el tumor ha alcanzado, o está próximo a alcanzar, su tamaño límite; este aspecto se corresponde perfectamente con la dependencia, mencionada anteriormente, entre la frecuencia de alteraciones en genes de estabilidad genómica y el estado mitótico del tumor, es decir, la proporción de células tumorales que se encuentran en fase de división activa en el momento que ocurren dichas alteraciones genéticas. Por último, la influencia de la naturaleza de la alteración genética en sí misma se explica en función de la diferencia significativa que existe entre la frecuencia de mutaciones espontáneas, considerada globalmente como resultado de diversos mecanismos moleculares, es del orden de 10^{-7} por gen (Monnat, 1989 y Oller y cols., 1989), mientras que la frecuencia de pérdida de información genética (considerando la pérdida de los dos alelos del mismo gen) es varios órdenes de magnitud superior (Hakoda y cols., 1990).

En este sentido es importante considerar que la pérdida de un solo alelo de los genes de mantenimiento de la estabilidad genómica no tiene efectos fenotípicos directos, ya que las células mantienen el funcionamiento normal del otro alelo; sin embargo, cuando la pérdida de información genética es debida a alteraciones estructurales a nivel cromosómico, pueden predisponer a la pérdida del segundo alelo del gen afectado. Todos estos factores afectan la inducción de alteraciones en los genes de estabilidad genómica en un contexto celular, sub-tumoral y orgánico que, dadas sus características peculiares, pueden participar en la modulación del proceso de carcinogénesis; propiedades relacionadas con la capacidad de producción de radicales de oxígeno, susceptibilidad constitucional a mutágenos ambientales, mecanismos inflamatorios, etc., afectan el desarrollo tumoral. De hecho, se ha demostrado que las condiciones microambientales (nutrientes, oxígeno, pH, etc.) son distintas en regiones sub-tumorales diferentes (Sutherland, 1988).

La fase de progresión tumoral, en conjunto, aparece como un proceso en el que tanto los factores intrínsecos de las células preneoplásicas como los agentes extrínsecos derivados de los ambientes endógeno y exógeno del individuo en que el tumor se desarrolla, contribuyen a la acumulación secuencial de alteraciones en los genes de mantenimiento de la estabilidad genómica. La aparición del “fenotipo mutador” en las células, contribuye a iniciar la cascada de alteraciones genómicas que resulta en la expresión por parte del tumor de propiedades progresivamente más malignas. Es importante resaltar que la existencia de genes “mutadores” y su contribución a la alteración de mecanismos de control y mantenimiento de la fidelidad del ciclo celular ha

sido claramente establecida en levaduras (Hartwell y cols., 1991). La identificación y el aislamiento de genes mutadores humanos, y su caracterización estructural y funcional aparecen como una de las áreas de investigación que debe proporcionar en un futuro próximo abundante información sobre los mecanismos de progresión tumoral y, tal vez, sobre las alternativas moleculares para prevenir o detener el desarrollo carcinogénico.

4.4. Comportamiento del cáncer de tiroides.

El adenoma folicular (FA) comienza como un tumor encapsulado con evidencia de diferenciación celular folicular, y es la neoplasia tiroidea más común. Los tumores malignos pueden ser clasificados como bien diferenciados, poco diferenciados o indiferenciados. El cáncer de tiroides bien diferenciado está clasificado en dos tipos: carcinoma tiroideo papilar (PTC) y carcinoma tiroideo folicular (FTC). El PTC muestra evidencia de diferenciación celular folicular y se caracteriza por la formación de papilas y un conjunto de cambios nucleares distintivos. El FTC ha sido definido como un tumor epitelial maligno que muestra evidencia de diferenciación celular folicular pero carentes de rasgos de PTC y cuya identificación requiere invasión de la cápsula, vasos sanguíneos o tiroides adyacente. El hecho es que ambos, PTC y FTC, muestran diferenciación celular folicular que es clínicamente muy relevante. Por ello, el tratamiento del cáncer de tiroides bien diferenciado (PTC y FTC) está basado en tiroidectomía total, dosis absolutas de radioiodida y tratamiento supresivo con tiroxina para disminuir los niveles séricos de TSH. También explica un seguimiento basado en las medidas séricas de Tg (tiroglobulina) y

exploraciones con radioiodida y porqué esos tumores malignos tienen un resultado muy bueno. Por el contrario, el carcinoma tiroideo anaplásico indiferenciado (ATC) es una neoplasia altamente maligna, no encapsulada y sin evidencia de diferenciación celular folicular. Se compone por células atípicas que exhiben numerosas mitosis y forman una variedad de modelos. ATC no acumula yodo y no produce Tg. La presencia de focos de PTC y FTC sugiere que puede ser precursor de ATC. El carcinoma poco diferenciado (PDC) ha sido definido como un tumor de origen folicular con atributos morfológicos y biológicos entre bien diferenciado y ATC. Esta clasificación, basada en características clinicopatológicas, desde hace mucho tiempo es la base para la investigación del cáncer de tiroides, excepto para PDC y ATC, la mayor parte de estos pacientes se curan de la enfermedad (Schlumberger y cols., 2003).

Sin embargo, aunque el cáncer de tiroides tiene, en términos generales, un buen resultado, hay todavía cuatro cambios críticos que los puntos de vista clinicopatológicos clásicos no han podido resolver:

(i) 15-20% de las aspiraciones de aguja fina (FNA) son inconclusas o no se puede discriminar entre adenoma folicular y carcinoma, por lo que el paciente necesita sufrir una tiroidectomía parcial o total para un diagnóstico.

(ii) Se estima que sobre el 20% de los pacientes con carcinoma de tiroides bien diferenciado desarrollarán una recurrencia local o distante y el 1% morirá (Fleming y cols., 2002). Identificándose a estos pacientes de alto riesgo durante la diagnosis mediante factores pronósticos bien establecidos puede ayudar a

acertar con el más apropiado tratamiento para que mejoren los resultados en éstos pacientes. Aunque hay varios sistemas de pronóstico, como la clasificación de las metástasis nodulares de tumor (TNM) (Schlumberger y cols., 2003), desarrollados para el cáncer de tiroides, lamentablemente hay todavía un debate abierto sobre la definición y desarrollo de pacientes de bajo riesgo contra los de alto riesgo, y cada centro utiliza sus propios protocolos (Fleming y cols., 2002).

(iii) Todavía no existe tratamiento para una de las situaciones más intrigantes con las que un endocrinólogo podría enfrentarse: pacientes con elevada Tg sérica y medidas negativas para I¹³¹. Esto llama la atención en la dirección que toma el cáncer de tiroides, así como la localización anatómica de recidivas que no pueden ser evaluadas y el tratamiento con dosis absolutas de I¹³¹ que no son efectivas, prediciendo un mal pronóstico.

(iv) El ATC, aunque raro, es extremadamente agresivo, acabando en muerte en el 100% de los casos en unos pocos meses. Recientes avances en biología molecular del cáncer de tiroides han mejorado tremendamente el entendimiento de los mecanismos que son la base de la patogénesis del cáncer de tiroides, especialmente en el inicio tumoral.

5. Biología molecular del cáncer de tiroides.

5.1 Oncogenes y transmisión de la señal por receptores de tirosina quinasa (RTK)

La respuesta de una célula a un determinado factor requiere que la célula posea receptores para ese factor (ligando). Los receptores funcionan como una especie de antenas moleculares que reciben la señal y la transmiten al interior de la célula en forma de reacciones bioquímicas encadenadas que constituyen la vía de transmisión de la señal. Esta llega al núcleo e induce la expresión de genes específicos cuyos productos determinan la respuesta o fenotipo celular. El tipo de respuesta dependerá de la expresión de receptores para otros factores, de la posible interacción entre éstos, y entre los componentes de las diferentes vías de transmisión de la señal presentes en la célula, la etapa de desarrollo del organismo y la interacción con otras células y componentes de la matriz extracelular.

La transmisión de la señal se inicia con la unión del ligando al receptor, que como consecuencia se autofosforila en tirosina y presenta sitios de unión para sustratos específicos los cuales son activados por diversos mecanismos. La activación de los sustratos constituye el primer paso de la vía de la transmisión de la señal que debe llegar al núcleo, donde se produce la respuesta celular específica de proliferación, diferenciación, etc.

Existen evidencias bioquímicas y genéticas de que una gran variedad de estímulos tanto mitogénicos como de diferenciación, mediados por diferentes ligandos, convergen en la proteína P21^{ras}. Esta proteína une nucleótidos de guanina y se comporta como un interruptor molecular que oscila entre un estado inactivo, unida a GDP, y otro activo, unida a GTP. La transmisión de la forma inactiva a la activa requiere el intercambio de GDP por GTP, proceso catalizado por las proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina, conocidas como factores de intercambio o factores de liberación de nucleótidos de guanina, GNRFs. La inactivación del complejo P21^{ras}-GTP la lleva a cabo la actividad intrínseca GTPasa de P21^{ras}, que es estimulada por una proteína activadora denominada RAS-GAP.

De acuerdo con esto, los factores intercambiadores son reguladores positivos de RAS, mientras que GAP sería un regulador negativo. Existe, sin embargo, una cierta controversia porque en algunos casos parece que GAP, o proteínas relacionadas como NF1, al estimular la transición P21^{ras}-GTP a P21^{ras}-GDP, a la vez que inactivan el complejo, podrían actuar como efectores transmitiendo la señal desde RAS activado a los eslabones siguientes de la cadena de transmisión de la señal (Martín y cols., 1992, Duchesne y cols., 1993; Rey y Hall, 1993 y Marshall, 1993). Se conocen, a nivel molecular, las conexiones entre ciertos receptores tirosina quinasa y RAS, a través de la molécula adaptadora GRB2/SEM5 y el intercambiador de nucleótidos SOS. GRB2 es una molécula constituida por dos dominios SH2 y uno SH3, que fue aislada de células de mamíferos por su capacidad de unirse a residuos de fosfotirosina del extremo carboxi-terminal del receptor del EGF (Lowenstein y

cols., 1992). SEM5 es una molécula homóloga a GRB2, identificada en *C. elegans* como producto de un gen que funciona en la ruta de señalización de un receptor tirosina quinasa, producto del gen *let-23*, entre éste y *ras* (Clark y cols., 1992).

SOS fue identificado en *Drosophila melanogaster* como una proteína componente de la vía de señalización de un receptor tirosina quinasa implicado en el desarrollo del fotorreceptor R7 del ojo de la mosca (Simon y cols., 1991). Se han aislado homólogos de SOS tanto humanos como de ratón, que poseen actividad intercambiadora GDP/GTP de H-*ras* (Bowtell y cols., 1992 y Chardin y cols., 1993).

GRB2 y SOS se asocian entre sí por interacción directa del dominio SH3 y GRB2 con una región rica en residuos de prolina del extremo carboxilo de SOS. La combinación de estudios genéticos en *Drosophila* y *C. elegans* con estudios bioquímicos utilizando los homólogos de mamíferos han permitido elaborar el siguiente modelo de conexión entre los RTK y RAS.

En ausencia de estímulo extracelular el receptor está desfosforilado y RAS se encuentra unido a GDP, inactivo. En estas condiciones, la molécula adaptadora GRB2 se encuentra en el citoplasma unida a SOS. La activación del receptor de EGF conduce a la fosforilación del residuo Y1068 del receptor, al cual se une el complejo GRB2-SOS, a través del dominio SH2 del adaptador. Como consecuencia, el complejo se transloca a la membrana induciendo el intercambio del GDP unido a RAS por GTP, debido a la actividad

intercambiadora que posee SOS, dando lugar a la formación del complejo P21^{ras}-GPT, activado (Egan y cols., 1993; Rozakis-Adcock y cols., 1993; Li y cols., 1993; Gale y cols., 1993 y Buday y cols., 1993). (Fig. 14, pág. 101).

Aparentemente, la actividad intrínseca de SOS no cambia por la estimulación del receptor del EGF, de forma que la activación de RAS se debería únicamente a la translocación de SOS a la membrana, aumentando su concentración cerca de P21^{ras}. No obstante, SOS es fosforilado en serina y treonina como resultado de la estimulación de las células por EGF, PDGF, FGF e insulina. El significado funcional de esta fosforilación es desconocido.

Además de este modelo descrito en fibroblastos, existen otras vías de activación de RAS que utilizan otras moléculas adaptadoras como SHC, y otros intercambiadores de nucleótidos como VAV o P140^{ras}-GNRF. Aunque las proteínas RAS son ubicuas, su estimulación puede ser modulada de forma específica por reguladores específicos de tejido. Así, por ejemplo, el producto del protooncogen *vav*, expresado exclusivamente en células hematopoyéticas (Katzav y cols., 1989) está implicado en la activación de RAS mediada por el receptor de las células T, aparentemente debido a una actividad intercambiadora de nucleótidos intrínseca de VAV, que, a diferencia del caso de SOS, es activada por fosforilación en tirosina (Gulbins y cols., 1993). Otro factor intercambiador específico de tejido se ha clonado a partir de cerebro humano por su semejanza estructural y funcional con el gen *cdc25* de *S. cerevisiae* (Shou y cols., 1992 y Martegani y cols., 1992).

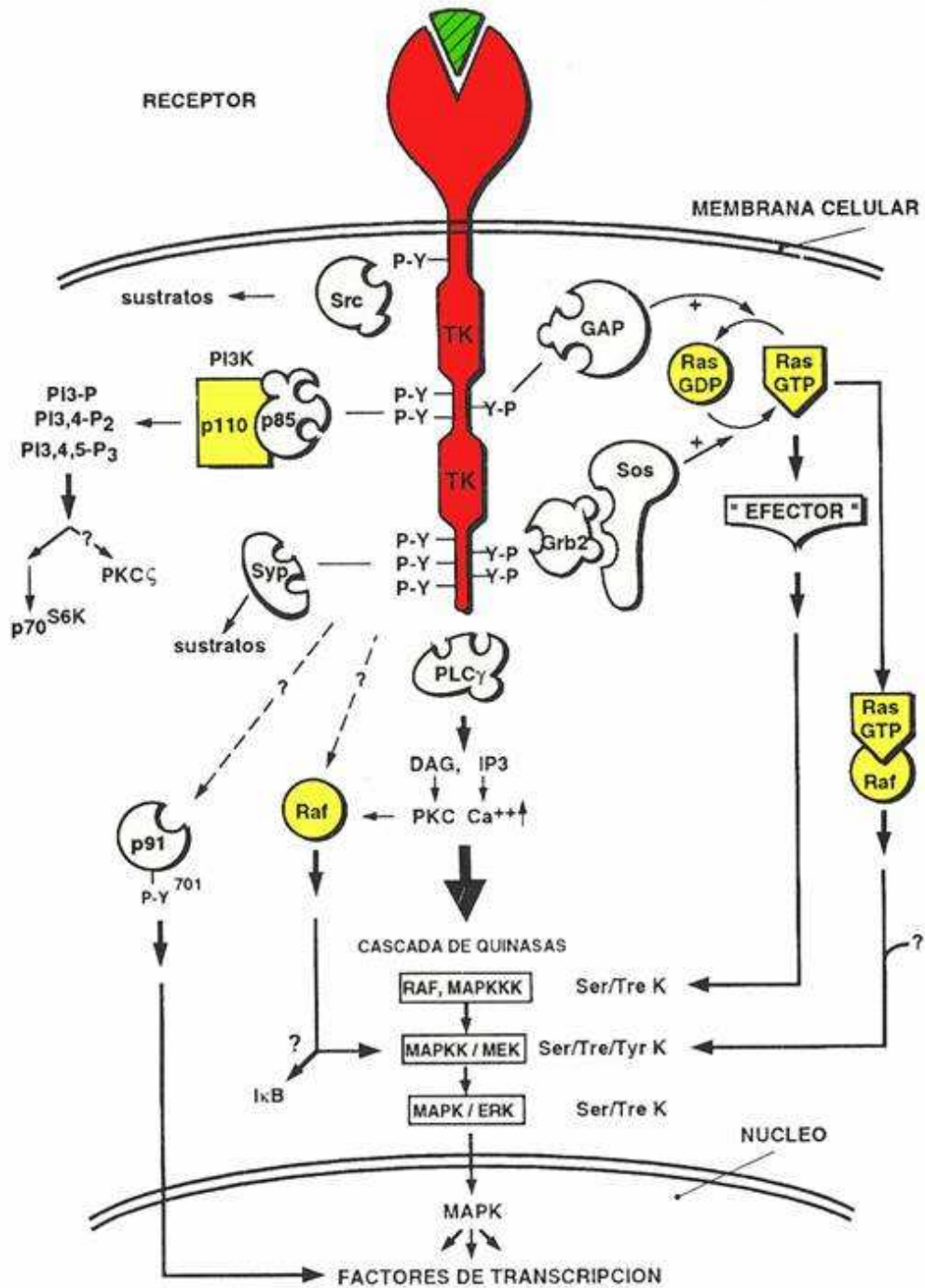


Figura 14. Señalización por receptores tirosina quinasa. Esquema de un receptor ideal en asociación con los sustratos de RTKs descritos hasta la fecha. Se muestra la conexión del receptor con Ras a través del complejo Grb2/Sos; de Ras con Raf; y de todos los sustratos con la cascada de quinasas. A la izquierda se indica también la vía directa a través de p91 (SIF).

Dominios indicados: SH₂ (—), SH₃ (>) (Fundación Científica AECC, 1994).

Esta molécula no tiene dominio rico en residuos de prolina, por lo que su conexión con los receptores debe utilizar mecanismos diferentes a los descritos para SOS.

Por otra parte, la conexión entre el receptor de insulina y RAS hace por medio de una molécula de anclaje, IRS-1, que se fosforila en múltiples residuos de tirosina por el receptor de insulina estimulado (Sun y cols., 1991 y Skolnik y cols., 1993). Estas fosfotirosinas en IRS-1 sirven de sitio de unión a múltiples proteínas con dominios SH₂ como los complejos GRB2-SOS, P85-PI3K, SHC o SYP.

Por último, la molécula adaptadora SHC parece también implicada en la regulación de RAS en varios sistemas, como es el caso, de la diferenciación de células PC-12 inducida por NGF o por sobreexpresión de la misma SHC; en la transformación de células por *v-src*; y en células estimuladas por insulina, FGF y otros factores (Pawson y cols., 1993).

Uno de los primeros blancos descritos de los receptores tirosina quinasa es el producto del protooncogen *c-raf*, una serina/treonina quinasa que se asocia al receptor del PDGF estimulado por su ligando. A diferencia de otros sustratos de RTKs, RAF no posee dominios SH₂, por lo cual se supone que su asociación al receptor requiere una proteína adaptadora desconocida. La unión de RAF al receptor de PDGF estimula la fosforilación de RAF en residuos de serina, y quizás algo en tirosina. La forma hiperfosforilada de RAF posee una actividad serina/treonina quinasa aumentada (Morrison y cols., 1989). Por otra

parte, existen múltiples evidencias bioquímicas y genéticas según las cuales RAF es el eslabón siguiente a RAS en la cadena de transmisión de señales en una gran variedad de sistemas biológicos (Vojtek y cols., 1993).

Se ha demostrado que RAS activado interacciona con RAF. Esta asociación requiere que RAS esté unido a GTP y que el dominio efector de RAS esté intacto (Zhang y cols., 1988, Vojtek y cols., 1993 y Moodie y cols., 1993), lo cual parece indicar que RAF es un efector de RAS. RAF es capaz de asociarse con RAS y fosforilar a una enzima denominada MAP quinasa quinasa, MAPKK o MEK, situada al principio de la cascada de quinasas responsable de que la señal llegue al núcleo (Pelech y cols., 1992). Es posible, aunque no se ha probado, que la unión de RAS a RAF estimule la actividad quinasa de esta última, iniciando la cascada, de forma que RAF establecería una conexión directa entre los acontecimientos en la membrana, activación de tirosina quinasa y de RAS, y que la serie de fosforilaciones que ocurren en el citoplasma y que culminan con la fosforilación de proteínas nucleares. Otra alternativa es que la unión de RAS y RAF sirva para translocar esta quinasa a la membrana plasmática, donde puede ejercer diversas funciones, como modular la actividad GTPasa de RAS o la estimulación de ésta por GAP (Zhang y cols., 1993). Por otra parte RAF puede fosforilar sustratos localizados en la membrana, o ser fosforilada por otras quinasas allí localizadas. Esta fosforilación de RAF podría ser necesaria para estimular su actividad (Crews y cols., 1993). RAS y RAF se ha encontrado asociados en un complejo de más de 250 kDa. en fibroblastos transformados por *ras* y tras activación del receptor de células T.

Se ha postulado que RAF y MAPKKK (MEKK) ocupan una posición equivalente al inicio de la cascada de quinasas, donde ambas pueden fosforilar y activar a la MAPKK. En RAF y MEKK convergen dos tipos de señales diferentes; las iniciadas por los RTKs serían mediadas por *Raf*, mientras que la señalización de receptores acoplados a proteínas G, o vía PKC, serían mediadas por MEKK (Lange-Carter y cols., 1993) (Fig. 14, pág. 102).

El último componente de la vía, MAPK, se transloca al núcleo como consecuencia de su fosforilación en respuesta a la activación de los receptores, y allí fosforila factores de transcripción y otras proteínas nucleares que son los responsables últimos de la respuesta celular (Hunter y Karin, 1992). La activación de la MAPK es un punto de convergencia de muchas vías de señalización tanto mitogénicas como de diferenciación, de forma que una activación constitutiva de esta quinasa (*rolled*) activa vías de señalización tan diversas como las iniciadas por los receptores *Sev*, *Torso* o el receptor del EGF en *Drosophila* (Brunner y cols., 1994).

La Figura 15 (pág. 107) muestra un esquema simplificado de las vías que participan en la transmisión de la señal por receptores tirosina quinasa, en la cual no se han representado las múltiples interconexiones entre las diferentes rutas, ni muchas de las moléculas implicadas en la regulación negativa de las mismas, que proporcionan un alto grado de regulación para que la respuesta celular esté controlada.

Cada una de las proteínas señalizadoras tiene una estructura modular más o menos compleja que puede incluir un dominio catalítico con actividad enzimática; dominios implicados en la interacción con componentes anteriores y posteriores de la vía, incluyendo los sustratos; y dominios importantes para la regulación positiva y negativa, ejercida por otras proteínas. Esta estructura permite que las moléculas de la vía puedan recibir y emitir información en conexión con otras muchas proteínas, comportándose como nodos de una red o quizás de forma análoga a los “chips” de los circuitos electrónicos.

Por otra parte, la estructura modular permite que alteraciones en diferentes dominios puedan anular alguna función importante de la proteína sin afectar a otras, dando lugar, por ejemplo, a proteínas con actividad enzimática constitutiva que no puede ser regulada porque se haya alterado el dominio responsable de la interacción con reguladores negativos.

En general, cualquier mutación que suponga una ganancia de función de las moléculas encargadas de la señalización mitogénica puede conducir a un crecimiento celular incontrolado. Por otra parte la interferencia con las rutas que conducen a la diferenciación celular puede desencadenar el proceso opuesto, proliferativo.

La mayor parte de los oncogenes dominantes conocidos corresponden a formas alteradas de moléculas que juegan un papel importante en los procesos de transmisión de señales de proliferación y diferenciación. De forma que el esquema que representa a las oncoproteínas según su localización en la célula

es prácticamente idéntico al esquema de las vías de transmisión de la señal (Fig.15, pág. 108).

Hay oncogenes cuyos productos son factores de crecimiento como *sis*, *hst*, *int-1*, *int-2*, *fgf-5*, etc. Otros codifican receptores tirosina quinasa alterados de tal forma que están constitutivamente activados, en ausencia de ligando. Existen oncogenes que codifican tirosina quinasas no receptores, como los de la familia SRC.

Dado el papel central que juega la proteína RAS en cuya activación convergen multitud de señales proliferativas y de diferenciación, la activación constitutiva de P21^{ras} la convierten en un oncogén muy frecuente en tumores humanos de muy diversos orígenes (Bos, 1989).

Otra proteína integradora es la serina/treonina RAF que recibe señales de RAS y de otros efectores como PKC y las transmite hacia la cascada de las MAP quinasas. Mutaciones que suponen una ganancia de función de RAF, incluyendo deleciones de su dominio N-terminal, implicado entre otras cosas en la interacción con RAS, le convierten en un potente oncogén (Heidecker y cols., 1990 y Vojtek y cols., 1993). Otros oncogenes que codifican serina/treonina quinasas son *mos*, *pim*, *cot*, etc.

Como cabría de esperar, los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina que catalizan la activación de *ras*, pueden ser oncogénicos si se activan constitutivamente.

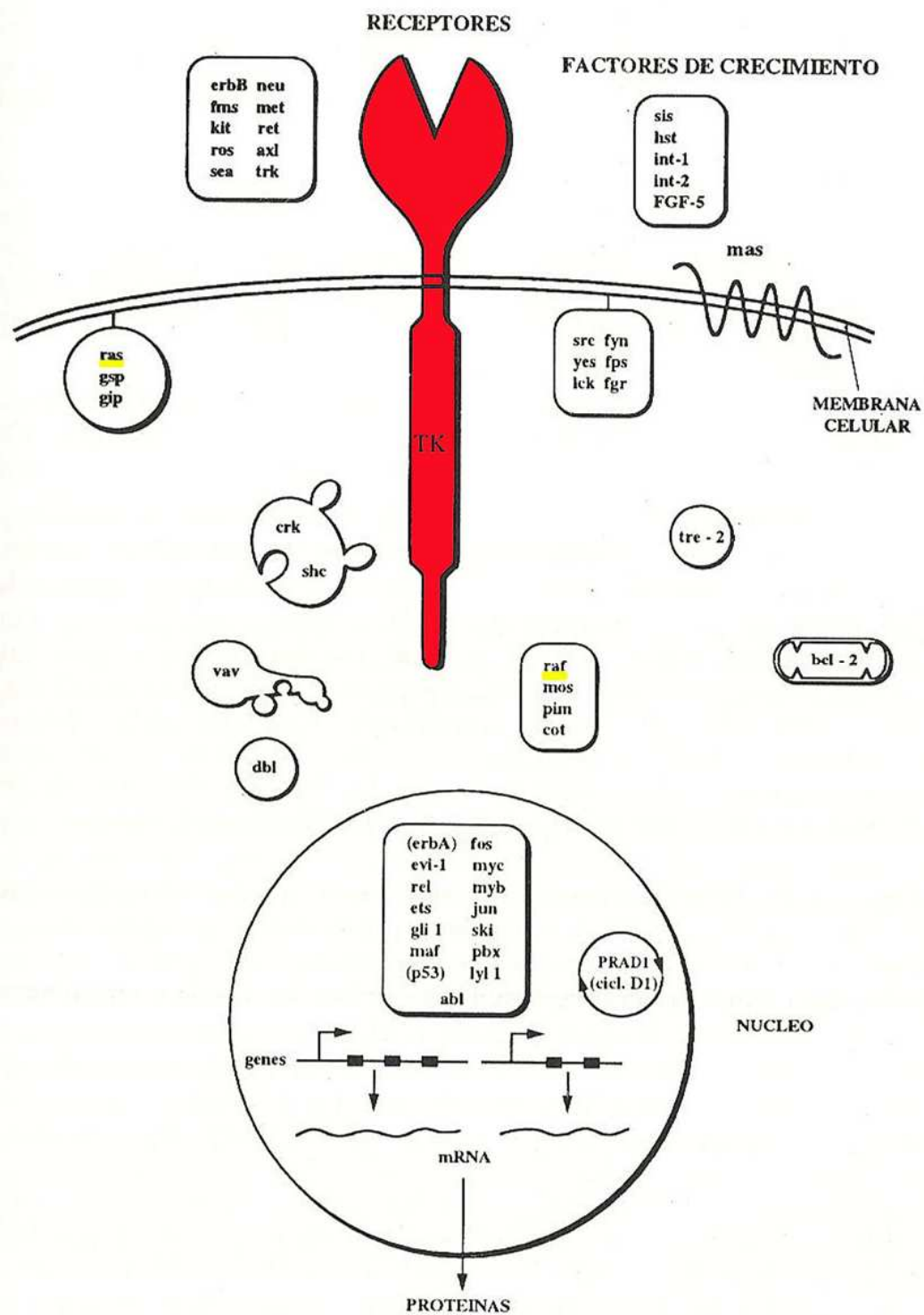


Figura 15. Localización subcelular de las proteínas oncogénicas. Los productos de los oncogenes dominantes son componentes alterados de las vías de transmisión de la señal. Obsérvese el paralelismo entre ésta figura y la Figura 14 (pág. 101) (Fundación Científica AECC, 1994).

De este tipo son los productos de los oncogenes *vav* y *dbl*. Además, *src* puede inducir transformación si es sobreexpresado en fibroblastos (Egan y cols., 1993).

Hay oncogenes que codifican formas mutadas de adaptadores/sustratos de tirosina quinasas, con dominios SH₂ y SH₃, como *crk*, *shc*, *nck*, etc. Algunas de estas proteínas, como CRK, deben la capacidad transformante a su interacción con residuos de fosfotirosina implicados en la regulación negativa de tirosina quinasas como SRC (Cantley y cols., 1991). Por el contrario, la sobreexpresión de moléculas adaptadoras como *sbc*, *nck* y *grb2* induce la emisión constitutiva de señales estimuladoras a las etapas siguientes de la vía de señalización iniciada en tirosina quinasas tanto tipo SRC como tipo receptor. Dado el papel central de las MAP quinasas como integradoras de múltiples señales, y como responsables de su transmisión directa al núcleo, resulta sorprendente que no se haya encontrado ninguna MAP quinasa activada oncogénicamente. El hecho de que la activación de las MAP quinasas requiera su fosforilación en múltiples sitios, mecanismo probablemente diseñado para evitar su activación accidental, podría explicar que no sea fácil que se activen como oncogenes. Por último, las proteínas nucleares, blanco final de la vía de señalización, como factores de transcripción, (*ets*, *rel*, *ski*, *evi-1*, etc.) y los productos de genes de inducción temprana por factores de crecimiento, (*fos*, *jun*, *myc*, etc.) pueden activarse oncogénicamente por alteraciones estructurales que estimulen constitutivamente su capacidad de regular la transcripción génica, o por sobreexpresión. Recientemente, se ha implicado incluso una ciclina de G1, la ciclina D1, en carcinogénesis humana como el

oncogén *prad1*, el cual se ha encontrado reordenado en adenomas paratiroideos. Como consecuencia del reordenamiento el promotor de la hormona paratiroidea se sitúa en la región 5' de *prad1* causando la sobreexpresión de su producto, la ciclina D1. La acumulación de las ciclinas de G1 es probablemente el factor limitante para que las células pasen el punto de restricción (R) y se “comprometan” a la entrada en fase S y en mitosis. La ciclina D1 es inducida por CSF-1 y tal vez por otros factores de crecimiento al final de la fase G1, por lo que conceptualmente su capacidad de inducir transformación no es diferente de la de otros genes de inducción temprana no inmediata, como *myc*. Puesto que los adenomas paratiroideos son benignos, parece que la sobreexpresión de la ciclina D1 sólo confiere una ventaja proliferativa, sin llegar a causar tumores invasivos. Todas las evidencias indican que el gen *prad1* es el oncogén *bcl-1*, frecuentemente implicado en linfomas/leucemias de células B. Además, *prad1/bcl 1*, *int-2* y *hst* se encuentran en el mismo amplicón, en el cromosoma 11q13, que se encuentra frecuentemente amplificado en tumores de mama y de células escamosas, de forma que la ciclina D1 podría ser responsable principal del fenotipo tumoral en estos casos (Motokura y Arnold, 1993).

La vía de señalización descrita está sometida a un control negativo ejercido a todos los niveles desde el exterior de la célula hasta el núcleo. Son componentes de esa vía negativa, los inhibidores del crecimiento, las proteína fosfatasas, los reguladores negativos de RAS, los inhibidores endógenos de quinasa y fosfatasas, y las proteínas nucleares reguladoras del ciclo celular, como pRb; o aquellas encargadas de retrasar la replicación del DNA dañado

hasta que esté reparado, o en su caso de inducir la muerte celular programada o apoptosis, como p53.

La pérdida de función de estas proteínas reguladoras negativas de la proliferación, al eliminar un freno de ésta, puede conducir al crecimiento incontrolado y a la transformación maligna.

Los genes que codifican estas proteínas se denominan oncogenes recesivos y hoy se sabe que la carcinogénesis es un proceso multietapa que requiere la cooperación de los dos tipos de oncogenes descritos, dominantes y recesivos (Vogelstein y Kinzler, 1993).

