



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN MÉDICA

***Comparación entre los niveles de expresión de ATPasas en
lesiones tiroideas foliculares y resultados de MIBI (+) en la
detección de cáncer diferenciado de tiroides***

**Tesis de posgrado que presenta la
Dra. Claudia B. Domínguez Fonseca
para obtener el título de Cirujano General**

SECRETARÍA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO O.D.
México, D.F., agosto de 2007

**Tutor: Dr. Luis Mauricio Hurtado López,
Cirujano de cabeza y cuello
Clínica de Tiroides
Hospital General de México**

**Asesor: Dr. David Velázquez Fernández,
Cirujano Endocrino e Investigador
INMEGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa un poco del conocimiento adquirido durante los años de residencia, confiado a los residentes por el entusiasmo y criterio de nuestros maestros y tutores, así como de todos los cirujanos con quienes tenemos contacto.

Agradezco el apoyo y asesoría de un buen amigo, el Dr. David Velázquez F. y a todos aquellos que contribuyeron y apoyaron de una u otra forma mi desarrollo. Agradezco en particular al Dr. Luis Mauricio Hurtado L. por su guía durante mi residencia y en este trabajo. Gracias al apoyo del INMEGEN en el procesamiento de las muestras, al Dr. Armando Gamboa Domínguez (Servicio de Patología INCMNSZ) y al Dr. Jaime Berumen Campos (Jefe del Servicio de Medicina Genómica, Hospital General de México) y a todo el personal del servicio por su contribución.

Claudia B. Domínguez Fonseca

ÍNDICE

ABREVIACIONES UTILIZADAS	V
ANTECEDENTES	
Introducción	1
Nódulo tiroideo y cáncer	1
Epidemiología y etiopatogenia	
Evaluación del nódulo tiroideo	3
Uso de la PAAD como estándar diagnóstico. Estudios complementarios. Gammagrafia dual metabólica con Tc-MIBI	
Diagnóstico combinado de cáncer con PAAD y MIBI	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Pacientes	
2. Selección	
3. Recolección de datos	
3.1. Extracción de RNA total	
3.2. Hibridación en el Microarreglo para análisis de expresión de ATPasas	
3.3 Obtención de valores	
4. Análisis estadístico	
RESULTADOS	17
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	29

ANEXOS

	Etiopatogenia en el cáncer derivado de células foliculares.	
A.	Genética molecular del cáncer de tiroides. Análisis genético en cáncer papilar de tiroides.	31
B.	Categorías diagnósticas en la PAAD	37
C.	Diagnóstico por PAAD y gabinete: uso de USG, gammagrafía y PET. Gammagrafía dual metabólica con Tc-MIBI.	39
D.	Mecanismo de acción a nivel celular de MIBI. La relación de MIBI y las ATPasas.	42
E.	Mitocondrias y cadena respiratoria: presencia de ATPasas. Metabolismo respiratorio y cáncer	46
F.	Familia de proteínas ABC Características de la primera proteína ABC descrita: MRP (ABCC1)	50
G.	Tecnología genómica y cáncer de tiroides: análisis mediante genoma humano y microarreglos	57

BIBLIOGRAFÍA

60

Antecedentes

Introducción

El nódulo tiroideo se define en el consenso nacional realizado en el 2001 como “condición clínica caracterizada por crecimiento focalizado, único o múltiple, en la glándula tiroides”¹. Los nódulos tiroideos palpables son una entidad común entre la población adulta que en Estados Unidos tiene una prevalencia del 4 al 7%² mientras que la prevalencia de nódulos identificados en autopsias y en ultrasonografía de alta resolución en EUA es del 20 al 65%^{3,4}. Los nódulos tienen una mayor prevalencia en mujeres, la misma que aumenta con la edad, siendo la razón de 3:1 con respecto a los hombres.

Los factores de riesgo para la presencia de nódulos tiroideos son radiaciones en la infancia, bocio endémico, tiroiditis de Hashimoto, historia familiar de adenoma tiroideo, poliposis adenomatosa familiar y cáncer tiroideo familiar. La posibilidad de que un nódulo sea maligno según establece la American Thyroid Association, es aproximadamente del 10%⁵.

Nódulo tiroideo y cáncer

El cáncer en tiroides tiene una incidencia del 3% en la población general (2.3% en mujeres y 0.74% en hombres) y la mortalidad por esta patología ha disminuido hasta ser del 0.3%. Sin embargo en la última década, la incidencia del cáncer de tiroides ha aumentado, sobre todo en la población femenina, mientras que la mortalidad está en descenso. Esto puede

¹ Consenso nacional sobre nódulo tiroideo 2001 Cir Gen 2002;24:83

² Peter A Singer, Evaluation and Management of the Euthyroid Nodular and Diffuse Goiter, en Diseases of the Thyroid, 2nd ed, Ed. Braverman LE, Humana Press, 2003, p 217-238.

³ Rice CO, Incidence of nodules in the thyroid: a comparative study of symptomless thyroid glands removed at autopsy and hyperfunctioning goiters operatively removed. Arch Surg 1932;24:505-515

⁴ Bruneton JN, Balu-Maestro C, Marcy OY, et al, Very high frequency (13MHz) ultrasonographic examination of the normal neck, detection of normal lymph nodes and thyroid nodules. J Ultrasound Med, 1994;13:87-89

⁵ Mazafferri EL, Management of a solitary thyroid nodule. N Engl J Med, 1993;328:553-559

deberse a mejoras para la realización del diagnóstico y a que la detección temprana favorece un mejor tratamiento.

En Europa se considera que el cáncer representa un 15% de los nódulos tiroideos, la hiperplasia nodular (bocio) un 60%, los adenomas foliculares un 20%, y la tiroiditis un 5%⁶. En la población general mexicana se ha visto que los nódulos tiroideos se asocian a bocio coloide en un 67.5% de los casos, tiroiditis 5.4%, adenomas 9.7%, cáncer papilar 15.2%, cáncer folicular 1.8%, y cáncer medular 0.6%⁷. Más del 95% de los cánceres se derivan de las células foliculares⁸ (ver anexo A) y la presentación clínica inicial es un nódulo tiroideo único en 95% de los casos.⁹ Además, puede ocurrir que la primera manifestación sean metástasis linfáticas ganglionares a nivel de cuello, particularmente en población pediátrica. Hasta un 30% de los nódulos tiroideos no diagnosticados en nuestra población son malignos¹⁰, mientras que en algunos estudios se ha reportado una prevalencia de malignidad en los nódulos del 4 al 50% dependiendo de las indicaciones para cirugía⁷. La detección oportuna de cáncer permite un tratamiento adecuado, así como evitar gastos innecesarios en la evaluación de la patología benigna.

Evaluación del nódulo tiroideo

La finalidad de la evaluación de los nódulos tiroideos es conocer su diagnóstico, ya que son la manifestación de diversas enfermedades tiroideas, por lo que se debe evaluar para tomar una conducta terapéutica apropiada y acorde al diagnóstico. El tratamiento del

⁶ Maddox PR, Wheeler MH. Approach to thyroid nodules. In: Clark OH, Duh QY. Textbook of Endocrine Surgery W.B. Saunders Company Philadelphia. 1997:69.

⁷ Zaldivar-Ramírez FR, López-López JA, Hurtado-López LM. Nódulo tiroideo: Frecuencia de malignidad. Cir Gen. 2001; 23(2):92-94.

⁸ Kondo T, Ezzat S, Asa SL. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular cell neoplasia, Nature, 2006;6; 292.

⁹ Greenspan FS, Strewler GJ, The thyroid gland in Basic and Clinical Endocrinology, 6th ed, Appleton – Lange, p. 250-252.

¹⁰ López-López JA, Hurtado-López LM, Zaldivar-Ramírez FR, Soto-Abraham MV, Arellano-Montaño S. Frecuencia de la patología quirúrgica tiroidea. Rev Med Hosp. Gen Méx. 2001; 64(3):137-142.

nódulo tiroideo dependerá de su diagnóstico presuntivo, siendo indicativo de cirugía una neoplasia maligna o sospecha de malignidad. Por esta razón se han hecho esfuerzos para maximizar un diagnóstico confiable preoperatorio. La evaluación funcional mediante un perfil hormonal resulta innecesaria, ya que un 97% de los nódulos tiroideos tienen una función normal y sólo un 3% son hiperfuncionales¹¹.

La decisión del manejo quirúrgico depende en buena medida del diagnóstico citológico, así como de la historia clínica, los factores de riesgo, la exploración física y en algunos casos el uso de estudios complementarios (USG, gammagrafía, PAAD e inmunohistoquímica). Desde 1982¹² se ha determinado por diversos autores que la PAAD es la prueba más sensible para el diagnóstico del nódulo tiroideo. Los diagnósticos erróneos o no concluyentes resultan del análisis de material no satisfactorio obtenido por la PAAD^{13,14}. En algunos estudios se reporta un porcentaje nulo de falsos positivos con PAAD, mientras que los falsos negativos llegan al 2.2%, aunque este porcentaje es difícil de calcular ya que el porcentaje de cáncer papilar oculto aumenta de acuerdo con el número de casos benignos por PAAD que se someten a cirugía¹⁵. La sensibilidad de la PAAD en diversas publicaciones varía desde el 68 al 98% (media de 83%) mientras que la especificidad es del 72 al 100% (media de 92%)^{16,17,18}. La técnica de la PAAD provee un diagnóstico preoperatorio no sólo en bases morfológicas sino citológicas y citoquímicas

¹¹ GLA, Lawson VG. Solitary Thyroid Nodule: Concepts in diagnosis and treatment. En: Falk SA. Thyroid Disease. E W.B. Endocrinology, surgery, nuclear medicine and radiotherapy Segunda Edición Lippincott-Raeven publishers Philadelphia. 1997; 411

¹² Van Herle A, Rich P, Ljung B-ME, et al: The thyroid nodule. Ann Intern Med 96:221, 1982.

¹³ Ljung BM, Drejet A, Chiampi N. The factors important for successful fine-needle-aspiration biopsies: a comparison study of breast diagnoses at two hospitals. Pathology 4, 493, 1996.

¹⁴ Zarbo R, Howanitz P, Bachner P, Interinstitutional comparison of performance in fine-needle-aspiration cytology: a Q-probe quality indicator study. Arch Pathol Lab Med, 115:743, 1991

¹⁵ Werga P, Tallin G, Skoog L, et al, Expanding role of Fine-needle Aspiration Cytology in Thyroid Diagnosis and Management, Worl J Surg. 24, 2000: 907-912

¹⁶ Greenblat DY, Woltman THarter J, et al, Fine-needle aspiration optimizes surgical management in patients with thyroid cancer. Annals of Surgical Oncology, 2006; 13: 859-863

¹⁷ American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of thyroid nodules. http://www.aace.com/clin/guidelines/thyroid_nodules.pdf

¹⁸ Burch HB, Burman KD, Reed HL, et al, Fine needle aspiration of thyroid nodules. Determinants of insufficiency rate and malignancy yield at thyroidectomy. Acta Cytol 1996, 40,1176-83

(inmunohistoquímica). Esto convierte a la PAAD en la herramienta de primera elección en el diagnóstico preoperatorio de los nódulos¹⁹ (figura 1). Los estudios empleados se dividen en morfológicos (como USG y gammagrafía con I/Tc) y funcionales (gammagrafía I123, I131, Tc99, MIBI) para aumentar la especificidad diagnóstica de la PAAD. Estos estudios aumentan en cierto grado la sensibilidad del diagnóstico combinado, sin haber hasta ahora logrado tener un estudio que se pueda correlacionar en mayor medida al cáncer cuando se tiene PAAD no diagnóstica.

Desde la introducción de este estudio, el número de cánceres detectados en forma preoperatoria ha aumentado del 10-15% hasta el 20-50%^{20,21}. Sin embargo los aspirados con material no diagnóstico son un problema real en nuestro medio ya que no siempre se cuenta con la suficiente experiencia en la toma de biopsias y esto aumenta el porcentaje de resultados no diagnósticos^{19,22}.

¹⁹ Lopez LH, Canto JA, Herrera MF, et al: Efficacy of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: experience of a Mexican institution. *World J Surg*, 21, 408. 1997

²⁰ Rojeski MT, Gharib H. Nodular thyroid disease: evaluation and management. *N Engl J Med*, 1985, 313:428-436

²¹ Caruso D, Mazzaferri EL, Fine needle aspiration biopsy in the management of thyroid nodules. *Endocrinologist* 1991;1:194-202.

²² Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid*. 2001;11:1147-1151

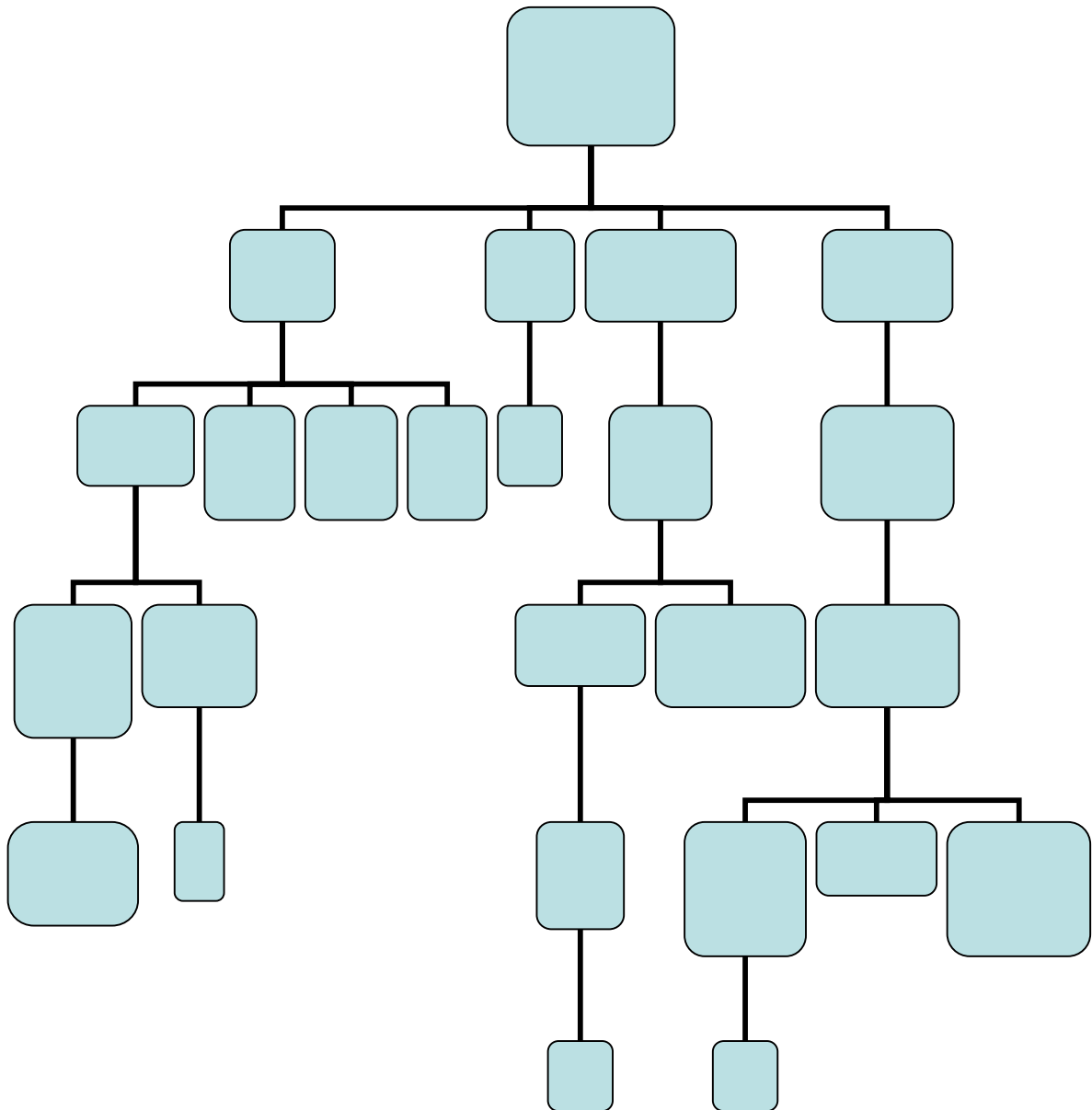


Fig. 1 Guía de diagnóstico y manejo del nódulo tiroideo. Adaptado de Mazaferrí EL, *Management of a solitary thyroid nodule. N Engl J Med, 1993;328:553-559* y *American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of thyroid nodules. www.aace.com/clin/guidelines/thyroid_nodules.pdf*

MIBI: metoxi-isobutil isonitrilo; PAAD: punción-aspiración con aguja delgada; Qx: indicación de cirugía; USG: ultrasonograma

*factores pronósticos negativos: edades pediátricas y ancianos, antecedente familiar, antecedente de radiación, nódulo de crecimiento rápido.

**Actualmente hay evidencia de la baja respuesta de los nódulos tiroideos al tratamiento crónico de supresión con levotiroxina, por lo que es probable que esta guía diagnóstica tenga modificaciones.

Por ello se han establecido categorías para la PAAD que ofrecen guías sobre ciertas conductas clínicas (tabla 1, ver anexo B). En diagnósticos indeterminados se decide la realización de hemitiroidectomía con análisis transoperatorio para obtener la confirmación histopatológica que en el 50% de las ocasiones es benigno y significa una cirugía innecesaria para el paciente. Es por esto que los casos no diagnósticos (inadecuados e indeterminados) requieren estudios complementarios que permitan una mejor aproximación al diagnóstico, pues hasta el 50% de estos casos resultan en una patología maligna²³.