5.2. Oncogenes derivados de receptores tirosina quinasa.

Los receptores de los factores de crecimiento ocupan una posición clave en la vía de transmisión de las señales mitogénicas y de diferenciación. Estos receptores tienen una estructura modular, la más compleja entre los componentes de la vía, con un dominio catalítico con actividad tirosina quinasa, en cuya regulación positiva y negativa están implicados todos los demás dominios de la molécula.

Desde el descubrimiento de que el oncogén viral *v-erbB* codificaba una forma alterada del receptor del EGF, se han descrito al menos 13 oncogenes cuyos productos derivan de receptores tirosina quinasa. Las alteraciones

estructurales de estos oncogenes, aunque diferentes en los detalles, tienen varios aspectos comunes:

1. La alteración da lugar a un receptor aberrante con actividad tirosina quinasa constitutiva, debido a la eliminación o mutación de dominios implicados en la regulación negativa, como el dominio extracelular que ejerce un control negativo sobre la actividad del receptor que es liberado, fisiológicamente por la unión del ligando, y en la oncogénesis por mutación. La mayor parte de las oncoproteínas derivadas de los RTKs carecen de dominio extracelular, por lo que no pueden unir ni responder al ligando. Otras mutaciones, así como las fusiones con otras proteínas, parecen inducir la dimerización del ligando con la consiguiente estimulación de la actividad quinasa del receptor.

2. En muchos casos los oncogenes RTK se expresan en tipos celulares diferentes de aquellos en los que se expresa el gen normal. Esto, unido a la activación constitutiva de la quinasa, puede dar lugar a la fosforilación no fisiológica de sustratos y a la transformación de estos tipos celulares.

3. La proteína oncogénica tiene a veces una localización subcelular anormal de forma que puede interactuar con y fosforilar sustratos inadecuados, o a los sustratos normales en el compartimento celular inadecuado.

4. Otro mecanismo de activación oncogénica de los RTKs es la sobreexpresión de receptores estructuralmente normales en células que expresan también el ligando o son estimuladas por éste. La sobreexpresión de un receptor podría favorecer la formación de complejos activos ligando-receptor a bajas concentraciones de ligando, como las que se dan normalmente en el organismo, que conferirían a la célula con mayor número de receptores una ventaja proliferativa.

Muchos de los eventos genéticos en el inicio tumoral han sido identificados y bien definidos en el cáncer tiroideo. Durante las dos pasadas décadas, los genes activadores de cáncer mediante la ruta MAP quinasa, (MAPK)-principalmente, la mutación V600E del BRAF, reordenaciones RET/PTC y mutaciones en RAS- han estado claramente implicadas en la patogénesis de PTC (Xing, 2005). Posteriormente fue descrito que tres de ellos eran mutuamente exclusivos y se cree que son los causantes en la patogénesis de una proporción significativa de PTC. Igualmente, existe una evidencia interesante que sugiere que los genes activadores del cáncer mediante la ruta del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-PI3KCA y PTEN- están implicados en la patogénesis de FTC (Xing, 2005). Dos clases de evidencias demuestran que los acontecimientos genéticos anteriormente descritos probablemente son acontecimientos de inicio tumoral. Uno de ellos es la presencia de mutaciones en microcarcinomas. El otro surge de estudios con ratones transgénicos, donde la activación específica de esos oncogenes en el tiroides provoca un fenotipo tumoral muy similar al observado en humanos. Finalmente, los mecanismos de

desregulación de p53 parecen ser un segundo paso importante, permitiendo la formación de PDC/ATC (Fig. 16) (Riesco-Eizaguirre, 2007).

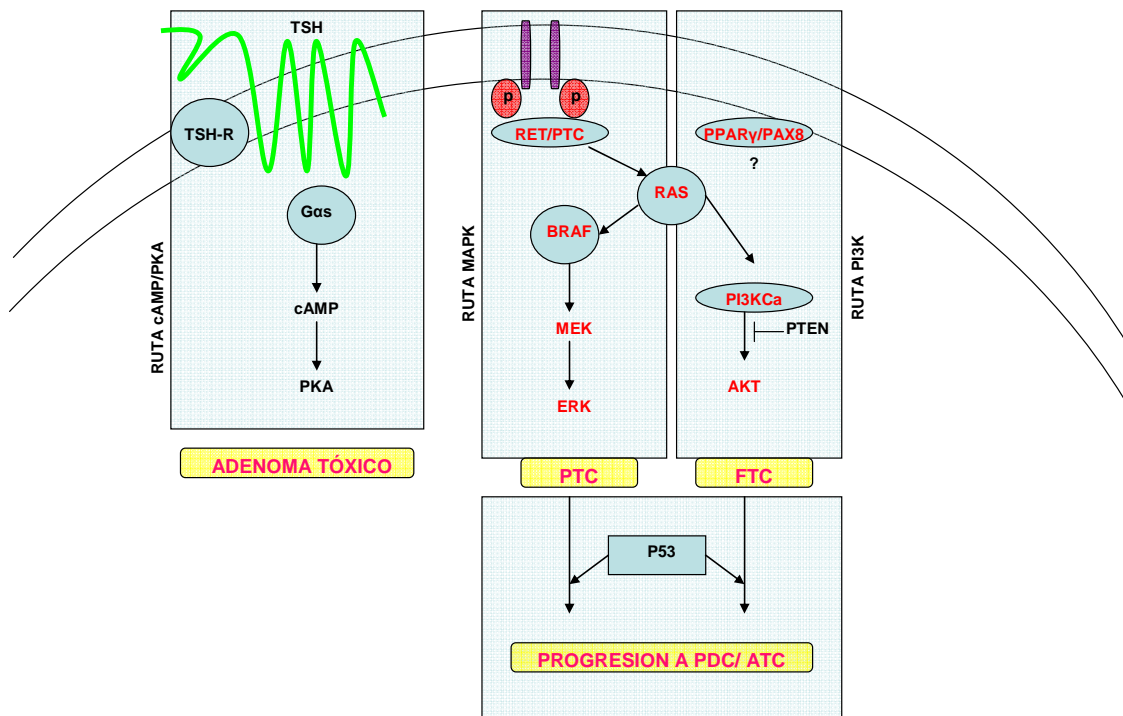


Figura 16. La célula tiroidea necesita, para su proliferación y crecimiento, la activación combinada de las rutas cAMP/PKA, MAPK y PI3K, mediada por la TSH y otros factores de crecimiento. El fenotipo tumoral puede diferir en parte de acuerdo con la preexistencia de una ruta aberrantemente activada y la temprana o tardía progresión tumoral. Esto ha conducido al desarrollo de nuevas terapias que bloquean estas rutas (Riesco-Eizaguirre, 2006).

5.3. El oncogén *ret*

El gen *ret* fue aislado como un gen transformante en experimentos de transfección de DNA de un linfoma de células T, en fibroblastos NIH3T3. El análisis del DNA del oncogén mostró que se había originado por un reordenamiento ocurrido durante la transfección, que fusionó secuencias de una tirosina quinasa con parte de un gen que codifica una proteína con “dedos de zinc”, denominado *rfp*.

El oncogén *ret* codifica una proteína de fusión constituida por 315 aminoácidos del extremo amino de RFP, seguidos por un dominio transmembranal y una tirosina quinasa de RET (Takahashi y Cooper, 1987).

La clonación del cDNA del oncogén *ret* demostró que éste codifica un receptor TK que tiene la particularidad de poseer dos dominios transmembranales, como ROS y SEVENLESS. El receptor RET es el prototipo de una familia caracterizada por poseer dominios tipo cadherina en el dominio extracelular, lo cual, unido a una semejanza con SEVENLESS, sugiere que RET podría participar en interacciones célula- célula.

El procesamiento alternativo del mRNA de *ret* da lugar a dos tipos de extremo amino, con y sin péptido señal, y a dos tipos de extremo carboxilo diferentes, codificados por exones alternativos, uno de 51 aminoácidos que incluyen dos residuos de tirosina, y el otro de 9 que no incluye tirosinas.

El gen *ret* codifica mRNAs de 3,5; 4,5; 6 y 7 Kb detectados en varias líneas celulares humanas como THP-1 (leucemia monocítica), HL-60 (leucemia promielocítica) y SK-N-SH (neuroblastoma). En tejidos de ratón adulto se han detectado dos mRNAs de 4,5 y 6 Kb, exclusivamente en médula espinal, y más recientemente a muy bajos niveles en tiroides normal y a altos niveles en carcinomas medulares de tiroides, feocromocitomas y neuroblastomas (Santoro y cols., 1990, Nagao y cols., 1990).

En el reordenamiento responsable de la primera activación descrita de *ret*, la mayor parte del dominio extracelular del receptor fue sustituida por secuencias del gen *rfp*, aunque se mantenía el segundo dominio transmembranal. En otros reordenamientos descritos posteriormente este dominio también resulta eliminado, mientras que el dominio TK se mantiene intacto en todos los casos (Fig. 17).

En los últimos años se ha demostrado que un oncogén activado en aproximadamente el 30% de tumores papilares de tiroides humanos, denominado PTC, es una forma activada del gen *ret*.

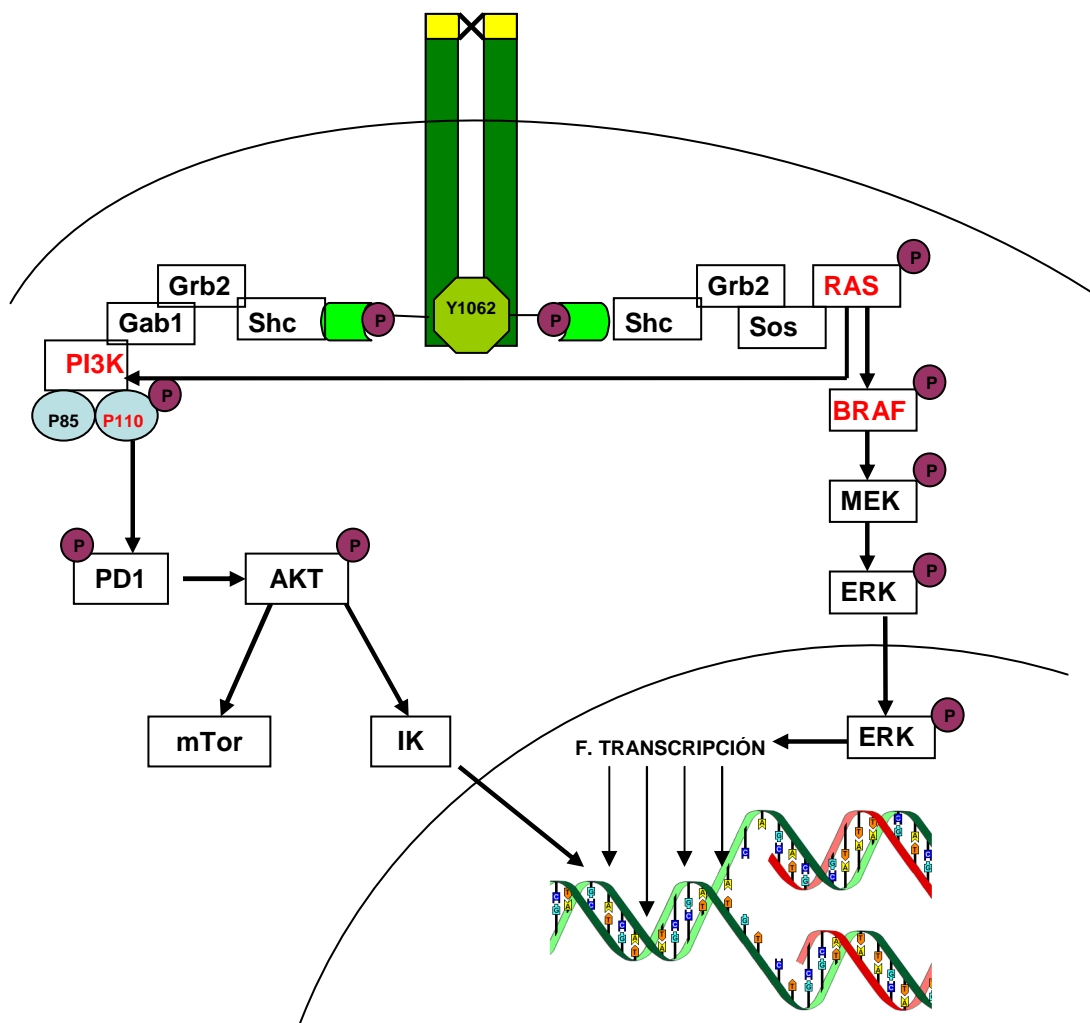


Figura 17. Esquema representativo de las rutas activadas por el oncogén *ret/PTC*.

En todos estos casos la activación es consecuencia de reordenamientos somáticos, detectados en los tumores pero no en tejido normal de los pacientes. En 9 de los 14 casos descritos, *ret* estaba fusionado con secuencias del locus D10S170, originalmente denominado H4, localizado, al igual que *ret*, en el brazo largo del cromosoma 10 humano (Grieco y cols., 1990).

En el caso mejor caracterizado, se vio que el reordenamiento consistió en una inversión paracéntrica del brazo largo del cromosoma 10, inv (10) (q11.2q21). El oncogén resultante codificaba una proteína híbrida cuyo extremo amino procedía del gen H4, y seguido inmediatamente por el dominio TK de *ret*. En los 9 casos, el segundo dominio transmembranal fue eliminado, y el reordenamiento ocurrió en el intrón situado entre los exones que codifican los dominios TM y TK de *Ret*.

En los otros 5 casos, el locus H4 no estaba implicado. En al menos uno de ellos, *ret* se fusionó con el gen que codifica la subunidad reguladora α de la proteína quinasa A, $R1\alpha$, que está localizado en el cromosoma 17. El reordenamiento ocurrió en el mismo intrón que en el caso de la fusión con H4.

La proteína híbrida resultante tiene un extremo amino formado por 236 aminoácidos procedentes de $R1\alpha$, seguidos por el dominio TK de *ret*. Esta proteína existe en dos formas de 76 y 81 kDa., que difieren en su extremo carboxilo debido al procesamiento alternativo del extremo 3' del gen *ret*, que hemos mencionado antes.

En experimentos de inmunoprecipitación y Western, en condiciones no reductoras, se ha podido demostrar que las proteínas híbridas forman homo y heterodímeros, probablemente debido a la presencia de las secuencias de R1 α responsables de que esta proteína, en su configuración normal, forme dímeros estabilizados por puentes disulfuro. La dimerización es probablemente responsable de la actividad tirosina quinasa constitutiva exhibida por la proteína oncogénica (Bongarzone y cols., 1993).

En resumen, la actividad transformante de las oncoproteínas RET puede deberse a la combinación de una serie de características genéticas y bioquímicas conferidas por la fusión de H4 o a R1 α , entre las que cabe citar: a) la expresión de la quinasa RET en tipos celulares donde normalmente no se expresa, debido a que los genes H4 y R1 α proporcionan secuencias promotoras al gen híbrido; b) la localización subcelular inadecuada de la proteína híbrida, probablemente citoplásmica; c) la dimerización espontánea, en ausencia de ligando, mediada por las secuencias de H4 y R1 α , que conduce a la actividad quinasa constitutiva; y d) probablemente la eliminación del dominio extracelular, que suele ejercer un control negativo sobre la actividad quinasa del receptor, contribuye a la activación constitutiva de éste.

En otros estudios se ha observado un menor porcentaje (11%) de tumores papilares de tiroides con el gen *ret* reordenado, aunque se ha observado que un gran porcentaje de ellos (50%), presentaba metástasis a distancia (Jhiang y cols., 1992).

Los análisis genéticos de PTC realizados a niños expuestos a radiación durante el accidente nuclear de Chernobyl implicaban al oncogén *ret* en la patogénesis de los tumores que presentaban (Klugbaues y cols., 1995; Fugazzola y cols., 1995 y Nikiforov y cols., 1997). El oncogén *ret* es un receptor tirosina quinasa que se expresa principalmente en células derivadas de la cresta neural, normalmente no se expresa o está presente en muy bajos niveles en células foliculares tiroideas. La activación de *ret* en PTC ocurre a través de la recombinación cromosómica, originando una expresión ilegítima de la fusión proteica que consiste en un dominio intracelular de la tirosina quinasa de RET acoplado al fragmento N-terminal de un gen heterólogo, dando un aumento de oncoproteínas *ret*/PTC (Santoro y cols., 1992). Se han identificado varias formas, las cuales difieren en el extremo 5' involucrado en el reordenamiento, las dos más comunes son RET/PTC1 y RET/PTC3.

Las mutaciones *ret* están presentes en PTC esporádicos. Después de la exposición de los niños a la radiación, surgieron muchos casos de PTC (Santoro y cols., 1992; Ito y cols., 1994; Fugazzola y cols., 1995; Bongarzone y cols., 1996 y Bounacer y cols., 1997;). Sin embargo, las mutaciones *ret* no están restringidas al fenotipo maligno, también se han encontrado en el comienzo de los nódulos tiroideos (Bounacer y cols., 1997 y Elisei y cols., 2001) incluyendo FAs (Ishizaka y cols., 1991) y tiroiditis de Hashimoto (Nikiforov 2002). Estas mutaciones son muy abundantes en microcarcinomas y no se han descrito en PDC o ATC. El RET/PTC 1 tiende a ser más común en tumores con crecimiento papilar típico, además RET/PTC3 está también presente en la variante sólida de PTC, que tiende a tener un comportamiento

tumoral más agresivo (Nikiforov, 2002). Las frecuencias de reordenamientos *ret*/PTC en PTC esporádicos varían extensamente entre países diferentes; se han descrito límites bajos como el 2.5% en Arabia Saudita y altos, como el 59% en el Reino Unido (Nikiforov, 2002). Se han evocado varias razones para esta amplia variedad de frecuencias, como son: el origen étnico o genético en la ocurrencia de las reordenaciones *ret*, el uso de diferentes métodos de detección, la heterogeneidad genética de los tumores y, finalmente, no se puede descartar el desconocimiento de la exposición ambiental a radiaciones ionizantes o a otros factores mutagénicos (Zhu y cols., 2006). La sobreexpresión específica de RET/PTC1 en tiroides (Jhiang y cols., 1996 y Santoro y cols., 1996) o RET/PTC3 en ratones transgénicos, permite el desarrollo de tumores con características histológicas similares a los PTC. Los ratones transgénicos RET/PTC1 desarrollan tumores tiroideos con manifestaciones de hiperplasia tiroidea, la principal característica histológica de los PTC. Estos tumores son lentamente progresivos y no causan metástasis (Santoro y cols., 1996). Los ratones transgénicos que expresan RET/PTC3 humano, desarrollan hiperplasia tiroidea y variantes tumorales sólidas del PTC que metastatizan en los nódulos linfáticos regionales (Powell y cols., 1998).

Existe una gran evidencia de que la radiación ionizante puede inducir directamente eventos recombinatorios de *ret* (Ito y cols., 1993 y Ito y cols., 1994), siendo el factor de mayor riesgo de desarrollo de PTC. Parece existir una relación entre los eventos ambientales y el inicio tumoral en el cáncer de tiroides. Finalmente, puede considerarse a *ret* como diana para la inhibición selectiva en los PTC. En varios estudios preclínicos publicados por diferentes grupos se ha mostrado los efectos inhibidores, en bajas concentraciones

(nanomolares), de la actividad RET quinasa y el deterioro del crecimiento celular *in vitro* y en ratones con tumores humanos implantados (Carlomagno y cols., 2002, 2003; Lanzi y cols., 2003 y Strock y cols., 2003).

5.4. El papel intrínseco del oncogén *ras* en PTC y FTC.

Las frecuencias de las mutaciones *ras* en neoplasias tiroideas varía considerablemente a lo largo de diferentes series (Tabla 3, pág. 122). Las mutaciones *ras* no están restringidas a un tipo de tumor tiroideo específico, sino que están presentes en FA, FTC, variante folicular de PTC y, en alta frecuencia, en PDC y ATC (Lemoine y cols., 1988; Wright y cols., 1989; Suárez y cols., 1990; Namba y cols., 1990; Challeton y cols., 1995 y García-Rostan y cols., 2003;). Interesantemente, los ratones transgénicos expresan mutaciones *N-ras* en células foliculares tiroideas desarrolladas en el 11% de los FAs y aproximadamente en el 40% de las desarrolladas en carcinomas foliculares invasivos, en algunos casos con morfología papilar/folicular. Sobre el 25% de los carcinomas *N-ras* exhibieron grandes áreas pobremente diferenciadas con invasión vascular y metástasis distales en pulmón, hueso o hígado (Vitagliano y cols., 2006).

Esta oncoproteína está presente en PTC y FTC y se ha demostrado que RAS activa la ruta MAPK y PI3K/AKT en células epiteliales. Así, se podría especular que, dependiendo de la preexistencia de la activación de la ruta por RAS y/o el contexto celular, la célula desarrollará PTC o FTC, aunque los mecanismos subyacentes de los distintos destinos no están claros todavía.

	<i>B-RAF</i> (%)	<i>RET/PTC</i> (%)	<i>RAS</i> (%)	<i>PI3KCA</i> * (%)	<i>PTEN</i> (%)	<i>PAX8/PPARγ</i> (%)
PTC	29-83	2,5-59**	-	-	-	-
PTCfV	-	-	5-15	15	2	37,5
FTC	-	-	7-62	8-42	6-7	36-45
FA	-	14	9-11	8-23	-	4-33
ATC/PDC	10-35	-	50-55	54	16	-
EXTENSIÓN EXTRATIROIDEA	SI	NO	-	-	-	-
INCREMENTO DEL RIESGO DE RECURRENCIA	SI	NO	-	-	-	-
POCA SUPERVIVENCIA	?	NO	SI	-	-	-

* Ganancia de copias o mutaciones del gen *PI3KCa*

** Preferentemente en pacientes con PTC después de la exposición a radiación y en niños.

Tabla 3. Principales eventos génicos presentes en el cáncer de tiroides (Riesco-Eizaguirre y cols., 2007).

Fernández-Santos y cols. (2004) en un estudio sobre la prevalencia de mutaciones *K-ras* en tumores tiroideos de ratas Wistar inducidos mediante yodo radiactivo y perclorato potásico, sugirieron que las mutaciones en el gen *K-ras* no están involucradas en la carcinogénesis experimental tiroidea ya que no encontraron estas mutaciones en los 72 carcinomas tiroideos experimentales que analizaron y aunque estos datos coinciden con los trabajos publicados por otros autores, también existen publicaciones que los contradicen, tanto en investigaciones experimentales como en carcinomas tiroideos humanos. Por lo tanto, añaden que las mutaciones del gen *K-ras* no

son un evento frecuente ni temprano en la carcinogénesis tiroidea experimental. .

5.5. El oncogén BRAF como el evento genético más común y específico en PTC esporádico.

La mutación V600E del gen *B-raf*, presente en 29-83% de los PTC esporádico, ha llegado a ser el cambio genético más común en esta patología (Xing 2005). A diferencia de RAS o las reordenaciones RET/PTC, las mutaciones de BRAF son únicas en PTC, y no se encuentran en ninguna otra forma de neoplasia folicular bien diferenciada surgida del mismo tipo celular. Las mutaciones del BRAF pueden ocurrir en fases tempranas del desarrollo de PTC, basadas en la evidencia de que están presentes en PTC microscópicas (Nikiforova y cols., 2003). La variante de PTC de célula alta, extensamente conocida como la más agresiva, tiene en particular un alto predominio de mutaciones en BRAF (Nikiforova y cols., 2003). El ATC y el PDC surgen de un PTC preexistente que también ha tenido una prevalencia significativa de mutaciones en BRAF, a diferencia de los que surgen de los FTC preexistentes (Nikiforova y cols., 2003; Namba y cols., 2003; Begum y cols., 2004; Soares y cols., 2004; Xing y cols., 2004 y Quiros y cols., 2005;). La sobreexpresión específica en tiroides de mutaciones BRAF en ratones transgénicos permite desarrollar tumores con características histológicas consistentes en un PTC invasivo, que exhibe características focales clásicas, características focales de células altas y PDCs focales. Estos ratones tuvieron un 30% menos de

supervivencia a los 5 meses (Knauf y cols., 2005). Esto explica el fenotipo BRAF positivo en PTCs humanos (Fig. 18, pág. 125).

Aprovechando la presencia única de mutaciones del gen *B-raf* en PTC, se ha estudiado su valor pronóstico. La FNA es una técnica usada rutinariamente en los diagnósticos preoperatorios de nódulos tiroideos, pero el 15-20% de las FNA son indeterminadas. Un pronóstico fiable podría ser la detección de una mutación del gen *B-raf* en células aspiradas por FNA de un nódulo tiroideo y se ha mostrado el establecimiento de diagnóstico de PTC en el 16% de los carcinomas sin grupos indeterminados (Cohen y cols., 2004 y Xing y cols., 2004).

Se ha observado una asociación entre *B-raf* y características clinicopatológicas agresivas tales como un estado clínico avanzado y la extensión extratiroidal (Nikiforova y cols., 2003; Namba y cols., 2003; Xing y cols., 2005 y Riesco- Eizaguirre y cols., 2006) y, más importante, una alta tasa de recurrencia durante la fase temprana de los pacientes. Además, Riesco-Eizaguirre y col. (2006), junto con Xing y col. (2005), argumentan que la mayoría de las recurrencias BRAF-positivas no tiene ninguna avidéz por la radioiodida (D^{131}) y no responden al tratamiento con yodo y que los tumores BRAF-positivos tienen un bajo nivel significativo de expresión del simporte sodio/yodo (NIS). Esto apunta a que estos eventos genéticos pueden ser un nuevo marcador biológico para predecir el pobre pronóstico y la resistencia al tratamiento de pacientes con bajo y alto riesgo.

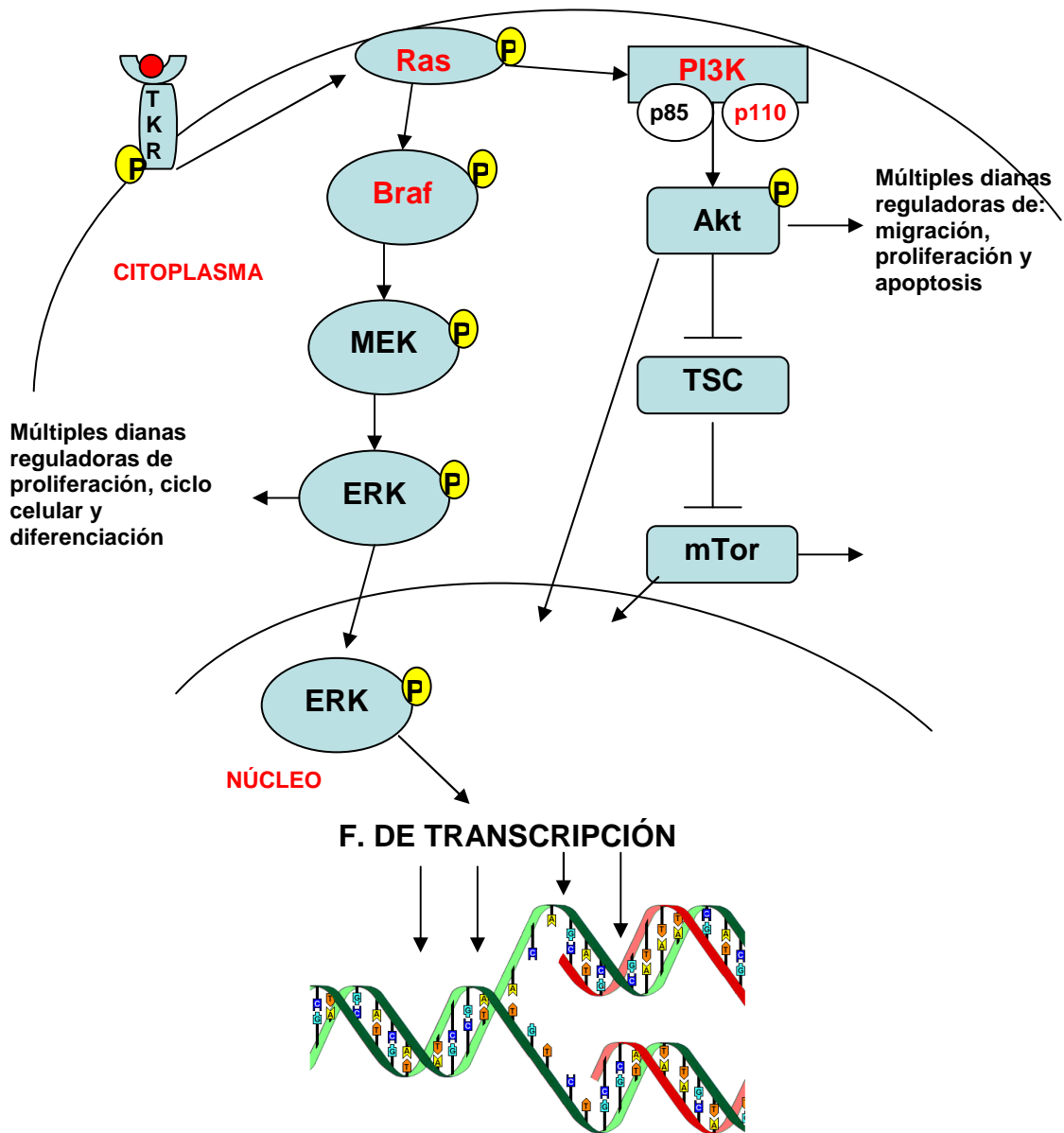


Figura 18. Esquema de la ruta *ras/B-raf/MEK/ERK* en la célula tiroidea.

Sin embargo, existe controversia a este respecto, lo que sugiere la necesidad de estudios aleatorios retrospectivos con una serie grande de pacientes. La observación de tumores BRAF-positivos con bajos niveles de expresión de NIS, asociados con las recurrencias comentadas anteriormente, junto con el hecho de que pierda la capacidad de concentrar radioiodida, puede ayudar a aclarar los mecanismos básicos del proceso de diferenciación

que afecta a algunas metástasis del cáncer de tiroides. Además, proveen de nuevas estrategias para tratar la todavía no resuelta situación de elevada tiroglobulina y exploraciones negativas de radioiodida en pacientes con cáncer de tiroides.

5.6. El papel emergente de la ruta fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K)/Akt en FTC.

La activación de PI3K puede producirse mediante dos mecanismos. Primero, por una fosforilación del residuo tirosina (Y) en el receptor que actúa como un lugar de anclaje para el p85 que es la subunidad reguladora de PI3K (Blalock y cols., 1999). Esta subunidad recluta a la subunidad catalítica de PI3K, p110, de este complejo. Alternativamente, una sobreactivación del receptor por la citoquina afín hace que SHC se una al receptor para permitir a GRB-2 y SOS formar un complejo que activa a RAS (Rodríguez-Viciano y cols., 1996; Vanhaesebroeck y cols., 1997; Duronio y cols., 1998 y Scheid y cols., 2001). Entonces, RAS puede inducir la localización y activación de la subunidad p110 de PI3K (Pacold y cols., 2000). Esta interacción específica ocurre entre dos regiones de RAS, conocidas como switch I (residuos 33-41) y switch II (residuos 63, 64 y 73), las cuales se unen a una secuencia en PI3K, llamada dominio de unión a RAS (RBD) (Djordjevic y Driscoll, 2002). La subunidad reguladora de PI3K, p85, contiene dos dominios reguladores adicionales: un dominio sensible a GTPasa (GRD) que puede mediar la activación de PI3K a través de la unión de una pequeña GTPasa (Ras, Rac-1), y un dominio inhibidor que puede bloquear esas uniones. La unión de PI3K

puede ser anulada cuando ciertas tirosinas quinasas como SRC, LCK y ABL fosforilan al residuo S668 contenido dentro del dominio inhibitorio (Chan y cols., 2002). Existen diferentes isoformas de RAS que activan a PI3K. Aunque normalmente las moléculas de RAS activan cada una de las cascadas PI3K/Akt y BRAF/MEK/ERK, Ha-Ras activa preferentemente a PI3K y Ki-RAS a BRAF (Yan y cols., 1998).

PI3K activado convierte al fosfatidilinositol (4,5)-fosfato [PI (4,5) P2] en fosfatidilinositol (3, 4,5)-fosfato [PI (3, 4,5) P3], que se une en la membrana al fosfatidilinositol dependiente de kinasa-1 (PDK1) mediante su homología con el dominio pleckstrina (PH). AKT se recluta también a la membrana por su dominio PH y es fosforilado en los residuos T308 y S473 por PDK1 y una kinasa no identificada respectivamente (Fig. 19, pág. 128).