Tabla 1. Categorías diagnósticas en la PAAD

Tipo 1 (inadecuada insuficiente)	No-diagnóstica (inadecuada o que los artificios técnicos impiden la interpretación; los extendidos deben contener seis o más grupos de al menos 10 células foliculares para considerarse adecuados).
Acción	Repetir la punción, considerar uso de ultrasonido para guiar biopsia.
Tipo 2 (benigno)	No neoplásico (características compatibles con bocio coloide, nodular, quístico, hiperplásico o con tiroiditis y proliferaciones foliculares no malignas)
Acción	Dos diagnósticos benignos en un periodo de 3 a 6 meses para excluir neoplasia. En los pacientes en el grupo de alto riesgo (hombres, extremos de edad, otros datos sugestivos de cáncer, historia familiar, antecedente de radiaciones) puede realizarse la hemitiroidectomía aun con PAAD con resultado benigno, si existen datos de compresión o crecimiento rápido del nódulo o cuando el paciente así lo desee
Tipo 3 (indeterminada)	i) todas las lesiones foliculares.
Acción	hemitiroidectomía. Completar tiroidectomía si diagnóstico es maligno
	ii) algunos casos en los que los hallazgos citológicos no son concluyentes y no se puedan incluir en benigno o maligno. La descripción reportará el hallazgo sospechoso –proliferación de células de Hurthle, ausencia de células epiteliales en lesiones quísticas, muestra adecuada en calidad y cantidad pero con características citológicas limitadas para realizar diagnóstico.
Acción	Discusión entre cirujano, endocrinólogo y citólogo para tomar decisión. Cirugía indicada para hemitiroidectomía. El tratamiento subsecuente dependerá del reporte histopatológico transoperatorio o definitivo con HE.
Tipo 4 (maligno)	Diagnóstico de malignidad (datos inequívocos de cáncer papilar, medular o anaplásico, de linfoma o tumor metastático)
Acción	Tratamiento quirúrgico indicado, dependiendo del tamaño del tumor, estirpe, estadio clínico y factores de riesgo. Manejo con radioterapia o quimioterapia cuando esté indicado

* Adaptado de Wang HH, *Reporting thyroid fine-needle aspiration: literature review and proposal, Diagnostic Cytopathology, 2005:34(1); 67-76*

El uso de USG resulta útil, pues guía la PAAD, confirma la presencia de un nódulo y determina su relación con respecto a la tiroides, pero no distingue en la mayoría de los

²³ Hurtado-Lopez LM, Arellano-Montaño S, Torres-Acosta EM, et al. Combined use of fine-needle aspiration biopsy, MIBI scans and frozen section biopsy offers the best diagnostic accuracy in the assessment of the hypofunctioning solitary nodule. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2004) 31: 1273-79

casos entre patología benigna y maligna (ver anexo C). Otros de los estudios auxiliares son la gammagrafía con yodo (^{131}I , ^{123}I) o tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc-p}$), y su comparación con metoxiisobutilisonitrilo (gammagrafía dual metabólica con MIBI, ver anexo D). La probabilidad de neoplasia maligna es 16% mayor en los casos de nódulos hipofuncionales de acuerdo con la gammagrafía con ^{131}I , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pernectato. La gran mayoría de los nódulos son hipofuncionales en la gammagrafía convencional y de estos hasta el 25% son malignos²³. En algunos estudios se ha utilizado el rastreo con MIBI, con el cual se evalúa metabolismo para diferenciar maligno de benigno. En la mayoría de los estudios se propone la intensidad de captación o el cambio de captación con el tiempo, sin embargo los resultados en este sentido no son concluyentes en cuanto al diagnóstico de benignidad. Se ha observado que cuando el resultado del rastreo con MIBI es negativo, el nódulo con seguridad es benigno (no hay falsos negativos, VPN 100%, ver anexo C)²³, mientras que los pacientes con nódulos en quienes el MIBI resulta positivo (independientemente de la intensidad de captación), requieren de alguna evaluación que descarte malignidad, lo cual puede incluir una nueva PAAD o el estudio transoperatorio con sección congelada de una muestra de tejido (FS)²³.

Diagnóstico combinado de cáncer con PAAD y MIBI

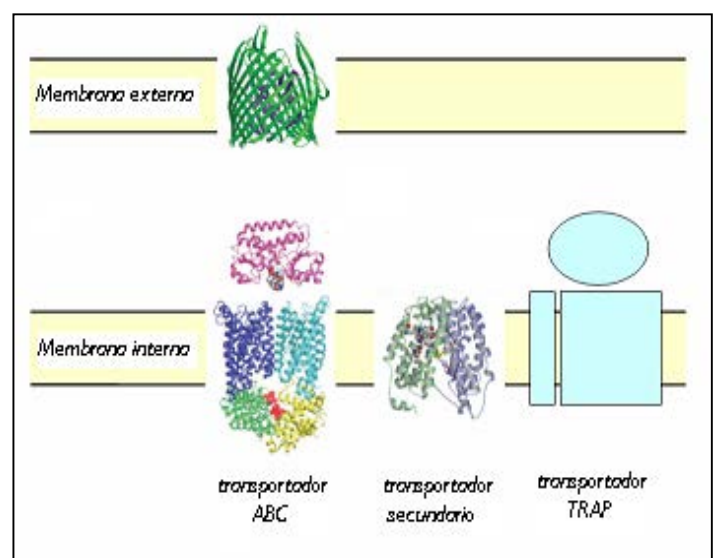
En el estudio de Hurtado-López M. et.al²³ que incluyó de manera prospectiva a 130 pacientes intervenidos en el Hospital General de México, se determinó la sensibilidad y especificidad de la PAAD, MIBI y FS (frozen section por sus siglas en inglés), comparándolos con el resultado histopatológico definitivo. Para este estudio se definió

como nódulo una tumoración tiroidea palpable identificada por el paciente o por el médico durante la exploración física. La gammagrafía con MIBI descartó la posibilidad de malignidad en el 33% de los pacientes con PAAD no diagnóstica (38.5% de los pacientes con PAAD inadecuada y 23% de los pacientes con PAAD indeterminada). Todos los pacientes con MIBI negativo resultaron con diagnóstico benigno y de los pacientes con una PAAD indeterminada o sospechosa con MIBI positivo, el 50% tuvo diagnóstico final de cáncer. Esto indica que cuando una PAAD se realiza de primera instancia y se reporta como inadecuado o indeterminado (sospechoso), un rastreo con MIBI negativo ayuda a excluir malignidad en un número significativo de pacientes (aproximadamente un 30%).

La gammagrafía con Tc-MIBI es un estudio en el que se evalúa el metabolismo celular mediante la captación de MIBI, el cual se acumula a nivel mitocondrial. El Tc-MIBI se une a la P-glicoproteína (PGP), producto del gen MDR₁ (human multidrug resistance gene) y a MRP (proteína asociada a MDR). Esta proteína pertenece a un grupo de proteínas de transporte conocidas como familia ABC (siglas que corresponden al inglés ATP-Binding Cassette, figura 2) unidas generalmente a la membrana mitocondrial y que son transportadores activos dependientes de ATP (ver anexo D). Además de esta función, se unen al ATP y lo hidrolizan, por lo que participan activamente en la respiración celular (fig. 3).

Fig. 2 Representación de una de las proteínas de transporte ABC, su localización en la membrana mitocondrial, y sus relaciones membranales con otras proteínas de transporte.

**tomado de www-ssrl.slac.stanford.edu/.../Rees_ABC.html*



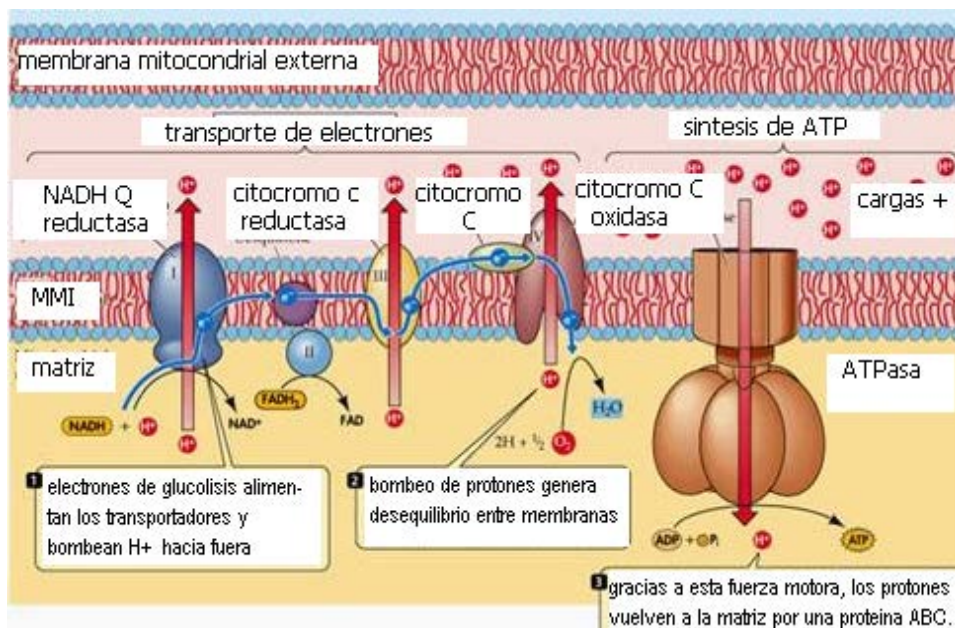


Fig. 3 Representación de la cadena de transporte de electrones (cadena respiratoria), la energía se obtiene a través de un gradiente electroquímico en la membrana mitocondrial interna (MMI) establecido por las proteínas de transporte (ABC).

* tomado de <http://www.bioonline.com.br/noticiaseditoria.jsp>

Tanto ^{99m}Tc como MIBI se unen a PGP mientras que MIBI también se une a MRP, por lo que se ha propuesto que estos radiofármacos pueden ser útiles para valorar el estado funcional de estas proteínas (ATPasas).

De acuerdo a los resultados presentados por Hurtado-López et al, se podría especular que cuando las proteínas ABC se encuentran mutadas, el radio-fármaco MIBI no puede unirse para ser transportado y eliminado, lo que ocasiona su acumulación, dando un resultado positivo o hipercaptación del mismo en los casos con cáncer de tiroides.

En las células foliculares normales de la glándula tiroides sin mutación de estas proteínas asociadas a la membrana mitocondrial, el MIBI se eliminaría normalmente, por lo que se observaría una ausencia de la captación del radio-fármaco²⁴. *En presencia de alteración en la expresión y/o mutación de los genes que codifican para estas proteínas, la concentración de MIBI sería hipotéticamente mayor, por lo que el rastreo con MIBI podría contribuir al diagnóstico de cáncer en relación al metabolismo celular y concentración del MIBI. Nuestra hipótesis es que esta concentración del MIBI incrementada podría ser dependiente del estado y expresión de estas proteínas en las células foliculares malignas.*

Tanto el estudio de gammagrafía con MIBI como la presencia de alteraciones en la expresión de los genes de la familia ABC se pueden asociar con los cambios mitocondriales asociados a proliferación anormal y aunque se ha establecido que las mitocondrias son reguladoras del metabolismo celular (anexo E), su importancia dentro del diagnóstico y tratamiento del cáncer no se ha explorado en forma adecuada ni explotado clínicamente. *Suponemos que mediante los perfiles moleculares y mapeo genómico (anexo G) se pueden diferenciar las células neoplásicas que respiran por vía anaerobia debido a una alteración en los transportadores mitocondriales de las células que son benignas.*

²⁴ Utsonomiya K, Ballinger JR, Piquette-Miller M, et al. Comparison of the accumulation and efflux kinetics of technetium-99m sestamibi and technetium-99m tetrofosmin in an MRP-expressing tumour cell line. Eur J Nucl Med 27 (12), 2000. 1786-92

Planteamiento del problema

La PAAD es el estándar de oro para la evaluación de nódulo tiroideo, sin embargo sus resultados varían de acuerdo con la experiencia tanto en la toma de muestra como en la interpretación, lo que lleva a reportes no diagnósticos y a cirugía innecesaria, con el consecuente aumento en la morbilidad asociada a tiroidectomía. Existen estudios de gabinete que ayudan a complementar el diagnóstico, entre estos la gammagrafía dual metabólica con Tc-MIBI con un VPN del 100% reportado en la literatura. Esta complementación de dos métodos diagnósticos aun deja un 30% de pacientes con patología benigna dentro de los pacientes que se someten a cirugía por diagnóstico indeterminado. El mecanismo fisiológico por el cual funciona la gammagrafía con MIBI indica alteraciones en el proceso de respiración celular a nivel mitocondrial. Estas alteraciones se asocian a cambios moleculares en las células y se ha propuesto que las ATPasas juegan un papel importante. Por otro lado, se sabe que las ATPasas son parte de la familia de proteínas ABC y que algunas de estas proteínas se encargan del transporte de MIBI en las células. En los últimos años se ha propuesto la determinación de perfiles moleculares para explicar la fisiología de ciertas lesiones y para ayudar en el diagnóstico. Los perfiles moleculares para cáncer tiroideo muestran alteraciones que varían de una publicación a otra, pero en algunos se han reportado la sobre-expresión de diferentes genes de ATPasas^{1,2,3,4}.

¹ Weber F, Shen L, Aldred M, et al. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on three-gene combination. *Jour Clin Endocr & Metab.* 2005;90(5):2512-21

² Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, et al. Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2004;10:6586-97.

³ Van Staveren WCG, Weiss Solis D, Delys L, et al. Gene Expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals supression of negative feedbacks in tumorigenesis. *PNAS*, 2006;103(2):413-418.

⁴ Finley DJ, Arora N, Zhu B, et al. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *Jour Clin Endocr & Metab.* 2004;89(7):3214-23

Hipótesis

- a) Ya que el CPT se ha relacionado con una hipercaptación de MIBI en la gammagrafía y este se une a nivel mitocondrial gracias a las proteínas MRP (un tipo de ATPasa), suponemos que es factible que las muestras de los pacientes con un MIBI hipercaptante puedan tener una expresión diferente de ATPasas en relación a las lesiones benignas en el perfil molecular determinado con microarreglos (anexo G).
- b) El diagnóstico de nódulo tiroideo se podría afinar determinando mediante el uso de análisis de expresión genómica de las alteraciones específicas en genes asociados a la respiración celular, dado que se ha comprobado que la respiración está alterada en cáncer. Las células tiroideas malignas probablemente muestran un patrón distinto de expresión de ATPasas que las lesiones benignas.

Objetivo

Determinar si los niveles de expresión de los transcritos primarios (a partir de RNA total) de algunos genes ABC (ABCC3, ATP10A, ATP13A4 y ATP6V0E2) ayudan a diferenciar los casos MIBI(+) con CPT de las lesiones tiroideas MIBI(+) benignas en pacientes intervenidos quirúrgicamente en el Hospital General de México.

Materiales y métodos

1. Pacientes

Se recolectaron muestras consecutivas de tejido tiroideo con lesión y tejido normal microscópicamente, que fueron obtenidos de hemitiroidectomías o tiroidectomías totales. La indicación de cada una de las cirugías fue debido a nódulos tiroideos sospechosos, siguiendo los criterios según diagnóstico por PAAD, de la población del Hospital General de México que acudió a la Clínica de Tiroides durante aproximadamente un año (de abril a diciembre del 2006). De 95 casos, se obtuvieron 24 muestras de pacientes que cumplieron con criterios de inclusión.

2. Selección

Criterios de inclusión: pacientes de dicha población que aceptaran la participación voluntaria en el estudio y que contaran con PAAD, gammagrafía con MIBI y resultado histopatológico definitivo.

Criterios de exclusión: no contar con estudio de MIBI, PAAD y/o diagnóstico histopatológico, o muestras de RNA/tejido insuficiente.

3. Recolección de datos

3.1. Extracción de RNA total

Cada muestra constó de aproximadamente 50-100 mg de tejido tiroideo del nódulo y por separado, 50-100 mg de tiroides macroscópicamente normal tomados durante el procedimiento quirúrgico, congelando el tejido de forma inmediata en crioviales dentro de nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C en ultracongeladoras (Revco). Se confirmó nuevamente en cada uno de los casos el diagnóstico histopatológico mediante una sección en parafina de cada una de las muestras incluidas. Sólo se incluyeron aquellos casos en los

que se confirmó el diagnóstico con el definitivo hecho en el Hospital General por otro patólogo experto en tiroides (AGD). Sólo se incluyeron aquellas muestras que contenían más del 70% de células tumorales (benignas o malignas) o menos estroma o tejido infiltrativo (vgr. Linfocitos en los casos de tiroiditis de Hashimoto).

Una vez descongelado el fragmento de tejido se homogenizó mecánicamente por al menos 45 segundos (Polytron, Inc.) dentro de una solución estabilizante para RNA total (Qiagen) y sobre hielo. Para la extracción de RNA total se utilizaron columnas de acuerdo a las recomendaciones generales del laboratorio (RNeasy mini kit, 74106, Qiagen). Se centrifugó por 3 minutos a máxima velocidad (4000 rpm) en microcentrífuga y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo al que se le agregó etanol al 70%. Se agitó vigorosamente y se transfirió a una columna de RNeasy para posteriormente centrifugar por 15 segundos a más de 10 000 rpm ó 8 000 x g. Se descartó el filtro y se repitió con el buffer RW1 que incluye el kit. Se le agregaron 80 microlitros de DNAsa I (a una concentración de 10 µl de DNAsa I (RNase-Free DNase set cat no. 79254) + 70 µl de Buffer RDD mezclado por inversión suave) y se incubó en la mesa del laboratorio por 15 minutos. Se volvió a agregar buffer RW1 y se volvió a repetir este paso para descartar el filtrado. Se lavó con 500 µl de RPE (también incluido en el kit) y se centrifugó por 15 segundos a 10 000 rpm. Se descartó el filtrado, secándose la columna por centrifugación y agregándose 20 µl de agua libre de RNAsas para bajar el RNA total de la membrana. Se extrajeron también proteínas por precipitación con acetona poco después de la homogenización de tejidos. Se verificó la calidad y concentración del RNA total mediante espectrofotometría (considerando un valor superior a 1.7 en la razón 260/280 A como de buena calidad y una concentración mayor a los 100 ng/µl). Se evaluó también la calidad de las muestras mediante el uso del bioanalizador RNA 6000 Nano Assay (Agilent), considerándose de buena calidad con un

260/280 mayor a 1.9, un RIN mayor a 8 y un área superior a 1.7, obteniéndose electroferogramas satisfactorios para cada una de las muestras.

3.2. Hibridación en el Microarreglo para análisis de expresión de ATPasas

Se tomaron 2 µg de RNA total como material de inicio, agregándosele controles de RNA poliadenilados (Poly-A) diluídos con primers oligodT (50 µM) y completando con agua libre de RNAsas hasta los 12 µL. A continuación se realizó la síntesis de la primera hebra de DNA complementario con un ciclo de amplificación utilizando una SuperScript II con 10 minutos de incubación a 70°C, con un hola de 4°C, seguido por 2 minutos de 42°C por 1 hora y al terminar con 4°C sostenido en un termociclador ABI 9700. Posterior a esta amplificación inicial se realizó la purificación de la hebra doble de DNAc y se obtuvo RNA complementario mediante transcripción in Vitro marcado con biotina. Esta amplificación se realizó en dos ciclos mediante el uso de marcaje con IVT enzimático en buffer de marcaje. Se purificó el RNAc marcado y se fragmentó para posteriormente verificarse por bioanalizador (ver arriba) e hibridar en un microarreglo de Affymetrix (Genoma Humano U133A2) por 16 horas para después lavarlo de acuerdo al protocolo convencional. Se realizó su lectura mediante un escáner Agilent para la detección y transformación de las señales fluorescentes. Esto se consideró una cuantificación relativa de los transcritos primarios y se comparó con genes con niveles basales de expresión (housekeeping genes vgr. Transferían o 18S). Se validaron los niveles de expresión obtenidos por el microarreglo mediante el uso de PCR con transcriptasa reversa (MultiScribe RT) con el kit de alta capacidad para cDNA (Applied Biosystems 4322171) y posterior amplificación con sondas marcadas (VIC) en tiempo real en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

3.3. Obtención de valores

Se normalizaron estadísticamente todos los valores de los niveles de expresión mediante la técnica de Loess en ambiente R para bioinformática y se obtuvieron distribuciones logarítmicas (mediante los valores M) que se consideraron como los niveles de expresión que se muestran en esta tesis. El nivel M significa el valor exponencial en base 2 de los valores aquí expresados. Se obtuvieron plots de volcano para determinar cuáles fueron los genes diferencialmente sobreexpresados en cáncer de tiroides en comparación con tejido benigno y normal (datos no mostrados). Por análisis jerárquico no supervisado se mostraron también los genes diferencialmente expresados. De estos genes se obtuvieron las ATPasas representativas que estuvieron diferencialmente expresadas y estadísticamente significativas en cáncer tiroideo. Actualmente se están realizando biología de sistemas y validación de biomarcadores de algunos de estos genes diferencialmente expresados en cáncer.

Se realizó revisión de expedientes para obtener datos clínicos, resultados de MIBI y diagnóstico histopatológico definitivo.

4. Análisis estadístico

Se realizó análisis estadístico descriptivo para todas las variables clínico-demográficas adicionalmente recolectadas. Para las variables dicotómicas y nominales se obtuvieron proporciones y medidas de tendencia central y dispersión.

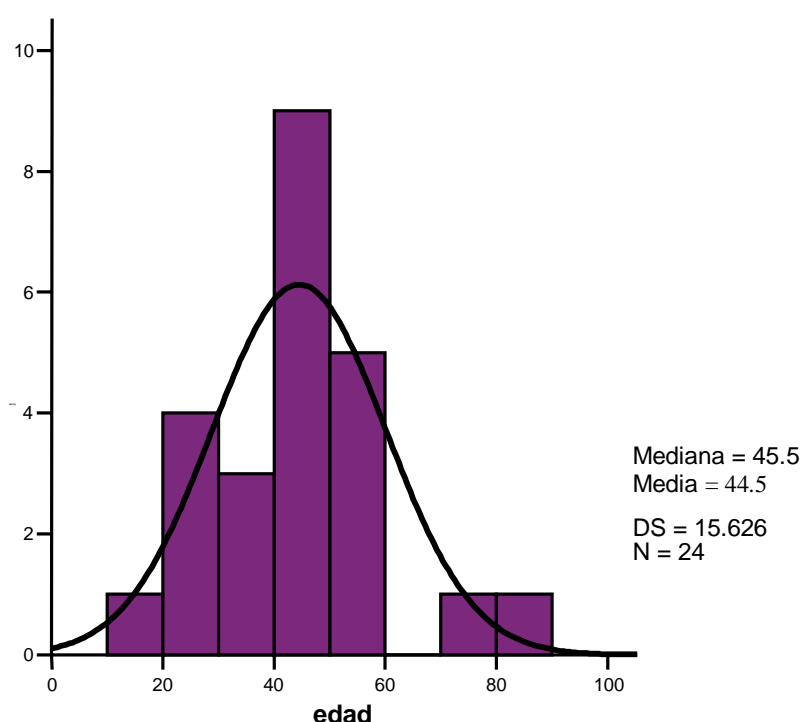
Para las variables dimensionales se obtuvieron mediana y rango. Para el análisis se obtuvieron tablas de R x C de donde se analizaron las proporciones mediante la prueba de Ji cuadrada (y exacta de Fisher) utilizando el programa de SPSS versión 12.0. Para la comparación de los niveles de expresión de ATPasas entre CPT y condiciones benignas se realizó una comparación de medias (t de Student para muestras independientes), normalización Loess por ambiente R (software libre), LIMMA y valores M, A y t

multivariada. Consideramos significativa cualquier diferencia que fuera menor a un error alfa de 0.05.

Resultados

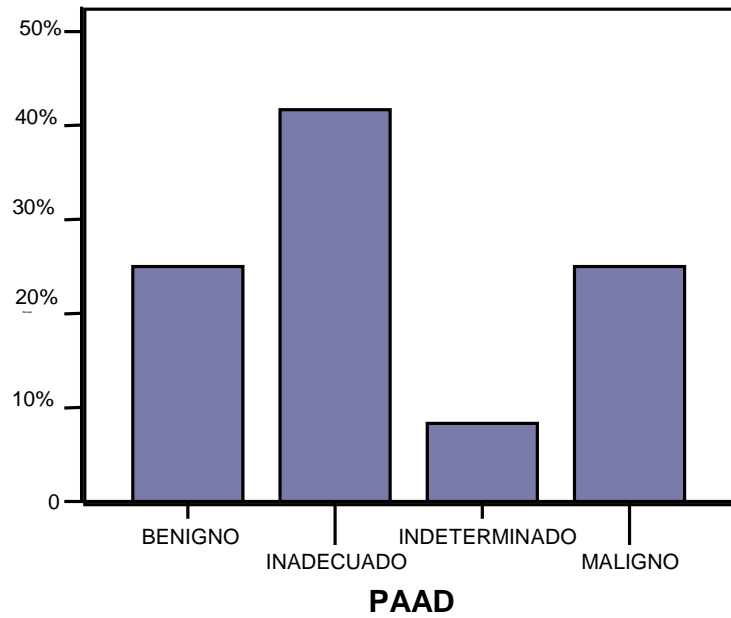
Se analizaron 24 casos de pacientes con nódulo tiroideo, PAAD y MIBI. De estos, únicamente 2 casos tuvieron resultado MIBI negativo y 22 fueron MIBI positivo (91.7%). La media de edades fue de 45.5 (rango de 19 a 83, con 87.5% de los pacientes por debajo de 56 años, gráfica 1), con un 95.8% de pacientes mujeres (únicamente un caso masculino).

Gráfica 1. Distribución por edades

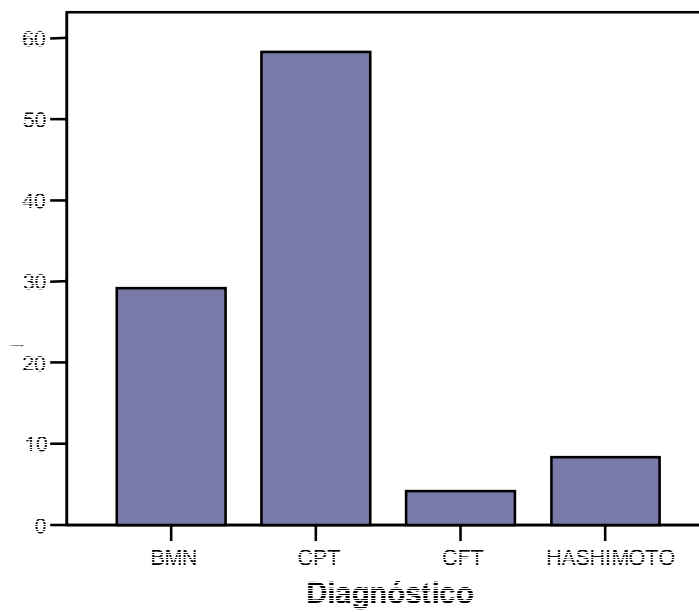


Las PAAD resultaron no diagnósticas en un 50% de los casos (10 casos o 41.7% inadecuados y 2 casos u 8.3% indeterminados), que corresponde con la sensibilidad de la PAAD reportada para nuestra institución Error! Bookmark not defined. (gráfica 2). Los diagnósticos finales en esta muestra fueron: 7 (29.2%) casos de bocio, 14 (58.3%) casos con CPT, 1 (4.2%) caso con cáncer folicular y 2 (8.3%) casos con tiroiditis de Hashimoto (ver gráfica 3).

Gráfica 2 diagnósticos por PAAD



Gráfica 3. Porcentajes de diagnósticos finales



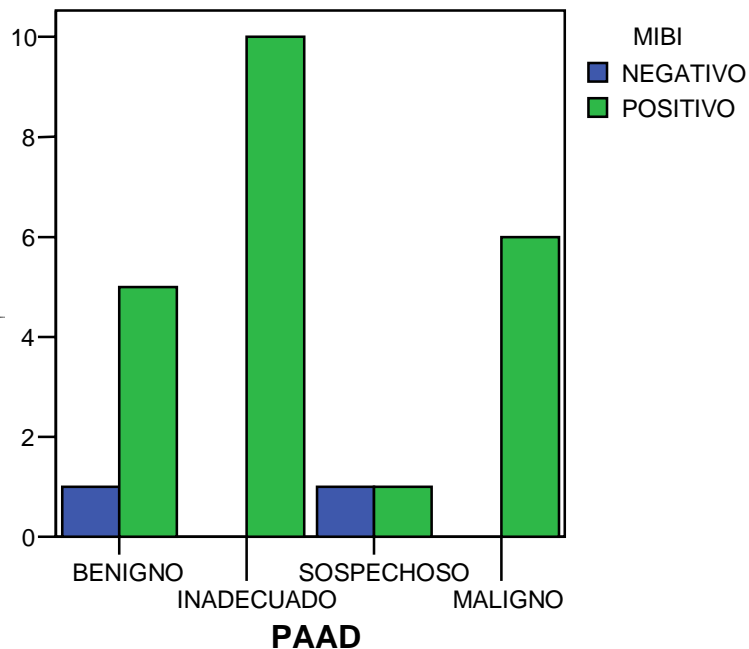
Al analizar los resultados de MIBI en relación a los diagnósticos por PAAD, se confirmó que todos los casos que reportaron maligno en PAAD fueron MIBI positivos (tabla 2, gráfica 4), así como los casos reportados como malignos en el diagnóstico histopatológico definitivo (gráfica 5).

Tabla 2 Casos MIBI vs PAAD

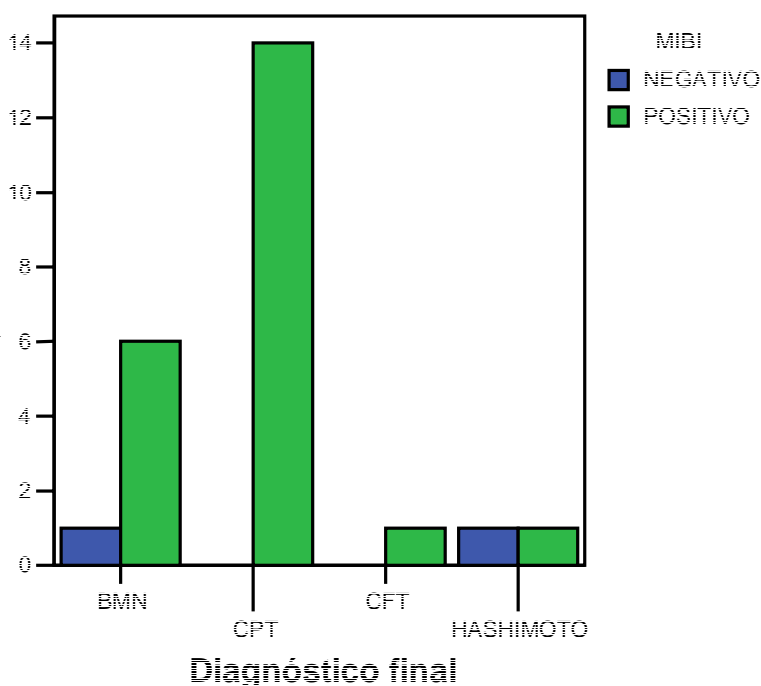
		MIBI		Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
PAAD	BENIGNO	1	5	6
	INADECUADO	0	10	10
	SOSPECHOSO	1	1	2
	MALIGNO	0	6	6
Total		2	22	24

Chi cuadrada: 6.545; p de 0.088

Gràfica 4: Resultados de MIBI y PAAD



Gráfica 5. Resultado de MIBI vs diagnóstico final



Los casos de MIBI negativo, ambos resultaron benignos en el diagnóstico definitivo (100% benignos por BMN y tiroiditis de Hashimoto, ver gráfica 5), confirmando el valor predictivo negativo propuesto por el grupo del Dr. Hurtado y cols. De los casos con MIBI(+) un 29.2% fueron benignos (14.3% por tiroiditis de Hashimoto y 85.7% por BMN) y 62.5% fueron malignos (6.7% por cáncer folicular y 93.3% por CPT).

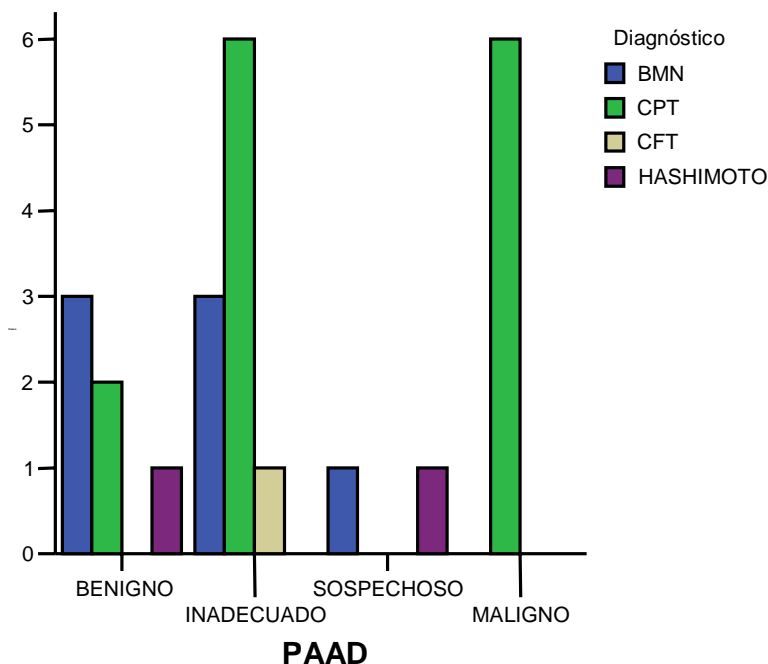
Tabla 3 Diagnóstico final vs MIBI

Diagnóstico final	MIBI		Total
	Negativo	positivo	
BMN	1	6	7
CPT	0	14	14

CFT	0	1	1
Hashimoto	1	1	2
Total	2	22	24

Ji cuadrada: 6.234; p de 0.101

Gráfica 6: Diagnósticos definitivos comparados con diagnóstico por PAAD



En la gráfica 6 se muestra que de los casos con diagnóstico benigno e inadecuado en la PAAD, un porcentaje fueron malignos, mientras que de los casos sospechosos, ninguno tuvo diagnóstico final de maligno. En los resultados negativos por MIBI, todos fueron benignos.

En relación a la expresión de ATPasas medidas en 13 de los casos, se observó que existe una mayor expresión de ABCC3, ATP10A y ATP13A4 en los casos de CPT que en los BMN, mientras que la ATP6V0E2 se encuentra con menor expresión en los casos de CPT que en el BMN¹. La media de sobre-expresión de los valores M para los casos analizados para ABCC3 fue de 8.31 en cáncer (aprox. 300 veces) y 6.33 (aprox. 80 veces) en bocio

¹ Una vez identificadas las ATPasas con expresión diferente en lesiones benignas y en cáncer, se realizó búsqueda bibliográfica de estas en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap> (Online Mendelian Inheritance in Man, para identificar su tipo y su función. Aunque se encuentran todas ellas descritas, aun no se han caracterizado completamente.

($p=0.026$), para ATP10A fue de 6.56 (aprox. 90 veces) en cáncer y 5.42 (aprox. 40 veces) en bocio ($p=0.001$), para ATP13A4 fue de 8.99 en cáncer y 7.08 en bocio ($p=0.003$), de ATP6V0E2 fue de 9.08 en BMN y 7.17 en CPT ($p=0.020$). Estas medias de sobreexpresión en los casos se muestra en la tabla 4, mostrando p significativa en todas ellas.

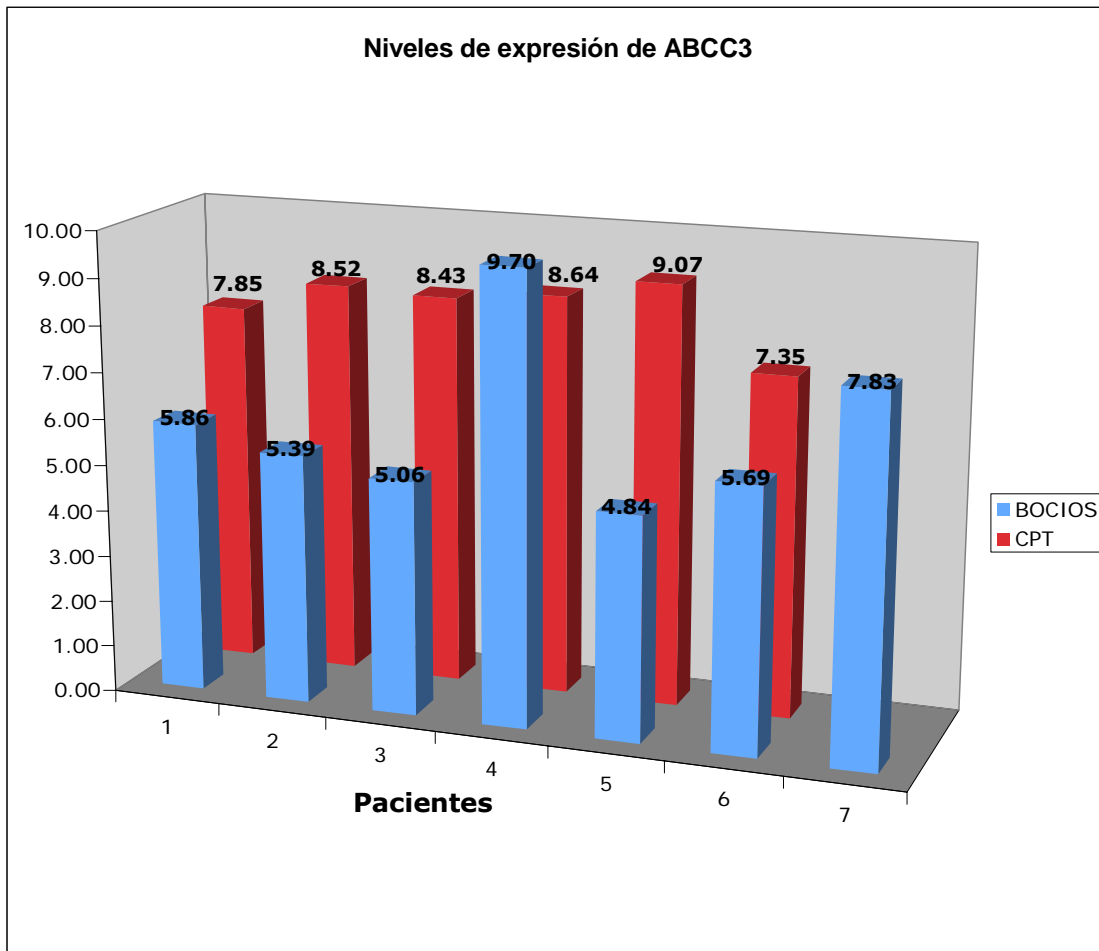
A continuación se presentan las gráficas de estos resultados.