Akt es el principal mediador de PI3K que inicia la señalización y tiene un número de sustratos aguas abajo que puede contribuir a transformaciones malignas. Algunos de estos sustratos son Bad, procaspasa 9, I- κ B kinasa (IKK), CREB, la familia de factores de transcripción FKHR/AFX/FOX, glicógeno sintasa kinasa 3 (GSK-3), p21^{Clp1} y Raf (Nicholson y Anderson, 2002). IKK y CREB son activados por la fosforilación de Akt, mientras que Raf, Bad, procaspasa 9, FKHR y GSK-3 son inactivadas.

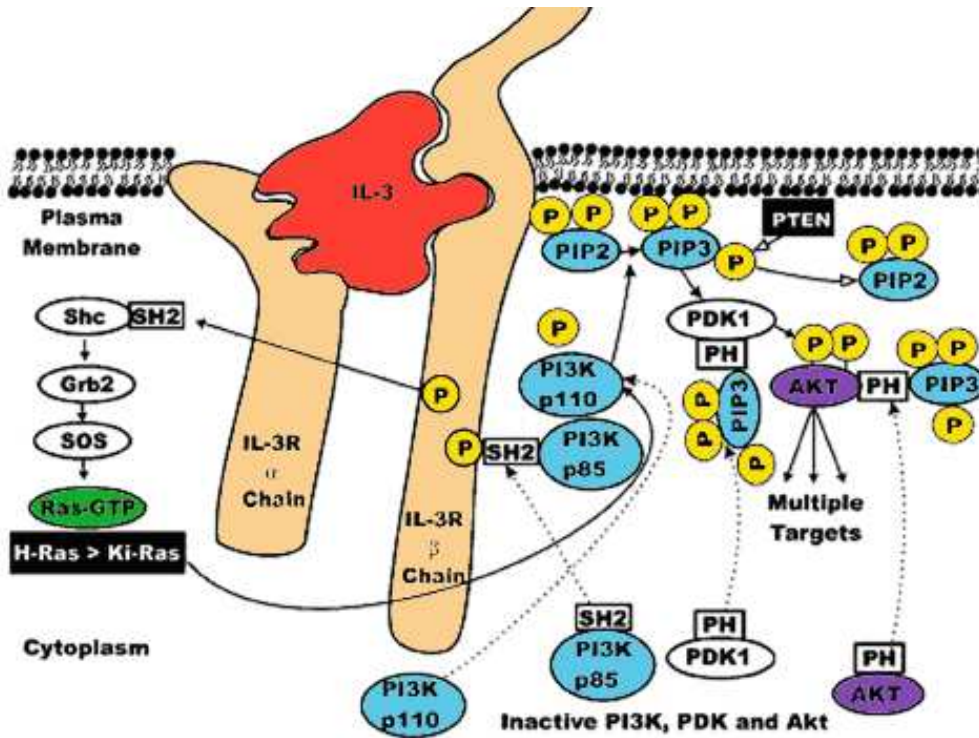


Figura 19. Activación de la ruta PI3K/Akt. Se representan los dos mecanismos por los que la activación del receptor de citoquina puede resultar en la activación de la ruta PI3K/Akt. Nótese que la activación de esta ruta ocurre en las proximidades de la membrana celular. SH2: dominio Src homólogo2; PH: dominio de homología pleckstrin.

La actividad de la ruta PI3K/Akt es regulada negativamente mediante la acción de fosfatasas. La fosfatasa y tensina homóloga deletionada en el cromosoma 10 (PTEN), que también puede mutar en múltiples cánceres avanzados-1 (MMAC1), así como Src homólogo 2 (SH2), contienen fosfatasas 1 y 2 (SHIP-1 y SHIP-2) que quitan fosfatos a PI (3, 4,5) P₃ (Wu y cols., 1998; Sakai y cols., 1998; Muraille y cols., 1999; Vázquez y cols., 2000 y Taylor y cols., 2000). Las mutaciones de estas fosfatasas que eliminan su actividad pueden permitir la progresión tumoral. Consecuentemente, los genes que codifican esas fosfatasas son denominados antioncogenes o genes supresores de tumores. La visión general de la ruta PI3K/Akt se representa en la Figura 20 (pág. 130).

La primera evidencia de la implicación de este mecanismo en los tumores tiroideos se encontró en un síndrome llamado enfermedad de Cowden. Las mutaciones germinales del gen PTEN confieren predisposición para la enfermedad Cowden, una condición característica para el desarrollo de daños en múltiples órganos, empezando por desórdenes tiroideos tales como bocio multinodular y adenoma, y un incremento del riesgo de cáncer de tiroides (principalmente de tipo folicular), mama y otros (Eng, 1998). La pérdida de heterocigosis (LOH) se encontró en el 27% de los carcinomas foliculares y 7% de FAs, uno de los cuales fue una pequeña delección homocigótica (Halachmi y cols., 1998), y pérdida o reducción de la expresión de PTEN, así como una inapropiada compartimentación subcelular en tumores tiroideos (Bruni y cols., 2000; Gimm y cols., 2000 y Vasko y cols., 2004). La potencial relevancia de estos mecanismos apoya la idea del incremento en la expresión y activación de Akt en cánceres tiroideos, particularmente en FTC (Vasko y cols., 2004 y Ringel y cols., 2001).

Además, la pérdida de PTEN en ratones transgénicos y la consiguiente activación del mecanismo PI3K/Akt causa bocio y FA, pero no es suficiente para la transformación maligna de células tiroideas (Yeager y cols., 2007). Todos estos datos han apoyado la idea de buscar otros genes involucrados en la ruta PI3K/Akt que puedan estar involucrados. Existen varios grupos que han descrito mutaciones somáticas dentro de la subunidad catalítica de PI3K (PI3KCA) y/o amplificación del gen PI3KCA en FA, FTC, PTC y ATC así como en varias líneas de tumores tiroideos (García-Rostan y cols., 2005; Wu y cols., 2005 y Wang y cols., 2007).

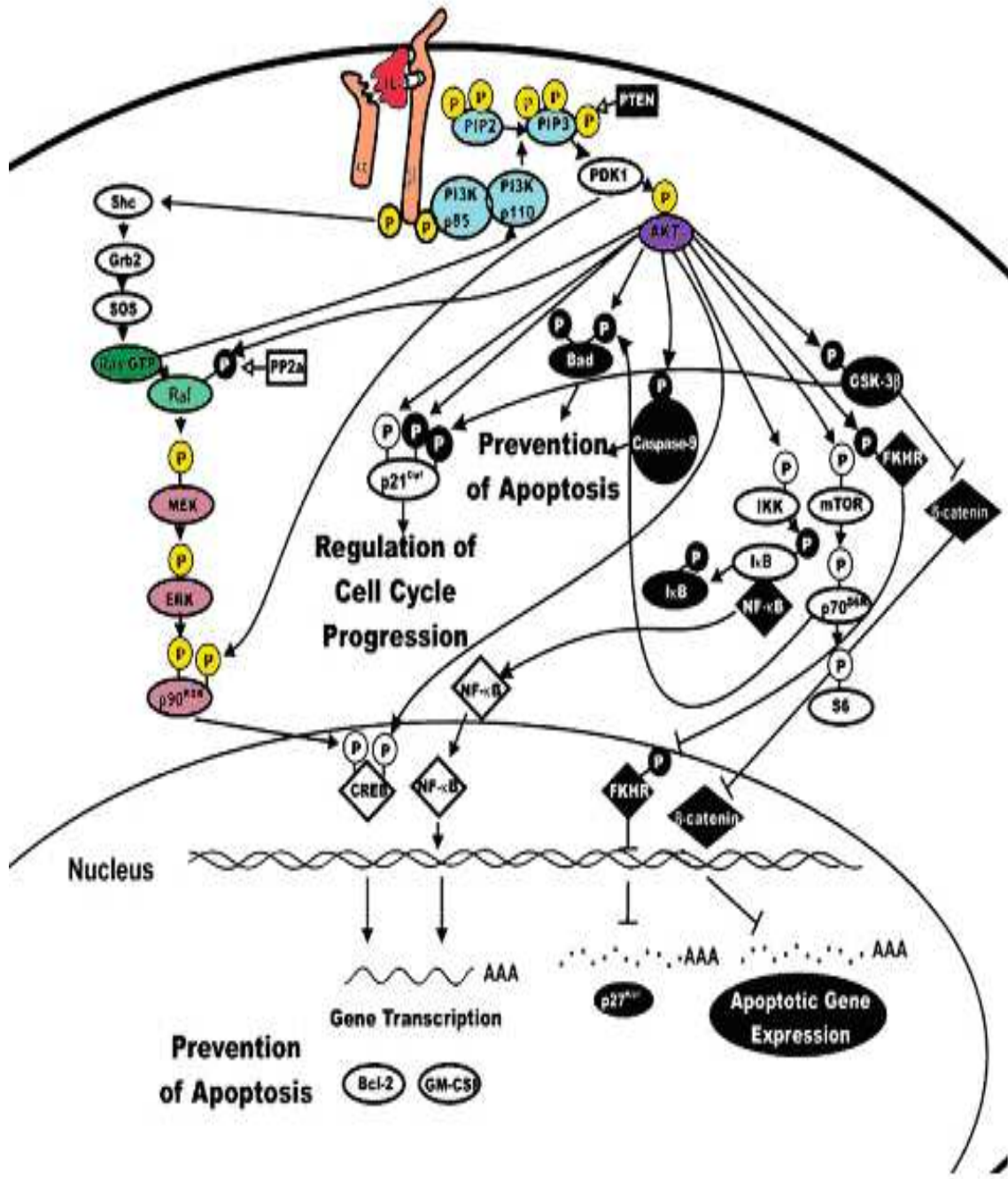


Figura 20. Visión de la ruta PI3K/Akt. La ruta PI3K/Akt es activada por p85, subunidad reguladora de PI3K unida a un residuo de tirosina activado en el receptor IL-3 activado o mediante la subunidad p110 de PI3K unida a Ras activado. Cada uno resulta en la localización de PI3K en la membrana. Se muestran algunos de los efectos de la activación de la ruta PI3K aguas abajo. PI (4,5) P₂ es fosforilado por PI3K a PI (3, 4,5) P₃, el cual promueve la localización en la membrana de PDK1 a través de su dominio PH. PDK1 fosforila y activa a Akt. Nótese que, dependiendo del residuo fosforilado, las proteínas activadas pueden ser activadas o inactivadas por fosforilación. Proteínas activadas mediante la fosforilación de Ser/Thr o Tir se indican con una P negra en un círculo blanco. Las proteínas inactivadas mediante la fosforilación de Ser/Thr o Tir se indican con una P blanca en un círculo negro. Los factores de transcripción están indicados con rombos, las fosfatasas por rectángulos y las fosfatasas que inhiben actividad, como PTEN y SHIP representadas con rectángulos negros. La PP2A fosfatasa, que activa a Raf, indicada en rectángulo blanco. Las flechas abiertas indican grupos fosfatos hidrolizados por fosfatasas.

Los autores no mencionan si estas mutaciones de PI3KCA están presentes en variantes foliculares de PTC (PTCfv), un subtipo común de PTC consistente en un cambio nuclear distintivo de PTC pero sin la formación de papilas. Por lo tanto, parece probable que PI3KCA sea un nuevo oncogén involucrado en el desarrollo de los carcinomas tiroideos bien diferenciados (particularmente FTC) y ATC. En un intento de investigar el conjunto global de las alteraciones genéticas en el mecanismo PI3KCA/Akt en cáncer tiroideo esporádico, Hou y colaboradores (2007) vieron la presencia de copias de PI3KCA y mutaciones en RAS y en PTEN frecuentes en una larga serie de tumores tiroideos. Estos autores no encontraron ninguna de estas alteraciones genéticas en el 31% de FA, en 55% de FTC, en 24% de PTC y en 58% de ATC. El aumento de copias obtenidas en PI3KCA estaban asociadas con un incremento de la expresión de la subunidad catalítica PI3K. No obstante, Hou y cols., (2007) describieron esta exclusividad mutua de estas alteraciones en carcinomas bien diferenciados y en adenomas, pero no en ATC, discutiendo así su papel en la progresión de FTC a ATC por acumulación de estas alteraciones genéticas en la ruta.

Muchos estudios *in vitro* e *in vivo* son necesarios para elucidar el papel que juega esta activación aberrante del mecanismo PI3KCA/Akt en la tumorigénesis del tiroides, particularmente en FTC y ATC. Se han desarrollado varias moléculas pequeñas diseñadas específicamente como diana para PI3KCA-Akt, induciendo el secuestro del ciclo celular o apoptosis en células cancerígenas humanas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Osaki M y cols., 2004). Además, la inhibición específica de la activación de Akt podría ser una

aproximación válida para tratar malignidades tiroideas, particularmente FTC y ATC.

5.7. Los reordenamientos PAX8/PPAR γ .

La translocación PAX8/PPAR γ produce la fusión del gen del factor de transcripción específico de tiroides, PAX8, con el gen PPAR γ , un factor de transcripción ubicuo con un importante papel en la regulación de genes involucrados en la diferenciación de los adipocitos y el metabolismo lipídico. La translocación del cromosoma 3p25 y 2q13, crea una fusión génica que abarca al promotor y al codón 50 proximal de la secuencia del gen del factor de transcripción específico de tiroides, PAX8, y la mayor parte de la secuencia del gen PPAR γ . Los reordenamientos PAX8/PPAR γ se han identificado en una porción significativa de FTC (36-45%), FA (4-33%), la variante folicular de PTC (37.5%) o el carcinoma de células Hurthle (Kroll y cols., 2000; Marques y cols., 2002; Nikiforova y cols., 2002; French y cols., 2003; Nikiforova y cols., 2003 y Castro y cols., 2006).

El mecanismo de transformación inducido por PAX8/PPAR γ no está todavía claro. A pesar de que estos eventos genéticos están claramente asociados con FTC y FA, no existe una relación con los mecanismos de PI3K/Akt, aunque se ha demostrado que tiene un efecto negativo dominante en la trans-activación de PPAR γ inducida por tiazolidinediona (Kroll y cols., 2000) y la sobreexpresión del tipo salvaje de PPAR γ en líneas celulares cancerígenas de tiroides, inhibiendo el crecimiento celular, que aumenta fuertemente por el

agonista PPAP (Martelli y cols., 2002). Sin embargo, Au y colaboradores (2006) no encontraron este efecto negativo dominante en las células tiroideas de rata FRTL5 ni en las células tiroideas humanas inmortalizadas, quedando sin aclarar la incógnita de si las propiedades transformantes de PAX8/PPAR γ pueden ser atribuidas sólo a la función inhibitoria de PPAR γ .

5.8. El mecanismo p53 en la progresión del cáncer.

Las mutaciones puntuales inactivadoras del gen supresor tumoral p53 son muy frecuentes en ATC y PDC, pero no en los carcinomas papilares bien diferenciados o foliculares (Ito y cols., 1992 y Fagin y cols., 1993). Estos datos implican la inactivación de p53 como un importante paso en la progresión del estadio tardío del cáncer. Las células tiroideas que llevan una mutación del gen p53 no forman colonias en agar o tumores en ratones atímicos, sugiriendo que una mutación en el gen p53 no es suficiente para la inducción del fenotipo maligno, y probablemente la cooperación con otros oncogenes es necesaria para lograr una malignidad completa. Sin embargo, un gen mutado p53 causa una pérdida marcada del fenotipo diferenciado en la línea celular de tiroides de rata PCC13, incluyendo la inhibición de la expresión del factor de transcripción específico de tiroides PAX8 (Battista S y cols., 1995). Inversamente, la re-expresión de la actividad wt-p53 (silvestre) en líneas celulares cancerígenas indiferenciadas de tiroides inhiben la proliferación celular y restauran la diferenciación (Fagin y cols., 1996 y Moretti y cols., 1997).

5.9. Una perspectiva integrada de la patogénesis del cáncer de tiroides: hacia una clasificación molecular.

El crecimiento celular tiroideo requiere la combinación de efectos de TSH, mediante la vía cAMP, además de la señalización de los factores de crecimiento (por ejemplo IGF-I), principalmente a través de la ruta MAPK y PI3K (Medina y cols., 2000 y Kimura y cols., 2001). Por lo tanto, sería lógico pensar que las mutaciones de los efectores a lo largo de estos mecanismos de señalización jueguen un papel principal en la patogénesis de la neoplasia tiroidea. Por ejemplo, adenomas tiroideos funcionalmente autónomos están asociados con las mutaciones activadoras del receptor de TSH (Parma y cols., 1993; Porcellini y cols., 1994 y Parma y cols., 1995) o G α , permitiendo una activación constitutiva de la adenilciclase (Lyons y cols., 1990 y O' Sullivan y cols., 1991) (Fig.18 pág. 125). Estos comienzos tumorales raramente progresan a malignidad. Por el contrario, existe una convincente evidencia que indica que PTC, la forma más prevalente del cáncer de tiroides, requiere la activación constitutiva de la ruta MAPK para la iniciación tumoral. Del mismo modo, existe una clara evidencia de que la ruta PI3K/AKT parece jugar un importante papel en la iniciación tumoral de FTC. Finalmente, la desregulación del mecanismo p53 se observa constantemente en ATC y tiene un papel más importante en la progresión tumoral (Fig. 18, pág. 125). Además, parece tener una fuerte relación entre el fenotipo histológico de la neoplasia tiroidea y la ruta predominantemente activada, es decir, hay tres caminos para que las células tiroideas puedan proliferar inapropiadamente mediante estas tres rutas. Se podría especular que el fenotipo tumoral podría diferir, en parte, de acuerdo a

la preferencia de la ruta activada y su ocurrencia temprana o tardía en la progresión tumoral. Este punto de vista es probablemente simplista pero es un buen punto de comienzo que pueda conducir, por ejemplo, al desarrollo de nuevas terapias diana destinadas al bloqueo de estas rutas.

Esta idea es compatible con lo observado en las células de tiroides diferenciadas de rata PCC13 cuando hay una activación de la ruta MAPK por cualquiera de las tres oncoproteínas descritas hasta ahora en PTC. La activación del eje RET/PTC-RAS-BRAF induce proliferación celular e invasión de las células foliculares tiroideas, y la expresión del perfil génico revela que los tres oncogenes activados en un programa transcripcional común en las células tiroideas incluye la regulación al alza de las citoquinas (Melillo RM y cols., 2005). La expresión de perfiles de genes tumorales mediante microarrays de cDNA ha demostrado que PTC se caracteriza por un modelo de expresión global y específica. De hecho, se han propuesto varios marcadores para discriminar el PTC de otros tumores (Huang Y y cols., 2001; Wasenius VM y cols., 2003; Finley DJ y cols., 2004 y Jarzab B y cols., 2005).

Sin embargo, mientras la ruta predominantemente activada determine el fenotipo histológico principal del cáncer de tiroides, la naturaleza de los eventos genéticos determinará el comportamiento biológico del tumor y se podría predecir su pronóstico. Hay una gran evidencia que indica que las mutaciones *ret/PTC*, *ras* y *B-raf* ejercen sus implicaciones oncogénicas, exhibiendo distintas características patológicas, perfiles genómicos, cambios epigenéticos y comportamientos biológicos.

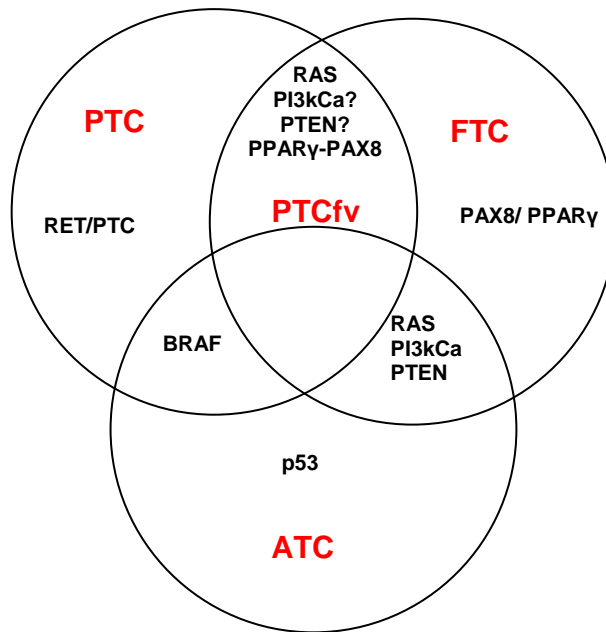


Figura 21. Esquema que representa los principales eventos genéticos asociados a los dos principales tipos de cáncer tiroideo bien diferenciados (PTC y FTC) y ATC. Notar que los eventos genéticos presentes en la variante folicular de PTC (PTCfv) parecen indicar que esos tumores están más relacionados a FTC que a PTC.

Por ejemplo, mientras *ret* y *B-raf* activen la misma ruta y estén claramente involucrados en la patogénesis de PTC, el comportamiento biológico y pronóstico será diferente (Tabla 3, pág. 122). *B-raf* predice un menor estado de diferenciación y una alta tasa de recurrencia, mientras que *ret/PTC* no, incluso el tipo de reordenamientos dentro de *ret/PTC* determina su pronóstico. RET/PTC 3 está presente en la variante sólida de PTC, que es más agresiva, mientras que RET/PTC 1 está presente en la forma clásica de PTC y no está asociada con un peor pronóstico. Esto significa que pequeños cambios en las condiciones finales (activaciones de diferentes mutaciones de la misma oncoproteína y/o diferente contexto celular) pueden tener un gran impacto en el resultado final (malignidad que conduce a metástasis y muerte). Este concepto se apoya por el hecho de que, aunque PTC esté caracterizado por un modelo global de expresión génica constante y específico, se ha demostrado la

activación de un único modelo de expresión génica empleado por las tres principales oncoproteínas, BRAF, RET/PTC y RAS, (Giordano y cols., 2005 y Mesa y cols., 2006). Por ejemplo, Mesa y colaboradores (2006) encontraron en células epiteliales tiroideas normales de rata una regulación al alza de las metaloproteinasas inducidas sólo por BRAF, pero no por RET/PTC. Esas metaloproteinasas fueron esenciales para una menor invasión inducida por BRAF. También, se ha hecho una consideración especial en relación a la variante folicular de PTC (PTCfv). De algún modo sorprende que, mientras desde un punto de vista clinicopatológico el PTCfv esté clasificado como PTC, desde un punto de vista molecular, los principales eventos genéticos presentes en PTCfv parecen decirnos que esos tumores están más estrechamente relacionados a FTC (Fig.21, pág. 136).

Si la naturaleza de estos eventos genéticos determina el comportamiento biológico y la evolución del paciente, entonces las terapias deberían enfocarse más bien a los genes implicados en estos eventos que en las rutas que los dirigen. Esto podría tener implicaciones clínicas: selección de pacientes para nuevas terapias con inhibidores específicos de quinasas, basados principalmente en el estado mutacional del paciente y no solo en la ruta predominantemente activada, el fenotipo histológico o las características clinicopatológicas. Se deberían dirigir los esfuerzos en conocer otras rutas de señalización y dianas moleculares (por ejemplo, genes involucrados en la angiogénesis), que aunque no estuviesen activados directamente por mutaciones genéticas, podrían ser cruciales para la progresión del cáncer de tiroides y encontrar así dianas inhibitoras apropiadas.

6. Animales de experimentación en patología tiroidea.

El desarrollo de modelos experimentales de carcinogénesis hace posible el análisis de la naturaleza y cronología de los cambios moleculares que acompañan a la expresión progresiva de los fenotipos tumorales. En particular, se puede estudiar el papel de genes específicos, como los oncogenes y los genes supresores de tumores, en las diferentes fases del desarrollo tumoral. El uso de cepas puras de animales de laboratorio proporciona un fondo genético homogéneo, haciendo el sistema altamente reproducible. Puesto que muchos de estos modelos reproducen con bastante fidelidad la patogenia de las neoplasias humanas homólogas, un mejor conocimiento de sus mecanismos moleculares subyacentes es probable que tenga relevancia para el cáncer humano (Fundación Científica de AECC, 1994).

Los métodos para inducir tumores de tiroides en la rata pueden ser divididos en dos grupos según el mecanismo de acción. El primer grupo comprende métodos basados en el uso de sustancias con un efecto oncogénico directo sobre células tiroideas, por ejemplo, agentes cancerígenos apropiados. Los métodos del segundo grupo apuntan principalmente al establecimiento de un desequilibrio hormonal que, como consecuencia, conducirá al desarrollo de tumor. Esta clasificación, sin embargo, es bastante artificial, ya que algunos agentes cancerígenos conocidos, con un mecanismo de acción directo, también pueden producir perturbaciones hormonales profundas e irreversibles que conducen a la carcinogénesis de tiroides. Y

viceversa, muchos de los agentes que solían provocar el desequilibrio hormonal pueden ejercer un efecto cancerígeno directo.

Esmarch (1942) fue, probablemente, el primero en inducir tumores de tiroides en ratas por la inyección de metilcolantreno en la glándula. Más tarde, se estudió el uso directo de otros cancerígenos como los hidrocarburos policíclicos (Gnatyshak, 1957) que causaban una alta frecuencia de carcinomas de células escamosas y mal diferenciación tumoral, pero los adenocarcinomas eran sólo ocasionales (Napalkov, 1958). Se describieron adenomas solitarios y un adenocarcinoma en ratas alimentadas con 2-acetilaminofluoreno o tratados con dicloro-benceno (Cox y cols., 1947; Pliss, 1959). Los métodos que implican la administración local o aplicación sistémica de sustancias cancerígenas nunca han sido usados para la inducción de tumor de tiroides en ratas.

El descubrimiento del efecto tirostático de unas sustancias naturales y el desarrollo subsecuente de numerosos preparativos sintéticos con la misma acción, proporcionó una técnica mucho más conveniente para la producción experimental de neoplasias de tiroides. Esta estrategia desarrollada en los experimentos de Griesbach y cols., (1945), consistía en alimentar ratas Wistar con una dieta que contenía semillas de Brassica, obteniéndose a los dieciocho meses adenomas de tiroides. Bielschowsky (1945) describió tumores de tiroides benignos en ratas tratadas con aliltiourea; Purves y Griesbach (1947) demostraron el desarrollo del crecimiento maligno en glándulas tiroideas de ratas expuestas a tiourea durante casi dos años.

Durante la década siguiente, este método de inducción de tumor de tiroides en ratas fue desarrollado en numerosos experimentos con diferentes sustancias antitiroideas (tirostáticos, goitrogénicos), la mayor parte de ellos derivados de tiourea o tiouracil (Morris, 1955a-b; Bielschowsky, 1955 y Napalkov, 1958). Desde entonces, el único avance ha sido la introducción de 3-amino-1, 2,4 triazol. Esta droga antitiroidea tan poderosa, tiene una estructura química diferente a la de las tioamidas o tiocarbomidas y es un inductor muy eficaz de tumores de tiroides en ratas (Jukes y Shaffer, 1960; Napalkov, 1962; Tsuda, 1983).

Se puede decir que numerosos experimentos han confirmado la capacidad de drogas antitiroideas para conducir al desarrollo tumoral en ratas tratadas durante períodos suficientemente largos (al menos varios meses). La frecuencia y el aspecto de tumor varían considerablemente, en la rata, con la estructura química y la dosificación de la droga.

Por lo general, la intensidad de la tumorigénesis es directamente proporcional a la dosificación diaria de la droga, pero sólo hasta un cierto nivel. Los niveles de dosis más eficaces para la inducción de tumor de tiroides en la rata son aquellos que no previenen la restauración del estado eutiroideo después de un cierto período de administración continua de la droga. En tales condiciones, surgen neoplasias de tiroides verdaderas, más o menos, en ligeramente más del 50 % de las ratas que sobreviven a partir de uno a dos años después del comienzo de tratamiento. Aproximadamente la mitad de los tumores de tiroides desarrollados hacia el final del segundo año posee los

rasgos característicos de crecimiento maligno. Los datos sobre la frecuencia comparativa de tumores malignos y benignos inducidos por drogas antitiroideas en ratas masculinas y femeninas son muy contradictorios, y no permiten dibujar ninguna conclusión definida.

Hay tres clases principales de agentes farmacológicos utilizados en la clínica para el tratamiento del hipertiroidismo: a) Las tioamidas (p.e.: metiltiouracilo, propiltiouracilo, tiocarbamida e imidazol), que generalmente actúan inhibiendo la formación de yodo activo a la subsecuente iodación de residuos tirosilo (Forrest, 1975). b) Los ioduros, que tienen un efecto de inhibición transitoria de la síntesis hormonal y que raramente son utilizados de forma aislada en pacientes hipertiroideos. Sin embargo, cuando se suministran junto a una droga tionamídica, constituyen una buena pauta de tratamiento (Kasai y cols., 1976). c) Los aniones monovalentes, entre los que se encuentra el perclorato, que inhiben el transporte de yodo al tiroides impidiendo consecuentemente la síntesis hormonal por depleción de los ioduros tiroideos (Stewart y cols., 1966). Al existir déficit en sangre de hormonas tiroideas se induce un aumento de la TSH por retroalimentación negativa y, por tanto, las modificaciones que sufre el tiroides ante cualquier mecanismo estimulador guardan relación directa y dependen, fundamentalmente, de la TSH secretada por la adenohipófisis (Fig. 22, pág. 142).

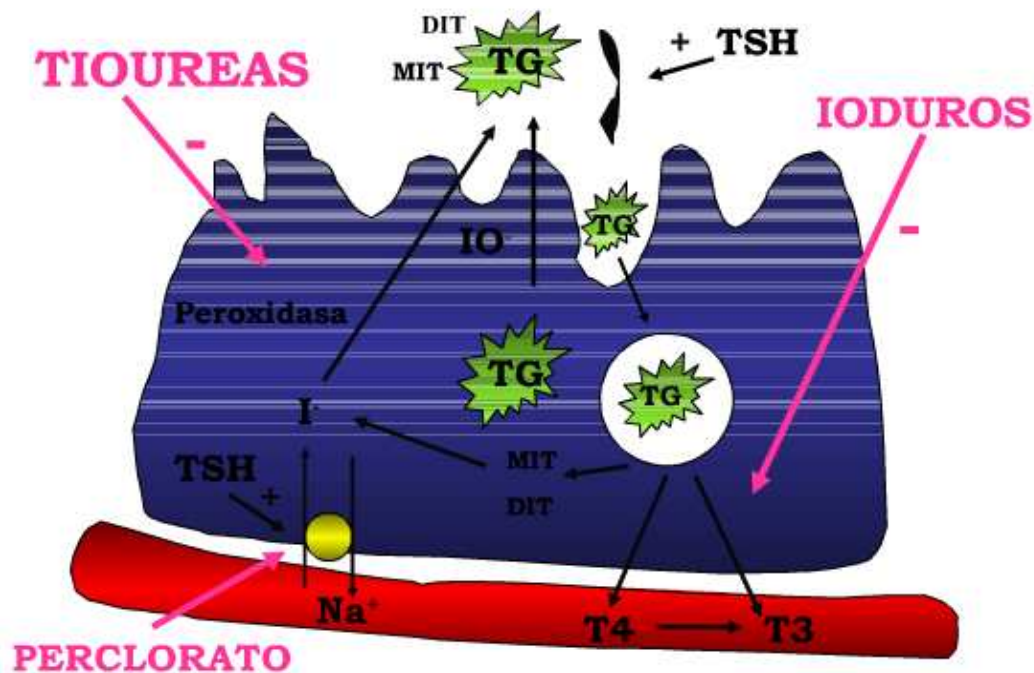


Figura 22. Mecanismo de acción de las drogas que disminuyen la síntesis de hormonas tiroideas (perclorato potásico y las tioureas) y la liberación de las mismas (ioduros y derivados) (www.slideshare.net/tomiadriano/teorico-de-hormonas-tiroideas).

La carcinogénesis en animales tratados con tioureas pasa por tres estadios morfológicos (Seifter y cols., 1949; Bielschowsky, 1955; Napalkov, 1958; Wollman, 1961 y Christov, 1968a):

1. Hiperplasia difusa de epitelio tiroideo. Este estadio normalmente continúa hasta casi el 6º y 8º mes tras el inicio del experimento.
2. Proliferación nodular de células foliculares con formación de tumores benignos. Este estadio se inicia desde el 8º mes y continúa hasta el 16º o 18º, mes aproximadamente.
3. Crecimiento tumoral maligno después de 18 meses del inicio del experimento.