En la gráfica 7 se muestran los niveles de sobreexpresión de ABCC3, una de las ATPasas identificadas. Se observa claramente en la gráfica como los niveles se encuentran incrementados en comparación de la mayoría de los casos de bocio. Esta relación es menos notoria para las otras dos atpasas (gráfica 8 y 9).

En la gráfica 10 se muestra la expresión de ATP6V0E2, y se observa una relación contraria a las de las otras ATPasas, una mayor expresión en los casos de bocio.

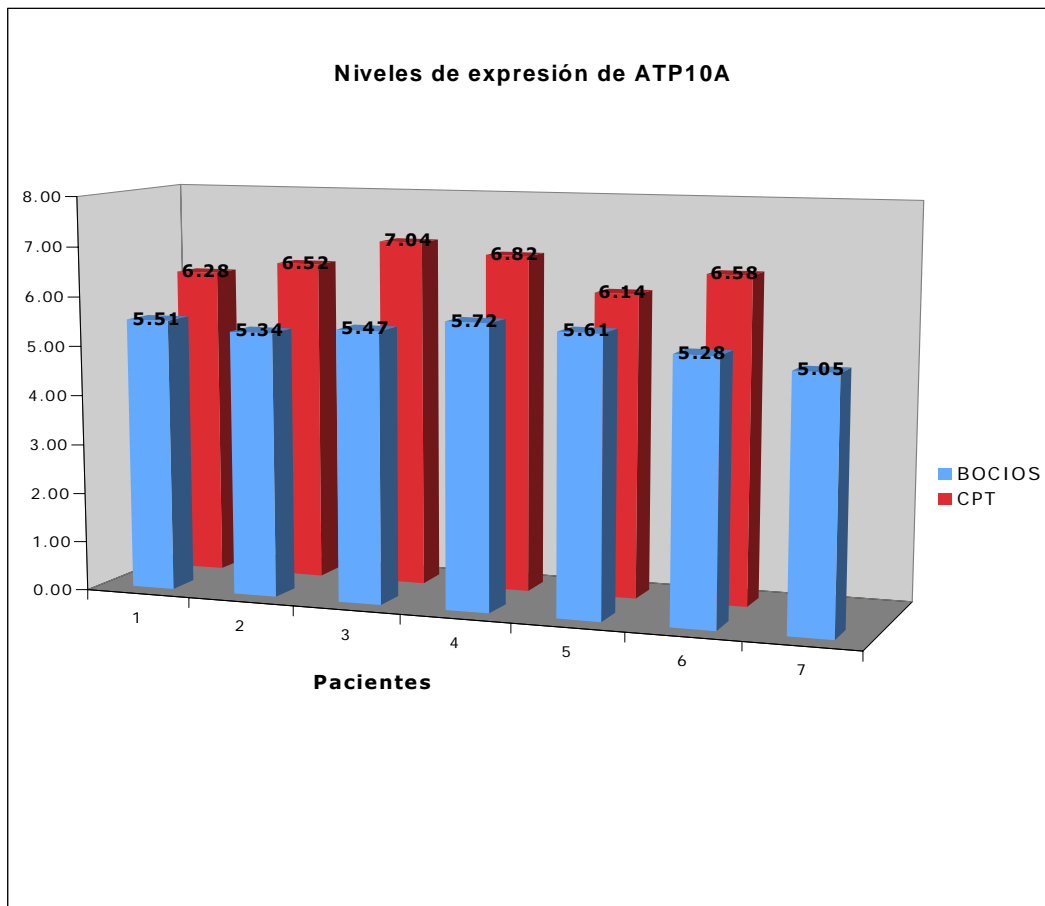
Dx Final	ABCC3	ATP10A	ATP13A4	ATP6V0E2
CPT	8.31	6.56	8.99	7.17
<i>p</i>	<i>0.026</i>	<i>0.0001</i>	<i>0.003</i>	<i>0.02</i>
BCN	6.33	5.42	7.08	9.08

Tabla 4. Nódulos tiroideos y medias de expresión de ATPasas



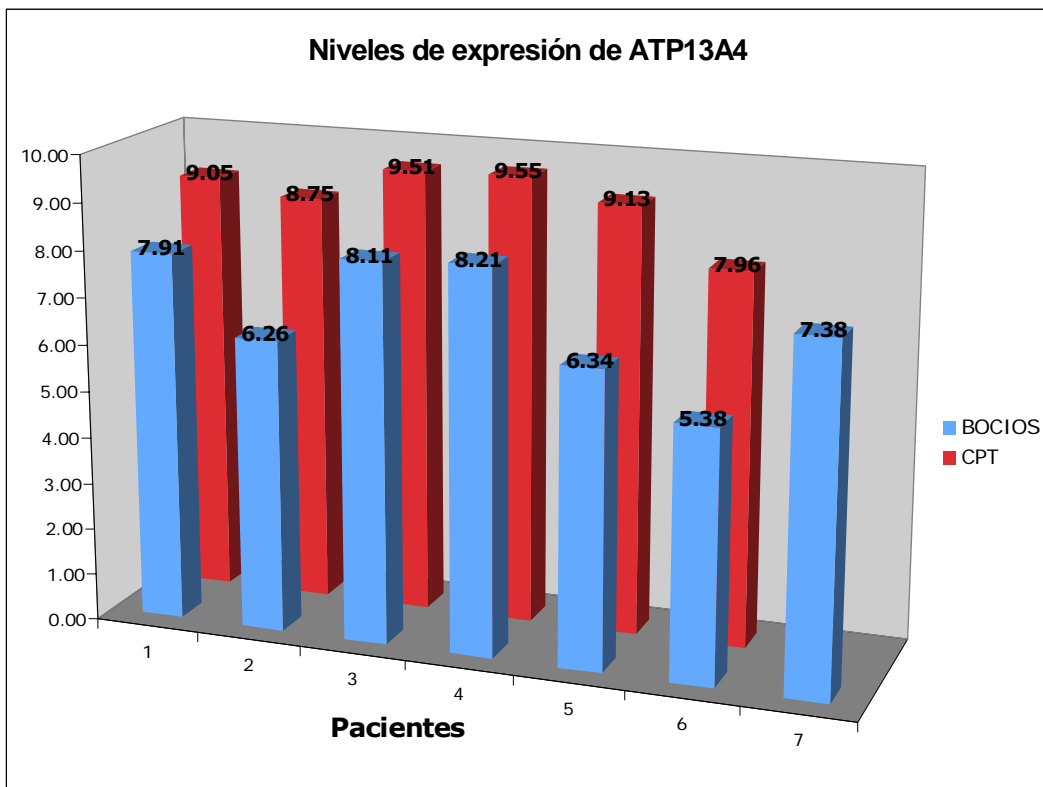
Gráfica 7. ABCC3 es una de los genes ABC que se categoriza dentro de las MDR, pues también causa resistencia al manejo con fármacos por sus propiedades de transporte de xenobióticos. Se le ha asociado a patologías inflamatorias crónicas en colon y patologías pulmonares²

² Ho, G. T.; Soranzo, N.; Nimmo, E, et al. Gene wide haplotypic analysis demonstrates novel associaton between ATPBinding Cassete 3&Multidrug Resistance Protein 3 (ABCC3/MRP3) gene and inflammatory bowel diseade. en <http://gateway.ut.ovid.com/gw1/ovidweb.cgi> \l "14#14" free text.

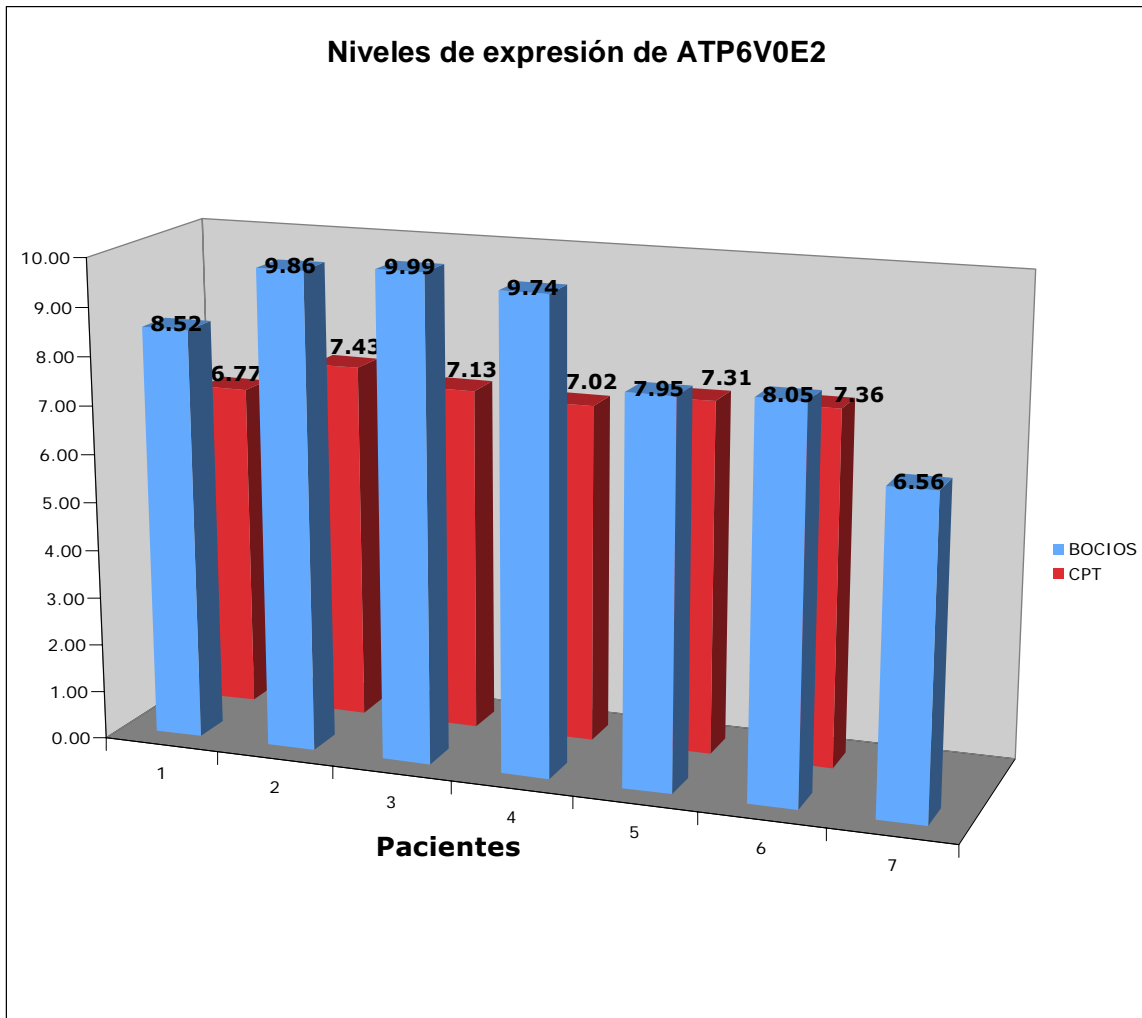


Gráfica 8. La ATP10A es una ATPasa tipo P, es decir que se encuentra fosforilada en su estado intermedio y su función es el transporte de metales y iones a nivel mitocondrial y en otras membranas celulares. Pertenecer a las ATPasas clase V, tipo 10C, ubicación genética en 15q11-q13 (OMIM KIAA0566).

* www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM



Gráfica 9. La ATP13A4 es una ATPasa poco caracterizada, tipo 13A4 con ubicación genética en 3q25-q29. (OMIM 609556). Aun no existe descripción sobre su función específica.



Gràfica 10. Esta ATPasa se encuentra apenas descrita; se trata de una ATPasa reguladora de voltaje para transporte de H^+ , caracterizada en membrana lisosomal en rata.

Discusión

Existe una dificultad real en el diagnóstico del nódulo tiroideo en nuestra población, basándose en los resultados que se obtienen por PAAD que es inadecuada/indeterminada hasta en el 50% de los casos de este estudio, lo que obliga a una cirugía innecesaria con aumento en la morbilidad de los pacientes que se someten al procedimiento. El valor predictivo negativo del 100% con gammagrafía dual con MIBI propuesto por el grupo del Dr. Hurtado-López y cols. se confirma en esta serie, pues los dos casos negativos resultaron benignos. De la misma forma se confirma que de los casos MIBI(+) el 29.2% (aproximadamente 30%) resultan benignos, por lo que son estos casos en los que potencialmente podría funcionar la complementación diagnóstica con ATPasas.

Cabe resaltar que la ATP6V0E2 fue la que mostró una mayor expresión en bocio, pudiendo ser la contraparte de las ATPasas que se sobreexpresan en CPT. También resulta interesante que en las gráficas se observan dos casos con diagnóstico final de BMN en que la ABCC3 se encuentra sobreexpresada.

La relevancia biológica de estos resultados no puede determinarse en este estudio, pero podría apoyar la teoría de mutación somática de las neoplasias tiroideas en la que el bocio puede progresar a cambios displásicos y a cáncer.

Conclusiones

Nuestros resultados muestran una tendencia a la sobreexpresión de ATPasas en cáncer papilar de tiroides en comparación con bocio. Esta sobreexpresión es parte de lo que podría ser una firma molecular genómica para cáncer de tiroides, sin embargo falta por validar algunos de estos genes y de explorar la relevancia de esta sobre-expresión de ATPasas en la ontogénesis del cáncer tiroideo. Sin embargo es interesante notar que estos genes se encuentran expresados diferencialmente en comparación con bocio. Esto podría explicar la hipótesis de nuestro trabajo anterior en el que se muestra un aumento de la captación de MIBI en los casos de cáncer. Especulamos que un aumento en la expresión de estos genes, y probablemente de las mismas proteínas podría conducir a un mayor acúmulo del radiofármaco dentro de mitocondrias, lo que podría explicar la mayor captación en estos casos. Sin embargo por las mismas limitaciones del estudio en cuanto al tamaño muestral y la recolección no prospectiva, esta conclusión no puede establecerse por completo, por lo que se propone la validación mediante realización de un estudio prospectivo y muestra calculada con realización de MIBI, PAAD y determinación de ABCC3, ATP13A4 y ATP10A con RT-PCR o inmunohistoquímica en los mismos casos. Esto tendría el objeto de determinar la relación causal de estas proteínas y el valor potencial de este tipo de análisis dentro de la complementación diagnóstica del nódulo tiroideo.

La interpretación de estos resultados podría sugerir la mayor utilidad del MIBI en el estudio preoperatorio de pacientes con tumores tiroideos foliculares sospechosos principalmente, en los que la PAAD no es diagnóstica o suficiente para indicar la cirugía. También es probable que la determinación de los niveles de estas ATPasas pudiera contribuir a la mayor especificidad de la PAAD para la detección diagnóstica del cáncer tiroideo. Sin embargo no debemos perder de vista que el presente trabajo es sólo un estudio piloto con esfuerzos por clarificar la biología molecular del cáncer hipercaptante por MIBI

y la probable explicación a este fenómeno a la luz del análisis genómico de expresión a gran escala. La utilidad de este tipo de análisis molecular se tendrá que validar en un mayor número de pacientes o casos y comprobarlo en estudios moleculares más detallados sobre la función mitocondrial y el significado biológico de las ATPasas en el tejido neoplásico tiroideo. La complementación diagnóstica de la PAAD mediante la expresión de ATPasas también debe validarse, ya que el número de células puede resultar crucial para poder llevar a cabo el análisis molecular, cosa que no podría realizarse en muestras acelulares, aunque hasta ahora se han reportado casos con obtención suficiente de RNA a partir de una cantidad tan pequeña como 10 células/ μ l.

ANEXO A

Etiopatogenia en el cáncer derivado de células foliculares

El factor etiológico más claramente asociado al cáncer tiroideo son las radiaciones externas, primero identificado por Duffy y Fitzgerald en 1950 al ver que la mayoría de sus pacientes con cáncer tiroideo tenía antecedente de tratamiento con radiaciones¹. El riesgo asociado no se ha logrado establecer pues no existe un estudio con la muestra suficiente para cuantificarlo en forma adecuada. Sin embargo es indudable que existen otros factores de riesgo. Ya que es dos a tres veces más frecuente en la mujer, se ha considerado el papel de factores hormonales,^{2,3} lo cual aun no ha sido demostrado. Se ha determinado que otros factores ambientales como la dieta también pueden estar relacionados y se piensa que operan a través de la acción de la tirotrópina (TSH). Existen estudios en animales que sugieren que la estimulación prolongada de la TSH puede causar cáncer de tiroides, pero en los humanos la relación no es clara⁴. En cuanto a los factores ambientales, se ha visto mayor incidencia de carcinoma folicular en zonas con deficiencia de yodo, mientras que el carcinoma papilar es más frecuente en zonas con dietas altas en yodo. Resulta de interés que la suplementación con yodo en modelos animales ocasiona cambio de morfología de folicular a papilar, lo que podría indicar que el yodo juega un papel regulador más que precipitador de neoplasia⁵.

¹ Duffy BJ, Fitzgerald P, Thyroid cancer in childhood and adolescence: a report on twenty-eight cases. *Cancer*, 1950;10:1018.

² Jaklic BR, Rushin J, Ghosh BC, estrogen and progesterone receptors in thyroid lesions. *Annals of Surgical Oncology*, 1995; 2(5): 429-434.

³ Dos Santos Silva I, Swerdlow AJ, Sex differences in the risk of hormona-dependent cancers. *Am J Epidemiol* 1993, 138.

⁴ Henderson BE, Ross RK, Pike MC, et al. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 1982;42:3232

⁵ Kondo T, Ezzat S, Asa SL, Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular/cell neoplasia, *Nature*, 2006;6; 292.

Dada la existencia de cáncer tiroideo con origen en células foliculares asociado a dos síndromes familiares, se piensa que el factor genético pueda ocupar un rol importante en la etiopatogenia del cáncer, sin embargo esto no se ha demostrado para los casos esporádicos. Del 3.5 a 6% de carcinomas de origen en células foliculares resulta de una forma idiopática familiar. Los carcinomas de tiroides ocurren también en asociación a síndromes con mutaciones en la línea germinal del gen APC, como el síndrome de Gardner en donde aparece el carcinoma a edades tempranas, antes de los 35 años y con un patrón histológico distintivo⁶, caracterizado por carcinoma papilar con patrón cribiforme y áreas sólidas con células en huso. El otro síndrome familiar asociado a carcinoma de tiroides es la enfermedad de Cowden y se relaciona aparentemente a mutaciones en el gen PTEN (gen homólogo de fosfatasa con tensina), un gen supresor de tumor y el síndrome de Werner asociado a mutaciones en el gen WRN. Existen otros loci genéticos asociados a predisposición para el carcinoma papilar de tiroides, como el (1q21) y el ((3;8)(p14.2;q24.1)) asociados a carcinomas renales y el (19p13.2) con bocio multinodular⁵. La inestabilidad genética es otra de las propuestas para el cáncer papilar esporádico, como son las mutaciones de RAS y BRAF que ocasionan una activación oncogénica constitutiva de la vía de MAPK (mitogen activated protein kinase). Esto puede promover una mayor inestabilidad y mutaciones somáticas durante la progresión del cáncer (Fig. A)⁵. Existe otra teoría en la que se propone una alteración desde la línea germinal⁷ (Fig. B) que ocasiona predeterminación para la progresión hacia un tipo histológico particular de cáncer tiroideo. Takano et al proponen que la

⁶ Harach HR, Williams GT, Williams ED. Familiar adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology* 1994;25:549

⁷ Takano T, Amino N, In my view...Fetal cell carcinogenesis: a new hipótesis for better understanding of thyroid carcinoma. *Thyroid* 2005;15(5):432-438

sobreexpresión de RNAm de fibronectina oncofetal (onfFN) presente en los carcinomas papilares de tiroides y en los carcinomas anaplásicos tiene relación con su origen y puede funcionar como un marcador sérico para diagnóstico. En su estudio se midieron los niveles relativos de expresión de RNAm de onfFN en los tejidos mediante rtPCR, utilizando la tiroglobulina como control interno. Mediante estos marcadores se distinguieron todos los CPT y anaplásicos, así como 3 de los 6 CFT del tejido normal o con lesiones benignas.⁸ En este estudio se sugiere la posibilidad de afinar el diagnóstico preoperatorio mediante el uso de marcadores moleculares.

A pesar de los estudios realizados, ninguna de las teorías sobre la oncogénesis en tiroides se ha confirmado aun a nivel molecular; hasta ahora los hallazgos histopatológicos apoyan la teoría de la evolución clonal posterior a mutaciones somáticas. El cáncer usualmente se asocia a la presencia de otras entidades como son el bocio endémico y esporádico, los nódulos benignos, la tiroiditis linfocítica y la enfermedad de Grave's. Aun no se ha determinado si los pacientes con estas patologías deben considerarse con riesgo aumentado para cáncer, sin embargo en algunos estudios de casos-controles, se ha demostrado un mayor porcentaje de nódulos tiroideos benignos y bocio preexistentes en los pacientes con cáncer que en los pacientes control⁹. Estos resultados pueden relacionarse con un "recall bias" (sesgo de memoria), ya que los pacientes que presentan cáncer es más probable que recuerden los eventos relacionados. Los estudios genéticos recientes sugieren que las neoplasias tiroideas pueden progresar de

⁸ Higashiyama, T.; Takano, T.; Matsuzuka, F et al. Measurement of the expression of oncofetal fibronectin mRNA in thyroid carcinomas by competitive reverse transcription polymerase chain reaction, *Thyroid*, 2005; 9(3): 235-240

⁹ Negri E, Ron E, Franceschi S, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. I. methods y IV. Benign thyroid disease. *Cancer Causes Control* 1999;10:138.

tumores benignos a carcinomas bien diferenciados conforme se acumulan las mutaciones somáticas.

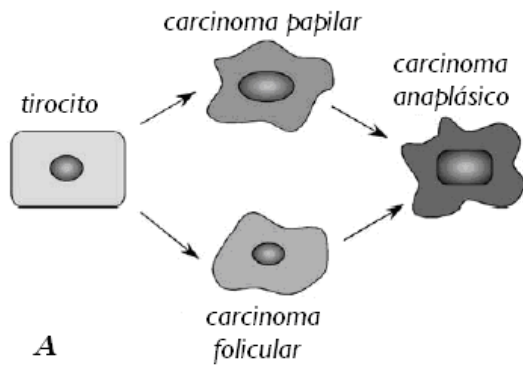
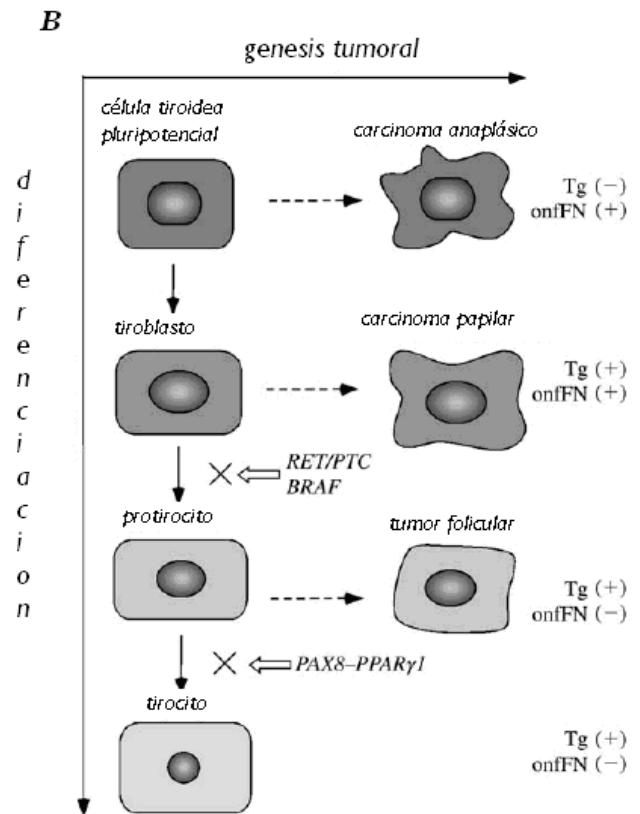


Fig A Teoría de la evolución clonal y dediferenciación celular. El carcinoma anaplásico es derivado de dos lesiones diferentes con progresión a la dediferenciación.

Fig B Teoría de origen embriológico del cáncer derivado de células epiteliales de tiroides, donde cada tipo de cáncer se origina de una célula con potencial embriológico determinado, de lo cual depende su diferenciación, los marcadores y su potencial maligno.



* Takano T, Thyroid 2005;15:432

Genética molecular del cáncer de tiroides

El carcinoma papilar de tiroides es el más frecuente de los carcinomas originados en las células foliculares. Se ha establecido que la ingesta de yodo es un factor ambiental que determina la incidencia relativa de cáncer papilar y folicular. La asociación de carcinoma folicular con la deficiencia de yodo sugiere que este tipo de tumor se desarrolla en las glándulas sujetas a un estímulo de proliferación crónico. Se sospecha que muchos de estos tumores surgen a partir de adenomas preexistentes y por lo tanto coinciden con la teoría de la evolución clonal a través de un proceso que involucra la transformación progresiva a través de mutaciones somáticas de los genes relacionados con el crecimiento y probablemente el metabolismo (Fig. C). Hasta ahora no se ha demostrado tal lesión precursora para los carcinomas papilares, sin embargo se les ha visto asociados con frecuencia a bocio y en relación a radiaciones.

Mediante diversos estudios y asociaciones familiares, se han identificado algunos de los genes relacionados con la etiopatogenia del cáncer tiroideo. Los factores de crecimiento extracelulares estimulan señales intracelulares específicas que dictan la secuencia de órdenes necesarias para la síntesis de DNA y la proliferación celular, como es el caso de la TSH. Muchos de los intermediarios en estas señales son protooncogenes, que pueden activar incorrectamente el crecimiento celular al sobreexpresarse, o a través de mutaciones que aumenten su función. Entre los genes relacionados se encuentran los receptores de tirosin-cinasa *ret* que habitualmente no se expresan en las células foliculares, pero con la mutación *ret/PTC* se expresan los receptores en las células tiroideas, presentando varias formas de la proteína quimérica según sea la mutación. Esto se asocia a señalización anómala que estimula la proliferación celular o la expresión de receptores a otros factores de crecimiento, como el caso de sobreexpresión del gen *met* (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos).

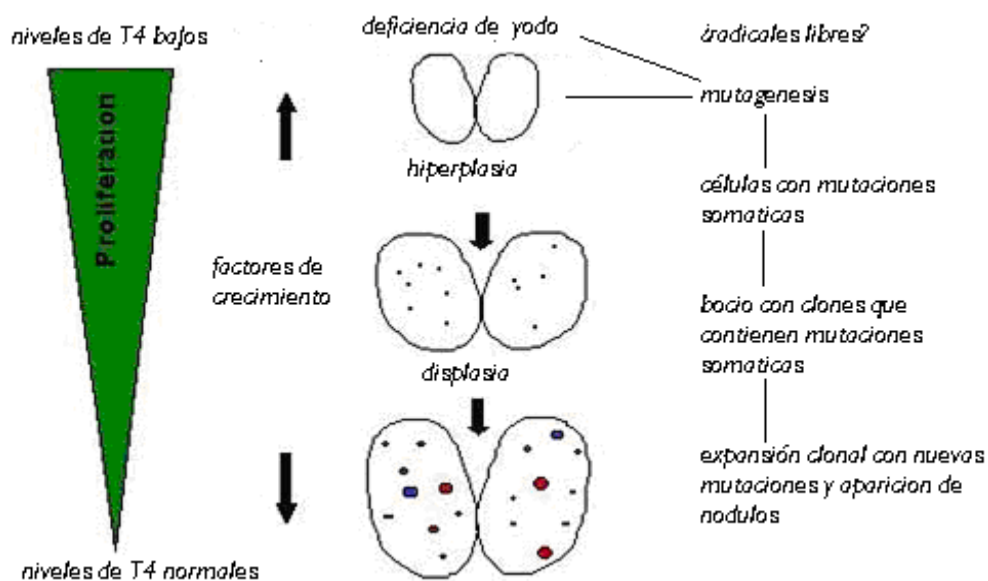


Fig C Teoría de la mutación somática relacionada a factores ambientales y la expansión clonal que lleva a hiperplasia (bocio) y posteriormente a displasia y cáncer en algunos casos

El oncogen *ras* (BRAF) codifica una proteína de la cascada de las map-quinasas, y su mutación aumenta la afinidad por GTP y la actividad de GTPasa. Las implicaciones fenotípicas de este tipo de cambio celular se encuentran relacionadas con el hecho de que la célula tiroidea normal requiere de TSH para la proliferación, mientras que las células con la mutación *ras* adquieren independencia metabólica y pueden crecer en ausencia de TSH¹⁰. Esta independencia metabólica podría correlacionarse con el metabolismo anaerobio y la función mitocondrial.

Análisis genético en cáncer papilar de tiroides

Se han tratado de demostrar marcadores biológicamente relevantes para el diagnóstico y pronóstico del nódulo tiroideo y del cáncer papilar de tiroides, motivado por las mutaciones conocidas de *ret* y BRAF asociadas a cáncer en pacientes con antecedente de radiación (*ret*) y casos esporádicos (BRAF). Recientemente se ha utilizado la tecnología de

¹⁰ Fusco A, Berlingieri MT, Di Flore PP, et al. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncoenes. *Mol Cell Biol* 1987;3:365.

microarreglos de expresión genética para determinar el perfil molecular de ciertos tejidos y tumores. En el caso del cáncer papilar de tiroides, se han publicado distintos perfiles moleculares que comparten algunos marcadores, sin embargo la mayoría muestra patrones distintos, suponemos relacionados a la población y al número de muestra. Dentro de estos perfiles se encuentran algunas ATPasas con expresión diferente en las lesiones benignas y malignas. El estudio de Chevillard S et al, muestran la ATP2B2 (ATPasa transportadora de Cu^{2+}) con aumento de su expresión en cáncer papilar variante folicular, al igual que ABCC8 y ABCF2¹¹ EN el estudio de Weber F et al, se identifica una ATPasa sobreexpresada en el análisis por arreglos (ATPasa clase VI, tipo 11A)^{Error! Bookmark not defined.}. La ATP5B mitocondrial se encontró sobreexpresada en el estudio de Van Staveren, et al¹², y en el estudio de Finley et al se encontró la ATP5G sobreexpresada en las lesiones benignas¹³.

ANEXO B

Categorías diagnósticas en la PAAD¹⁴

El uso de la biopsia citológica tomada por medio de una punción con aguja delgada se inicio en 1952 por Söderstrom y se introdujo a Norteamérica en la década de los 70s. Dada la alta prevalencia de los nódulos tiroideos, este tipo de citología es una de las más frecuentes para el patólogo, sin embargo los reportes de estas citologías son de los más confusos, existiendo varias categorías y clasificaciones. Esto es resultado en buena medida de la presencia de lesiones foliculares benignas y malignas que no pueden distinguirse

¹¹ Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, et al. Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. Clin Cancer Res 2004;10:6586-97.

¹² Van Staveren WCG, Weiss Solis D, Delys L, et al. Gene Expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals supression of negative feedbacks in tumorigenesis. PNAS, 2006;103(2):413-418.

¹³ Finley DJ, Arora N, Zhu B, et al. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. Jour Clin Endocr & Metab. 2004;89(7):3214-23

¹⁴ Wang HH, Reporting Thyroid fine-needle aspiration: literature review and proposal. Diagnostic Cytopathology, 2005;34(1):67-76

mediante características citológicas, a la variedad de hallazgos citológicos que pueden ser inespecíficos y a la existencia de lesiones quísticas que disminuyen la celularidad de la muestra. Existe el esquema dicotómico en el que se categoriza el resultado como benigno o maligno (que incluye sospechosos). El reporte de inadecuado no se toma como una categoría de la PAAD. Existen además esquemas de 3, 4 o 5 categorías, todos con terminología diferente y que se muestra en la tabla A. Además existen esquemas con 6 categorías basadas en la probabilidad de malignidad con cada uno de los reportes. La existencia de tantos sistemas de categorías para el diagnóstico de citología por PAAD indica que aun ninguno es adecuado para el reporte, además de que ninguna de esta serie de clasificaciones da una guía clínica de la conducta a seguir, y que en los casos categorizados como indeterminados, sospechosos, lesión folicular, atipia, entre otros, se prefiere el manejo quirúrgico para obtener un diagnóstico definitivo, aunque esto pueda significar cirugía innecesaria.

Tabla A. Esquemas de categorías diagnósticas en la PAAD, no se incluye en ninguna el material inadecuado

	<i>Categorías</i>	<i>Correlación clínica</i>
Esquemas de tres categorías		
A	Benigno	No hay datos de neoplasia
	Anormal	Atípico, no concluyente, indeterminado, sospecha de malignidad, posiblemente maligno, posible neoplasia, sospechoso.
	Cáncer	Carcinoma, maligno, probablemente maligno
B	Benigno	Negativo
	Neoplasia folicular	Tumor folicular o de células de Hurthle
	Maligno	Positivo
C	Benigno	Benigno
	Condiciones no-neoplásicas	Condiciones no neoplásicas (tiroiditis)
	Maligno	Carcinoma
Esquemas de cuatro categorías		
D	Benigno	
	Equivoco/indeterminado/no diagnóstico	
	Sospechoso	
	Maligno	

E	Benigno	No neoplásico
	Indeterminado	Posiblemente maligno, sospechoso
	Maligno	Cáncer
	Adenoma folicular	Neoplasia folicular, con células de Hürthle, no concluyente.
F	Benigno	Bocio multinodular
	Inflamatorio	Tiroiditis
	Neoplasia folicular	Indeterminado/ sospechoso
	Maligno	Carcinoma
G	Benigno	Bocio, nódulo adenomatoso
	Tiroiditis	
	Indeterminado	
	Maligno	Carcinoma
H	Benigno	
	Neoplasia con células de Hürthle	
	Lesiones foliculares	
	Maligno	
Esquemas de cinco categorías		
I	Benigno	
	Indeterminado	
	Atipia celular	
	Sospechoso de malignidad	
	Maligno	
J	Benigno	Normal
	Neoplasia folicular	
	Atípico	Indeterminado
	Sospechoso	
	Maligno	
K	Benigno	Bocio
	Adenoma folicular	Posible adenoma, probablemente benigno
	Atípico	Adenoma, posible carcinoma
	Sospechoso	
	Maligno	Carcinoma
L	Nódulo adenomatoso	
	Tiroiditis de Hashimoto	
	Neoplasia folicular	
	Indeterminado	
	Carcinoma	
M	Benigno	
	Tiroiditis	
	Células de Hürthle	
	Sospecha de maligno	
	Maligno	

ANEXO C

Diagnóstico por PAAD y gabinete: uso de USG, gammagrafía y PET

Con la PAAD no se pueden distinguir claramente los nódulos de carcinoma papilar con degeneración quística en donde el diagnóstico puede ser compatible con bocio y depender

del área de muestreo^{16,15}. De la misma forma, el bocio con cambios atípicos puede ser diagnosticado como cáncer papilar¹⁶. Tampoco se puede distinguir citológicamente un adenoma de un carcinoma folicular. Por último, puede ser imposible diagnosticar casos de bocio con focos de microcarcinomas, los cuales se han demostrado hasta en 36% de tiroides tomadas de autopsias¹⁷. Estos espacios en el diagnóstico ocasionan cirugías innecesarias¹⁸, por lo que la complementación del diagnóstico por PAAD para incrementar su sensibilidad y especificidad ha sido de especial interés para los grupos de cirugía tiroidea y endocrinólogos. Los casos sospechosos e indeterminados requieren estudios complementarios que permitan una mejor aproximación al diagnóstico, ya que el 50% de estos casos resultan en una patología maligna¹⁹.

El uso de inmunohistoquímica en el material de PAAD ha sido propuesto como de relativa utilidad en algunos casos para el diagnóstico, utilizando marcadores como galectina 3, ciclina D1 y ciclina E1, p21, p53, p27, β catenina, citokeratina 19 y tiroglobulina²⁰. Sin embargo ninguno de estos marcadores ha sido validado apropiadamente y no han mostrado aumentar el porcentaje de diagnóstico.

El uso de estudios morfológicos (como USG y gammagrafía con I/Tc) y funcionales (gammagrafía I123, I131, Tc99, MIBI) puede ayudar a complementar el diagnóstico por PAAD. Para aumentar la proporción de verdaderos positivos de CPT obtenidos por PAAD se ha utilizado el USG, que resulta útil pues guía la PAAD, confirma la presencia de un

¹⁵ Kini SR, Guides to clinical aspiration biopsy: Thyroid. 1987, 1ª ed, Ed. Igaku-Shoin, NY-Tokyo. Capítulos: Adequacy, Reporting System and Cytopreparatory Technique p.13-28; Cysts of thyroid p. 307-314

¹⁶ Castro-Gomez L, Cordova-Ramirez S, Duarte-Torres R, Alonso de Ruiz P, Hurtado-Lopez LM. Cytologic criteria of cystic papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytologica* 2003;47(4):590-4

¹⁷ Fink, A., Tomlinson, G., Freeman, J. L., et al, Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms. *Mod. Pathol.* 1996, 9, 816-820

¹⁸ Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid.* 2001;11:1147-1151

¹⁹ Hurtado-Lopez LM, Arellano-Montaña S, Torres-Acosta EM, et al. Combined use of fine-needle aspiration biopsy, MIBI scans and frozen section biopsy offers the best diagnostic accuracy in the assessment of the hypofunctioning solitary nodule. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2004) 31: 1273-79

²⁰ Nakamura N, Erickson LA, Jin L, et al, immunohistochemical separation of follicular variant of papillary thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Endocr Pathol.* 2006;17(3):213-23

nódulo y determina su relación con respecto a la tiroides, pero no distingue en la mayoría de los casos entre patología benigna y maligna. En EUA principalmente se ha propuesto que ciertos criterios ultrasonográficos pueden ayudar a diferenciar un caso de nódulo tiroideo benigno de maligno, basándose en la suma de los criterios que se muestran en la tabla B. Estos criterios no han demostrado aumentar la especificidad de la PAAD, por lo que en muchos grupos no se considera de utilidad el USG para complementar el diagnóstico sino como una guía para realización de una punción adecuada.