Como resultado a numerosas investigaciones, se formuló un concepto consistente en la patogénesis de tumores tiroideos experimentales para explicar el efecto tumorigénico de drogas antitiroideas (Bielschowsky, 1955; Furth, 1959). Según este concepto, el primer estado de desarrollo de tumores tiroideos es la inhibición de la producción de hormona por el tejido tiroideo bajo la influencia de goitrógenos. El segundo estadio es la intensificación sustancial de la síntesis y liberación de TSH por parte de la hipófisis. La secreción excesiva continua de esto último es asumido como un factor patogénico básico, responsable del desarrollo tumoral en el tiroides. Así, el efecto de drogas antitiroideas en la tumorigénesis en el tiroides podría estar limitado por la estimulación indirecta de la actividad hormonal de la hipófisis anterior. Sin embargo, algunas sustancias antitiroideas por sí solas no son responsables de un cambio en el balance hormonal, pero también puede ejercer un efecto carcinogénico directo (Napalkov, 1965 y 1967).

Las primeras observaciones del desarrollo de tumores tiroideos en ratas mantenidas como tales pueden remontarse a Bircher (1910 y 1911). Los tumores tiroideos de ratas se sometieron a una inducción prolongada de sobrestimulación de la glándula con sólo TSH endógena. Este método implica el mantenimiento de los animales en un estado de deficiencia de yodo crónica. Desde entonces el método ha sido investigado completamente por Bielschowsky (1953), Axelrad y Leblond (1955), Leblond et al (1957) e Isler et al (1958). Los adenomas tiroideos y los tumores sólidos podrían ser inducidos en todos los animales experimentales manteniéndolos durante dos años con una dieta restringida de yodo (toma diaria de 0.7 µg). Sin embargo, la

malignidad de las neoplasias foliculares que ocurren en el tiroides de rata como resultado de una deficiencia crónica de yodo es cuestionable. En todos los casos descritos hasta ahora, la frecuencia de tumores malignos originados desde el epitelio folicular son claramente más bajos en ratas mantenidas con una dieta pobre en yodo que en animales tratados con goitrógenos. En ratas, la deficiencia de yodo es mucho más efectiva como promotor tumoral que como carcinogénico, sugiriendo la existencia de una relación similar en las poblaciones humanas (Ward & Ohshima, 1986).

Por otro lado, la aplicación de varios tipos de radiación ionizante ha demostrado también ser un método efectivo de inducción de tumores tiroideos en ratas (Russfield, 1967). Así, Lindsay y colaboradores (1957) observaron una alta frecuencia de adenomas tiroideos, carcinomas foliculares y papilares (1:5) en ratas Long-Evans, tres años después de una sola inyección de 0.37, 0.9 o 3.7 MBq/ml. Los tumores sólidos inducidos por yodo radiactivo difirieron muy significativamente de los ocurridos naturalmente. Los tumores tiroideos sólidos pueden también ser inducidos por radiación externa de la rata con pequeñas dosis relativas de rayos X que no producen deficiencias tiroideas (Lindsay y cols., 1961). En ratas Wistar, la radiación con rayos X (con 11 Gy) tuvieron el mismo efecto tumorigénico en el tiroides que una inyección simple de 1.1 MBq de I^{131} (Doniach, 1970), y no había diferencias significativas en respuesta al efecto carcinogénico de radiación observado entre los recién nacidos y los adultos (Doniach, 1969). Lindsay (1969), habiendo revisado los datos publicados en radiación ionizante y neoplasias tiroideas experimentales, llegó a la conclusión de que la radiación perjudica a la glándula y establece un

potencial maligno en las células tiroideas. La radiación que perjudica en el parénquima tiroideo puede permitir también la deficiencia en las hormonas tiroideas como resulta en una secreción prolongada y excesiva de TSH. Así, el incremento de la salida de TSH puede jugar un importante papel en la tumorigénesis por radiación, al menos en lo que concierne a los tumores originados en el epitelio folicular. Bajas dosis de radiación, sin embargo, pueden incrementar la frecuencia de tumores malignos derivados de cada una de las células foliculares sin un incremento nocivo en la salida de TSH.

Los métodos de inducción –a saber, tratamiento con sustancias antitiroideas, restricción del consumo de yodo y radiación- son incluso usados en combinaciones varias. Por ejemplo, la pre-radiación del tiroides incrementa significativamente el desarrollo de tumores foliculares en ratas mantenidas con una dieta baja en yodo (Nadler y cols., 1969). Similares efectos han sido observados en experimentos con la aplicación combinada de radiación y drogas antitiroideas o ciertos carcinógenos químicos (Lindsay, 1969). La combinación de drogas antitiroideas o una dieta baja en yodo y carcinógenos químicos (2-acetilaminofluoreno, normalmente) usado también resultó en un desarrollo tumoral acelerado (Bierschowsky, 1944 y 1945; Paschkis, y cols., 1948; Hall & Bielschowsky, 1949; Axelrad & Leblend, 1955), pero la producción de neoplasias demostró ser más alta que en otros estudios, sobre todo en las etapas tempranas de los experimentos. Los datos sobre el mecanismo gradual de inducción de tumor de tiroides experimental fueron repasados por Turusov & Kobliakov (1986), y los autores llegando a la conclusión de que la TSH actuó

como un último agente promotor en todos los experimentos con sustancias goitrogénicas.

PLANTEAMIENTO DEL TEMA

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA

En carcinomas humanos, especialmente en adenocarcinomas, es frecuente encontrar activaciones anómalas de la ruta MAPK. La ruta MAPK es la siguiente: RET/PTC → RAS → BRAF → MEK → ERK → MAPK. Las señales de activación llegan al núcleo de forma constitutiva y provocan una proliferación incontrolada de las células (Mercer and Pritchard, 2003). En el gen de *B-raf*, se ha descrito una mutación en el exón 15 del gen (T1799A, antes descrita como T1796A) que origina la sustitución de la valina 600 por ácido glutámico (V600E, antes V599E) que conduce a una activación constitutiva de la quinasa (Davies y cols., 2002). En los carcinomas tiroideos, esta mutación aparece casi exclusivamente en la variante papilar (PTC) con patrón arquitectural papilar o mixto papilar-folicular, así como en las variantes de células altas de Warthin-like (Xing y cols., 2005; Ciampi and Nikiforov 2005 y 2007).

A diferencia del carcinoma folicular (FTC), casi todos los carcinomas papilares son diploides o casi diploides, y no tienen inestabilidad de microsatélites. Hay mutaciones activadoras de *ras* (*N-ras*, *H-ras* y *K-ras*) tanto en adenomas como en carcinomas foliculares que podrían ser responsables de la aneuploidía. Los datos más característicos de los carcinomas foliculares son la aneuploidía y la elevada incidencia de mutaciones *ras*. En los PTC hay menor frecuencia de mutaciones activadoras de *ras* que en los FTC. La variante folicular del PTC comparte alteraciones moleculares del PTC clásico y

del FTC: suele mostrar la mutación del *B-raf* característica (K601E) y tienen una incidencia de mutaciones de *ras* más próximas al FTC que al carcinoma papilar clásico.

La activación de PI3K (phosphoinositide 3 kinase) puede producirse mediante dos mecanismos (Blalock y cols., 1999): por una fosforilación del residuo tirosina (Tir) en el receptor que actúa como un lugar de anclaje para el p85 (subunidad reguladora de PI3K) y por la sobreactivación del receptor, bajo efecto de la citoquina Shc que se une al receptor para permitir a GRB-2 y SOS formar un complejo que activa a RAS (Rodríguez-Viciano y cols., 1996; Vanhaesebroeck y cols., 1997; Duronio y cols., 1998 y Scheid y cols., 2001,). RAS induce la localización y activación de PI3K (Pacold y cols., 2000). PI3K activado inicia una cascada de fosforilaciones que termina con la fosforilación de Akt. A su vez, Akt es el principal mediador de PI3K e inicia la señalización (Nicholson y Anderson, 2002).

Existen varios grupos que han descrito mutaciones somáticas dentro de la subunidad catalítica de PI3K (*PI3KCA*) y/o amplificación del gen *PI3KCA* en FA, FTC, PTC y ATC así como en varias líneas de tumores tiroideos. Por lo tanto, parece probable que *PI3KCA* sea un nuevo oncogén involucrado en el desarrollo de los carcinomas tiroideos bien diferenciados (particularmente FTC) y ATC (García-Rostan y cols., 2005; Wu y cols., 2005 y Wang y cols., 2007).

Los análisis genéticos realizados a niños expuestos a radiación durante el accidente nuclear de Chernobyl implicaban al oncogén *ret* en la patogénesis

de los PTC que presentaban (Klugbaues y cols., 1995; Fugazzola y cols., 1995 y Nikiforov y cols., 1997). El oncogén *ret* es un receptor tirosina quinasa que se expresa principalmente en células derivadas de la cresta neural, y normalmente no se expresa o está presente en muy bajos niveles en células foliculares tiroideas. La activación de *ret* en PTC ocurre a través de la recombinación cromosómica, originando una expresión ilegítima de la fusión proteica que consiste en un dominio intracelular de la tirosina quinasa de *ret* acoplado al fragmento N-terminal de un gen heterólogo, dando lugar a la oncoproteína *ret*/PTC (Santoro y cols., 1992). Se han identificado varias formas de reordenamiento *ret*/PTC las cuales difieren en el extremo 5' involucrado en el reordenamiento, las dos más comunes son RET/PTC1 y RET/PTC3.

Por otra parte, los tumores tiroideos de ratas tratadas con perclorato potásico y/o sometidos a otros métodos carcinogénicos, presentan tumores con un patrón histológico folicular y pseudopapilas incluido en un tejido tiroideo hiperplásico. Es frecuente encontrar ambas arquitecturas dentro del mismo lóbulo tiroideo, si bien no es habitual la presencia de cambios nucleares propios del PTC humano. Además, la invasión vascular y capsular es común en estos cánceres, encontrándose en algunos de estos tumores metástasis en pulmón (como ocurre en los carcinomas foliculares humanos, distintos de los papilares donde las metástasis suelen ser en ganglios linfáticos). Parece, por tanto, difícil clasificar estos tumores en base a parámetros histológicos, con la idea de obtener un modelo experimental de cáncer de tiroides homólogo a algún tipo concreto de patología tiroidea en humanos. Quizás un conocimiento de las alteraciones moleculares descritas anteriormente pueda ayudar a resolver el

diagnóstico en los tumores tiroideos inducidos en ratas tratadas con bociógenos.

Por tanto en este trabajo se pretende caracterizar molecularmente los tumores tiroideos que se desarrollan en ratas tratadas con perclorato potásico y determinar si este tratamiento aporta tumores aptos como modelo experimental de alguna variedad de cáncer tiroideo. Para la caracterización molecular se estudiarán varios genes involucrados en la ruta MAPK, concretamente, *ret/PTC*, *N-ras*, *B-raf* y *PI3K*.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 20 tiroides de ratas Wistar incluidos en parafina, tratadas durante 18 meses con perclorato potásico al 1% por vía oral “ad libitum” de forma continua y 10 tiroides controles sin tratar, incluidos en parafina. Para el estudio de reordenamiento *ret*/PTC se utilizó tejido fresco.

1. Carcinogénesis experimental (Método del perclorato potásico).

Para la preparación de 5 litros de perclorato potásico al 1% se necesitó disolver en aproximadamente 2,5 litros de agua sin destilar, 32,3 ml. de ácido perclórico al 20% y 23,84 gr. de hidróxido potásico (KOH), se agita suavemente hasta que queda totalmente disuelto y se añade agua sin destilar hasta completar el volumen final de 5 litros. Esta disolución se llevó a una garrafa de 20 litros (enjuagando bien el matraz y la probeta que utilizamos), repitiendo todo el proceso hasta completar los 20 litros. La garrafa disponía de un grifo dosificador para llevar la solución a los bebederos de las jaulas dónde se encontraban las ratas.

A todas las ratas, excepto a las del grupo control, se les administró la solución de perclorato potásico al 1% vía oral “ad libitum”, de forma continua durante 18 meses.

Todos los animales fueron pesados antes del sacrificio, se realizó mediante punción intracardíaca bajo anestesia con Ketamine/xylazine (100/10 mg/Kg) y se les realizó una autopsia minuciosa. Los tiroides fueron extraídos con posterioridad al sacrificio, tras una incisión media cervical junto con los ganglios linfáticos cervicales laterales y demás tejidos adyacentes a la glándula tiroidea.

2. Estudio histológico.

Una vez extraídos los tiroides, éstos fueron pesados y fijados en formaldehído al 4% durante 12 horas y procesados mediante la técnica habitual de inclusión en parafina.

Para el estudio microscópico del tejido se realizan cortes de los bloques de espesor variable de 4 a 5 micras utilizando el microtomo Angla scientific (Casa Álvarez). Una vez obtenidos los cortes se procede a la tinción con la técnica de Hematoxilina-Eosina.

Se sumergen en xilol 1 durante 10 min. para desparafinar el tejido.

- Se vuelven a sumergir en xilol 2 durante 10 min.

- Se rehidrata el tejido pasándolo por una batería de etanol de gradación decreciente:
 - * Etanol 100° realizando de 25 a 35 pases rápidos .
 - * Etanol 100° realizando de 25 a 35 pases rápidos .
 - * Etanol 90° realizando de 25 a 35 pases rápidos.
 - * Etanol 80° realizando de 25 a 35 pases rápidos.
 - * Etanol 70° realizando de 25 a 35 pases rápidos.
- Se sumerge el tejido durante 5 min. en agua destilada.
- Precedemos a la tinción con hematoxilina durante 2 min.
- Enjuagar y escurrir con agua corriente.
- Tinción con eosina realizando de 2 a 3 pases.
- Enjuagar con agua destilada y escurrir bien. Este paso se realiza dos veces.
- Deshidratación del tejido haciéndolo pasar por una batería de etanol de gradación creciente:
 - * Etanol 70° realizando de 25 a 35 pases rápidos.
 - * Etanol 80° realizando de 25 a 35 pases rápidos.
 - * Etanol 90° realizando de 25 a 35 pases rápidos.
 - * Etanol 100° realizando de 25 a 35 pases rápidos .
 - * Etanol 100° realizando de 25 a 35 pases rápidos .
- Se sumerge el tejido durante 10 min. en xilol 2.
- Se sumerge el tejido durante 10 min. en xilol 1.

Se procede al montaje de la preparación histológica, se pone una gota de resina para pegar el cubre, se deja secar y se observa al microscopio óptico.

Para la identificación inmunohistoquímica de los endotelios vasculares y de la producción de tiroglobulina (TG) se utilizaron los anticuerpos CD34 y TG respectivamente, en diluciones 1:1 (Immunotech, Westbrook ME).

- Preparación de la muestra:

- * Realizar cortes de 3 μm en portaobjetos xilanizados.
- * Secar durante dos horas en estufa a 60°C.

- Pretratamiento

- * Desparafinar e hidratar con gradiente decreciente de etanol.
- * Agua oxigenada al 2% en metanol para eliminar peroxidasa endógena
- * Alcohol 96%
- * Agua destilada
- * PBS
- * Desenmascarar antígenos mediante digestión enzimática en tripsina colocando los cristales en la placa caliente unos 20-30 minutos.
- * Lavar con PBS

- Técnica:

- * PBS
- * Anticuerpo primario, 30 min.
- * Lavado en PBS
- * Anticuerpo biotinado
- * Lavado en PBS
- * Estreptavidina
- * Lavado en PBS
- * Cromógeno, 10 min.
- * Lavado en PBS y luego en agua destilada
- * Hematoxilina acuosa, 3 min.
- * Pasar por agua caliente y montar en medio acuoso.

3. Métodos de valoración.

Se procede a la observación de las muestras con un microscopio óptico convencional (Olympus BX41) y se hacen fotos con una cámara de Olympus SC30 y el procesador de análisis de imagen fue Cell'A (Olympus España S.A.U), las fotos se hacían sobre los casos más representativos de cada grupo y a tres aumentos (4X, 20X y 40X). Para la valoración del tiroides se tiene en cuenta la existencia o no tanto de cambios difusos como focales. En el caso de la existencia de cambios focales se valoran éstos dependiendo de que constituyan un verdadero nódulo o por el contrario se trate de un área formada por un grupo pequeño de 2 a 3 folículos en los que la celularidad tenga características diferentes del resto del parénquima adyacente, en cuyo caso nosotros las hemos denominado como "zonas de transformación pretumoral".

Para considerar estas áreas como verdaderos tumores exigimos como requisito las siguientes características:

- Focalidad
- Signos de crecimiento progresivo
- Diferencias citológicas y/o arquitecturales con el resto de la glándula.

Para encuadrar estos tumores como adenoma exigimos además:

- La presencia de cápsula
- Ausencia de signos de invasión
- Signos de compresión y de atrofia del parénquima adyacente.

Por último recogemos como carcinomas aquellos tumores en los que puede observarse infiltración del parénquima adyacente, invasión capsular, invasión vascular, etc. La invasión vascular es mucho más valorable como signo de malignidad que la invasión capsular. El vaso debe estar localizado dentro de los límites de la cápsula o inmediatamente fuera y debe ser de gran calibre (capilares venosos) con una capa de revestimiento endotelial. Las células intravasculares deben tener un corte limpio con una apariencia epitelial, aunque pueden simular a veces acúmulos de células endoteliales en áreas de organización trombótica. Deben proyectarse dentro de la luz del vaso en forma de trombo. Un grupo de células foliculares puede estar flotando dentro de la luz vascular como resultado de la pérdida de su adherencia a consecuencia de la manipulación quirúrgica y no debe ser considerado como invasión vascular.

4. Biología Molecular.

4.1. Extracción de ADN en material parafinado.

Se realizaron 4-5 cortes de 10 μm de grosor de cada bloque con el tejido incluido en parafina con el microtomo, y se introducen en un eppendorf de 2 ml. Se desparafinaron y se procedió a la extracción de ADN con el siguiente protocolo:

- Desparafinar los cortes de 10 μm de grosor con 1,2 ml de xilol, centrifugar 10.000 rpm 5 min.

- Retirar xilol y lavar dos veces con etanol (EtOH) al 100% centrifugando cada vez a 10.000 rpm durante 5 minutos.
- Retirar el EtOH y añadir 1 ml de tampón de lisis de leucocitos (BLL) que contiene; 500 µl de Tris 1M, 200 µl EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5M, 4 ml de ClNa 5M, 45,30 ml de agua ultrapura, ajustar el pH a 8,2 y guardar a 4°C.
- Añadir 50 µl de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10% (conservado a temperatura ambiente).
- Añadir 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) e incubar durante 1 hora a 50°C, en agitación en un horno de hibridación.
- Añadir 2 µl de Proteinasa K e incubar a 37°C toda la noche. (Para los casos que necesiten más digestión se puede añadir 3 µl más de Proteinasa K y se deja incubar otro día más en las mismas condiciones).
- Fenolizar con un volumen de Fenol/Cloroformo (pH 8,0), agitar vigorosamente, dejar reposar hasta que se formen dos fases, centrifugar 15 minutos a 10.000 rpm y recuperar la fase acuosa.
- Precipitar añadiendo 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y pH 5,2 y 1 volumen de isopropanol a -20°C. Incubar a -20°C durante toda la noche.
- Centrifugar a 10.000 rpm durante 15 minutos, eliminar el sobrenadante, dejar secar y resuspender en 20 µl de agua ultrapura.
- Conservar a -20°C.

4.2. Extracción de ADN en material fresco (NBT).

- Cortar 25 mg de tejido en pequeñas piezas y añadir 180 ul de tampón T1 y 25 ul de proteinasa K. Vortear vigorosamente durante 10-20 seg.
- Incubar a 56 °C con agitación esporádica hasta que se aprecie lisis completa (1-3 horas).
- Vortear la muestra, añadir 200 ul de tampón B3, vortear vigorosamente para mezclar e incubar a 70°C durante 10 min.
- Añadir 210 ul de etanol absoluto (96-100%) y vortear inmediatamente.
- Aplicar a una columna de purificación y centrifugar durante 1 min a 8000 g (10.000 rpm). Si la filtración no es completa, mezclar y repetir nuevamente la centrifugación.
- Añadir 500 ul de tampón de lavado (BW) y centrifugar a 8000g durante 1 min.
- Añadir 600 ul de tampón B5 a la columna y centrifugar a 800 g durante 1 min
- Centrifugar la columna a máxima velocidad durante 3 min
- Pasar la columna a un tubo de 1.5 ml y eluir el ADN añadiendo 200 ul de tampón de elución (BE) precalentado a 70°C y centrifugando a máxima velocidad durante 1 min

4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se buscaron posibles mutaciones amplificando y secuenciando el exón 1 del gene N-ras, analizando los codones 12 y 13 de dicho gen, el exón 15 del BRAF y los exones 9 y 20 del PIK3CA (Tabla 4, pág. 168).

El protocolo de PCR utilizado fue el siguiente:

- Se utilizó la Taq Polimerasa de Boline. La mezcla de reacción para 20 μ l fue: 2 μ l de Master Mix 10X [600 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 mM KCl, 20 mM MgSO_4 , pH 8,3], 0,8 μ l dNTPs 10mM (solución equimolar de dATP, dCTP, dGTP y dTTP ultrapuros), 0,4 μ l de MgCl_2 25mM, 0,2 μ l rN-RAS forward 10 mM, 0,2 μ l rN-RAS reverse 10 mM, 16,2 μ l agua ultrapura y 0,2 μ l DNA polimerasa. A 18 μ l de mezcla de reacción se le añaden 2 μ l de ADN.

-Se les da un pulso en la centrífuga a todos los tubos de PCR.

-Se ponen en el termociclador (MJ Mini, BIO-RAD) con el siguiente programa de PCR:

* 5 minutos a 94°C para la desnaturalización.

*40 ciclos de 94°C durante 1 minuto, T^a de *annealing* específica de cada pareja de cebador, durante 1 minuto

*5 minutos a 72°C para la elongación final.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa ML-SIEVE (CONDA) al 2% y utilizando dos marcadores de cuantificación comerciales de 100pb y el n° VIII (Bioneer). El protocolo de

electroforesis fue de 85 voltios durante 45 minutos y la visualización con luz ultravioleta se hizo en un transiluminador. Se realizaron fotos de todos los casos que serán expuestas en los resultados.

Para la purificación de los productos de PCR se utilizaron las columnas comerciales –*PCR purification kit (Quiagen)*- con el siguiente protocolo:

-Añadir a cada 100µl de producto de PCR, 500µl de *Binding Buffer*.

Mezclar bien y aplicar toda la mezcla al filtro de la columna.

-Centrifugar 13.000 rpm durante 1 minuto.

-Tirar sobrenadante y añadir a la columna 500µl de *Wash Buffer*.

-Centrifugar 13.000 rpm durante 1 minuto.

-Tirar sobrenadante y añadir 200µl de *Wash Buffer*.

-Centrifugar 13.000 rpm durante 1 minuto.

-Tirar sobrenadante y la columna, se pone una nueva y se añade 100µl de *Elution Buffer*.

-Centrifugar 13.000 rpm durante 1 minuto.

-Recoger sobrenadante con los productos de PCR purificados.

Estos productos de PCR son rotoevaporados para liofilizarlos en la rotoevaporadora DNA Plus (HETO). Se envían a secuenciar a Sistemas Genómicos S.L (Valencia) donde se sometieron a secuenciación diagnóstica directa.

El análisis de los resultados se realizó mediante el programa informático Chromas (versión 1.42).

4.4. Estudio de reordenamientos *ret*/PTC.

Para realizar el estudio de los posibles reordenamientos *ret*/PTC, se enviaron los ADNs de las muestras previamente extraídos y purificados por los métodos antes descritos, a la empresa Newbiotechnic, S.A (NBT, Sevilla). El estudio lo realizaron siguiendo dos aproximaciones distintas que permiten detectar distintos niveles de reorganización. Por un lado se realizó análisis tipo Southern Blot (Southern, 1975) que permite detectar niveles de reorganización medios y altos. En segundo lugar, se realizó y analizó una genoteca parcial a partir de amplificaciones con un solo primer de secuencias flanqueantes (Hermann y cols., 2000) al dominio tirosin quinasa del gen RET. Esta segunda metodología permite detectar reorganizaciones con mayor sensibilidad que el Southern.

Los protocolos que siguieron para la realización de los dos análisis se describen a continuación.

4.4.1. Southern blot.

Digestión de ADN genómico y electroforesis: Se digirieron alícuotas de 5-10 ng de ADN con EcoRI en dos fases de 3 h, cada una con una carga de 2 µl de enzima. Los fragmentos originados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio, a bajo voltaje (1 V/cm), durante 18-24 h. una vez cargadas las muestras, se aplicó una corriente de 100 V durante los 5 primeros minutos para asegurar la entrada de todos los fragmentos de ADN

en el gel. Una vez finalizada la electroforesis el ADN del gel se visualizó con luz UV y se marcó la posición de los pocillos y marcadores de peso molecular pinchando el gel con una aguja impregnada en tinta china. La eficacia de la digestión se corresponde con la aparición de bandas que corresponden a secuencias repetitivas de ADN. A continuación, se trató el gel sucesivamente con:

- HCL 25 mM (hidroliza fragmentos de alto peso molecular)
- Southern I (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) (solución desnaturalizante)
- Southern II (1 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl) (solución neutralizante)
- SSC 20X (3 M NaCl, 0.3 M citrato trisódico, el pH se ajusta a 7 con HCl 1 M) (tampón de transferencia)

Cada tratamiento se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Transferencia a membrana: Tras los tratamientos anteriores, el ADN se transfirió a un filtro de Yulon (Hybond-N, Amersham, UK) por capilaridad. Para ello, el gel se colocó sobre un puente de papel de filtro Whatman 3 MM, cuyos extremos se sumergieron en tampón de transferencia, SSC20X. Sobre el gel se colocaron sucesivamente una membrana de nylos del tamaño del gel, tres papeles Whatman 3 MM, y una pila de papel absorbente. Sobre el conjunto, se colocó un peso de unos 500 g y se mantuvo durante un periodo mínimo de t horas. Una vez realizada la transferencia, el filtro se secó a temperatura ambiente, y el ADN se fijó covalentemente al filtro por iluminación con luz UV en un "cross.linker" (CI 100/UVP, San Gabriel, USA) según las indicaciones del fabricante.

Marcaje: La sonda se preparó con 50-100 ng de ADN, siguiendo el método de cebadores al azar descrito por Feinberg y Volgestien (1983). Se usaron los kits comerciales de Amersham Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante. La polimerasa Klenow utiliza los cebadores aleatorios como inicio de la síntesis de la cadena complementaria en presencia de dATP, dTTP, dGTP y dCTP.

Hibridación y lavados: Los filtros se colocaron en el horno de hibridación (HybaidTU micro-4), con 15 ml de solución de hibridación, y se incubaron durante al menos 1 h a 65°C para bloquear los sitios de unión inespecífica presentes en las membranas. Posteriormente, el fragmento de ADN marcado y desnaturalizado se añadió a la solución de hibridación (SSPE 5X, 0.2% ficoll 400, 0.2% polivinilpitolidona, 0.1% SDS, 0.2% BSA) donde se siguieron incubando los filtros durante 12-18 horas a 65°C. Tras la hibridación, se retiró la sonda y se lavaron varias veces las membranas con las soluciones de lavado I (2X SSPE, 1% SDS) y con la solución de lavado II (0.2% SSPE, 0.1% SDS) a 65°C durante un periodo mínimo de 20 minutos cada una.

4.4.2. Construcción y análisis de genotecas parciales de regiones flanqueantes del dominio TK.

Amplificaciones con un solo primer de secuencias flanqueantes al dominio TK:

Para ello se realiza una nested-PCR con dos primers del dominio TK (primers A y B) y con un tercer primer (primer C) que contiene una región degenerada de

10 nucleótidos y una cola de secuencia única, siguiendo el esquema descrito en la Figura 23.

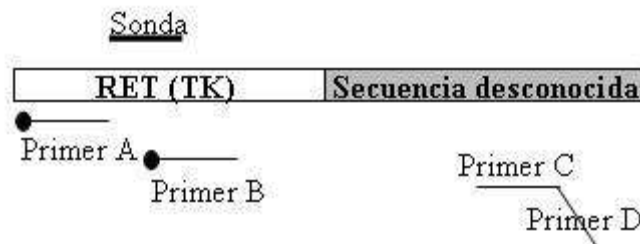


Figura 23. Esquema general de la construcción de la genoteca parcial de regiones flanqueantes al dominio TK para el estudio del reordenamiento *ret*/PTC.

-En primer lugar, se realiza una PCR lineal con el primer A (5'-TGGGAATTCCTCGGAAGAA-3'), y 50 ng de ADN genómico empleando las siguientes condiciones: 94°C, 2 min; 92°C, 30 seg., 55°C, 30 seg., 72°C, 5 min. (35 ciclos); 72°C, 10 min. Para ello se emplea un termociclador GeneAmp 9700 PCR Systems (Applied Biosystems).

-El producto de la amplificación anterior se purifica y se emplea como sustrato para una segunda amplificación con los primers A y D (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGGNNNNNNNNNNNN-3'). Las condiciones de amplificación son las siguientes: 94°C, 2 min; 92°C, 30 seg., 52°C, 30 seg., 72°C, 5 min. (35 ciclos); 72°C, 10 min.

-El producto de la amplificación anterior se purifica y se emplea como sustrato para una nueva PCR con los primers B y C (5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3').

Construcción de una genoteca parcial en pGEM-T: El producto de la última amplificación del apartado anterior se purifica empleando columnas de GFX

(Amersham Pharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante y los insertos se introducen en el vector comercial pGEM-T (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Aislamiento de clones y construcción de macroarrays:

-En primer lugar se transforma *E.coli* con la genoteca y se siembra en placas de LB con ampicilina y X-gal más IPTG para realizar selección por color. Las colonias blancas (portadoras de insertos) se picaron con palillos de dientes redondos y estériles, y se transfirieron a placas de 96 pocillos con 100 µl de LB + antibiótico. Se dejaron crecer toda la noche a 37°C en una estufa, sin agitación. Al día siguiente aparecieron turbias.

-Se agregó igual volumen de glicerol estéril (glicerol comercial al 99% aprox.) a cada uno de los pocillos con una pipeta multicanal, y se mezcló bien mediante varios “pipeteos” arriba y abajo, con lo que quedaron listas para ser transferidas a los filtros.

-La transferencia se llevó a cabo en el robot BIOMEK 2000 (Beckman) mediante un programa modificado que permitió ordenar 4 placas por duplicado (768 clones) sobre un filtro de área 11.5 x 7.5 cm, según la configuración mostrada en la Figura 24 (pág. 166). Esta configuración permitió localizar positivos (dobles) de forma inequívoca.

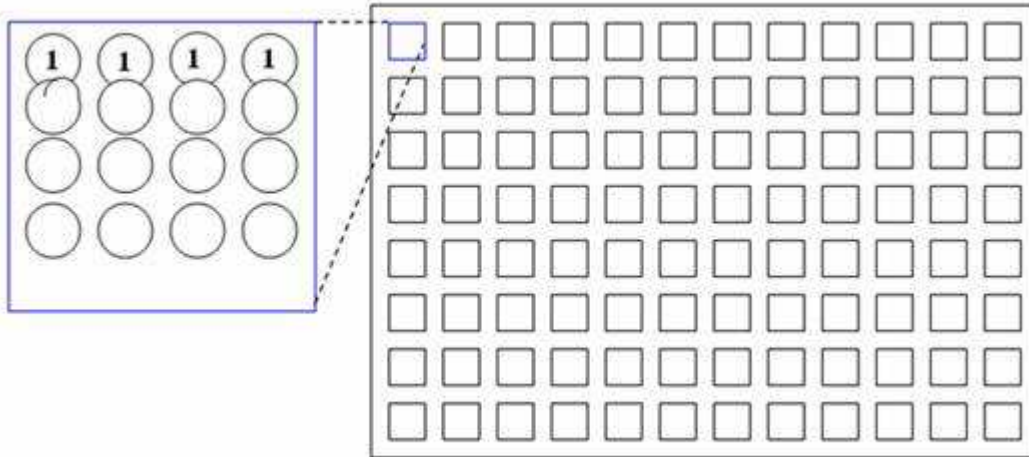


Figura 24. Esquema de la configuración del filtro para el aislamiento de clones y construcción de macroarrays.

Como filtros se emplearon piezas de Hybond N (Amersham) recortadas para ajustarse a la superficie interna de uno de los contenedores de lavado de las puntas metálicas (11.5 x 7.5 cm). Una vez efectuada la transferencia, el filtro se dispuso sobre una placa de agar LB (la cara en contacto con las puntas hacia arriba) con el antibiótico correspondiente, y se dejaron crecer en una estufa a 37°C hasta que se consideró adecuado (colonias suficientemente grandes, homogéneas y no confluentes).

-El tratamiento de los filtros para producir la lisis de las bacterias, y la adhesión del DNA al filtro se realiza siguiendo protocolos estándar (Sambrook y cols., 1989).