Tabla B Criterios diagnósticos por USG

Criterio	Sensibilidad	Especificidad
<i>Ausencia de halo</i>	69 %	86.4%
<i>Hipoecogénico</i>	40%	61%
<i>Microcalcificaciones</i>	30%	50%
<i>Vascularidad</i>	69.9%	87.9%

* *Lyshchik AJ. Radiology 2005;235:604*

La gammagrafía es el otro estudio que se ha validado como complementación diagnóstica de la PAAD, ya que evalúa la morfología (localización y tamaño del nódulo) y la función, dependiendo de la cantidad de radiofármaco captado. Usualmente las células foliculares más activas y con mayor producción de T4 tienen un mayor índice de organificación y por tanto de transporte de iones a través de las células. Se considera un estudio funcional pues se determina la captación del radiofármaco en los folículos tiroideos en el caso del I y Tc. Los radiofármacos ocupan el lugar del Na⁺ y del I y son transportados a la célula folicular sin participar en la organificación, pero indicando la funcionalidad de la lesión. El grupo de Hurtado-López y Martínez-Duncker observó que la realización de una gammagrafía dual

metabólica con Tc-MIBI tiene un valor predictivo negativo del 100%, característica que no se ha explotado clínicamente ni se ha explorado por otros grupos.

Otro estudio propuesto recientemente es la tomografía por emisión de positrones (^{18}F -FDG PET), con un VPN de 100%²¹. Los resultados tanto de gammagrafía con Tc-MIBI y de ^{18}F -FDG PET aun están en discusión en la literatura y no se ha realizado comparación entre estos dos. Sin embargo el alto costo del PET y la imposibilidad de realización en ciertos medios limita su utilidad²². Por otro lado, en el análisis realizado de los estudios en la literatura de nódulo tiroideo y diagnóstico por MIBI/histopatológico, se repite el VPN del 100%, aunque es una característica estadística que ha sido pasada por alto. (ver tabla C).

ANEXO D

Gammagrafía dual metabólica con Tc-MIBI

Se denomina gammagrafía dual metabólica con Tc-MIBI ya que se requiere de la comparación de ambos estudios para dar una interpretación adecuada. Aunque algunos grupos reportan la diferencia de captación o el índice de eliminación, nuestro grupo ha propuesto el reporte de negativo (no hay captación, captación similar a la del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pernectato) o positivo (captación mayor que la del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pernectato)²³.

²¹ de Geus-Oei L-F, Pieters GFFM, Bonenkamp JJ, et al. ^{18}F -FDG PET reduces unnecessary hemithyroidectomies for thyroid nodules with inconclusive cytologic results. J Nucl Med. 2006;47:770–775.

²² Martínez-Duncker C, Hurtado-López M, Letter to the Editor: ^{18}F -FDG PET of Thyroid Nodules with Inconclusive Cytologic Results. J Nucl Med. 2006;48.

²³ Hurtado-López M, Martínez-Duncker C, Negative MIBI thyroid scans exclude differentiated and medullary thyroid cancer in 100% of patients with hypofunctioning thyroid nodules. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2007, Letter to the Editor.

Tabla C Resultados reportados en 9 estudios que investigaron el uso de MIBI para evaluación de pacientes con nódulo tiroideo hipofuncional y que incluyeron diagnóstico histopatológico.

Autor	Año	N	Cancer	CDT		Cancer medular		benigno		VPN (%)
				MIBI +	MIBI -	MIBI+	MIBI-	MIBI +	MIBI-	
<i>Kresnik et al</i>	1997	62	12	11	0	0	0	43	7	100
<i>Erdil et al</i>	2000	40	21	12	0	0	0	14	5	100
<i>Sarikaya et al</i>	2001	25	6	6	0	0	0	13	6	100
<i>Mezosi et al</i>	1999	59	15	12	0	2	0	39	5	100
<i>Demirel et al</i>	2003	43	9	8	0	1	0	31	3	100
<i>Alonso et al</i>	1998	30	4	4	0	0	0	12	14	100
<i>Foldes et al</i>	1993	34	4	3	0	0	0	20	10	100
<i>Nakahara et al</i>	1996	25	13	13	0	0	0	8	4	100
<i>Hurtado-López et al</i>	2004	130	50	49	0	1	0	32	48	100
Total		448	134	127	0	4	0	212	102	

* CDT: cáncer diferenciado de tiroides

Tomado de: *Hurtado-Lopez LM, Martinez-Duncker C, Negative MIBI thyroid scans exclude differentiated and medullary thyroid cancer in 100% of patients with hypofunctioning thyroid nodules. Eur J Nucl MedMol Imaging. Letters to the Editor, 2007.*

El estudio con la molécula de MIBI habla de la función metabólica, pues su captación es a nivel mitocondrial y no depende del transporte iónico a nivel de las células foliculares en si. Como se mencionó previamente en el trabajo, dentro de la medicina nuclear se han desarrollado hormonas peptídicas, anticuerpos y oligonucleótidos radiactivos para uso diagnóstico y terapéutico. Se descubrió accidentalmente que el talio-201 y el tecnecio-99m marcado con 2-metoxiisobutilisonitrilo desarrollados para imagenología cardiaca, se acumulaban en tumores. Se realizaron múltiples estudios para determinar la causa de esta acumulación, encontrando que sus propiedades lipofílicas facilitan la difusión a través de membranas, mientras que sus cargas positivas llevan a la concentración con potenciales de

membrana negativos, como ocurre en la matriz mitocondrial^{24,25}. Los otros radiofármacos funcionan de manera similar, actuando como iones, mientras que el MIBI interactúa con sitios específicos en las proteínas transportadoras. El Tc-pernectato actúa como el yodo, sin embargo no es organificado y no se retiene en la tiroides.

Mecanismo de acción a nivel celular de MIBI

La acumulación de los radiofármacos como el Tc-MIBI es debido al flujo pasivo dependiente del potencial de membranas celulares y de la extracción controlada por la P-glicoproteína. Se mencionó previamente que el Tc-MIBI se une a la P-glicoproteína (PGP), producto del gen MDR₁ (human multidrug resistance gene). La PGP es una proteína de membrana que actúa como un transportador responsable de la extracción de agentes antineoplásicos de la célula, así como de la unión de estos radiofármacos. Estas proteínas pertenecen a un grupo de proteínas de transporte conocidas como familia ABC (siglas que corresponden al inglés ATP-Binding Cassette, Fig. D) unidas generalmente a la membrana mitocondrial y que funcionan como transportadores activos dependientes de ATP. Además de esta función, se unen al ATP y lo hidrolizan, por lo que participan activamente en la respiración celular.

²⁴ Schomacker K, Schicha H, Use of myocardial imaging agents for tumour diagnosis- a success story? Eur Jour Nucl Med. 2000,27(2): 1845-63.

²⁵ McDougal IR, Cavalieri RR, In Vivo radionuclide tests and imaging

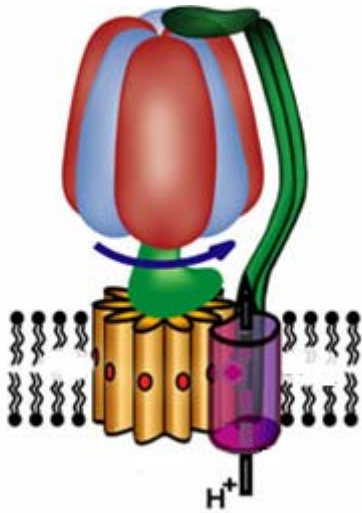


Fig. D. Esquema representativo de las proteínas ABC, mostrando el sitio de unión a hidrogeniones y en rojo y azul las subunidades ABC que se encargan de unir e hidrolizar al ATP. La porción transmembranal se representa en amarillo y en morado y verde los dominios variables en cada una de los grupos de la familia ABC.

* tomado de

<http://vcell.ndsu.nodak.edu/animations/etc/atpsynthase.htm>

El Tc-MIBI se comporta como el ion Na^+ , por lo que su captación depende de la bomba antiportadora Na^+/H^+ (Fig. E) localizada en membrana y posiblemente también de los canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Es así como entra a la célula folicular y atraviesa también la membrana mitocondrial (cosa que no ocurre con otros radiofármacos), gracias al potencial de membrana. La matriz mitocondrial puede incrementar su potencial de cargas negativas como resultado del transporte de protones desde la matriz hacia la membrana mitocondrial interna durante los procesos metabólicos relacionados con la respiración celular que se comentará más adelante (anexo E). Estas cargas negativas aumentan el potencial de membrana y aumenta el transporte de los radiofármacos. Sin embargo la extracción de MIBI de la mitocondria depende como se dijo en el párrafo anterior de proteínas del grupo ABC, hasta ahora identificándose a PGP y MRP como responsables de esta función.

La relación de MIBI y las ATPasas

La sobre-expresión de PGP y de la proteína asociada a MDR (MRP) en las células tumorales es una causa importante de resistencia farmacológica y falla terapéutica en algunos cánceres. Los radio-fármacos catiónicos (Tc-MIBI y Tc-Tfos) resultan útiles para detectar varios tumores; ambos se unen a PGP mientras que MIBI también se une a MRP,

por lo que se ha propuesto que pueden ser útiles para valorar el estado funcional de estas proteínas (ATPasas de la familia ABC).

ANEXO E

Mitocondrias y cadena respiratoria: presencia de ATPasas

Las mitocondrias son organelos esenciales que llevan a cabo varias funciones fundamentales que incluyen la síntesis de ATP y regulación metabólica celular. Se componen de al menos seis compartimentos complejos y dinámicos: membrana externa, membrana interna, espacio intermembranal, membranas cristalinas (forma las crestas), espacio intracristalino y matriz mitocondrial (fig F). Este dinamismo interno se refleja en el pleomorfismo y la motilidad de las mitocondrias en el medio celular. La cadena respiratoria remueve electrones de un donador de electrones (NADH o FADH₂) y los pasa a un aceptor de electrones final (O₂) a través de varias reacciones redox. Estas reacciones se acoplan a la creación de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

Existen tres bombas de protones: I, III y IV. El gradiente transmembranal resultante se utiliza para generar ATP via una ATPasa. El complejo I (NADH coenzima Q reductasa) toma electrones del NADH derivado del ciclo de Krebs y los pasa a la coenzima Q (ubiquinona), que a su vez recibe electrones del complejo II (succinato deshidrogenasa). La UQ pasa electrones al complejo III (complejo citocromo bc₁) que los pasa al citocromo c. El citocromo c pasa los electrones al complejo IV (citocromo c oxidasa), que utiliza los electrones e hidrogeniones para reducir el oxígeno molecular a H₂O (fig G).

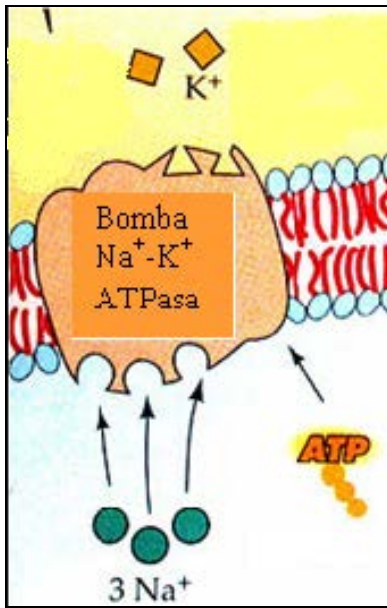


Fig. E Esquema del transportador sodio-potasio. El Tc y el MIBI se comportan como el Na⁺ por su tamaño y su carga, por lo tanto se transportan de esta forma a la matriz mitocondrial y a otros espacios celulares.

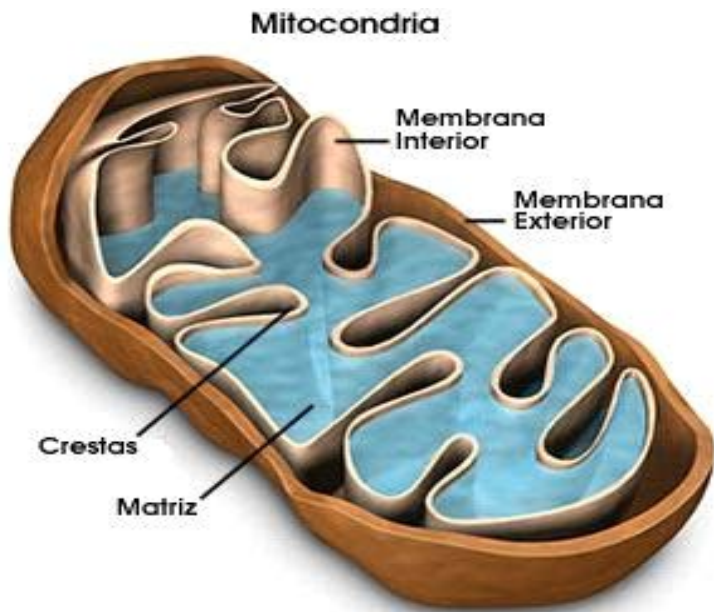


Fig F. Esquema de la estructura mitocondrial

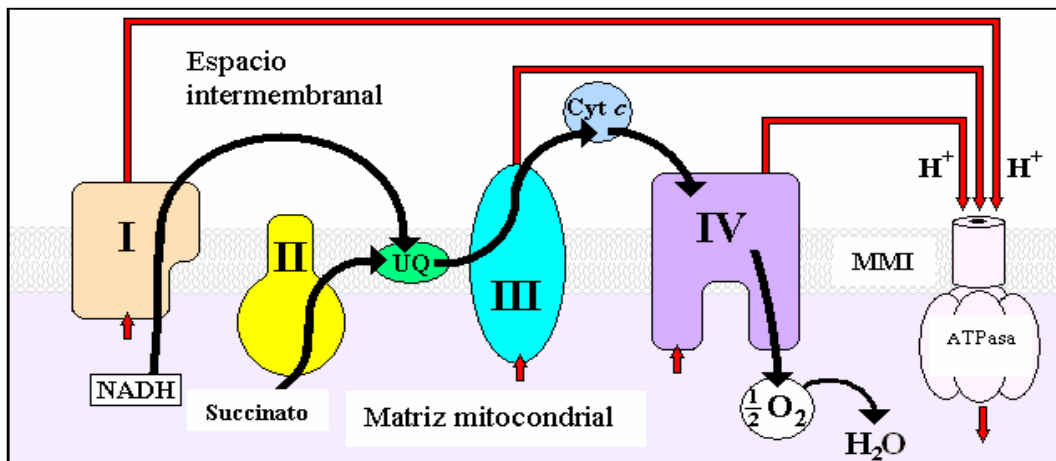


Fig G. Esquema de la cadena respiratoria, o cadena de transporte de electrones, en la que se representa cada uno de los transportadores y el papel final de la ATPasa. Es mediante este mecanismo que se genera el potencial de membrana con un aumento en las cargas negativas dentro de la matriz mitocondrial, lo que favorece el transporte de cationes y moléculas con cargas positivas como es el caso de Tc-MIBI

** tomado de www.progressivegardens.com/knowledge_tree/bio101.html*

Metabolismo respiratorio y cáncer

En los primeros estudios de metabolismo energético en células tumorales, se propuso que el aumento de la glucólisis se induce por una disminución de la fosforilación oxidativa. En 1930, Warburg propuso que en el cáncer existe un fenotipo metabólico característico que es la glucólisis aerobia resultado de una disfunción mitocondrial. La tomografía con emisión de positrones (PET) confirma el hecho de que la mayoría de los tumores malignos tienen una mayor captación de glucosa y aumento del metabolismo. Esta faceta bioenergética es un marcador adecuado de la presencia de cáncer o de alta proliferación celular, sin embargo no se ha explorado clínicamente al identificarse como un resultado y no una causa del cáncer. Se propuso inicialmente que las células se basan en la glucólisis para la producción de energía debido al daño mitocondrial constante que impide la

fosforilación oxidativa. Sin embargo aun no se sabe si las mitocondrias en el cáncer se encuentran en realidad dañadas o si este daño es reversible.

Gatenby y Gillies propusieron que dado que la carcinogénesis temprana ocurre en un microambiente hipóxico, las células transformadas en un inicio deben de utilizar la glucólisis para la producción de energía. Además, los productos de la glucólisis (lactato y acidosis) contribuyen al rompimiento de la matriz extracelular, facilitando la movilidad celular y aumentando el potencial metastático. Aun cuando el tumor eventualmente se vuelva vascularizado y los niveles de oxígeno aumenten, el fenotipo glucolítico persiste y ocurre el “efecto Warburg”, un efecto paradójico de glucólisis en condiciones aerobicas. A partir de esta tesis, se afirma que toda célula tumoral obtiene el ATP por glucólisis sin existir evaluación experimental apropiada que lo confirme.

Las alteraciones del metabolismo energético en las células neoplásicas ocasionan diferencias como es el aumento en la glucólisis²⁶ y cambios en los patrones de isozimas DHL. El alto nivel glucolítico puede deberse a alteración en la expresión de estas enzimas²⁷. La glucólisis puede estar estimulada por la disponibilidad de ADP (paso limitante), ocasionada por una actividad subóptima de las ATPasas con subsecuente aumento en la hidrólisis de ATP o una función incrementada que contribuya mayores niveles de ADP²⁸.

Las teorías de carcinogénesis por mutaciones ha hecho que las hipótesis de Warburg sobre el metabolismo energético se pongan en duda. Se han hecho análisis del metabolismo anaerobio identificando tipos celulares que llevan a cabo glucólisis y fosforilación oxidativa independientemente del medio hipóxico²⁹. Algunos proponen que los defectos en

²⁶ Warburg, O., On the origin of cancer cells. Science, 1956. 123: 309-314.

²⁷ Subhash, M.N., B.S.S. Rao, and S.K. Shankar, Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in patients with tumors of the central nervous system. Neurochem. Int. 1993. 22(2): 121-124.

²⁸ Racker, E. and M. Spector, Warburg effect revisited: merger of biochemistry and molecular biology. Science, 1981. 213: p. 303-307

²⁹ Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez, S, Marin-Hernandez A, et al. Energy metabolism in tumor cells. FEBS Journal. 2007;274(6):1393-1418

ATPasas promueven la presencia de glucólisis en medio anaerobio. Existen documentación clínica de niveles reducidos de la subunidad catalítica de la H⁺ATPasa mitocondrial en los carcinomas, como en el cáncer colónico y pulmonar,³⁰ donde esta alteración se correlaciona con un mal pronóstico. En el cáncer de colon se ha visto que la disminución en la expresión de la H⁺ATPasa se relaciona a resistencia a fármacos en las células que se basan en glucólisis para obtención de energía y no en la fosforilación oxidativa. Otra de las alteraciones observadas en células neoplásicas, es la transcripción aumentada de ANT2 o proteína transportadora de nucleótidos de adenina (otra proteína de la familia ABC), que correlaciona la unión de ATP con el desarrollo de un fenotipo neoplásico³¹. En algunos estudios se han comparado líneas celulares normales y con cáncer, encontrando que las segundas tienen mitocondrias hiperpolarizadas, lo que da por resultado un metabolismo oxidativo menor. Las vías metabólicas que convergen en las mitocondrias no son independientes y es posible que el fenotipo metabólico se deba a una potencial remodelación mitocondrial, que resulta en disminución de la fosforilación oxidativa, aumento de la glucólisis y supresión de la apoptosis.³²

ANEXO F

Familia de proteínas ABC

Las proteínas transportadoras constituyen un 2% del total de genes en el genoma humano. Ya que existen 23,857 genes reconocidos³³ en el genoma humano, se estima que existen aproximadamente 477 genes de proteínas transportadoras. Los transportadores membranales se han clasificado en 2 familias principalmente: la

³⁰ Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, et al. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis*, 2006, 27(5):925-935

³¹ Cuezva, J.M., et al., Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J of Bioenergetics and Biomembranes*, 1997. 29(4): p. 365-377.

³² Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007, 11:37-51.

³³ www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature.genefamily.abc

superfamilia ABC (ATP Binding Cassette) y la superfamilia de acarreadores de solutos³⁴. En el genoma humano se han identificado 49 genes de transportadores ABC,³⁵ los cuales se han subdividido en 7 subfamilias (fig H) v.g., ABCA (12 proteínas), ABCB (11), ABCC (13), ABCD (4), ABCE (1), ABCF (3) y ABCG (5).

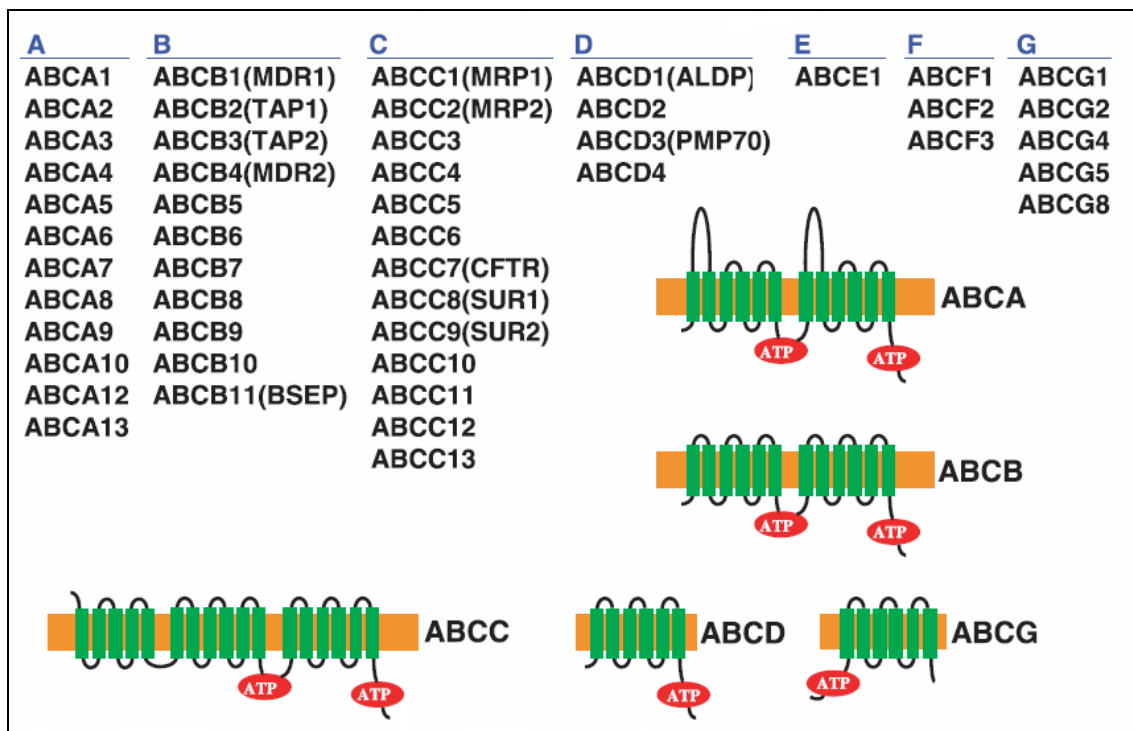


Fig H. Miembros de la familia ABC en humanos, mostrando las subfamilias (A a G) y sus estructuras secundarias típicas.

* Kimura Y, Morita S, Matsuo M, et al. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci* 2007

Aunque todas estas proteínas ABC comparten estructuras comunes que son el dominio de unión a nucleótidos (NBD) y el dominio transmembranal (TMD), la diferencia de sus secuencias primarias determina su función específica. Las proteínas ABC forman una de las familias más extensas de proteínas. La mayoría de estas proteínas transportadoras de

³⁴ Kimura Y, Morita S, Matsuo M, et al. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci* 2007

³⁵ <http://www.nutrigenet.com/humanabc.htm>

membrana traslocan distintas moléculas entre los compartimentos intracelulares. Los TMD están usualmente compuestos de 6 hélices alfa cada uno³⁶.

Tabla D Inventario de las proteínas ABC hasta 1999, con su localización genética, divididas en subfamilias.*

nombre	nomenclatura	locus	proteína (aa)	dominios	fenotipo	no. OMIM
MDR/TAP						
Pgp1, MDR1	ABCB1	7q21	1280	(TMD-ABC)2		171050
TAP1	ABCB2	6p21.3	686	TMD-ABC		170260
TAP2	ABCB3	6p21.3	748	TMD-ABC		170261
Pgp3, MDR3	ABCB4	7q21	1279	(TMD-ABC)2	PFIC3	171060, 602347
ABC7	ABCB7	Xq13.1-13.3	752	TMD-ABC	XLSAA	300135, 301310
M-ABC1	ABCB8	7q35-36	718	TMD-ABC		
BSEP, SPGP	ABCB11	2q24	1321	(TMD-ABC)2	PFIC2	603201, 601847
ALD						
ALD, ALDP	ABCD1	Xq28	745	TMD-ABC	ALD	300100
ALDL1, ALDR	ABCD2	12q11	740	TMD-ABC		601081
PXMP1, PXMP70	ABCD3	1p21-22	659	TMD-ABC	ZWS2	170995
PXMP1L, P70R	ABCD4	14q24.3	606	TMD-ABC		603214
MRP/CFTR						
MRP1	ABCC1	16p13.12-13	1531	TMD0(TMD-ABC)2		158343
MRP2, CMOAT	ABCC2	10q23-24	1545	TMD0(TMD-ABC)2	DJS	601107, 237500
MRP3, MOAT-D	ABCC3	17q21.3	1527	TMD0(TMD-ABC)2		
MRP4, MOAT-B	ABCC4	13q31-32	1325	(TMD-ABC)2		
MRP5, MOAT-C	ABCC5	3q27	1437	(TMD-ABC)2		
MRP6	ABCC6	16p13.1	1503	TMD0(TMD-ABC)2		
CFTR	ABCC7	7q31	1480	(TMD-ABC)2	CF	
SUR1	ABCC8	11p15.1	1581	TMD0(TMD-ABC)2	PHHI	600509, 601820
SUR2	ABCC9	12p12.1	1549	TMD0(TMD-ABC)2		601439
ABC1						
ABC1	ABCA1	9q22-q31	2201	(TMD-ABC)2		600046
ABC3, ABC-C	ABCA3	16p13.3	1704	(TMD-ABC)2		601615
ABCR	ABCA4	1p22	2273	(TMD-ABC)2	STGD1/FFM, ARMD2, RP19, COD, CRD	601691, 248200, 153800, 601718
KIAA0822	ABCA7	17	1581	(TMD-ABC)2		
White						
ABC8 White	ABCG1	21q22.3	638	ABC-TMD		603076
MXR1, BRCP, ABCP	ABCG2	4q22	655	ABC-TMD		603756
OABP						
RNAseL1, OABP	ABCE1	4q31	599	(ABC)2		601213
ANSA						
ANSA1			332	ABC		
ANSA2			348	ABC		
GCN20						
ABC50	ABCF1	6p21.33	807	(ABC)2		603429

* de Klein I, Sarkadi B, Varadi A; An inventory of the human ABC proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461 (1999) 237-262

³⁶ Linton KJ, Higgins CF, Structure and function of ABC transporters : the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* (2007)453: 555-567.

Tabla D proteínas ABC caracterizadas hasta la fecha y sus funciones.*

nombre	gen	aminoácido	fenotipo/función
ABCA			
ABC1	ABCA1	2261	extracción de colesterol y fosfolípidos
ABC2	ABCA2	2436	transporte de lípidos?, formación de mielina
ABC3	ABCA3	1704	secreción de surfactante
ABCR	ABCA4	2273	transporte de ácido retinoico
ABCA7	ABCA7	2146	transporte de fosfolípidos
ABCA12	ABCA12	2595	transporte de lípidos?
ABCB			
MDR1, PGY1	ABCB1	1280	extracción de xenobióticos
TAP1	ABCB2	808	transporte de péptido antigénico a retículo endoplásmico
TAP2	ABCB3	653	transporte antigénico
MDR2/3	ABCB4	1279	secreción de fosfatidilcolina a bilis
ABCB6	ABCB6	842	transporte de porfirina en la mitocondria
ABC7	ABCB7	752	transporte de complejos hierro-sulfato en la mitocondria
SPGP, BSEP	ABCB11	1321	extracción de ácidos biliares
ABCC			
MRP1	ABCC1	1531	transporte de xenobióticos inactivos
MRP2/cMOAT	ABCC2	1545	extracción de bilirrubina
MRP3	ABCC3	1527	excreción de metabolitos de glucurónido y sulfato
MRP4	ABCC4	1325	transporte de antivirales nucleosídicos y prostaglandinas
MRP5	ABCC5	1437	transporte de nucleótidos cíclicos y analogos nucleosídicos
MRP6	ABCC6	1503	??
CFTR	ABCC7	1480	canal de cloro
SUR1	ABCC8	1581	canal de ATP sensible al potasio en células B
SUR2	ABCC9	1549	canal de ATP sensible al potasio en miocitos
ABCD			
ALDP	ABCD1	745	
ALDR	ABCD2	740	transporte en peroxisomas de ac. grasos cadena larga
PMP70	ABCD3	659	
ABCG			
ABCG1	ABCG1	678	transporte de colesterol y fosfolípidos
ABCP, BCRP	ABCG2	655	resistencia a fármacos
ABCG5	ABCG5	651	extracción de fitoesteroles
ABCG8	ABCG8	673	" "

* de Kimura Y, Morita SY, Matuo M, et al. *Mechanisms of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. Cancer Sci. 2007 (pubmed)*

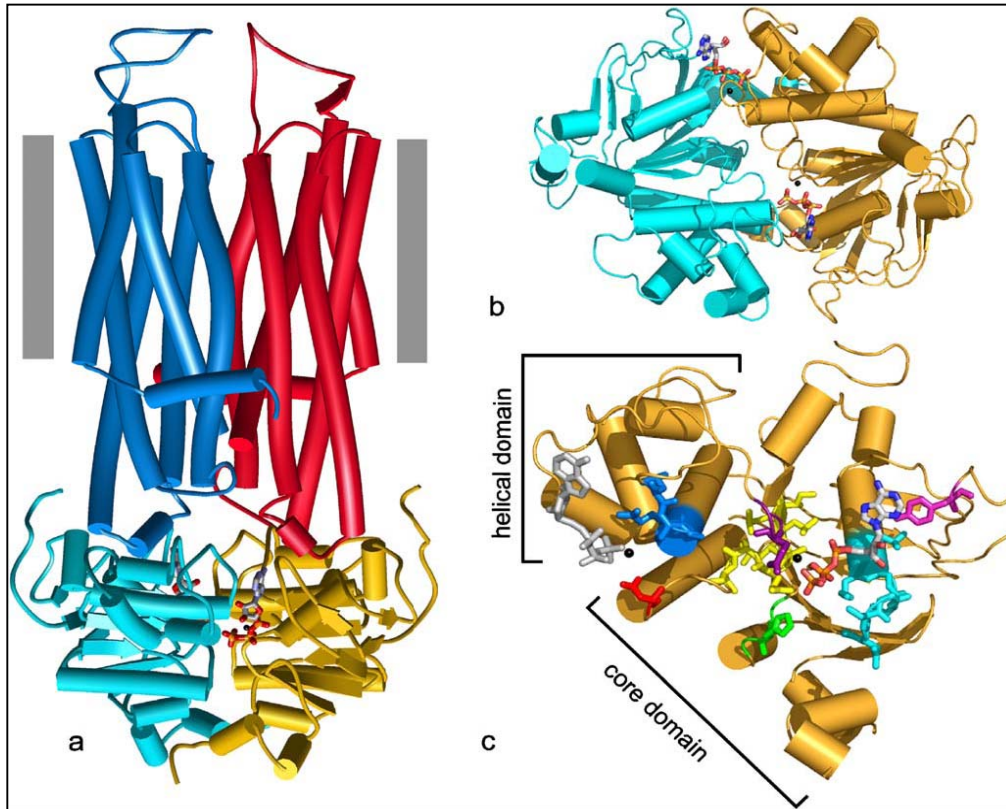


Fig 1 Estructura de las proteínas ABC. a) Representación esquemática de la PGP, donde los dominios de unión a nucleótidos (NBD) están representados en turquesa y amarillo con dos moléculas de ATP entre ellos. Los dominios transmembranales se representan en rojo y azul.

b) Proyección inferior del NBD con dos moléculas de ATP en su interior y dos iones Mg (negros). c) Representación de la cara interna de NBD1 (amarillo) desde NBD2 (turquesa) mostrando el dominio central y el helicoidal, característicos de esta familia de proteínas.

* Linton KJ, Higgins CF, *Structure and function of ABC transporters : the ATP switch provides flexible control. Pflugers Arch-Eur J Physiol* (2007)453: 555-567.

Típicamente se constituyen de cuatro dominios que forman la unidad mínima funcional.

Estos dominios forman los canales para el transporte y los sitios de unión para el reconocimiento del sustrato (fig 1) que son las dos subunidades ABC con motivos cortos encargados de la unión del ATP.

Son estas dos subunidades ABC (o subunidad NBD, llamadas también Walker A y B) las que caracterizan a la familia por su alto nivel de conservación entre especies, además de ser lo que caracteriza el mecanismo común de unión y catálisis del ATP. Estas

subunidades se acoplan a TMDs de distinta familia evolutiva, lo que explica el porque estas proteínas se unen a sustratos tan diversos que van desde un ion hasta polipéptidos. En estas proteínas, se utiliza la energía de hidrólisis de ATP para transporte, ocupando un mecanismo de cooperatividad positiva entre las subunidades ABC. Esto significa que estas proteínas actúan como bombas activas que transportan el sustrato en contra de gradiente y que los dos ATP se hidrolisan en forma no simultánea (fig J). A diferencia de las ATPasas tipo P, los transportadores ABC no forman intermedios fosforilados durante el ciclo de transporte.

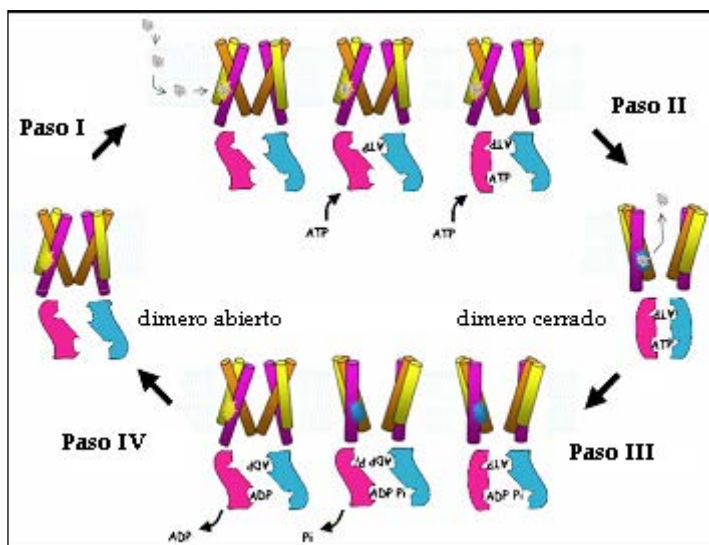


Fig J Modelo esquemático del transporte de ATP mediante cooperatividad positiva.

Las ATPasas presentes en la membrana mitocondrial interna son parte de esta familia de proteínas. Algunas de estas proteínas se asocian a resistencia farmacológica, por lo que en un inicio se les nombró como “proteínas relacionadas a resistencia fármacos” o MRP, las cuales mencionamos previamente y que se asocian con la unión de radiofármacos como el MIBI.

La sobreexpresión de los transportadores ABC como la PGP o ABCB1, la proteína de resistencia en cáncer de mama (BRCP o ABCG2) y/o MRP1 o ABCC1, confieren una resistencia a fármacos dada su capacidad para transportar un amplio rango de sustratos, entre ellos fármacos antineoplásicos. Además de su papel dentro de la resistencia a

fármacos, existe evidencia sustancial que sugiere que también participan en la defensa de tejidos³⁷ (respuestas inflamatorias mediadas por leucotrienos). Básicamente se expresan en tejidos con papeles importantes de absorción (pulmón y tracto gastrointestinal), así como en tejidos con altos niveles metabólicos y de eliminación (riñón e hígado). Juegan también un papel importante en el mantenimiento de las funciones de barrera (barrera hemato-encefálica, hemato-testicular, materno-fetal) y en la absorción, disposición y eliminación de una amplia gama de endo- y xenobióticos con estructuras diversas³⁸.

Características de la primera proteína ABC descrita: MRP (ABCC1)

Es una glicofosfoproteína integral de membrana con peso molecular de 190 kDa. A diferencia de PGP, transporta también aniones orgánicos (glutación, glucuronato, sulfato) por lo que se le ha denominado un transportador tipo MOAT (multispecific anion organic transporter) descritos antes del descubrimiento de MRP1. Esta proteína cuenta con una especificidad a sustratos inusualmente amplia, y es capaz de transportar no sólo compuestos neutros hidrofóbicos, sino que también facilita la extrusión de numerosos conjugados de glutación, glucuronato y sulfato. El mecanismo de transporte es complejo, ya que el sitio de unión (NBD) permite tanto cooperatividad como competitividad entre varios sustratos. Existen varias de las proteínas ABC que cuentan con características similares y que potencialmente pueden acarrear sustratos diversos, sin embargo aun no se han caracterizado en su totalidad. Esta capacidad las hace participes de distintas funciones fisiológicas como las mencionadas en el párrafo previo, además de la importante protección del efecto tóxico ante estrés oxidativo.