Selección de clones: Los arrays construidos en el punto anterior se hibridan con la sonda del dominio TK para seleccionar los clones positivos. La sonda se obtiene mediante PCR empleando los primers A y E (5'-TGCAAGCCCCGTACAACCTTG-3'). Los protocolos de marcaje e hibridación son los mismos que los descritos en el punto B.

Extracción de ADN y Secuenciación: Los clones seleccionados tras el proceso de hibridación se extrajeron y secuenciaron mediante métodos automatizados. Para ello, en primer lugar, los clones seleccionados se cultivan en placas de 96 pocillos con 1.5 ml de LB más ampicilina y tras una noche de cultivo a 37°C con agitación se procedió a la extracción de ADN empleando la estación de trabajo Biomek 2000 (Beckman-coulter). Finalmente, la secuenciación de ADN se realizó con el kit de marcaje BigDyeV2 y un analizador de ADN de 16 capilares (modelo ABI Prism 3100, Applied Biosystem).

GEN	FORWARD	REVERSE	EXÓN	MUTACIÓN	CEBADOR	Tª ANNEALING	TAMAÑO BANDA
rNRAS	5'TCGTAATTGCTGCTTTCC-3'	5'TGGATGAATATGATCCCACC-3'	1	Esperada	Kobayashi y cols., (2002)	58°C	150 pb
rBRAF	5'ATATATTTCTTCATGAAGACC-3'	5'ATCCAGACAACACTGTTCAAAC-3'	15	V600E	Diseño propio a partir de la secuencia del GeneBank XM_001070228	55°C	110pb
rPIK3CA	5'TGACAAGGAACAGCTCCGAGCAC -3'	5'TCTGCCTTGAGAGCCTCACTCCC -3'	9	G1633A A1634G C1636A	Diseño propio a partir de la secuencia del GeneBank XM_574916	61°C	107pb
rPIK3CA	5'TGATGCTTGGCTCCGGAAT-3'	5'GTGCGTCATTCATTTGCTTTGTG-3'	20	A3073G A3140G	Diseño propio a partir de la secuencia del GeneBank XM_574916	61°C	107pb

Tabla 4. Características de los cebadores y de los productos de PCR utilizados en el estudio

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Carcinogénesis experimental

Al analizar el modelo de carcinogénesis experimental en ratas Wistar con el método del perclorato potásico mediante la observación histológica y siguiendo los criterios de valoración explicados en el apartado de Materiales y Métodos, se establecieron tres grupos bien definidos (Tabla 5, pág. 180).

El primer grupo lo comprendían diez Ratras Wistar no tratadas (controles), donde la glándula tiroidea presentaba una histología normal y no se observaron evidencias de invasión capsular y/o vascular. Los órganos adyacentes (ganglios) o incluso los más lejanos (pulmón) a estas glándulas tiroideas, no presentaban signos de metástasis (Fig. 25 y Fig. 26, págs. 171 y 172).

Las veinte ratas Wistar restantes que fueron tratadas con perclorato potásico al 1%, se dividieron en dos grupos. El criterio de selección de estas 20 ratas, entre un conjunto mayor, fue el de presentar un tiroides de aspecto tumoral con signos claramente invasivos (Fig. 27 pág. 172). Uno estaba formado por diez ratas que presentaron tumores tiroideos en los que se descarta una simple hiperplasia puesto que se demuestra la invasión capsular

y/o vascular, sin que existiesen metástasis cervicales o pulmonares. En cuatro de estos tumores se advirtió invasión capsular y no vascular (Fig. 28 pág. 172) mientras los seis restantes presentaron ambos tipos de invasión (Fig. 29 pág. 173). El otro grupo, de otras diez ratas mostró tumores tiroideos invasivos pero adicionalmente presentaron metástasis pulmonares (Fig. 35 pág. 179).

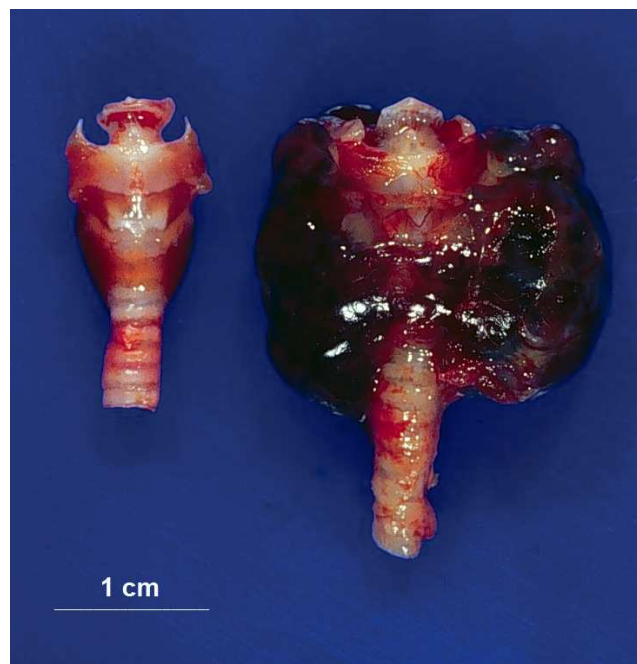


Figura 25. Macro de dos glándulas tiroideas de rata. La imagen de la izquierda corresponde a una glándula tiroidea de una rata no tratada (control) y la imagen de la derecha a una glándula tiroidea de una rata tratada con perclorato potásico durante 18 meses (1X).

Según los resultados anteriormente expresados los tumores tiroideos obtenidos en ambos grupos de ratas, con y sin metástasis, histológicamente correspondían a un cuadro ciertamente tumoral que rebasaba los límites de la hiperplasia pretumoral. En uno se demostró la existencia de la invasión local (capsular y/o vascular) y en otros la evidencia de proliferación tumoral maligna fue irrefutable mediante la demostración de metástasis pulmonares.

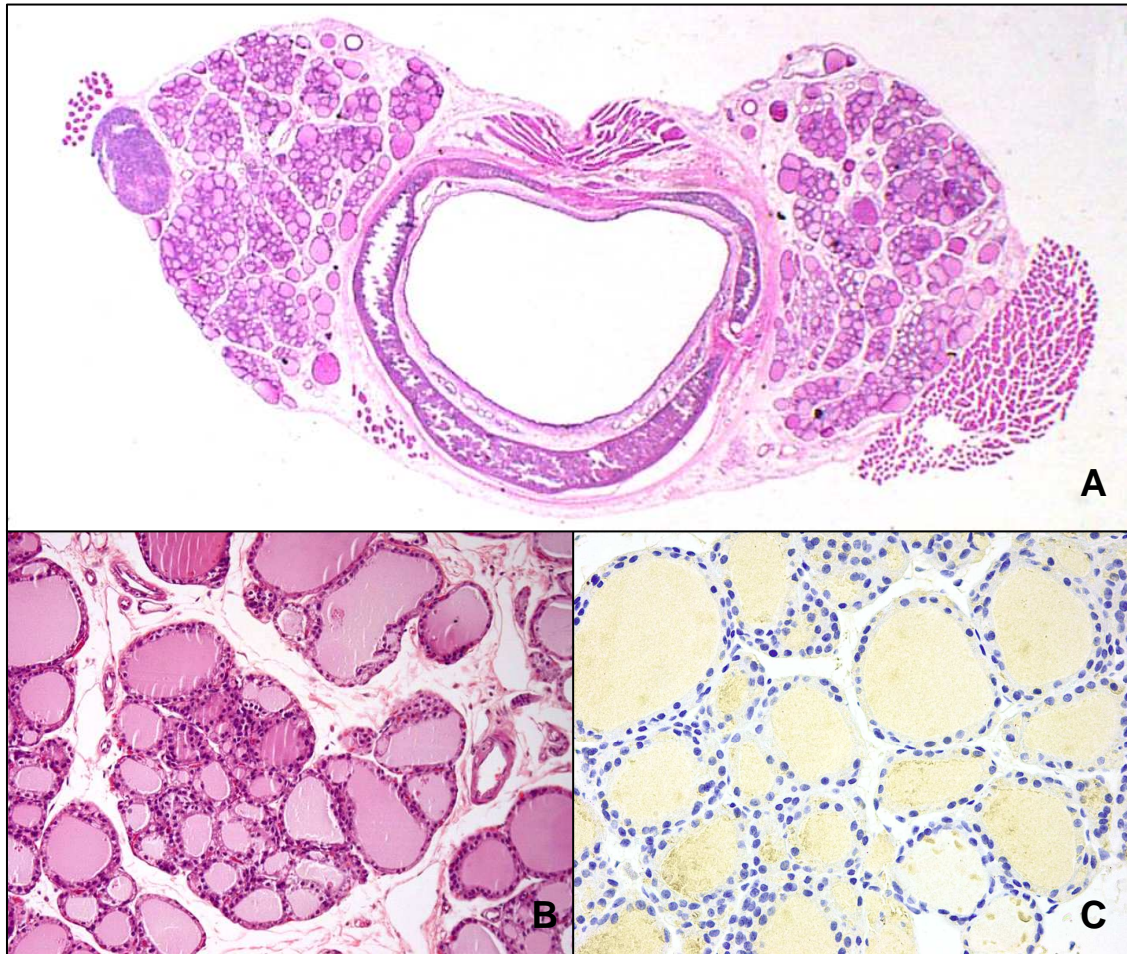


Figura 26. A Panorámica de la glándula tiroidea de una rata no tratada con perclorato potásico (control). Se pueden observar los dos lóbulos a ambos lados de la tráquea. En cada lóbulo se diferencian las agrupaciones de folículos tiroideos bien organizados separados por tabiques de colágeno H-E (1X). **B** Mayor aumento de la imagen anterior en la se observa el epitelio folicular que rodea el coloide de tiroglobulina formando el folículo tiroideo. En los tabiques de colágeno que separan las agrupaciones foliculares se puede observar vasos sanguíneos, linfáticos y nervios H-E (20X). **C** Expresión de tiroglobulina evaluada mediante análisis inmunohistoquímico. Se observa inmunotinción positiva para el coloide de tiroglobulina rodeado por el epitelio folicular (40X).

Una vez valorados los datos de la histología convencional para establecer la naturaleza tumoral maligna de las lesiones, se trata de correlacionar el cuadro histológico presentado con el comportamiento biológico, mas o menos predecible, por la experiencia que aporta la patología humana.

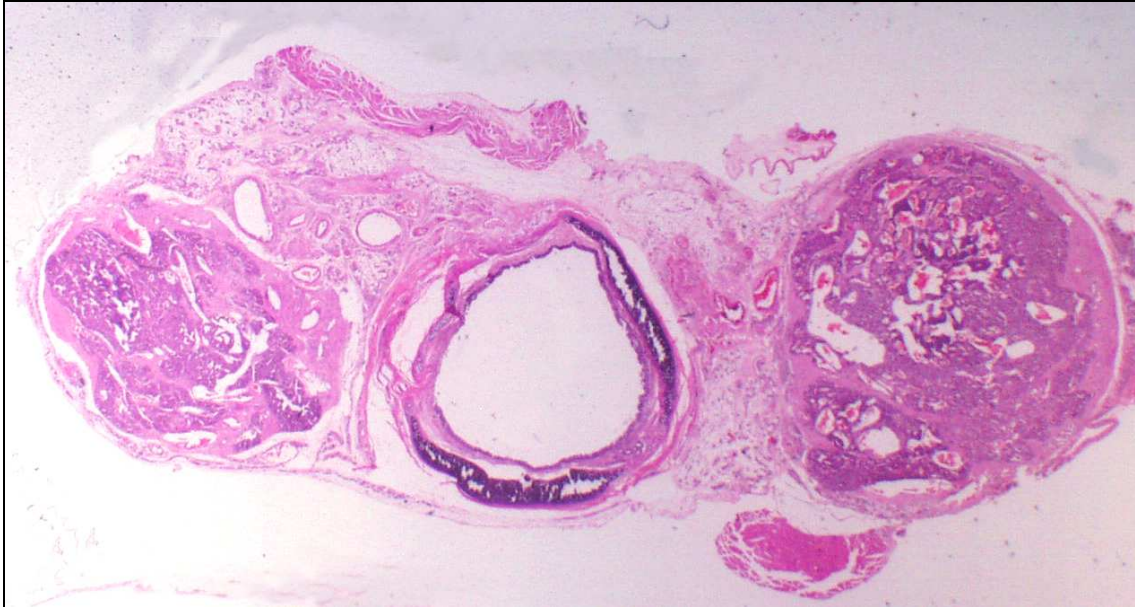


Figura 27. Panorámica de una glándula tiroidea de una rata tratada con perclorato potásico durante 18 meses H-E (1X). Obsérvese en el lado izquierdo un gran nódulo pretumoral que ocupa todo el lóbulo y en el que se pueden distinguir grandes vasos dilatados y aumento de la basofilia nuclear.

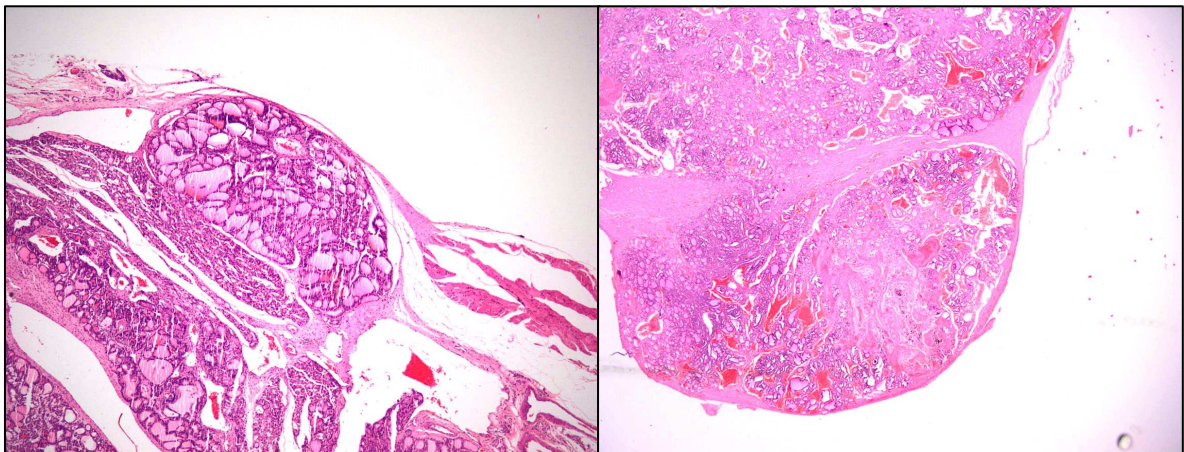


Figura 28. Imágenes de la invasión capsular del tejido tumoral. La fina capsula es atravesada por el tejido tumoral H-E (10X).

En este sentido la glándula tiroidea presenta en todos los animales que han sido tratados con el agente bociógeno un cuadro de hiperplasia difusa benigna, sobre el que asienta una hiperplasia nodular en principio potencialmente maligna (atipia arquitectural o hiper cromasia nuclear/núcleos vesiculosos) (Fig. 30 pág. 174).

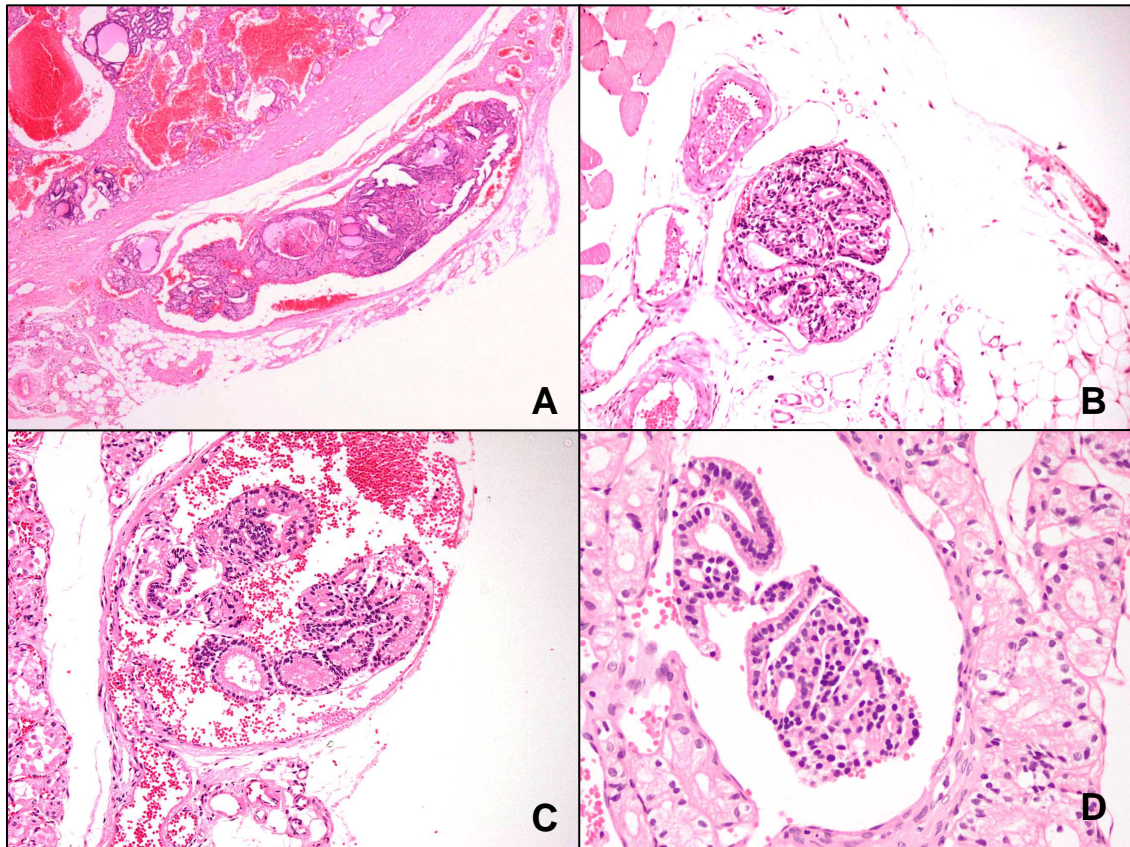


Figura 29. **A** Invasión vascular del tejido periglandular de una rata tratada con el bociógeno. Pueden observarse folículos tiroideos con coloide dentro de la masa tumoral. H-E (10X). **B** Masa tumoral en un vaso sanguíneo localizado en la periferia de la glándula y rodeado de tejido conectivo. Las células de la masa tumoral son hiper Cromáticas. H-E (10X). **C** Invasión vascular de tejido tumoral con folículos tiroideos de células hiper Cromáticas y con escaso o nulo coloide. H-E (20X). **D** Detalle de una masa tumoral dentro de un vaso sanguíneo rodeado de hiperplasia simple difusa. H-E (40X).

Pero todos los tumores tiroideos que conformaron el segundo y tercer grupo del experimento se acompañaron de estigmas de suficiente calado para ser catalogados como tumores malignos (invasión y/o metástasis).

Otro aspecto distinto es la equivalencia con los cuadros histológicos de los tumores tiroideos humanos. Estos tumores obtenidos en los tiroides de rata suponen una transición del cuadro histológico de una hiperplasia abigarrada y atípica a un tumor maligno e invasivo. Es preciso tener en cuenta que la glándula tiroidea de todos estos animales presenta hiperplasia nodular atípica.

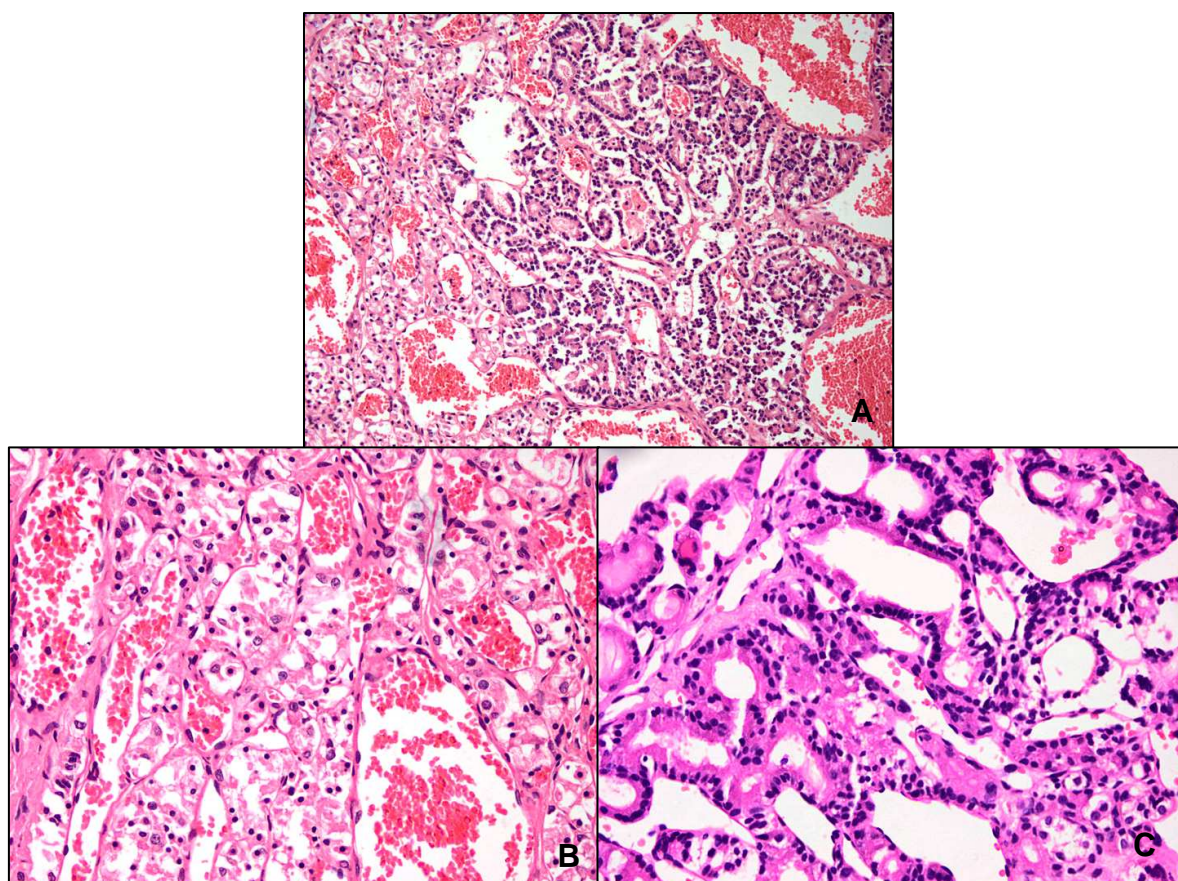


Figura 30. **A** Glándula tiroidea de rata tratada con bociógeno donde se puede observar a la izquierda una hiperplasia simple difusa y a la izquierda una proliferación tumoral. H-E (20X). **B** A mayor aumento la hiperplasia difusa benigna con células de mayor tamaño y folículos pequeños junto a una trama vascular abundante. H-E (40X). **C** A mayor aumento la proliferación tumoral. H-E (40X).

La hiperplasia simple difusa consiste en un aumento de células foliculares y de folículos pequeños, junto con una trama vascular muy abundante y de aspecto congestivo (Fig. 30 B). Las células foliculares no son atípicas, contienen núcleos redondeados y citoplasmas eosinófilos, mientras los pequeños folículos tampoco muestran grandes variaciones de forma y tamaño pero no contienen coloide o bien es muy escaso.

La hiperplasia nodular atípica corresponde a un cuadro histológico mas abigarrado, en el que el patrón nodular es relevante (Fig. 30 C y Fig. 31 pág. 175). La atipia arquitectural es muy marcada, en parte por la propia

conformación de los folículos y en parte porque el aumento de la vascularización se traduce en grandes lagos sanguíneos tapizados por endotelio (Fig. 32 pág. 176). La proliferación folicular protuye en el interior de los espacios sanguíneos tomando el aspecto de proyecciones papilares intravasculares. Se confirma que tales espacios corresponden a vasos sanguíneos dilatados mediante la inmunorreacción positiva para CD 34. Los folículos continúan siendo pequeños y el material coloide intrafolicular, cuando está presente es muy escaso. La presencia de coloide en el interior de las luces foliculares, así como la producción de TG por parte de las células foliculares se demuestra de forma más objetiva mediante la inmunorreacción positiva para TG.

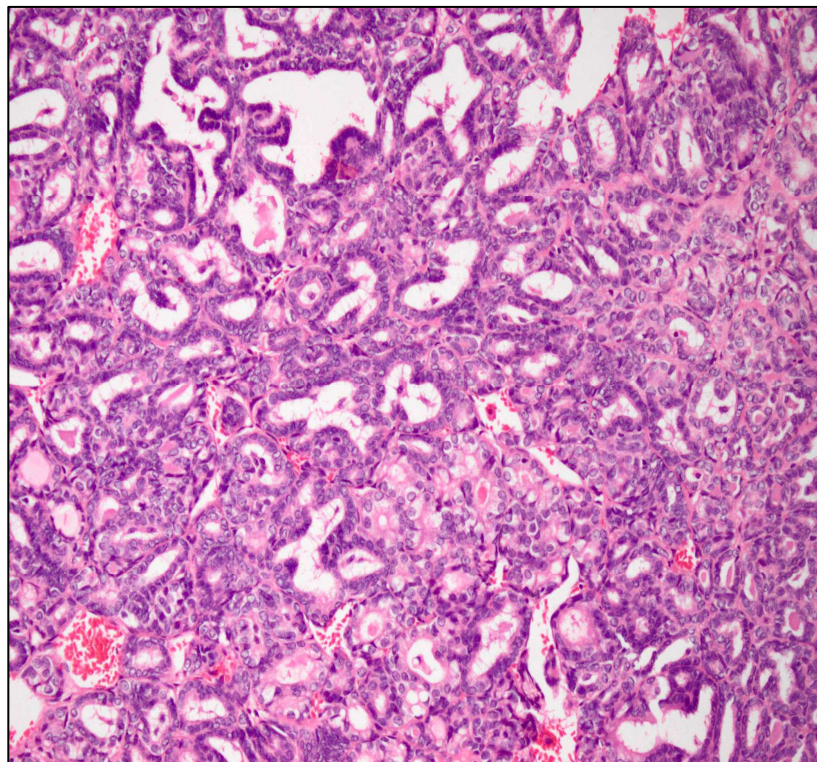


Figura 31. Proliferación tumoral con marcada atipia arquitectural H-E. (40X).

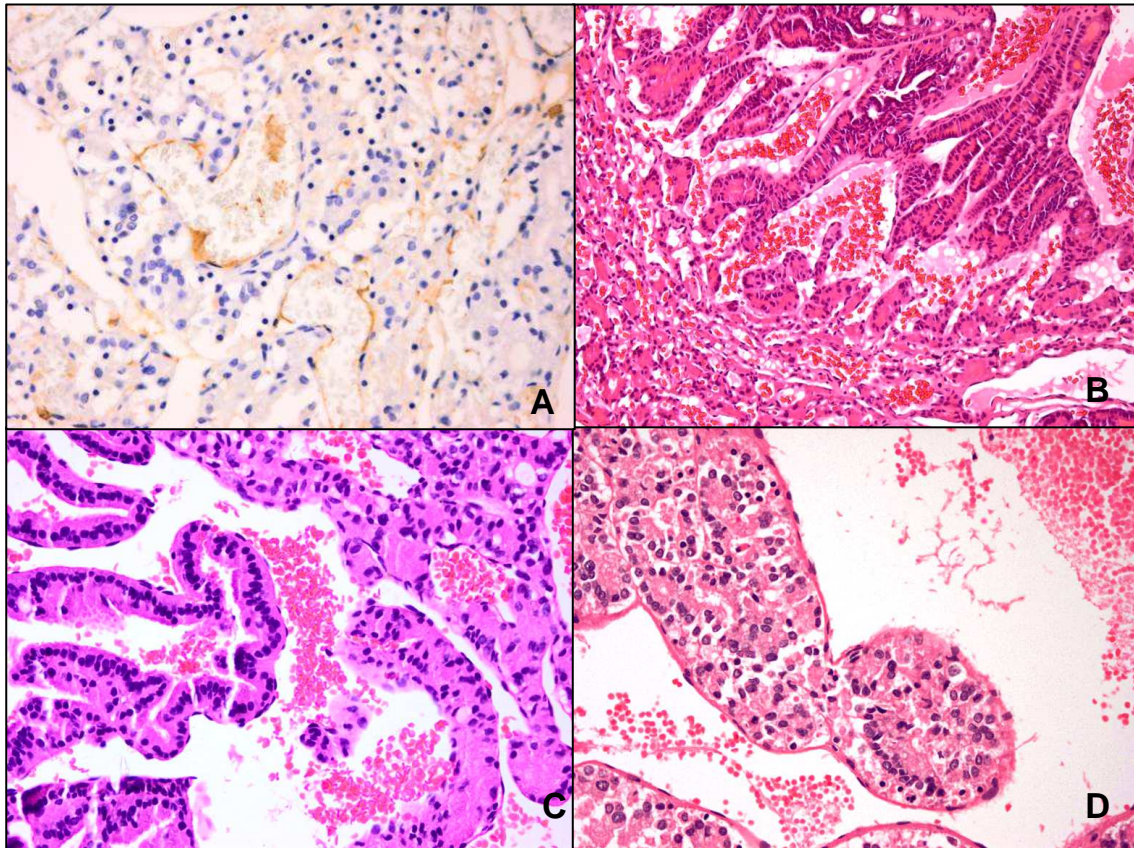


Figura 32. **A** Expresión de CD 34 evaluada mediante análisis inmunohistoquímico. Se observa inmunotinción positiva para las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos. Obsérvese el aumento de vascularización formando grandes lagos sanguíneos donde protuyen la proliferación celular (40X). **B** Proyecciones pseudopapilares intravasculares que hacen prominencia en la luz de los vasos sanguíneos H-E (10X). **C** Seudopapilas intravasculares dónde pueden verse folículos pequeños con poco o nulo coloide y células foliculares con núcleos hiperocrómicos H-E (20X). **D** Detalle de una pseudopapila intravascular tapizada por células endoteliales H-E (40X).

La atipia citológica es mas discreta; consiste en núcleos dismorficos e hiperocrómicos, además de presencia de ocasionales mitosis anormales. Algunos núcleos, más o menos agrupados, muestran aspecto vesiculoso, sin estar apilados ni presentar hendiduras o seudoinclusiones citoplásmicas (Fig. 34 pág.178). Cuando este cuadro histológico aparece sin otros signos morfológicos de malignidad el diagnóstico no puede sobrepasar el de hiperplasia nodular atipica. No obstante cuando se advierte la presencia de invasión vascular y/o capsular el diagnóstico es de carcinoma folicular mínimamente invasivo con comportamiento biológico incierto. En caso de

presencia de metástasis se confirma el diagnóstico de cáncer folicular metastásico.

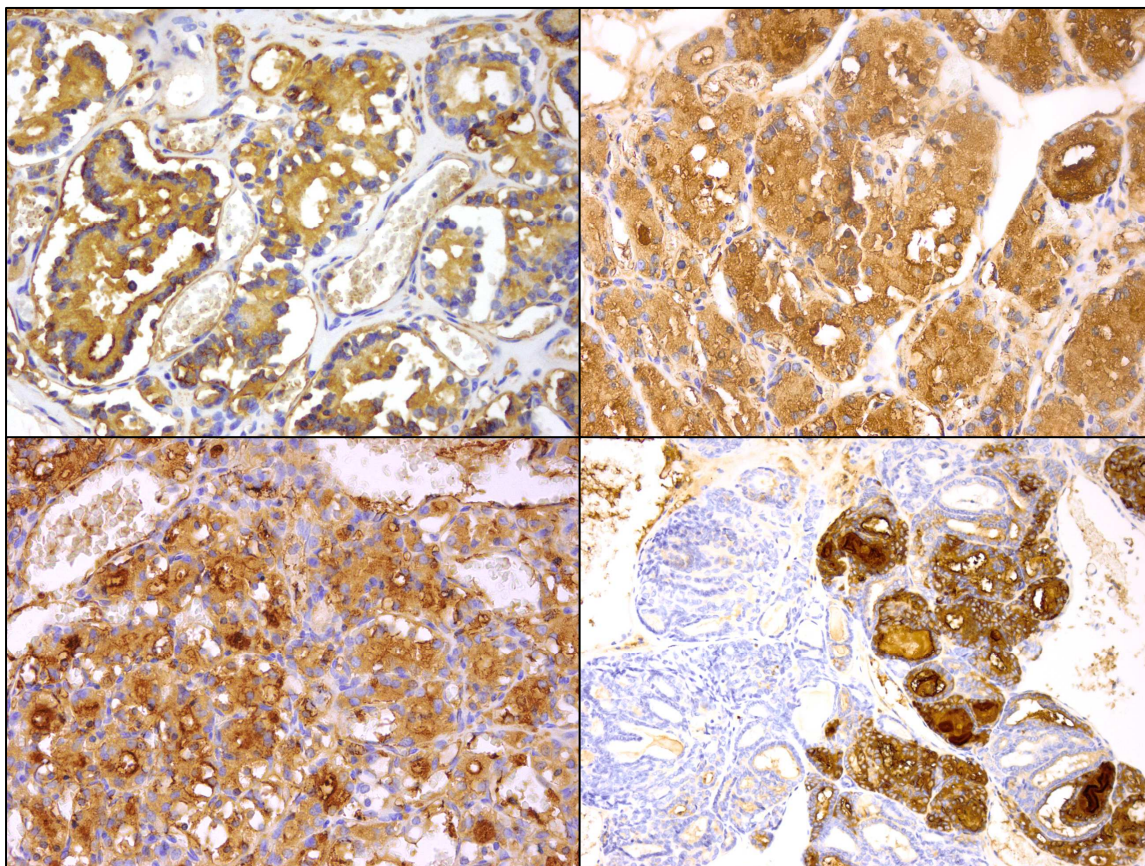


Figura 33. Expresión de tiroglobulina evaluada mediante análisis inmunohistoquímico. Se observa inmunotinción positiva en el citoplasma de células foliculares que forman folículos tiroideos en los que el coloide es escaso o nulo, aunque en algunos folículos que contienen coloide la positividad es marcada (40X).