³⁷ Éva Bakos & László Homolya, Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) Pflugers Arch - Eur J Physiol (2007) 453:621–641

³⁸ Chang XB, A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. Cancer Metastasis Rev 2007(26):15–37

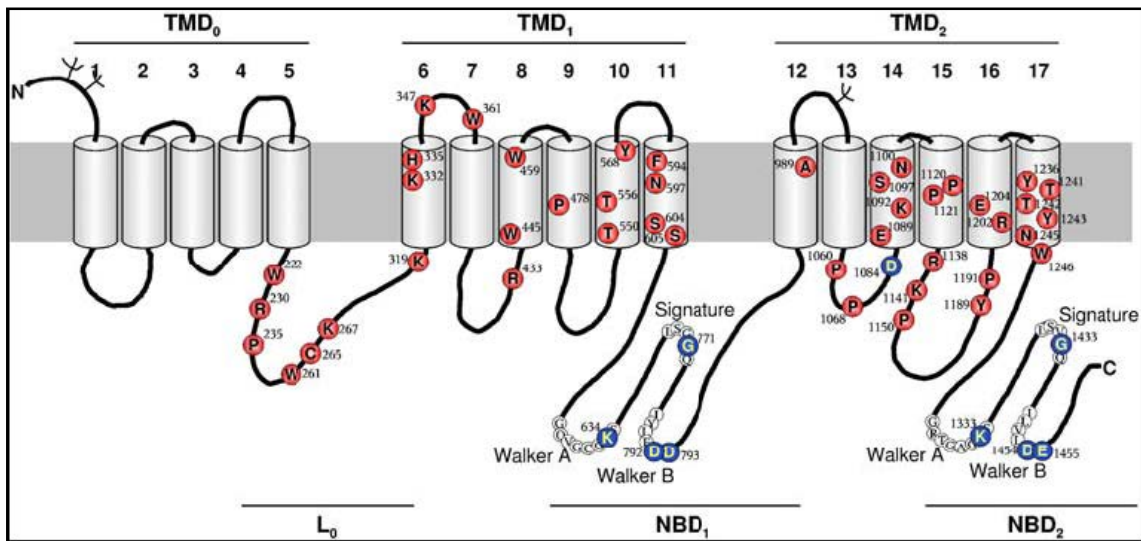


Fig. K Modelo de la topología membranaral de MRP1. TMD, dominio transmembranaral; NBD, dominio de unión a nucleótidos; L₀ región de unión entre TMD₀ y TMD₁. Las mutaciones que afectan la especificidad de sustratos y la actividad catalítica se indican en azul y rojo respectivamente.

La expresión de MRP1 depende de muchos mecanismos reguladores. En algunas líneas celulares que sobreexpresan MRP1, el gen se encuentra amplificado, mientras que en otras ocurre aumento de la transcripción sin amplificación del gen. Se ha identificado que las especies reactivas de oxígeno regulan la expresión de MRP1^{37,38}.

ANEXO G

Tecnología genómica y cáncer de tiroides: análisis mediante genoma humano y microarreglos

Durante la última década, la tecnología de microarreglos ha revolucionado la investigación de la fisiopatología del cáncer, al proporcionar una visión global de los cambios moleculares relacionados con la progresión de la enfermedad. La tecnología de Affymetrix ofrece métodos para la determinación de SNPs, número de copias cromosómicas, y análisis de expresión genética, que son las plataformas de microarreglos, en las cuales se pueden determinar hasta 8,500 genes (mientras que en los arreglos más amplios pueden determinar hasta 47,000 genes basados en los genes

caracterizados en el genoma humano)³⁹. Para entender los complejos mecanismos y redes relacionados en los procesos biológicos y la enfermedad, se ha propuesto que no resulta suficiente el enfoque hacia eventos genéticos aislados y vías únicas, sino que se requiere un abordaje integral como sistemas. Para esto se han desarrollado las tecnologías de análisis en chips para los perfiles de expresión y análisis de DNA. Este tipo de análisis permite mediciones múltiples e independientes de cada genotipo y material transcrito. El integrar la expresión genética y el análisis de DNA en una sola tecnología permite un mejor entendimiento de la fisiopatología. Este sistema es flexible y permite ver el genoma de manera global o enfocado a un set particular de genes. En tiempos recientes se ha aplicado esta tecnología particularmente a patologías neoplásicas, en este caso particular a las neoplasias tiroideas. Entre los usos de los chips de arreglos genómicos están la determinación de nuevas vías reguladoras, confirmar mecanismos de acción, validar blancos farmacológicos, clasificación de las enfermedades, análisis de respuestas toxicológicas y desarrollos diagnósticos. Esta última aplicación puede emplearse en la categorización de la patología tiroidea y en la diferenciación molecular de la tiroides normal, los nódulos por bocio, adenomas y las diferentes neoplasias malignas.

Finley et al⁴⁰ realizaron el perfil molecular de nódulos benignos y CPT en tejido realizando análisis de microarreglos en oligonucleótidos. La sensibilidad de su perfil para diagnosticar cáncer fue del 91.7% con una especificidad del 96.2%, perfil en el cual se asociaron los genes MET y galectina-3. Mazzanti et al⁴¹ desarrollaron un perfil de 6 genes en base a arreglos de expresión genética como modelo para diferenciar cáncer de tumores benignos, este modelo se verificó en un estudio subsecuente

³⁹ www.affymetrix.com/site/contact/index.affx.

⁴⁰ Finley DJ, Zhu B, Barden CB, Fahey TJ 3rd, Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg* 2004 Sep;240(3):425-36; discusión 436-7

⁴¹ Mazzanti C, Zeiger MA, Costourous N, et al, Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors, *Cancer Res*, 2004 64: 2898-903

mediante PCR⁴² en el que obtuvieron un VPP de 100% y VPN 85.7% con sensibilidad de 75% y especificidad del 100%.

En el estudio de Lubitz et al⁴³, se encontró que los adenomas foliculares se asemejan genéticamente a los carcinomas foliculares mínimamente invasivos. En el estudio de Barden et al⁴⁴ se identificó el perfil genético de carcinomas y adenomas foliculares, los cuales mostraron perfiles marcadamente distintos con diferencia de 105 genes, los cuales se utilizaron para análisis por grupos (clusters). Posteriormente se evaluaron 5 tumores en forma ciega, logrando un diagnóstico acorde al histopatológico en los 5 casos.

⁴² Rosen J, He M, Umbricht C, et al, A six-gene model for differentiating benign from malignant thyroid tumors on basis of gene expression. *Surgery* 2005;138(6): 1050-57

⁴³ Lubitz CC, Gallagher LA, Finley DJ, Zhu B, Fahey TJ 3rd. Molecular analysis of minimally invasive follicular carcinomas by gene profiling. *Surgery*. 2005;138(6):1042-8; discussion 1048-9

⁴⁴ Barden CB, Shister KW, Zhu B, et al, Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Can Res*, May 2003, (9);1792-1800

Bibliografía

1. Consenso nacional sobre nódulo tiroideo 2001 *Cir Gen* 2002;24:83
2. Braverman LE, *Diseases of the thyroid*, 2003, 2ª ed, Humana Press.
3. Kini SR, *Guides to clinical aspiration biopsy: Thyroid*. 1987, 1ª ed, Ed. Igaku-Shoin, NY-Tokyo. Capítulos: Adequacy, Reporting System and Cytopreparatory Technique p.13-28; Cysts of thyroid p. 307-314
4. Braverman LE, Utiger RD (editores) *Werner & Ingbar's: The Thyroid*, 2000, 8ª ed. Lippincot-Williams & Wilkins. Part II section A: Radioisotopes and direct test of thyroid function, p. 333-392; Part VIII Thyroid diseases: tumors, p. 875-958
5. Peter A Singer, *Evaluation and Management of the Euthyroid Nodular and Diffuse Goiter*, en *Diseases of the Thyroid*, 2nd ed, Ed. Braverman LE, Humana Press, 2003, p 217-238.
6. Rice CO, *Incidence of nodules in the thyroid: a comparative study of symptomless thyroid glands removed at autopsy and hyperfunctioning goiters operatively removed*. *Arch Surg* 1932;24:505-515
7. Bruneton JN, Balu-Maestro C, Marcy OY, et al, *Very high frequency (13MHz) ultrasonographic examination of the normal neck, detection of normal lymph nodes and thyroid nodules*. *J Ultrasound Med*, 1994;13:87-89
8. Mazafferri EL, *Management of a solitary thyroid nodule*. *N Engl J Med*, 1993;328:553-559
9. Maddox PR, Wheeler MH. *Approach to thyroid nodules*. In: Clark OH, Duh QY. *Textbook of Endocrine Surgery* W.B. Saunders Company Philadelphia. 1997:69.
10. Zaldivar-Ramírez FR, López-López JA, Hurtado-López LM. *Nódulo tiroideo: Frecuencia de malignidad*. *Cir Gen*. 2001; 23(2):92-94.
11. Kondo T, Ezzat S, Asa SL, *Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular/cell neoplasia*, *Nature*, 2006;6; 292.
12. Greenspan FS, Strewler GJ, *The thyroid gland in Basic and Clinical Endocrinology*, 6th ed, Appleton –Lange, p. 250-252.
13. López-López JA, Hurtado-López LM, Zaldivar-Ramírez FR, Soto-Abraham MV, Arellano-Montaña S. *Frecuencia de la patología quirúrgica tiroidea*. *Rev Med Hosp. Gen Méx*. 2001; 64(3):137-142.
14. GLA, Lawson VG. *Solitary Thyroid Nodule: Concepts in diagnosis and treatment*. En: Falk SA. *Thyroid Disease*. E W.B. Endocrinology, surgery, nuclear medicine and radiotherapy Segunda Edición Lippincott-Raeven publishers Philadelphia. 1997; 411
15. Van Herle A, Rich P, Ljung B-ME, et al: *The thyroid nodule*. *Ann Intern Med* 96:221, 1982.
16. Ljung BM, Drejet A, Chiampi N. *The factors important for successful fine-needle-aspiration biopsies: a comparison study of breast diagnoses at two hospitals*. *Pathology* 4, 493, 1996.
17. Zarbo R, Howanitz P, Bachner P, *Interinstitutional comparison of performance in fine-needle-aspiration cytology: a Q-probe quality indicador study*. *Arch Pathol Lab Med*, 115:743, 1991
18. Werga P, Tallin G, Skoog L, et al, *Expanding role of Fine-needle Aspiration Cytology in Thyroid Diagnosis and Management*, *Worl J Surg*. 24, 2000: 907-912
19. Greenblat DY, Woltman THarter J, et al, *Fine-needle aspiration optimizes surgical management in patients with thyroid cancer*. *Annals of Surgical Oncology*, 2006; 13: 859-863

20. American Association of Clinical Endocrinologists and the American College of Endocrinology. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of thyroid nodules. http://www.aace.com/clin/guidelines/thyroid_nodules.pdf
21. Burch HB, Burman KD, Reed HL, et al, Fine needle aspiration of thyroid nodules. Determinants of insufficiency rate and malignancy yield at thyroidectomy. *Acta Cytol* 1996, 40,1176-83
22. Lopez LH, Canto JA, Herrera MF, et al: Efficacy of fine-needle aspiration biopsy of thyroid nodules: experience of a Mexican institution. *World J Surg*, 21, 408. 1997
23. Rojeski MT, Gharib H. Nodular thyroid disease: evaluation and management. *N Engl J Med*, 1985, 313:428-436
24. Caruso D, Mazzaferri EL, Fine needle aspiration biopsy in the management of thyroid nodules. *Endocrinologist* 1991;1:194-202.
25. Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid*. 2001;11:1147-1151
26. Hurtado-Lopez LM, Arellano-Montaña S, Torres-Acosta EM, et al. Combined use of fine-needle aspiration biopsy, MIBI scans and frozen section biopsy offers the best diagnostic accuracy in the assessment of the hypofunctioning solitary nodule. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* (2004) 31: 1273-79
27. Utsonomiya K, Ballinger JR, Piquette-Miller M, et al. Comparison of the accumulation and efflux kinetics of technetium-99m sestamibi and technetium-99m tetrofosmin in an MRP-expressing tumour cell line. *Eur J Nucl Med* 27 (12), 2000. 1786-92
28. Weber F, Shen L, Aldred M, et al. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on three-gene combination. *Jour Clin Endocr & Metab*. 2005;90(5):2512-21
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/getmap>
30. Duffy BJ, Fitzgerald P, Thyroid cancer in childhood and adolescence: a report on twenty-eight cases. *Cancer*, 1950;10:1018.
31. Jaklic BR, Rushin J, Ghosh BC, estrogen and progesterone receptors in thyroid lesions. *Annals of Surgical Oncology*, 1995; 2(5): 429-434.
32. Dos Santos Silva I, Swerdlow AJ, Sex differences in the risk of hormona-dependent cancers. *Am J Epidemiol* 1993, 138.
33. Henderson BE, Ross RK, Pike MC, et al. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 1982;42:3232
34. Kondo T, Ezzat S, Asa SL, Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular/cell neoplasia, *Nature*, 2006;6; 292.
35. Harach HR, Williams GT, Williams ED. Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology* 1994;25:549
36. Takano T, Amino N, In my view...Fetal cell carcinogenesis: a new hipótesis for better understanding of thyroid carcinoma. *Thyroid* 2005;15(5):432-438
37. Higashiyama, T.; Takano, T.; Matsuzuka, F et al. Measurement of the expression of oncofetal fibronectin mRNA in thyroid carcinomas by competitive reverse transcription polymerase chain reaction, *Thyroid*, 2005; 9(3): 235-240
38. Negri E, Ron E, Franceschi S, et al. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. I. methods y IV. Benign thyroid disease. *Cancer Causes Control* 1999;10:138.
39. Fusco A, Berlingieri MT, Di Flore PP, et al. One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncoenes. *Mol Cell Biol* 1987;3365.

40. Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, et al. Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2004;10:6586-97.
41. Van Staveren WCG, Weiss Solis D, Delys L, et al. Gene Expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals supression of negative feedbacks in tumorigenesis. *PNAS*, 2006;103(2):413-418.
42. Finley DJ, Arora N, Zhu B, et al. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *Jour Clin Endocr & Metab.* 2004;89(7):3214-23
43. Wang HH, Reporting Thyroid fine-needle aspiration: literature review and proposal. *Diagnostic Cytopathology*, 2005;34(1):67-76
44. Castro-Gómez L, Cordova-Ramírez S, Duarte-Torres R, Alonso de Ruiz P, Hurtado-Lopez LM. Cytologic criteria of cystic papillary carcinoma of the thyroid. *Acta Cytologica* 2003;47(4):590-4
45. Fink, A., Tomlinson, G., Freeman, J. L., et al, Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms. *Mod. Pathol.*1996, 9, 816–820
46. Chow LS, Gharib H, Goellner JR, van Heerden JA. Nondiagnostic thyroid fine-needle aspiration cytology: management dilemmas. *Thyroid.* 2001;11:1147–1151
47. Nakamura N, Erickson LA, Jin L, et al, immunohistochemical separation of follicular variantof papillary thyroid carcinoma from follicular adenoma. *Endocr Pathol.* 2006;17(3):213-23
48. de Geus-Oei L-F, Pieters GFFM, Bonenkamp JJ, et al. 18F-FDG PET reduces unnecessary hemithyroidectomies for thyroid nodules with inconclusive cytologic results. *J Nucl Med.* 2006;47:770–775.
49. Martinez-Duncker C, Hurtado-López M, Letter to the Editor: ¹⁸F-FDG PET of Thyroid Nodules with Inconclusive Cytologic Results. *J Nucl Med.* 2006;48.
50. Hurtado-López M, Martinez-Duncker C, Negative MIBI thyroid scans exclude differentiated and medullary thyroid cancer in 100% of patients with hypofunctioning thyroid nodules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007, Letter to the Editor.
51. Schomacker K, Schicha H, Use of myocardial imaging agents for tumour diagnosis- a success story? *Eur Jour Nucl Med.* 2000,27(2): 1845-63.
52. McDougal IR, Cavalieri RR, In Vivo radionuclide tests and imaging
53. Warburg, O., On the origin of cancer cells. *Science*, 1956. 123: 309-314.
54. Subhash, M.N., B.S.S. Rao, and S.K. Shankar, Changes in lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in patients with tumors of the central nervous system. *Neurochem. Int.* 1993. 22(2): 121-124.
55. Racker, E. and M. Spector, Warburg effect revisited: merger of biochemistry and molecular biology. *Science*, 1981. 213: p. 303-307
56. Moreno-Sanchez R, Rodriguez-Enriquez, S, Marin-Hernandez A, et al. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal.* 2007;274(6):1393-1418
57. Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, et al. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis*, 2006, 27(5):925-935
58. Cuezva, J.M., et al., Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J of Bioenergetics and Biomembranes*, 1997. 29(4): p. 365-377.
59. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 2007, 11:37-51.
60. www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc
61. <http://www.nutrigene.4t.com/humanabc.htm>

62. Kimura Y, Morita S, Matsuo M, et al. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1. *Cancer Sci* 2007
63. Linton KJ, Higgins CF, Structure and function of ABC transporters : the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* (2007)453: 555-567.
64. Éva Bakos & László Homolya, Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1) *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2007) 453:621–641
65. Chang XB, A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 2007(26):15–37
66. www.affymetrix.com/site/contact/index.affx.
67. Finley DJ, Zhu B, Barden CB, Fahey TJ 3rd, Discrimination of benign and malignant thyroid nodules by molecular profiling. *Ann Surg*2004 Sep;240(3):425-36; discussion 436-7
68. Mazzanti C, Zeiger MA, Costourous N, et al, Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors, *Cancer Res*, 2004 64: 2898-903
69. Rosen J, He M, Umbricht C, et al, A six-gene model for differentiating benign from malignant thyroid tumors on basis of gene expression. *Surgery* 2005;138(6): 1050-57
70. Lubitz CC, Gallagher LA, Finley DJ, Zhu B, Fahey TJ 3rd. Molecular analysis of minimally invasive follicular carcinomas by gene profiling. *Surgery*. 2005;138(6):1042-8; discussion 1048-9
71. Barden CB, Shister KW, Zhu B, et al, Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Can Res*, May 2003, (9);1792-1800
72. Sheils O, Molecular Classification And Biomarker Discovery In Papillary Thyroid Carcinoma *Expert Rev Mol Diagn* 2005 Nov;5(6):927-46
73. van Steveren W, Weiss Solis D, Delys L et al, Gene expresión in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals supresión of negative feedbacks in tumorigenesis, *PNAS*, Jan 10 2006;103(2):413-418.
74. Baloch ZW, Zack MJ, Yu GH, et al, Fine needle aspiration of thyroid: an institutional experience *Thyroid* 1998: 8 (564-569)
75. Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, el al, Diagnosis of "follicular neoplasms" a grey zone in thyroid needle aspiration cytology, *Diagn Cytopathol*, 2002; 26:41-44
76. Winzer R, Schmoltzer C, Jakobs TC, et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis on thyrocyte-relevant genes in fine-needle aspiration biopsies of the human thyroid. *Thyroid*, 11:981-987; 1998
77. www.yahoo.com/search/images.