La histología de las metástasis pulmonares tiene una particularidad y es que la producción de coloide es la que cabe esperar en una proliferación folicular tumoral humana, bien diferenciada; los folículos son redondos en su mayoría, tapizados por células cúbicas y con moderada cantidad de material proteináceo eosinófilo en su interior. Estos nódulos metastásicos a veces son confluyentes y forman una gran masa que ocupa parte de un lóbulo, pero la mayoría son pequeños nódulos, a menudo microscópicos, en situación intermedia, situados en la proximidad de bronquiolos. Otra diferencia

importante, entre la metástasis pulmonar y el tumor primitivo es que los vasos son abundantes en la primera pero no alcanza la riqueza de los segundos ni se forman lagos sanguíneos por dilatación de luces (Fig. 35).

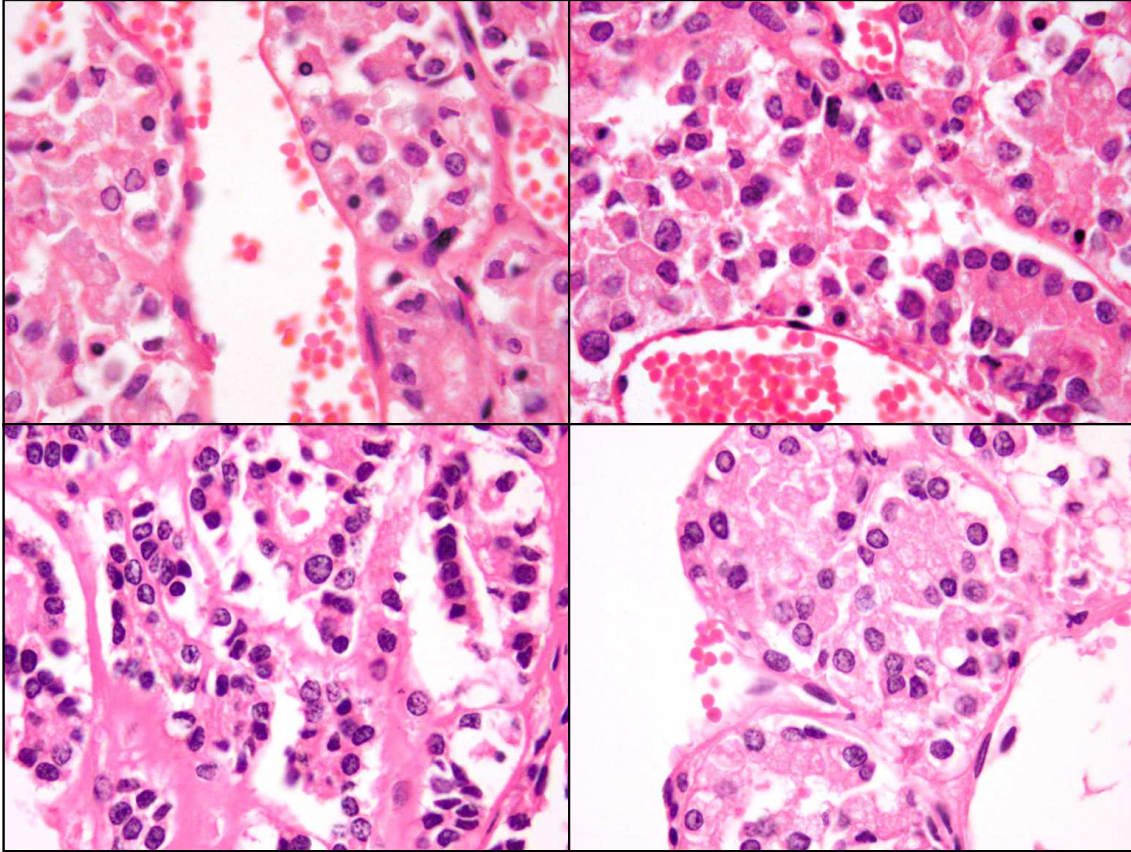


Figura 34. Núcleos atípicos, unos hipercrómicos y otros vesiculosos; éstos últimos sin pseudoinclusiones citoplasmáticas pero con escotaduras incipientes H-E (100X).

Según los resultados histológicos obtenidos, los dos grupos de ratas Wistar tratados con perclorato potásico manifestaban una glándula tiroidea con patrón arquitectural folicular que no reproduce exactamente el patrón de los tumores humanos de este tipo pero con características citológicas que son aceptables en esta interpretación diagnóstica. Las metástasis pulmonares del tercer grupo muestran patrón folicular arquitectural y un hábito citológico también folicular que se aproxima solo en algunos aspectos a la variante folicular del carcinoma papilar humano.

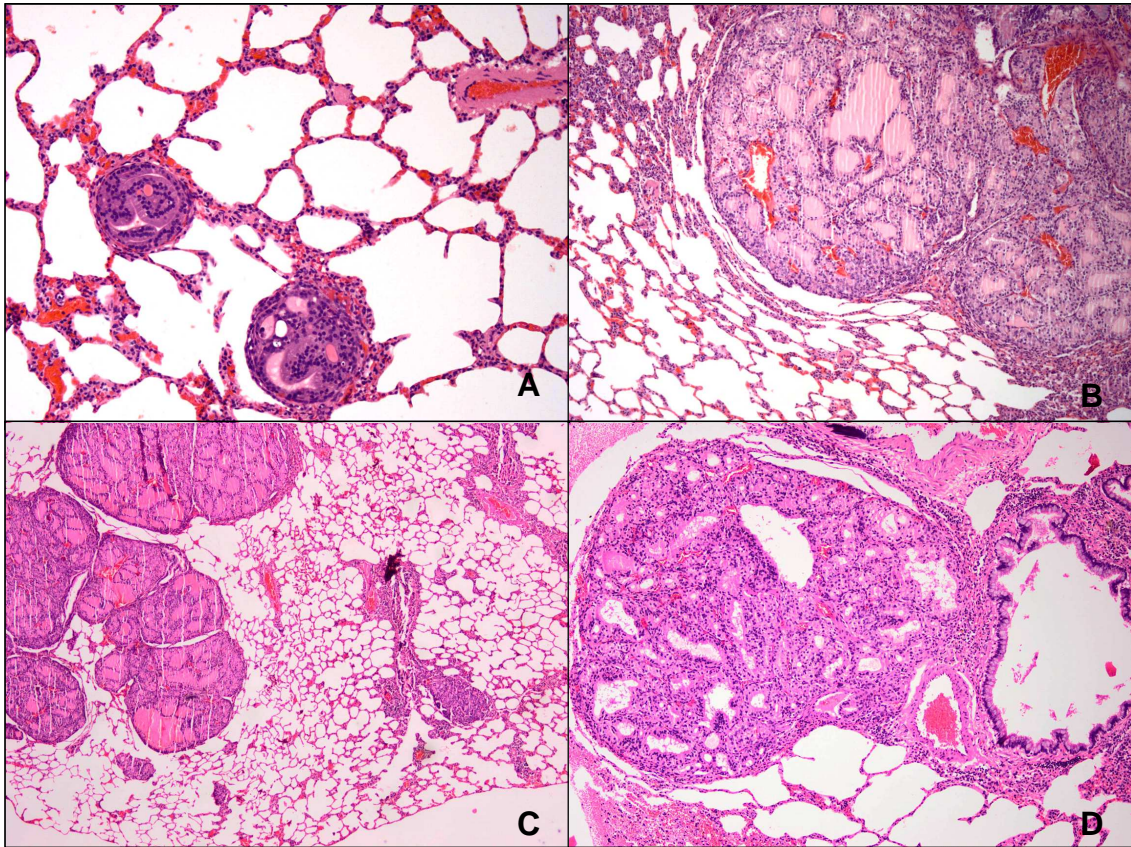


Figura 35. A Metástasis pulmonares H-E (40X). **B** Gran masa tumoral invadiendo el tejido pulmonar. Se puede distinguir los folículos tiroideos tapizados por células cúbicas, con moderado contenido coloideo y abundante irrigación sanguínea H-E (20X). **C** A menor aumento varias metástasis de distintos tamaños invadiendo el pulmón H-E (10X). **D** Detalle de una lesión metastásica cercana a un bronquiolo pulmonar H-E (40X).

GRUPO	IDENTIFICACIÓN	INVASIÓN VASCULAR	INVASIÓN CAPSULAR	METÁSTASIS PULMÓN
I	C-1	-	-	-
	C-2	-	-	-
	C-3	-	-	-
	C-4	-	-	-
	C-5	-	-	-
	C-6	-	-	-
	C-7	-	-	-
	C-8	-	-	-
	C-9	-	-	-
	C-10	-	-	-
II	TI-1	+	+	-
	TI-2	+	+	-
	TI-3	-	+	-
	TI-4	+	+	-
	TI-5	+	+	-
	TI-6	-	+	-
	TI-7	+	+	-
	TI-8	+	+	-
	TI-9	-	+	-
	TI-10	-	+	-
III	TM-1	+	+	+
	TM-2	+	+	+
	TM-3	+	+	+
	TM-4	+	+	+
	TM-5	+	+	+
	TM-6	+	+	+
	TM-7	+	+	+
	TM-8	+	+	+
	TM-9	+	+	+
	TM-10	+	+	+

Tabla 5. Clasificación según valoración histopatológica. (C: Controles, TI: tratadas + invasión y TM: tratadas + metástasis)

2. PCR y Secuenciaciones de los genes estudiados.

A) *B-raf*

En todos los casos se observó la expresión del gen BRAF mostrando una banda de 110pb en el gel de agarosa al 2% (Fig. 36).



Figura 36. Gel de agarosa al 2% para el gen de BRAF. (C: control, TI: tumores con invasión vascular y/o capsular pero sin metástasis y TM: tumores con metástasis).

Ninguno de los 20 tumores tiroideos (grupo II y III) mostraron la mutación puntual esperada en BRAF (exón 15), siendo la secuencia del gen en los tumores tiroideos del grupo II y III exactamente igual que en los tiroides controles en cuanto a ésta mutación puntual (Cuadro 1, cromatogramas 1, páginas 182 y 183, respectivamente).

No obstante se observan 4 mutaciones puntuales en todos los tumores tiroideos tanto los del grupo II como los del grupo III (Tabla 6, pág. 182). Tres de estas mutaciones puntuales se dan en el último nucleótido de cada codón (G1767A, C1794T y C1806T) y, por lo tanto, no se traducen en cambios de aminoácidos en la proteína *B-raf* (Cuadro 1, cromatogramas 2 y 3, páginas 182, 183 y 184 respectivamente). Sin embargo, aparece una cuarta mutación

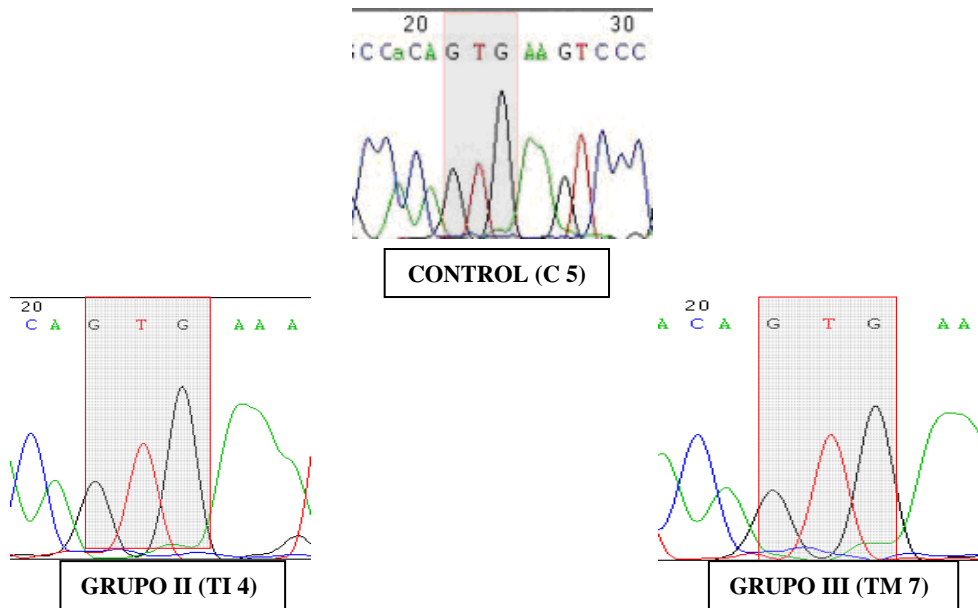
puntual en el primer nucleótido del codón (T1789C), traduciéndose en un cambio de aminoácido, asparragina por ácido glutámico (Asn→Asp), en la proteína resultante.

ADN	ARN	AMINOÁCIDO
TTA → CTA	AAU → GAU	Asn → Asp
GCC → GCT	CGG → CGA	Arg → Arg
TCC → TCT	AGG → AGA	Arg → Arg
ACG → ACA	UGU → UGU	Cys → Cys

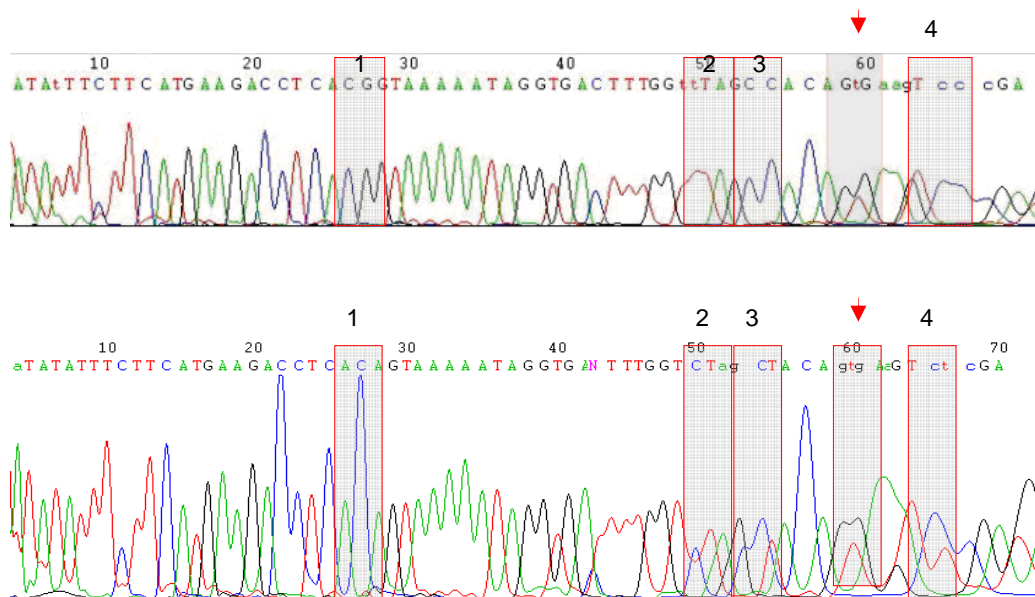
Tabla 6. Mutaciones puntuales encontradas en el gen de *B-raf*. Se muestra en color rojo el nucleótido que muta, timina por citosina, que ocupan el primer lugar del codón y que se traduce en un cambio de asparragina por ácido aspártico en la secuencia aminoacídica de la proteína (TTA→CTA = Asn→Asp).

C 5 (Control)			
TATTTCTTCA	TGAAGACCTC	<u>ACG</u> GTAAAAA	TAGGTGACTT
TGGT <u>T</u> AGCC	ACAG <u>T</u> GAAGT	<u>CC</u> CGATGGAG	TGGGTCCCAT
CAGTTTGAAC	AGTTGTCTG		
TI 4 (Grupo II)			
TATTTCTTCA	TGAAGACCTC	<u>ACA</u> GTAAAAA	TAGGTGACTT
TGGT <u>C</u> AGCC	TACAG <u>T</u> GAAT	<u>CC</u> TCGA	
TM 7 (Grupo III)			
TATTTCTTCA	TGAAGACCTC	<u>ACA</u> GTAAAAA	TAGGTGACTT
TGGT <u>C</u> AGCC	TACAG <u>T</u> GAAT	<u>CC</u> TCGA	

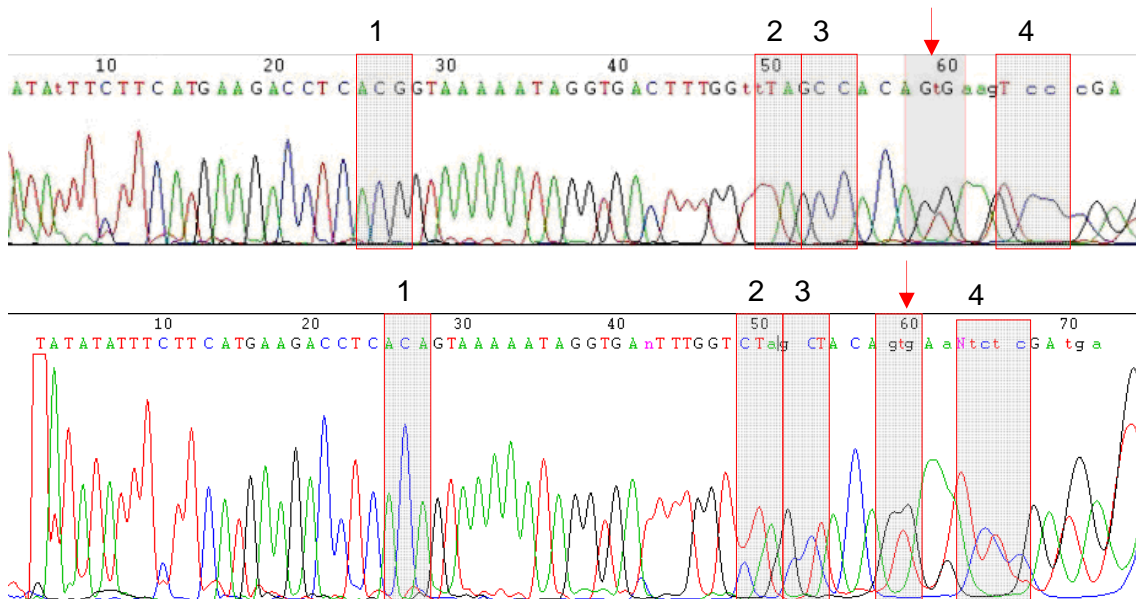
Cuadro 1. Secuencia parcial de *B-raf* del ADN de C 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata. Rojo, punto caliente (*hotspot*); verde, mutaciones puntuales que no se traducen en cambio de aminoácido en la proteína; amarillo, mutación puntual que se traduce en un cambio de aminoácido en la proteína.



Cromatograma 1. Figura superior: En el rectángulo gris se muestra el codón dónde se ubica el punto caliente (*hotspot*) esperado en el gen *B-raf*. **Figura inferior izquierda:** secuencia del gen *B-raf* de un ADN control (C 5). **Figura inferior derecha:** secuencia del gen *B-raf* de un ADN tumor tiroideo del grupo II (TI 4). En ninguno de los casos de los grupos II y III se observó mutación en este codón.



Cromatograma 2. En la figura superior se muestra la secuencia parcial de *B-raf* de ADN del control (C 5), en la figura inferior se muestra la secuencia parcial de *B-raf* de ADN de tiroides con invasión capsular o vascular después del tratamiento (TI 4). Los números indican las 4 mutaciones puntuales halladas (1: ACG → ACA, 2: TTA → CTA, 3: GCC → GCT y 4: TCC → TCT, flecha roja: codón donde se encuentra el punto caliente esperado del gen *B-raf*).



Cromatograma 3. En la figura superior se muestra la secuencia parcial de *B-raf* de ADN del control (T 5), en la figura inferior se muestra la secuencia parcial de *B-raf* de ADN de tiroides con metástasis pulmon después del tratamiento (TM 7). Los números indican las 4 mutaciones puntuales halladas (1: ACG → ACA, 2: TTA → CTA, 3: GCC → GCT y 4: TCC → TCT, flecha roja: codón donde se encuentra el punto caliente esperado del gen *B-raf*).

B) *N-ras*

En todos los casos se observó amplificación del gen *ras* mostrando una banda de 150 pb en el gel de agarosa al 2% (Fig. 37).

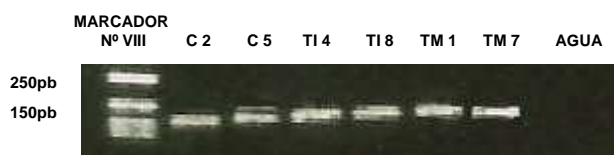


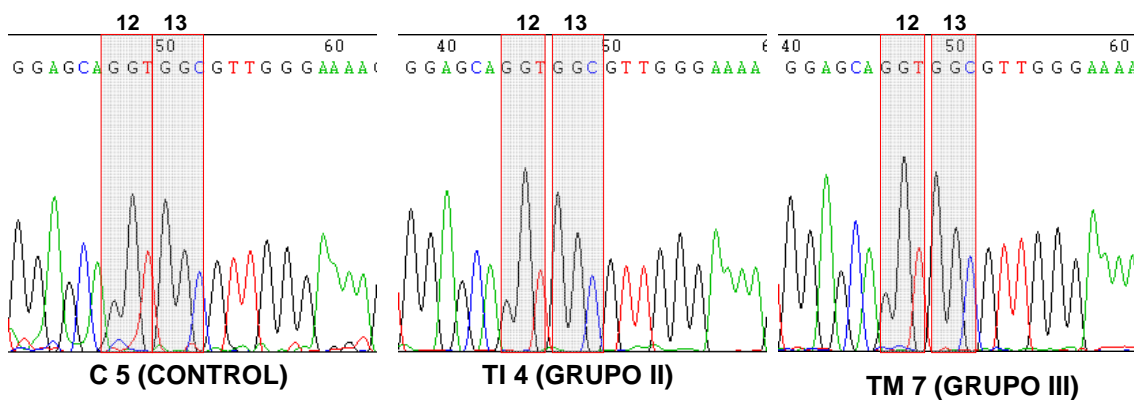
Figura 37. Gel de agarosa al 2% para el gen de *N-ras* (C: control, TI: tumores con invasión capsular y/o vascular, TM: tumores con metástasis).

Ninguno de los 20 tumores tiroideos (grupo II y III) mostraron mutaciones en el gen *N-ras* (codones 12 y 13), mostrándose la secuencia de los tumores

tiroideos del grupo II y III exactamente igual que los tiroides controles (Cuadro 2 y cromatograma 4).

C 5(control)			
TGAGTACAA	CTGGTGGTGG	TTGGAGCAGG	TGGCGTTGGG
AAAAGTGCTT	TGACAATCCA	GCTAATCCAG	AACCACTTTG
TGGATGAATA	TGATCCCACC		
TI 4 (grupo II)			
TGAGTACAA	CTGGTGGTGG	TTGGAGCAGG	TGGCGTTGGG
AAAAGTGCTT	TGACCATCCA	GCTAATCCAG	AACCACTTTG
TGGATGAATA	TGATCCCACC		
TM (grupo III)			
TGAGTACAA	CTGGTGGTGG	TTGGAGCAGG	TGGCGTTGGG
AAAAGTGCTT	TGACCATCCA	GCTAATCCAG	AACCACTTTG
TGGATGAATA	TGATCCCACC		

Cuadro 2. Secuencia parcial del gen *N-ras* del ADN de C 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata. (En rojo se indica el codón 12 y en amarillo el codón 13).



Cromatograma 4. Secuencia parcial del gen *N-ras* del ADN de C 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata (se indican los exones 12 y 13 en cada secuencia).

C) *PI3KCa*.

Tanto en los ADN controles, así como en los ADN de tumores tiroideos del grupo II y III, se observaron las bandas de amplificación de la expresión del gen *PIK3CA*, mostrando una banda de 107 pb en el gel de agarosa al 2% (Fig.38).

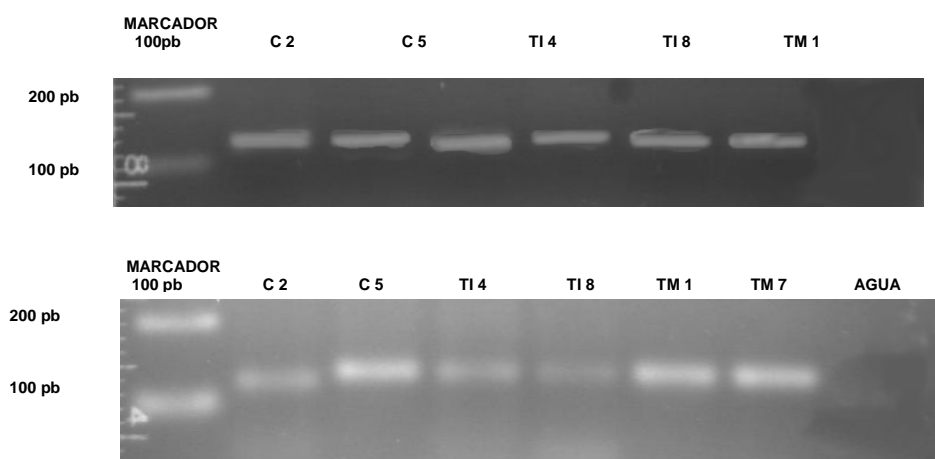
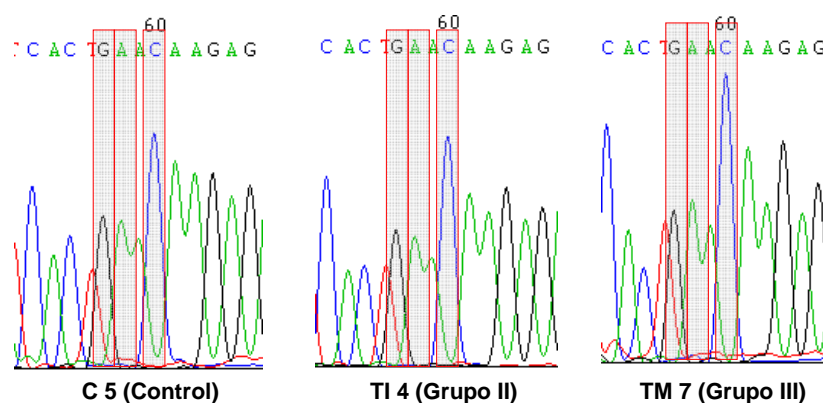


Figura 37. Imagen superior: gel de agarosa al 2% para el exón 9 del gen de *PI3KCa* (C 2 y C 3 son controles; TI 4 y TI 8 son tumores tiroideos del grupo II; TM 1 y TM 7 son tumores tiroideos del grupo III). Imagen inferior: gel de agarosa al 2% para el exón 20 del gen de *PI3KCa* (C 2 y C 3 son controles; TI 4 y TI 8 son tumores tiroideos del grupo II; TM 1 y TM 7 son tumores tiroideos del grupo III).

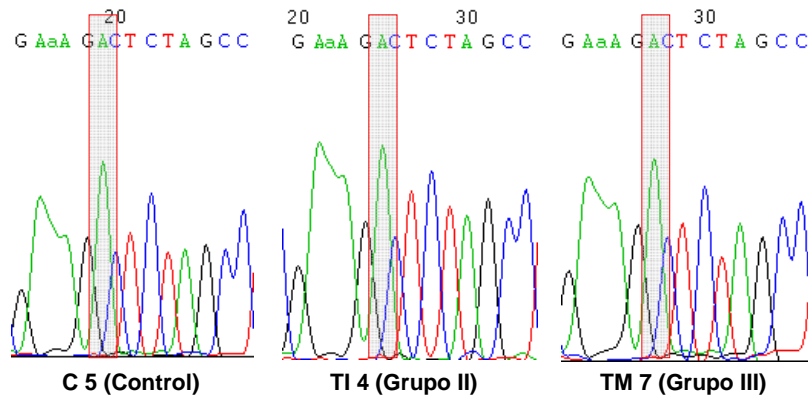
Ninguno de los 20 tumores tiroideos (grupo II y III) mostraron las mutaciones puntuales esperadas en los exones 9 y 20 del gen de *PIK3Ca*, mostrándose la secuencia de los tumores tiroideos del grupo II y III exactamente igual que los tiroides controles (Cuadro 3 y 4. Cromatogramas 5 y 6, págs. 187 y 188 respectivamente).

C 5 (Control)			
TGACAAGGAA	CAGCTCCGAG	CACTTTGTAC	CCGGGACCCA
CTGTCTGAAA	TCACTGAACA	AGAGAAAGAC	TTCCTATGGA
GCCACAGGCA	AGTGTGGGGA	GTGAGGCTCT	CAAGGCAGA
TI 4 (Grupo II)			
TGACAAGGAA	CAGCTCCGAG	CACTTTGTAC	CCGGGACCCA
CTGTCTGAAA	TCACTGAACA	AGAGAAAGAC	TTCCTATGGA
GCCACAGGCA	AGTGTGGGGA	GTGAGGCTCT	CAAGGCAGA
TM 7 (Grupo III)			
TGACAAGGAA	CAGCTCCGAG	CACTTTGTAC	CCGGGACCCA
CTGTCTGAAA	TCACTGAACA	AGAGAAAGAC	TTCCTATGGA
GCCACAGGCA	AGTGTGGGGA	GTGAGGCTCT	CAAGGCAGA

Cuadro 3. Secuencia parcial del exón 9 del gen de *PIK3Ca* del ADN de T 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata. (En amarillo se indican las tres mutaciones puntuales esperadas: G1633A, A1634G y C1636A).



Cromatograma 5. Secuencia parcial del exón 9 del gen de *PIK3CA* ADN de C 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata (se indican las mutaciones puntuales esperadas en cada secuencia).



Cromatograma 6. Secuencia parcial del exón 20 del gen de *PIK3CA* ADN de C 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata (se indica la mutación puntual esperada en cada secuencia).

C 5 (Control)			
TGATGCTTGG	CTCCGGAATG	CCAGAACTGC	AGTCTTTCGA
TGATATTGCA	TATATTCGAA	AG A CTCTAGC	CTTAGACAAA
ACTGAGCAAG	AGGCTCTGGA	GTATTTCACA	AAGCAAATGA
ATGACGCAC			
TI 4 (Grupo II)			
TGATGCTTGG	CTCCGGAATG	CCAGAACTGC	AGTCTTTCGA
TGATATTGCA	TATATTCGAA	AG A CTCTAGC	CTTAGACAAA
ACTGAGCAAG	AGGCTCTGGA	GTATTTCACA	AAGCAAATGA
ATGACGCAC			
TM 7 (Grupo III)			
TGATGCTTGG	CTCCGGAATG	CCAGAACTGC	AGTCTTTCGA
TGATATTGCA	TATATTCGAA	AG A CTCTAGC	CTTAGACAAA
ACTGAGCAAG	AGGCTCTGGA	GTATTTCACA	AAGCAAATGA
ATGACGCAC			

Cuadro 4. Secuencia parcial del exón 20 del gen de *PIK3Ca* del ADN de C 5 (control), TI 4 (grupo II) y TM 7 (grupo III) de tiroides de rata. (En amarillo se indica la mutación puntual esperada A3073G).

D) Reordenamientos RET/PTC.

D1. Análisis mediante Southern. En la Figura 39 se presenta el resultado de la hibridación de una muestra control (C 5), de una muestra con invasión vascular y/o capsular (grupo II) y de una muestra con metástasis (grupo III). Como se puede apreciar, en los tres casos se aprecia el mismo patrón, lo que descarta la presencia de reorganizaciones cromosómicas que afecten a la zona analizada.

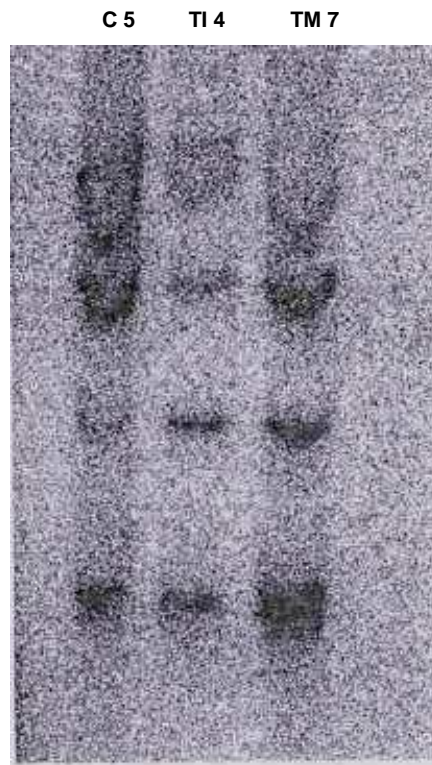


Figura 39. Película de revelado del Southern blot que muestra el mismo patrón de bandas tanto para la muestra control como para las muestras del grupo II y III.

D2. Construcción de macroarray y selección de clones: Siguiendo los protocolos descritos en el apartado de Materiales y Método se aislaron 396

clones y se fijaron en membranas de nylon. Tras hibridar con la sonda correspondiente, se seleccionaron 17 clones que fueron secuenciados posteriormente.

Los resultados de la secuenciación mostraron que todos los clones analizados resultaron silvestres, no encontrándose indicio de reorganización alguna.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

El genotipo de los cánceres determina su comportamiento biológico y en algunos casos sus respuestas a terapias específicas. Esto se ha comprobado también en los cánceres tiroideos, dónde se han hallado muchos defectos oncogénicos significativos en los distintos tipos de tumores tiroideos que dibujan la evidencia clínica para explicar su comportamiento en la patogénesis de dicha enfermedad (Sobrinho-Simoes y cols., 2008).

Los carcinomas papilares de tiroides (PTC) representan aproximadamente el 80% de los tumores tiroideos humanos. La incidencia total de esta forma particular de cáncer tiroideo es creciente, por motivos que aún no se conocen (Davies y Welch, 2006). Por lo general, estos tumores tienen un crecimiento lento que permite que la progresión de la enfermedad sea relativamente infrecuente. El diagnóstico histopatológico de PTC se centra principalmente en la morfología nuclear de las células tiroideas. Se han descrito diferentes variantes de PTC en humanos dependiendo del tipo de crecimiento, tipo celular y relaciones con el medio que rodea a la célula tiroidea (DeLellis y cols., 2004). Sin embargo esta prevalencia que está clara en el cáncer de tiroides humano no se reproduce en el cáncer experimental de tiroides en las ratas, ya que presentan un patrón arquitectural de carcinoma folicular, y en patrón citológico con neto predominio del tipo folicular y sólo algunos grupos celulares muestran algunas características que permiten la aproximación al

diagnóstico de variante folicular del carcinoma papilar humano. Además por otro lado, se producen metástasis pulmonares. Si se tienen en cuenta que en los humanos las metástasis ganglionares son peculiares en el carcinoma papilar y las pulmonares lo son en el folicular, los tiroides experimentales que aquí tratamos deben ser considerados como carcinomas foliculares y a lo sumo plantear la discusión diagnóstica con la variante folicular del carcinoma papilar. Esta particularidad en tipos histológicos habituales entre tumores humanos espontáneos y tumores experimentales de ratas nos hace pensar que deben existir diferencias en cuanto a los eventos génicos.

A pesar de que se ha orientado la discusión hacia una conclusión diagnóstica, por histología convencional, que acepta criterios suficientes para decidir que se está produciendo tumores experimentales en las ratas de tipo folicular con metástasis pulmonares (vía sanguínea), se advierte la necesidad de interpretar dos fenómenos timorogénicos. Uno de ellos, simplemente morfológico, se refiere a la rica vascularización de los tumores obtenidos. Los vasos están dilatados, son muy abundantes desfigura el cuadro histológico habitual de los tumores foliculares, forman lagos sanguíneos y las estructuras foliculares protuyen, con aspecto pseudopapilar, en el interior de las luces vasculares. Es posible que este hecho suponga una mayor liberación de factores angiogénicos, lo cual sería objeto de estudio biomolecular que escapa a los objetivos del presente trabajo. No obstante, con una interpretación más simplista, habría que tener presente que en estudios experimentales previos, con la misma pauta de tratamiento, nuestro grupo ha podido demostrar que la interrupción del experimento a los seis meses de su inicio, conduce a un

cuadro histológico de hiperplasia simple difusa también con gran vascularización pero sin dilatación de los espacios vasculares y formación de lagos sanguíneos. Es previsible que el incremento del riego del tejido glandular se produzca simplemente a expensas de una mayor demanda de la función tiroidea eficaz (bloqueada por el perclorato potásico) a expensas de la hiperproducción de TSH y sin que ello se pueda relacionar con neoangiogénesis tumoral. No obstante, la diferencia en vascularización entre el tumor primitivo y la metástasis es difícil de explicar. Asimismo la diferencia entre ambas lesiones también se refleja en la producción de coloide. Es previsible que todo ello se deba a factores condicionantes, propios del terreno o lugar de asiento metastásico, que podrían interactuar con el tejido extraño, modificando su estado y mecanismo productivo.

El otro funcionamiento timorogénico a considerar es el que se refiere a la interpretación biomolecular del proceso.

Se conocen muchos eventos genéticos de iniciación tumoral asociados a PTC humanos. Un evento importante son los oncogenes *ret*/PTC que juegan un papel causativo en la patogénesis en un porcentaje significativo de PTC (Santoro y cols., 2002). El gen *ret* codifica para una subunidad de señalización de receptores para los ligandos de la familia del factor glial derivado neurotrófico (GFL) (Treanor y cols., 1996). El gen *ret* se expresa en niveles muy bajos en las células foliculares tiroideas. En células tiroideas humanas, los reordenamientos cromosómicos entre los dominios del promotor y N-terminal de genes no relacionados con el dominio quinasa C-terminal del gen *ret*, dan

como resultado la producción de formas quiméricas aberrantes del receptor (RET/PTC) que son constitutivamente activas (Nikiforov, 2008).

Los reordenamientos *ret*/PTC son particularmente comunes en PTCs de individuos expuestos a radiación ionizante y en cánceres pediátricos (Nikiforov y cols., 1997). En PTCs esporádicos de pacientes adultos, la frecuencia de reordenamientos *ret* es baja (~20%) y varía según la región geográfica. Las oncoproteínas RET/PTC1 y RET/PTC3 son las más comunes y están formadas por la fusión del gen *ret* con los genes *h4* (*diOs170*) y *ncoa4* (*ele1*), respectivamente. Existen muchos estudios de investigación que evidencian que los reordenamientos *ret*/PTC pueden ser un evento muy temprano en el desarrollo del cáncer tiroideo. De esta forma, existe una alta prevalencia de expresión RET/PTC en microPTC (Viglietto y cols., 1995 y Sugg y cols., 1998). Además, Jhiang y cols., (1996), Santoro y cols., (1996) y Powell y cols., (1998) desarrollaron un ratón transgénico para PTC donde comprobaron que existía una sobreexpresión RET/PTC1 y RET/PTC3 en las células tiroideas.

Junto a estos estudios, al exponer a radiación ionizante líneas celulares (Ito y cols., 1993) y tiroides fetales (Mizuno y cols., 1997) dan como resultado la expresión de *ret*/PTC a las pocas horas de la exposición, apoyando la idea del papel directo que tiene la radiación ionizante sobre la recombinación ilegítima de *ret*. Se podría deducir que las oncoproteínas RET son las responsables de la iniciación tumoral en estos cánceres tiroideos. Sin embargo, si las oncoproteínas RET/PTC son las responsables de la iniciación tumoral en éstos cánceres, se podría pensar que todas las células tumorales deberían

tener la nueva combinación. No obstante, estudios recientes indican que al menos algunos cánceres de tiroides son oligoclonales para *ret*/PTC (Unger y cols., 2006 y Zhu y cols., 2006), sugiriendo que el reordenamiento pudo haber ocurrido más tarde en la progresión tumoral o como resultado de diferentes eventos clonales.

Existen también numerosos estudios que examinan si los cánceres tiroideos papilares con reordenamientos *ret*/PTC tienen características patológicas peculiares en humanos. Después de Chernobyl, los cánceres pediátricos RET/PTC1 que surgieron se asociaron con un PTC clásico, mientras que los cánceres pediátricos RET/PTC3 se asociaron con variantes sólidas de PTCs (Nikiforov y cols., 1997). Aunque en la literatura existen estudios que relacionan los oncogenes *ret*/PTC con desarrollos PTCs con diagnósticos favorables (Santoro y cols., 2002 y Adeniran y cols., 2006), los datos son confusos debido a que en algunos de estos estudios se utilizaron diferentes metodologías para detectar el gen *ret*, y en la mayoría de los estudios se analizaron un número pequeño de casos. Sin embargo, está razonadamente claro que los reordenamientos *ret*/PTC están presentes en sólo una pequeña fracción de cánceres tiroideos pobremente diferenciados (Santoro y cols., 2002 y Ricarte y cols., 2008), sugiriendo que esta oncoproteína podría no conferir un alto riesgo en la progresión tumoral.

Como otras oncoproteínas receptoras tirosin quinasa, RET/PTC forma parte de una compleja red de mecanismos de señalización. Las propiedades transformantes de *ret* son anuladas *in vitro* mediante la sustitución del residuo

Y1062 en el dominio RET quinasa, que es un sitio de unión para Shc, ShcC, IRIS1/2, FRS2, DOK1/4/5 y Enigma (Takahashi, 2001 y Hayashi y cols., 2000). La formación de ese complejo proteico a nivel de Y1062 permite la estimulación de la cascada *ras/ERK/PI3K*. Existen evidencias genéticas recientes que enfocan su atención en el papel de la ruta *ras/B-raf/*MAP quinasa en el desarrollo de PTC, debido a las observaciones de mutaciones puntuales activadoras de *B-raf* y *ras* que también tienen una alta prevalencia, además de la exclusividad de *ret* en PTC. Las mutaciones de *ret*, *trk*, *N-ras*, *H-ras*, *K-ras* o *B-ras* han sido descritas en ~70% de los PTCs, con poca o ninguna superposición entre ellos (Kimura y cols., 2003, Frattini et al 2004 y Soares y cols., 2003).

Los resultados obtenidos de nuestros estudios de reordenamiento *ret*/PTC en los tumores tiroideos de rata analizados mediante dos aproximaciones distintas que nos permitían detectar diferentes niveles de reorganización (Southern blot y la construcción de una genoteca parcial a partir de la amplificación de un solo primer de secuencias flanqueantes), indican que la reordenación cromosómica del dominio tirosin quinasa del oncogén *ret*, de existir, no es un fenómeno en absoluto frecuente en el carcinoma tiroideo de rata. No obstante, no se puede descartar que este tipo de reordenamientos tenga lugar en un porcentaje bajo de casos. Así, para estudiar esta última hipótesis sería necesario realizar este estudio con un número mayor de tumores tiroideos de rata, y así poder analizar y escrutar mayor número de clones de las genotecas construidas.

Los cuatro proto-oncogenes clásicos de *ras* codifican para *H-ras*, *K-ras* y *N-ras* pertenecientes a la extensa familia de proteínas G. Las proteínas RAS son GTPasas de la membrana plasmática activadas por receptores del factor de crecimiento, no receptores tirosin quinasa, y en menor grado a receptores acoplados a proteína G, permitiendo la activación de otros efectores de la ruta. La base molecular de la oncogénesis de *ras* es causada por mutaciones que favorecen su activación constitutiva, su conformación unida a GTP. Se han descrito mutaciones puntuales en todos los genes *ras* en el cáncer de tiroides, pero la más común está en el codón 61 de *N-ras*, y la menos en *H-ras* (<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=byhist&>; 2008). Se discute bastante sobre la alta prevalencia de mutaciones de *ras* en adenomas y carcinomas foliculares de tiroides; sin embargo, también se ven en PTC (Suarez y cols., 1988 y Namba y cols., 1990) con una prevalencia superior al 10-15%, particularmente en la variante folicular de PTC (Zhu y cols., 2003).

Las mutaciones *ras* se encuentran del 20-50% de los FTC (Esapa y cols., 1999), con la siguiente frecuencia relativa: *N-ras*>*H-ras*>*K-ras* (<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>, August 2008). La presencia de mutaciones *ras* en adenomas y carcinomas foliculares se considerada como una evidencia de que la activación RAS puede ser un paso temprano en la carcinogénesis tiroidea, aunque esto no ha sido comprobado concienzudamente. Esta idea está fundamentada en la recreación de la enfermedad en un modelo de ratón con sobreexpresión de *N-ras*^{Q61K} (Vitagliano y cols., 2006). Una de los rasgos característicos que distinguen las neoplasias foliculares de los FTC es que la neoplasia folicular tiene una alta frecuencia de

aneuploidia, mientras que los PTCs son normalmente diploides. Se ha demostrado que la activación del RAS oncogénico no promueve la inestabilidad genómica en células tiroideas in vitro (Knauf y cols., 2006 y Saavedra y cols., 2000). Sin embargo, aunque se ha demostrado que existe una correlación entre las mutaciones *ras* y la aneuploidia en tumores colorrectales (Giaretti y cols., 2004), no se ha encontrado tal relación en las neoplasias tiroideas (Sobrinho-Simoes y cols., 2008). No obstante, se ha encontrado un polimorfismo en el gen *H-ras* (T81C) que estaba fuertemente correlacionado con aneuploidia en tumores foliculares, por lo que algunos autores proponen que podría deberse al incremento de expresión del proto-oncogén (Castro et al., 2006).

Kobayashi y cols., (2002) realizaron un estudio en ratas Wistar para comprender las relaciones existentes entre las mutaciones del gen *ras* (*K-ras*) y los diferentes tipos de tumores tiroideos, mediante su inducción con diisopropanolnitrosamina (DIPN), un potente agente carcinogénico que induce tumores en varios órganos (Kitada y cols., 1996, Kitahori y cols., 1995, Kitahori y cols., 1996, Kitahori y cols., 1997 y Konishi y cols., 1978). El método que utilizaron para estudiar las mutaciones en el gen *K-ras* fue una microdissección de DNA seguida de una PCR y una secuenciación directa. Los resultados que obtuvieron fueron una alta frecuencia de mutación (75%, transición de G-A en el codón 12) en las lesiones nodulares y ausencia de mutación en las hiperplasias difusas y las lesiones pre-nodulares. Aunque no encontraron relación significativa entre los tipos histológicos y los periodos de tratamiento, sí existía correlación con el método de administración de la droga (una inyección

al 55% e inyecciones seriadas al 91%). Concluyen que la mutación en el gen *K-ras* juega un papel importante en la tumorigénesis tiroidea en ratas inducidas por DIPN y consideran la posibilidad de que sea un evento temprano en la tumorigénesis tiroidea. En un estudio sobre la frecuencia de mutaciones del gen *Ki-ras* (codones 12 y 13) en ratas Wistar a las que les indujeron carcinomas tiroideos mediante la administración de perclorato potásico y yodo radiactivo, los autores no encontraron ninguna mutación del gen *Ki-ras* en las 72 muestras de carcinoma tiroideo de rata estudiadas (Fernández-Santos y cols., 2004). Los autores, concluyeron que las mutaciones *Ki-ras* en los codones 12 y 13 no eran ni un evento constante ni temprano en el desarrollo del carcinoma folicular tiroideo en ratas.

La decisión de estudiar sólo las mutaciones del codón 61 del gen *N-ras* en nuestro trabajo, fue tomada tras ver en la bibliografía que este gen sufría mayor frecuencia de mutaciones que el gen *H-ras*. Decidimos entonces comenzar nuestros estudios en el oncogen *N-ras* y al resultar todos los casos negativos para mutaciones en el codón 61 del gen *N-ras* no continuamos con los estudios del *H-ras*. Según nuestros resultados, no podemos relacionar el gen *N-ras* con un desarrollo tumoral hacia carcinoma papilar o folicular debido a que en nuestro modelo experimental no se encontró mutación alguna en este gen (existente en el humano) en ninguno de los casos, ni en tumores tiroideos con invasión vascular/capsular ni en carcinomas tiroideos con metástasis.

Estos hallazgos nos llevan a pensar que en nuestro modelo de carcinogénesis experimental en ratas el oncogén *ras* no se ve afectado por

ningún desorden genético al igual que los resultados obtenidos por los estudios de Fernández-Santos y cols., (2004), sin embargo, en el modelo de ratón de Vitagliano y cols., (2006) si se observan mutaciones en el oncogén *ras*. Por lo tanto, deducimos que o bien nuestro modelo de carcinogénesis experimental inducida con perclorato potásico no es suficiente para el desarrollo de mutaciones en el gen *ras*, contradiciendo los hallazgos Kobayashi y cols., (2002), que si encontraron mutaciones puntuales en el gen *K-ras* aunque no pudieron relacionarlas con los diferentes tipos de tumores tiroideos.

En cuanto al gen *B-raf*, existen tres isoformas de la serina-treonina RAF quinasa en células de mamífero: ARAF, BRAF y CRAF o RAF1. La expresión de CRAF es omnipresente, mientras que la expresión de altos niveles de BRAF se encuentra en células hematopoyéticas, neuronas y testículos (Daum y cols., 1994). Los autores Zhang y Fagin (datos no publicados) encuentran altos niveles de expresión de *B-raf* en células foliculares tiroideas. Aunque todas las isoformas de RAF activan a MEK, son diferentemente activadas por *ras* oncogénico. Además, *B-raf* tiene una alta afinidad por MEK1 y 2 y es más eficiente en la fosforilación de MEK que otras isoformas de RAF (Peyssonnaud y Eychhe, 2001). Interesantemente, la activación de ERK por mitógenos no se ve afectada en fibroblastos de ratones C-Raf^{-/-}, esto coincide con otros trabajos en los que se indica que en células que expresan *B-raf*, ésta es la isoforma que mejor activa a MEK (Reuter y cols., 1995), cosa que también ocurre en células tiroideas (Mitsutake y cols., 2006).

La mutación BRAF^{T1799A} es el cambio genético más común en PTC. Así como en melanomas, más del 95% de las mutaciones resultan de un cambio de T por A en la posición 1799, resultando en una sustitución de valina por glutamato en el residuo 600 (V600E). La mutación oncogénica en el lazo de activación o lazo P de BRAF interrumpe la interacción entre cada uno de los lóbulos de la proteína y desestabiliza la conformación inactiva de la quinasa. Muchas (pero no todas) las sustituciones BRAF oncogénicas conocidas permiten la formación de nuevas interacciones que forman una quinasa con una estructura catalítica competente (Dhillon y Kolch, 2004).

El predominio total de mutaciones *B-raf* en PTC es aproximadamente del 45% (Kimura y cols., 2003, Soares y cols., 2003, Trovisco y cols., 2004, Nikiforova y cols., 2003, Fukushima y cols., 2003, Namba y cols., 2003, Xu y cols., 2003 y Cohen y cols., 2003). Las mutaciones *B-raf* pueden ocurrir en los primeros estadios del desarrollo tumoral tal y como se observan en los microPTCs (Nikiforova y cols., 2003). Aunque la mayoría de los PTCs con mutaciones *B-raf* tienen un aspecto histológico clásico, la variante PTC de células altas, considerado como el más agresivo, tiene una alta prevalencia de mutaciones *B-raf* (Nikiforova y cols., 2003). Muchos estudios (Nikiforova y cols., 2003 y Xing y cols., 2005), pero no todos (Puxeddu et al 2004), demuestran que los PTCs con mutaciones *B-raf* presentan más invasión extratiroidea y estadio más avanzado. Un estudio realizado con numerosos casos apoya fuertemente las implicaciones de *B-raf* en el cáncer de tiroides (Xing, 2007) con pronósticos negativos, incluyendo una alta frecuencia de metástasis en ganglios linfáticos del cuello y en tejidos distantes.

Nuestros resultados fueron negativos para la mutación BRAF^{T1799A}. En ninguno de los casos analizados, tumores tiroideos con y sin metástasis se encontró esta mutación que es frecuente en los PTC humanos (Kimura y cols., 2003, Soares y cols., 2003, Trovisco y cols., 2004, Nikiforova y cols., 2003, Fukushima y cols., 2003, Namba y cols., 2003, Xu y cols., 2003 y Cohen y cols., 2003). Sin embargo, se encontraron cuatro mutaciones puntuales diferentes a la esperada. Tres de ellas, G1767A, C1794T y C1806T, resultaron afectar al último nucleótido del codón y, como consecuencia, el cambio de nucleótido no afectó a la proteína, ya que no producía un cambio de aminoácido en la cadena proteica. No obstante, la cuarta consistió en una mutación puntual, T1789C, que resultó en el primer nucleótido del codón, produciéndose así un cambio de aminoácido en la proteína, asparragina por ácido glutámico (Asn→Asp), que sí podría estar involucrado en la activación constitutiva de la ruta MEK. Esta última mutación podría ser importante en la conformación terciaria de la proteína ya que se ha cambiado un aminoácido neutro por otro ácido y que, a pH fisiológico, está disociado pudiendo interactuar con otras proteínas de la cascada *B-raf*/MEK. Teniendo en cuenta que la mutación BRAF^{T1799A} provoca la activación constitutiva de la cascada MEK y que es muy frecuente en PTC humano, la mutación BRAF^{T1789C} encontrada en nuestro estudio y que se sitúa tan sólo tres codones hacia arriba en la cadena nucleotídica del gen *B-raf*, nos hace pensar que esta mutación podría estar involucrada en el desarrollo de tumores tiroideos producidos por bociógenos.

La ruta PTEN/*PI3K*/Akt regula los procesos celulares fundamentales, incluyendo el metabolismo de la glucosa, supervivencia celular, progresión del ciclo celular, adhesión y motilidad. Yeager y cols., (2007) crearon un modelo de ratón mutante que consistía en la eliminación específica de la expresión del gen *Pten* en células tiroideas y lo trataron con perclorato sódico al 0,5% y metilmazol al 0,05%. Querían demostrar que el silenciamiento o inactivación de éste gen podía producir neoplasias tiroideas como las encontradas en la enfermedad de Cowden (Nelen y cols., 1997, Bussaglia y cols., 2002 y Sogol y cols., 1983). Encontraron que la pérdida de la expresión del gen *Pten* causó un aumento significativo del índice de proliferación de las células tiroideas, que era mayor en las hembras, sin un aumento de los niveles de TSH. Pero, sorprendentemente, el tratamiento con el bociógeno no causó un aumento sustancial de la glándula tiroidea y sólo aparecían bocios difusos. Sugieren que una parte relevante de las señales de proliferación inducidas por la TSH son canalizadas por la ruta (*PI3K*)/Akt y que la pérdida de *Pten* provee al tiroides de una alta susceptibilidad a la transformación neoplásica por un aumento en la proliferación de las células tiroideas.

Las mutaciones activadoras de los genes que codifican para la subunidad catalítica p110 α de *PI3K* clase 1A fueron primero descritas en cánceres colorrectales, de ovario, de cerebro, gástrico y de mama, dónde la mayoría de las mutaciones ocurren dentro de los dominios helicoidales y quinasa de la proteína (Samuels y cols., 2004 y Samuels y cols., 2005). García-Rostan y cols., (2005) describieron una baja frecuencia relativa de mutaciones *PIK3CA* en PTCs bien diferenciados (2%) y FTCs (15%), y una alta frecuencia en ATCs (23%). Las mutaciones *PIK3CA* coexistieron con las

mutaciones *ras* o *B-raf* en estos cánceres. También se han descrito las ganancias de copias de *PIK3CA* en los PTC bien diferenciados y en ATC, aunque no está claro si tienen significado patogénico o son un resultado de desequilibrios cromosómicos (Hou y cols., 2007, Liu y cols., 2008 y Abubaker y cols., 2008).

Nuestros resultados fueron negativos para las tres mutaciones puntuales descritas en el exón 9 del gen *PIK3CA*, (G1633A, A1634G y C1636A) y para la mutación puntual descrita en el exón 20 del gen *PIK3CA*, (A3073) (Campbell y cols., 2004, Kang y cols., 2008, Hou y cols., 2007 y Samuels y cols., 2004). De acuerdo con los resultados obtenidos, no podemos afirmar que las mutaciones esperadas en el gen *PIK3CA* estén relacionadas con la carcinogénesis tiroidea de nuestro modelo experimental en ratas. No obstante, al igual que ocurre con el gen *ras*, no podemos concluir que la ruta *PI3K/Akt* no se vea alterada en algún otro gen que pueda estar implicado en la patogénesis de los carcinomas tiroideos de ratas tratadas con perclorato.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. El modelo de carcinogénesis experimental del tiroides de ratas tratadas con perclorato potásico (agente bociógeno), es útil por su fácil rendimiento en la producción tumoral, si bien los tumores obtenidos presentan diferencias con los tumores humanos, tanto histológicas como biomoleculares.
2. Las mutaciones habituales de *N-ras* y de *PI3K* que habitualmente se describen en cánceres humanos no están presentes en el modelo de carcinogénesis experimental.
3. También el reordenamiento *ret/PTC*, tan común, con todas sus variantes, en los carcinomas papilares humanos, se confirman que no está involucrado en la génesis de tumores tiroideos de la rata por esta vía experimental.
4. La exploración molecular del gen *B-raf* en los tumores del experimento demuestra la existencia de cuatro mutaciones puntuales, tres de ellas sin repercusión y una cuarta con posible participación en la génesis tumoral, ya que afecta a la secuencia de aminoácidos en la proteína con posibles consecuencias funcionales.

5. El modelo de carcinogénesis propuesto permite exploraciones biomoleculares más amplias de las proteínas hoy día conocidas como implicadas y de otras proteínas intervinientes en distintas rutas de señalización. Por consiguiente se trata de un excelente modelo de enfermedad humana en animal de experimentación, que puede ser útil para posteriores estudios sobre la génesis tumoral y para ensayos sobre terapias antitumorales.

6. Se interpreta que el agente bociógeno, perclorato potásico en este caso, no es carcinogeno por si mismo o responsable directo de las alteraciones biomoleculares que conducen a la activación del factores de transcripción.

7. Se entiende que el bloqueo metabólico que el perclorato potásico provoca en la cadena de producción de la hormona tiroidea, es responsable de la hiperproducción de TSH y que la hiperestimulación de sus receptores en la célula folicular, facilita el desarrollo de alteraciones biomoleculares en “puntos débiles” de distintas rutas canónicas hiperactivadas, en particular la que comprende la proteína BRAF.

8. La histología de los tumores corresponde a la variante folicular, con invasión capsular y vascular y con metástasis pulmonares. En el cuadro histológico destaca, por un lado, la gran vascularización y escasez de producción de coloide en el tumor primitivo, y, por otro lado, la menor vascularización y regular producción del coloide en las metástasis.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abubaker J, Jehan Z, Bavi P et al. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 Feb; 93(2): 611–618.

Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 2006 Feb; 30(2): 216–222.

AJCC. 2002. Thyroid. En Greene FL, Page DL, Fleming ID et al (eds) *AJCC cancer Staging Handbook*, 6th Edn, Springer, New York, 89-98

Arcoleo, JP y Weinstein, IB. Activation of proteina Kinase C by tumor promoting phorbol esters, teleocidin and aplysiatoxin in the absense of added calcium. *Carcinogenesis* 6, 213-217, 1985

Au AY, McBride C, Wilhelm KG Jr et al. 2006. PAX8-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) disrupts normal PAX8 or PPARgamma transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth. *Endocrinology* 147: 367-376 Axelrad, A.A. & Leblond, C.P. 1955

Induction of thyroid tumors in rats by a low iodine diet. *Cancer (Philadelphia)*, 8, 339-367

Battista S, Martelli ML, Fedele M et al. 1995 A mutated p53 gene alters thyroid cell differentiation. *Oncogene* 11: 2029-2037

Begum s, Rosenbaum e, Henrique R et al. 2004. BRAF mutations in anaplastic thyroid carcinoma: implicarions for tumour origin, diagnosis and treatment. *Mod. Pathol* 17: 1359-1363

Bielschowsky, F. 1944 Tumours of the thyroid produced by 2-acetylaminofluorene and allylthiourea. *Br. J. Exp. Pathol.*, 5, 90-95

Bielschowsky, F. 1945 Experimental nodular goitre. *Br. J. Exp. Pathol.*, 26, 270-275

Bielschowsky, F. 1955 Neoplasia and internal environment. *Br. J. Cancer*, 9, 80-116

Bielschowsky, F. Chronic iodine deficiency as cause of neoplasia in thyroid and pituitary of aged rats. *Brit. J. Cancer*. 7, 203-213, 1953

Bircher, E. 1910 On the experimental induction of goitre and a contribution on its histogenesis [in German]. *Dtsch Z. Chir.*, 103, 276-364

Bircher, E. 1911 Further histological findings on goitre induced by water in the rat [in German]. *Dtsch. Z. Chir.*, III, 368-424

Blumberg, PM. In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters. Part 1. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 8, 153-197, 1980

Bongarzone I., Monzini, N., Borrello, MG., Carcano, C.y Ferraresi, G. 1993. Molecular characterization of a thyroid specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit RI of cyclic AMP-dependet protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* 13, 358-366.

Bongarzone I, Dugazzola L, Vigneri P et al. 1996. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 81: 2006-2009

Boorman, GA., Noord, MJ. Y Hollander, CF. Naturally occurring medullary thyroid carcinoma in the rat. *Arch. Path.* 94, 35-41, 1972

Bos, JL. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Rev.* 49, 4682-4689

Bounacer A, Wicker r, Caillou B et al. 1997. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumours from patients who had received external radiation. *Oncogene* 15: 1263-1273

Bowtell, D., Fu, P., Simón, M y Senior, P. 1992. Identification of murine homologues of the Drosophila son of sevenless gene: potential activators of Ras. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 6511-6515

Boyd, JA y Barrett, JC. Genetic amplification and tumor progresion. Biochim Biophys. Acta 1155, 25-41, 1993

Bruni P, Boccia A, Baldassarre G et al. 2000. PTEN expression is reduced in a subset of sporadic thyroid carcinomas: evidence that PTEN grown suppressing activity in thyroid cancer cells mediated by p27kip1. Oncogene 19: 3146-3155

Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggslli, WH., Zipursky, SL y Hafen, E. 1994. A gain-of -function mutation in Drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. Cell 73, 611-620

Cantley, LC., Auger, KR., Carpenter, C., Duckworth, B., Garziana,A., Kapeller, R y Soltoff, S. 1991. Oncogenes and signal transduction. Cell 64, 281-302

Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T et al. 2002. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. Cancer Res 62: 7284-7290

Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T et al. 2003 Efficient inhibition of RET/papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5 (4-chloro-

phenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4d]pyrimidine (PP2). J. clin. Endocrinol Metab. 88: 1897-1902

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U y Nishizuka, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. J. Biol. Chem. 257, 7847-7851, 1982

Castro P, Rebocho AP, Soares RJ et al 2006. PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. J. Clin. Endocrinol. Metab. 91: 213-220

Cerutti, PA. Prooxidant states and tumor promotion. Science 227, 375-381, 1985

Challeton c, Bounacer A, Du Villard JA et al. 1995. Pattern of ras and gsp oncogene mutations in radiation-associated human thyroid tumours. Oncogene 11: 601-603

Chardin, P., Camoni, J., Gale, WI., Van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, MH y Bar-Sagi, D. 1993. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. Science 260, 1338-1343

Cheng, KC y Loeb, LA. Genomic instability and tumor progression: mechanistic considerations. Adv. Cancer Res. 60, 121-156, 1993

Clark,SG., Stern, MJ y Horvith, HR. 1992. *C. elegans* cell-signaling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356, 340-344

Cohen Y, Xing M, Mambo E et al. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 2003 Apr 16; 95(8): 625–627.

Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP et al. 2004. Mutational analysis of BRAF in fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin. Cancer Res.* 10: 2761-2765

Colburn, N. En: *Mechanisms of environmental carcinogenesis* (Ed. J. C. Barrett), CRC Press, Boca Raton Florida, 1987

Cox, A.J., Wilson, R.H. & De Eds, F. 1947 The carcinogenic activity of 2-acetaminofluorene: characteristics of the lesions in albino rats. *Cancer Res.*, 7, 647-657

Crews, CM y Erikson, RL. 1993. Extracellular signals and reversible phosphorylation: What to Mek of it all. *Cell* 74, 215-217

Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW et al. The ins and outs of Raf kinases. *Trends in Biochemical Sciences* 1994 Nov; 19(11): 474–480.

Davies L & Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973–2002. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*

2006 May 10; 295(18): 2164–2167

DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU & Eng C (eds.). World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press, 2004.

Diamond, L., O'Brien, TG y Baird, WM. Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. *Adv. Cancer Res.* 32, 1-74, 1980

Dhillon AS & Kolch W. Oncogenic B-Raf mutations: crystal clear at last. *Cancer Cell* 2004 Apr; 5(4): 303–304.

Doniach I: Comparison of the carcinogenic effect of X-irradiation with radioactive iodine on the rat's thyroid gland. *Br J Cancer* 11:67, 1957.

Doniach, I. 1969 Tumour production in thyroids of rats given various doses of radioactive iodine at birth. In: Hedinger, C.E., ed., *Thyroid Cancer* (UICC Monograph Series, Vol. 12), Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, pp. 174-182

Duchesne, M., Schwighoffer, F., Parker, F., Clerc, F., Forbert, Y., Thang., MN y Tocque, B. 1993. Identification of the SH3 domain of GAP as an essential sequence for Ras-GAP mediated signaling. *Science* 259, 525-528

Egan, SE., Giddings, BW., Brooks, MW., Buday, I., Sizeland, AM y Weinberg, R. 1993. Association of *Sos Ras* exchange protein With *Grb2* is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363, 45-51

Elisei R, Romei C, Vorontsova T et al. 2001. 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.* 86: 3211-3216

Eng C. 1998. Genetics of Cowden syndrome: through the looking glass of oncology. *Int. J. Oncol.*12: 701-710

Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P et al. Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clinical Endocrinology* 1999 Apr; 50(4): 529–535.

Esmarch, O. 1942 Deposition of methylcholanthrene in some organs of the rat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 19, 79-99

Fagin JA, Matsuo, K, Karmakar A et al. 1993 High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 91: 179-184

Fagin JA, Tang SH, Zeki K et al. 1996. Reexpression of thyroid peroxidase in a derivative of an undifferentiated thyroid carcinoma cell line by introduction of wild.type p53. *Cancer Res.* 56: 765-771

Farber, E. y Cameron, GR. The sequential analysis of cancer development. Adv. Cancer Res. 31, 125-226, 1980

Farber, E. Sequential events in Chemical Carcinogenesis. En: Cancer: A comprehensive treatise. (Ed. F. F. Becker). Plenum Publishing Corp., vol. 1, 485-506, 1982

Farber, E. y Rubin, H. Cellular adaptation in the origin and development of cancer. Cancer Res. 51, 2751-2756, 1991

Fearon, ER y Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61, 759-767, 1990

Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem. 1983 Jul 1;132(1):6-13.

Fernández-Santos, JM., De-Miguel M., González-Campora, R., Salguero-Villadiego, M., Cabrera, JJ y Galera-Davidson, H. Ki-ras mutational analysis in rat follicular-cell proliferative lesions of the thyroid gland induced by radioactive iodine and potassium perchlorate. J. Endocrinol. Invest. 27: 12-17, 2004

Finley DJ, Arora N, Zhu B et al. 2004. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 3214-3223

Frattini M, Ferrario C, Bressan P et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* 2004 Jul 26.

French CA, Alexander EK, Cibas ES et al. 2003. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J. Pathol* 162: 1053-1060

Fugazzola L, Pilotti S, Pinchera A et al. 1995. Oncogenic rearrangements of the RET protooncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res.* 55: 5617-5620

Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene* 2003 Sep 25; 22(41): 6455–6457.

Furth, J. 1959 A meeting of ways in cancer research: thoughts on the evolution and nature of neoplasms. *Cancer Res.*, 19, 241-258

Gale, WN., Kaplan, D., Lowenstein, EJ., Schlessinger, J y Bar-Sagi, D. 1993. *Grb2* mediates the EGF-dependent activation of guanine nucleotide exchange on *Ras*. *Nature* 363, 88-92

García-Rostan G, Zhao H, Camp RL et al. 2003. ras mutations are associated with aggressive tumour phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J. Clin. Oncol.* 21: 3226-3235

García-Rostan G, Costa AM, Pereira-Castro I et al. 2005. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res* 65: 10199-10207

Giaretti W, Molinu S, Ceccarelli J et al. Chromosomal instability, aneuploidy, and gene mutations in human sporadic colorectal adenomas. *Cellular Oncology* 2004; 26(5–6): 301–305.

Gimm O, Perren A, Weng LP et al. 2000. Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumours. *Am J Pathol.* 156: 1693-1700

Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG et al 2005. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* 24: 6646-6656

Gnatyshak, A.I. 1957 Experimental thyroid tumours and accompanying changes in some endocrine glands [in Russian]. *Vopr. Onkol*, 3, 659-665

Grieco, M., Santoro, M., Berlingieri, MT., Melillo, RM y Donghi, R. 1990. PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected *in vivo* in human thyroid papillary carcinomas. *Cell* 60, 557-563

Griesbach, W.E., Kennedy, T.H. & Purves, H.D. 1945 Studies on experimental goitre. VI. Thyroid adenomata in rats on Brassica seed diet. *Br. J. Exp. Pathol.*, 26, 18-24

Gulbins, E., Coggeshall, KM., Barer, G., Katzav, S., Burn, P y Altman, A. 1993. Tyrosine kinase-stimulated guanine nucleotide exchange activity of Vav in T cell activation. *Science* 260, 822-825

Hakoda, M., Nishioka, K y Kamatani, N. Homozygous deficiency at autosomal locus *aprt* in human somatic cells *in vivo* induced by two different mechanisms. *Cancer Res.* 50, 1738-1741, 1990

Halachmi N, Halachmi S, Evron E et al. 1998. Somatic mutations of the PTEN tumours suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumours. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 239-243

Hall, W.H. & Bielchowsky, F. 1949 The development of malignancy in experimentally induced adenomata of the thyroid. *Br. J. Cancer*, 3, 534-541

Harris, CC. Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. (Suppl)* 51, 5023s-5044s, 1991

Hartwell, LH y Weinert, TA. Genetic control of mitotic fidelity in yeasts and its relation to cancer. En: Origins of human cancer (Eds. Brugge, J., Curran, T., Harlow, E y McCormick, F). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor; New York, 1991

Hayashi H, Ichihara M, Iwashita T et al. Characterization of intracellular signals via tyrosine 1062 in RET activated by glial cell line-derived neurotrophic factor. *Oncogene* 2000 Sep 14; 19(39): 4469–4475.

Hazard, JB. Neoplasia. The thyroid, Baltimore. Williams and Wilkins, 239-255. International Academy of Pathology Monograph. Series nº 5. 1964

Heidecker, G., Huleikel, M., Cleveland, JL., Kolch, W., Beck, TW., Lloyd, P., Pawson, T y Rapp, UR. 1990. Mutational activation of *c-raf-1* and definition of the minimal transforming sequences. *Mol. Cell. Biol.* 10, 2503-2512

Hermann SR, Miller JA, O'Neill S, Tsao TT, Harding RM, Dale JL. Single-primer amplification of flanking sequences. *Biotechniques*. 2000 Dec;29(6):1176-8, 1180.

Huang Y, Prasad M, Lemon WJ et al. 2001. Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc. Natl Acad Sci USA* 98: 15044-15049.

Hou P, Liu D, Shan Y et al. 2007. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* 13: 1161-1170

<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=byhist&>; 2008

<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>, August 2008

<http://www.slideshare.net/tomiadriano/teorico-de-hormonas-tiroideas>

Hunter, T y Karin, M. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387

Ionov, Y., Peinado, MA., Malkhosyan, S., Shibata, D y Peruchú, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558-561, 1993

Isler, H., Leblond, C.P. & Axelrad, A.A. 1958 Influence of age and of iodine intake on the production of thyroid tumors in the rat. *J. Natl Cancer Inst.*, 21, 1065-1081

Ito T, Seyama R, Mizumo T et al. 1992. Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not with differentiated carcinomas of the thyroid gland. *Cancer Res* 52: 1369-1371

Ito T, Seyama T, Iwamoto KS et al. 1993. *In vitro* irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res* 53: 2940-2943

Ito T, Seyama T, Iwamoto KS et al. 1994. Activated RET oncogene in thyroid cancers of children from areas contaminated by Chernobyl accident. *Lancet* 344: 259

Ishizaka Y, Kobayashi S, Ushijima T et al. 1991. Detection of retTPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goitre by an RT-PCR method. *Oncogene* 6: 1667-1672

Jarzab B, Gubala E, Lange D. 2005. DNA microarrays and papillary thyroid carcinoma gene expression profile. *Endokrynol Pol* 56: 293-301

Jhiang, SM., Caruso, DR., Gilmore, E., Ishizaka, Y., Tahira, T., Nagao, M., Chiu, IM y Mazzaferri, EL. 1992. Detection of the PTC/*ret*^{TPC} oncogene in human thyroid cancers. *Oncogene* 7, 1331-1337

Jhiang SM, Sagartz JE, Tong Q et al. 1996. Targeted expression of the ret/PTC1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology* 137: 375-378

Jukes, T.H. & Schaffer, C.B. 1960 Antithyroid effects of aminotriazole. *Science*, 132, 296-297

Junqueira LC y Carneiro J. Histología Básica, 6ª ed. Masson, 2005. 408-411

Katzav, S., Martín-Zanca, D y Barbarcid, M. 1989. *vav*, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. EMBO J. 8, 2283-2290

Kawamura, H., Strickland, JE y Yuspa, SH. Association of resistance to terminal differentiation with initiation of carcinogenesis in adult mouse epidermal cells. Cancer Res. 45, 2748-2752, 1985

Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J et al. 2001. Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of *in vivo* models. Endocr Rev 22: 631-656

Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z et al. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. Cancer Research 2003 Apr 1; 63(7): 1454–1457.

Kitada H, Naitoh H, Konishi N, Ohnishi T, Shirai T, Hisaya Y (1995) Frequent mutation of Ki-ras but no mutations of Ha-ras and p53 in lung lesions induced by N-Nitrosobis (2-hidroxypropyl)amine in rats. Mol Carcinog 15:276-283.

Kitahori Y, Naitoh H, Konishi N, Ohnishi T, Shirai T, Hisaya Y (1995) Frequent mutation of Ki-ras codon 12 in N-bis (2-hidroxypropyl)nitrosamine-initiated

thyroid, kidney and lung tumors in Wistar rats. *Cancer Lett* 96:155-161.

Kitahori Y, Naitoh H, Konishi N, Fukushima M, Ohnishi T, Hisaya Y (1996) G_a mutation of ras genes and infrequent p53 gene mutation in rat transplantable thyroid carcinoma lines from tumors in vivo by N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Cancer lett* 100:55-62.

Kitahori Y, Naitoh H, Konishi N, Ohnishi T, Hisaya Y (1997) Genetic alteration in N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine-induced rat transplantable thyroid carcinoma lines: análisis of the TSH-R, Gas, ras and p53 genes. *Carcinogenesis* 18:265-269.

Klein, G y Klein, E. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* 315, 190-195, 1985

Klugbauer S, Lengfelder E, Demidchik EP, Rabes HM. 1995. High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumours of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 11: 2459-2467

Knauf JA, Ma X, Smith EP et al. 2005. Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.* 65: 4238-4245

Knauf JA, Ouyang B, Knudsen ES et al. Oncogenic RAS induces accelerated transition through G2/M and promotes defects in the G2 DNA damage and

mitotic spindle checkpoints. *The Journal of Biological Chemistry* 2006 Feb 17; 281(7): 3800–3809.

Kobayashi Y, Kawaoi A, Katoh R. Mutation of ras oncogene in diisopropanolnitrosamine-induced rat thyroid carcinogenesis. *Virchows Arch* 2002 441:289-295.

Konishi Y, Kondo H, Ikeda T, Kawabata A, Shoji Y, Denda A (1978) Effect of dose on the carcinogenic activity of orally administered N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine in rat. *Gann* 69:573-577

Kroll TG, Sarraf P, Pecciarrini L et al. 2000. PAX8-PPARgamma fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 289: 1357-1360

Lange-Carter, CA., Pleiman, CM., Gardner, AM., Blumer, KJ y Johnson, GL. 1993. A divergence in MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and *Raf*. *Science* 260, 315-319

Lanzy C, Cassinelli G, Cuccuru G et al. 2003. Inactivation of Ret/Ptc1 oncoprotein and inhibition of papillary thyroid carcinoma cell proliferation by indolinone RPI-1. *Cell Mol Life Sci* 60: 1449-1459

Leblond, C.P., Isler, H. & Axelrad, A. 1957 Induction of thyroid tumors by a low iodine diet. *Canad. Cancer Conf.*, 2, 248-266

Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS et al. 1988 Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res* 48: 4459-4463

Li, N., Batzer, A., Daly, R., Yajnik, V., Skolnik, E., Chardin, P., Bar-Sagi, D., Margolis, B y Schlessinger, J. 1993. Guanine nucleotide releasing factor hSos1 bindsto *Grb2* and links receptor tyrosine kinases to *Ras* signaling. *Nature* 363, 85-88

Lindsay, S., Potter, GD. Y Chaikoff, IL. Thyroid neoplasms in the rat: a comparison of naturally occurring and I-131 induced tumors. *Cancer Res.*, 17: 183-189. 1957

Lindsay, S., Sheline, G.E., Potter, G.D. & Chaikoff, I.L. 1961 Induction of neoplasms in the thyroid gland of the rat by X-irradiation of the gland. *Cancer Res.*, 21, 9-16

Lindday, S., Nichols, CW. Y Chaikoff, IL. Naturally occurring thyroid carcinoma in the rat: similarities to human medullary carcinoma. *Arch. Path.* 86, 353-364. 1968b

Lindsay, S. Ionising radiation and experimental thyroid neoplasms. A review in *Thyroid cancer*. Ed. By Chr. Hedinger. UICC mong., vol. 12, 161-171. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1969

Liu Z, Hou P, Ji M et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine

kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 Aug; 93(8): 3106–3116.

Lob, LA. Mutador phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 51, 3075-3079, 1991

Lowenstein, EJ., Daly, RJ., Batzer, AG., Li, W., Margolis, B., Lammers, R., Ullrich, A., Skolnik, EY., Bar-Sagi, D y Schlessinger, J. 1992. The SH2 and Sha domain containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to *rassignaling*. *Cell* 70, 431-442

Lyons J, Landis CA, Harsh G et al. 1990. Two G protein oncogenes in human endocrine tumours. *Science* 249:655-659

Marques AR, Espadiha C, Catarino AL et al. 2002. Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J. Clin. Endocrinol Metab* 87: 3947-3952

Marshall, MS. 1993. The effector interactions of p21^{ras}. *TIBS* 18, 250-254

Martegani, E., Canoni, M., Zippel, R., Coccetti, P., Brambilla, R., Ferrari, C., Sturani, E y Alberghina, L. 1992. Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a *Saccharomyces cerevisiae* Ras activator. *EMBO J.* 11, 2151-2157

Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I et al. 2002. Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on thyroid carcinoma cell growth. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 87: 4728-4735

Martín-Zanza, GA., Yatani, A., Clark, R., Conroy, L., Polakis, P., Brown, AM y McCormick, F. 1992. GAP domains responsible for *Ras* p21-dependent inhibition of muscarinic atrial K⁺ channel currents. *Science* 255, 192-194

Medina DL, Santisteba P 2000. Thyrotropin-dependent proliferation of *in vitro* rat thyroid cell systems. *Eur. J. Endocrinol* 143: 161-178

Meissner, WA y Warren S. Tumours of the thyroid gland. Atlas of tumor pathology. Washington DC., Armed Forces Institute of Pathology. Second series, fascicle 4. 1969

Melillo RM, Castellone MD, Guarino V et al. 2005. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signalling cascade mediate the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J. Clin Invest.* 115: 1068-1081

Mesa C Jr, Mirza M, Mitsutake N et al. 2006. Conditional activation of RET/PTC3 and BRAFV600E in thyroid cells is associated with gene expression profiles that predict a preferential role of BRAF in extracellular matrix remodeling. *Cancer Res* 66:6521-6529

Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S et al. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for

requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology* 2006 Feb; 147(2): 1014–1019.

Mizuno T, Kyoizumi S, Suzuki T et al. Continued expression of a tissue specific activated oncogene in the early steps of radiation-induced human thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 1997; 15: 1455–1460.

Monnat, RRJr. Molecular analysis of spontaneous hypoxanthine phosphoribosyl-transferase mutations in thioguanine-resistant HL-60 Human leukemia cells. *Cancer Res.* 49, 81-87, 1989

Moodie, SA., Willumsen, BM., Weber, MJ y Wolfman, A. 1993. Complexes of Ras-GTP with *Raf-1* and Mitogen-Activated Protein kinase. *Science* 260, 1658-1661

Moretti F, Farsetti A, Soddu S et al 1997. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene* 14: 729-740

Morris, H.P. 1955a Experimental thyroid tumors. In: *The Thyroid* (Brookhaven Symposia in Biology, No. 7), New York, Upton, 192-219

Morris, H.P. 1955b Experimental development and metabolism of thyroid gland tumors. *Adv. Cancer Res.*, 3, 52-115

Morrison, DK., Kaplan, DR., Escobedo, JA., Rapp, UR., Roberts, TM y Williams, LT. 1989. Direct activation of the serine/threonine kinase activity of *Raf-1* through tyrosine phosphorylation by the PDGF β -receptor. *Cell* 58, 649-657

Motokura, T y Arnold, A 1993. Cyclin D and oncogenesis. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3, 5-10

Nadler, N.J., Mandavia, M.G. & Leblond, C.P. 1969 Influence of pre-irradiation on thyroid tumorigenesis by low iodine diet in the rat. In: Hedinger, C.E., ed., *Thyroid Cancer (UICC Monograph Series, Vol. 12)*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 125-130

Nagao, M., Ishizaka, Y., Nakagawa, A., Kohno, K y Kuwano, M. 1990. Expression of *ret* proto-oncogene in human neuroblastomas. *Jap. J. Cancer Res.* 81, 309-312

Namba H, Rubin SA, Fagin JA. 1990 Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4: 1474-1479

Namba H, Nakashima M, Hayashi T et al. 2003. Clinical implication of hot spot BRAF mutation., V599E, in papillary thyroid cancers. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 88: 4393-4397

Napalkov, N.P. 1958 Experimental tumours of the thyroid gland [in Russian]. *Vopr. Onkol*, 4, 738-750

Napalkov, N.P. 1962 Blastomogenicity of 3-amino-1,2,4-triazole [in Russian].
Gig. Tr. Prof. Zabol, 6,48-51

Napalkov, N.P. 1965 Tumorigenic effect of thyreosta-tic substances. In: Modern
Problems of Oncology [in Russian], Leningrad, Meditsina, pp. 34-43

Napalkov, N.P. 1967 On blastomogenic effect of antithyroid drugs. In: Truhaut,
R., ed., Potential Carcinogenic Hazards from Drugs (UICC Monograph Series,
Vol. 7), Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, pp. 172-178

Napalkov, NP. Experimental analysis of the relationship between endemic
goitre and tumorous growth in the thyroid gland. Modern problems of oncology.
Leningrad. Patrov Institute of Oncology, 10-20, 1971

Napalkov, NP. Tumours of the thyroid gland. Pathology of tumours in laboratory
animals. Vol.1. Tumorous of the rat. Turusov VS (ed) IARC Scientific
Publications n^o 5 and n^o 6. Lyon, 239-272, 1987

Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE et al. 1997. Distinct pattern of ret oncogene
rearrangements in morphological variants of radiation- induced and sporadic
thyroid papillary carcinomas in children. Carcer Res. 57: 1690-1694

Nikiforov YE 2002. RET/PTC rearrangement in thyroid tumours. Endocr. Pathol.
13: 3-16

Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE et al. Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Research* 1997; 57: 1690–1694.

Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM et al. 2002. PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumours: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 26: 1016-1023

Nikiforova MN, Caudill CM, Biddinger P, Nikiforov YE. 2002. Prevalence of RET/PTC rearrangements in Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid carcinomas. *Int J Surg Pathol* 10: 15-22

Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M et al. 2003. BRAF mutations in thyroid tumours are restricted to papillary carcinoma and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5399-5404

Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW et al. 2003. RAS point mutations and PAX8-PPAP gamma rearrangement in thyroid tumours: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J. Clin Endocrinol Metab.* 88: 2318-2326

Nowell, PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28, 1976

Nowell, PC. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 40, 2203-2207, 1986

Oller, AR., Rastogi, P., Morgenthaler, S y Thilly, WG. A statistical model to estimate the variance in long term-low dose mutation assays: testing of the model in a human lymphoblastoid mutation assay. *Mutat. Res.* 216, 149-161, 1989

Osaki M, Oshimura M, Ito H. 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9: 667-676

O'Sullivan C, Barton CM, Staddon SL et al. 1991. Activating point mutations of the gsp oncogene in human thyroid adenomas. *Mol. Carcinog.* 4: 345-349

Parma J, Duprez L, Van Sande J et al. 1993. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 365: 649-651

Parma J, Van Sande J, Swillens S et al. 1995 Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the mayor cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3'-5'- monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Mol. Endocrinol.* 9: 725-733

Paschkis, K.E., Cantarow, A. & Stasney, J. 1948 Influence of thiouracil on carcinoma induced by 2-acetaminofluorene. *Cancer Res.*, 8, 257-263

Pawson, T y Schlessinger, J. 1993. SH2 and SH3 domains. *Current Biology* 3, 434-444

Pelech, SL y Sanghera, JS. 1992. Mitogen- activated protein kinases: versatile transducers for cell signalling. *TIBS* 17, 233-238

Peltomäki, P., Aaltonen, LA., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, JP., Järvinen, H., Green, JS., Jass, JR., Weber, JL., Leach, FS., Petersen, GM., Hamilton, SR., De la Chapelle, A y Vogelstein, B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260, 810-812, 1993

Peyssonnaud C & Eychene A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biologie cellulaire* 2001 Sep; 93(1–2): 53–62.

Pliss, G.B. 1959 The blastomogenic action of dichloro-benzidine [in Russian]. *Vopr. Onkol.*, 5(5), 524-533

Porcellini A, Ciullo I, Laviola L et al. 1994. Novel mutations of thyrotropin receptor gene in thyroid hyperfunctioning adenomas. Rapid identification by fine needle aspiration biopsy. *J Clin Endocrinol Metab.* 79: 657-661

Poste, G., Doll, J y Didler, IJ. Interactions between clonal subpopulations affects the stability of the metastatic phenotype in polyclonal populations of B16 melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6226-6230, 1981

Powell DJ Jr, Russell J, Nibu K et al. 1998. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res* 58: 5523-5528

Purves, H.D. & Griesbach, W.E. 1947 Studies on experimental goitre. VIII. Thyroid tumours in rats treated with thiourea. *Br. J. Exp. Pathol.*, 28, 46-53

Quiros RM, Ding HG, Gattuso P et al. 2005. Evidence that one subset of anaplastic thyroid carcinomas are derived from papillary carcinomas due to BRAF and p53 mutations. *Cancer* 103: 2261-2268

Puxeddu E, Moretti S, Elisei R et al. BRAF(V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 May; 89(5): 2414–2420.

Reuter CW, Catling AD, Jelinek T et al. Biochemical analysis of MEK activation in NIH3T3 fibroblasts. Identification of B-Raf and other activators. *The Journal of Biological Chemistry* 1995 Mar 31; 270(13): 7644–7655.

Rey, I y Hall, A 1993. Tumor suppressors and the regulation of GTP-binding protein activity. *Trends in Cell Biol.* 3, 39-42

Ricarte Filho J, Ryder M, Chitale D et al. Molecular profiling of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers by mass spectrometry with a thyroid cancer-specific platform reveals distinct patterns of oncogenic activation.

American Thyroid Association 2008 [abstract].

Riesco-Eizagurre G, Gutiérrez-Martínez P, García-Cabesas MA et al. 2006. 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* 13: 257-269

Ringel MD, Hayre N, Saito J et al 2001. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res* 61: 6105-6111

Rozakis-Adcock, M., Fernley, R., Wade, S., Pawson, T y Bowtell, D. 1993. The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF-receptor to the Ras activator mSos1. *Nature* 363, 83-85

Russfield, A.B. 1967 Pathology of the endocrine glands, ovary and testis of rats and mice. In: Cotchin, E. & Roe, F.J.C., eds, *Pathology of Laboratory Rats and Mice*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, pp. 391-467

Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* 2000 Aug 10; 19(34): 3948–3954.

Sager, R. Genetic instability, suppression, and human cancer. En: *Gene regulation in the expression of malignancy* (Ed. L. Sachs), Oxford University Press. London, 1985

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004 Apr 23; 304(5670): 554.

Samuels Y, Diaz Jr. LA, Schmidt-Kittler O et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005 Jun; 7(6): 561–573.

Santoro, M., Rosati, R., Grieco, M., Berlingieri, MT., D'Amato, GLC., De Franciscis, V y Fusco, A. 1990. The retprotooncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5, 1595-1598

Santoro M, Carlomagno F, Hay ID et al. 1992. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 89: 1517-1522

Santoro M, Chiappetta G, Cerrato A et al 1996. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene* 12: 1821-1826

Santoro M, Melillo RM, Carlomagno F et al. Molecular mechanisms of RET activation in human cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002

Jun; 963: 116–121.

Schlumberger MJ, Filetti S, Hay ID. 2003. Nontoxic goitre and thyroid neoplasia. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S et al. (eds) Williams textbook of endocrinology, 13th Edn. Saunders, Philadelphia, 457-491

Schlumberger M, Pacini F 2003. Tumeurs de la thyroïde. Editions Nucléon. Paris

Shou, K., Farnsworth, C., Neel, BG y Feig, LA. 1992. Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. Nature 358, 351-354

Simon, MA., Bowtell, DDL., Dodson, GS., Lavery, TR y Rubin, GM. 1991. Ras1 and putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the Sevenless protein tyrosine kinase. Cell 67, 701-716

Skolnik, EY., Lee, CH., Batzer, A., Vicentini, LM., Zhou, M., Daly, R., Myers, MJ., Backer, JM., Ullrich, A., White, MF y Schlessinger, J. 1993. The SH2/SH3 domain containing protein GRB2 interacts with tyrosine phosphorylated IRS-1 and Shc: Implications for insulin control of ras signaling. EMBO J. 12, 1929-1936

Slaga, TJ. Mechanisms of tumor promotion. Vol. 104, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1983

Smirnova, EA. Histochemical characteristics of follicular and Askanazy cells of the thyroid and histogenetic bases for the classification of thyroid tumours. Vestn. Akad. Med. Nauk. 26, 20-27, 1971

Soares P, Trovisco V, Rocha AS et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 2003 Jul 17; 22(29): 4578–4580.

Soares P, Trovisco V, Rocha AS et al. 2004. BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* 444: 572-576

Sobrinho-Simoes M, Maximo V, Rocha AS et al. Intragenic mutations in thyroid cancer. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2008 Jun; 37(2): 333–362. viii.

Southern, E.M. (1975): "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J Mol Biol.*, 98:503-517

Strock CJ, Park JI, Rosen M et al 2003. CEP-701 and CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity and block medullary thyroid carcinoma cell growth. *Cancer Res.* 63: 5559-5563

Suarez HG, du Villard JA, Caillou B et al. Detection of activated ras oncogenes

in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1988; 2: 403–406.

Suarez HG, du Villar JA, Severino M et al. 1990. Presence of mutation in all three ras genes in human thyroid tumours. *Oncogene* 5: 565-570

Sun, XJ., Rothenberg, P., Kahn, CR., Backer, JM., Araki, E., Wilden, PA., Cahill, PA., Goldstein, DJ y White, MF. 1991. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352, 73-77

Sutherland, RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177-184, 1983

Takahashi, M y Cooper, GM. 1987. ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1378-1385

Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2001 Dec; 12(4): 361–373.

Thibodeau, SN., Brien, G y Schaid, D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816-819, 1993

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996 Jul 4; 382(6586): 80–83.

Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P et al. BRAF mutations are associated

with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *The Journal of Pathology* 2004 Feb; 202(2): 247–251.

Tsuda, H. 1983 Goiter, adenoma, and carcinoma of the thyroid induced by amitrole and ethylenethiourea, rat. In: Jones, T.C., Mohr, U. & Hunt, R.D., eds, *Endocrine System (Monographs on Pathology of Laboratory Animals)*, Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, pp. 204-211

Turusov, V.S. & Kobliakov, V.A. 1986 Staging of carcinogenesis and mechanism of action of chemical carcinogens. In: Turusov, V.S. & Schnirelman, A.I., eds, *Chemical Carcinogenesis [in Russian]*, (VINITI Oncology Series, Vol. 15), Moscow, VINITI, pp. 6-46

UIC, Committee on Tumor Nomenclature. *Illustrated tumor nomenclature*, 2nd rev. Ed. Berlin, Heidelberg and New York, Springer. 1969

Unger K, Zurnadzhy L, Walch A et al. RET rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas with a short latency analysed by interphase FISH. *British Journal of Cancer* 2006 May 22; 94(10): 1472–1477.

Van Dyke, JH. Behavior of ultimobranchial tissue in the postnatal thyroid gland: the origin of thyroid cystadenomata in the rat. *Anat. Rec.*, 88, 369-391. 1944.

Van Dyke, JH. Experimental thyroid metaplasia in rat: preliminary report. *Arch. Path.*, 59. 73-81, 1

Vasko V, Saji M, Hardy E y cols., 2004. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet* 41: 161-170

Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ et al. RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 1995; 11: 1207–1210.

Vitagliano D, Portella G, Troncone G et al. 2006. Thyroid targeting of the N-ras (Gln61Lys) oncogene in transgenic mice results infollicular tumours that progress to poorly differentiated carcinomas. *Oncogene* 25: 5467-5474

Vogelstein, B y Kinzler, KW. 1993. The multistep nature of cancer. *TIG*9, 138-141

Vojtek, AB., Hollenberg, SM y Cooper, JA.1993. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205-214

Wang Y, Hou P, Yu H et al. 2007. High prevalence and mutual exclusivity of genetic alterations in the phosphatidylinositol-3-kinase/akt pathway in thyroid tumours. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 92: 2387-2390

Ward, J.M. & Ohshima, M. 1986 The role of iodine in carcinogenesis. In: Poirier, L.A., Newberne, P.M. & Pariza, W., eds, *Essential Nutrients in Carcinogenesis*, New York, Plenum, pp. 529-542

Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E et al. 2003. Hepatocyte growth factor receptor matrix metalloproteinase-11 tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarra study. Clin Cancer Res 9: 68-75

Williams, ED. Histogenesis of medullary carcinoma of the thyroid. J. Clin. Path. 19, 114-118, 1966

Willis, RA. Pathology of tumours. 3rd ed. London, Butterworths, 605-619, 1964

Wu G, Mambo E, Guo Z et al 2005. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumours. J. Clin Endocrinol Metab. 90: 4688-4693

Xing M, Tufano RP, Tufaro AP et al 2004 Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab 89: 2867-2872

Xing M, Vasko V, Tallini G et al.2004. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. J. Clin. Endocrinol. Metab 89: 1365-1368

Xing M 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. Endocr. Relat. Cancer 12: 245-262

Xing M, Westra WH, Tufano RP et al. 2005 BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 90: 6373-6379

Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocrine Reviews* 2007 Dec; 28(7): 742–762.

Xu X, Quiros RM, Gattuso P et al. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Research* 2003 Aug 1; 63(15): 4561–4567.

Yeager N, Klein-Szanto A, Kimura S, Di Cristofano A. 2007. Pten loss in the mouse thyroid causes goitre and follicular adenomas: in sights into thyroid function and Cowden disease pathogenesis. *Cancer Res* 67: 959-966

Yunis, J y Soreng, A. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226, 1199-1203, 1984

Zhang, XF., Sttleman, J., Kyriakis, JM., Takeuchi-Suzuki, T., Elledge, SJ., Marshall, MS., Bruder, JT., Rapp, UR y Avruch, J. 1993. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364, 308-313

Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN et al. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *American Journal of Clinical Pathology* 2003 Jul;

120(1): 71–77.

Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN et al. 2006. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J. Clin Endocrinol Metab* 91: 3603-3610.

