



00344
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

12

**ACTIVACIÓN DE LAS ONCOPROTEÍNAS RET/PTC, trk-T1,
Y EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS
ASOCIADAS A METÁSTASIS: NM23 Y CD44 EN
CARCINOMAS PAPILARES TIROIDEOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA CELULAR

P R E S E N T A :

IVÁN MARTÍNEZ MONROY

TUTOR:
DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

288468



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.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, bajo la dirección y asesoría del Dr. Mauricio Salcedo Vargas, Investigador asociado "B", del Instituto Mexicano del Seguro Social.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

Jesús y Eva, a quienes les debo la vida misma y todo lo que soy ahora. Su amor, confianza y esperanza son los pilares que me dan fuerza para seguir adelante en todas mis metas. Gracias papás.

A MIS HERMANOS:

Jesús y Alex, que aunque seamos muy diferentes, yo se que cuento con su apoyo y consejos siempre y para siempre. Gracias por aguantarme en las buenas y en las malas.

A MAURICIO:

Por guiarme durante 5 años en mi formación como futuro investigador y por la confianza y amistad que hemos tenido. Gracias Mau por ser antes que nada mi amigo.

A MIS AMIGOS DE LA CARRERA:

Que aunque hemos tenido problemas, espero que recuerden al igual que yo, solo los buenos momentos que hemos compartido. Gracias: Luisillo, Kena, Alfredo, Moni, Carlos, Isra, Ana, Angel y Laura.

A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO:

Por haberme ayudado en todo momento y por su valiosa amistad tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias: Ricardo, Guela, Paty, Monse, Raquel, Bety, Irene y Vicky.

A CANDELA:

Por haber compartido conmigo momentos inolvidables, lunas eternas y sentimientos fugaces. Gracias Pequeña.

**Toda nuestra ciencia,
comparada con la realidad,
es primitiva e infantil...
y sin embargo es lo máspreciado
que tenemos.**

**Albert Einstein
(1879-1955)**

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.

T. H. Huxley, 1887

INDICE

RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
Aspectos Generales de la Carcinogénesis.....	8
La Glándula Tiroides.....	9
ANTECEDENTES.....	11
El Cáncer de Tiroides.....	11
Carcinoma Papilar de Tiroides.....	11
Técnicas de Biología Molecular en Carcinomas de Tiroides.....	12
El Proto-oncogén ret.....	12
El proto-oncogén trk.....	14
La proteína NM23.....	16
La proteína CD44.....	18
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....	22
METODOLOGÍA.....	23
Tejidos y Muestras.....	23
Extracción y purificación de RNA.....	24
Detección de las proteínas RET, TRK, NM23 y CD44v6.....	25
Detección de los rearrreglos RET/PTC y trk-T1.....	26
El análisis estadístico.....	27
RESULTADOS.....	28
Muestras y Controles.....	28
Expresión elevada de la proteína RET y del transcrito RET/PTC3....	29
Expresión elevada de la proteína TRK y del transcrito trk-T1.....	29
Coexpresión elevada de las proteínas RET y TRK.....	30
Detección y localización de la proteína NM23.....	31
Detección elevada de la proteína CD44v6.....	31
Análisis estadístico.....	32

DISCUSIÓN..... 35

ANEXO..... 42

CONCLUSIONES..... 43

TABLA 1..... 45

TABLA 2..... 46

REFERENCIAS..... 47

RESUMEN

El carcinoma papilar de tiroides (CPT), representa el 70 % de los cánceres de tiroides. Aunque el CPT se ha considerado una lesión de baja malignidad, se ha observado que más de la mitad de los pacientes muestran invasión ganglionar y algunos subtipos morfológicos presentan un curso clínico más agresivo. Al estudiar el CPT a nivel molecular, se han visto involucrados a varios oncogenes, genes supresores de tumor y genes ligados a la progresión metastásica. Por lo anterior, el estudio de este tipo de neoplasia debe profundizarse, sobre todo en la búsqueda de marcadores pronóstico. Se estudiaron 36 muestras de CPT analizando la presencia de dos oncogenes con actividad tirosina-cinasa llamados *ret/ptc* y *trk-T1*, tanto a nivel de transcrito (RT-PCR) como protéico (Inmunohistoquímica), así como dos proteínas ligadas a metástasis: NM23 y CD44 variante 6. Estos datos se relacionaron posteriormente con el comportamiento del tumor y el subtipo histológico de CPT para poder utilizarlos como posibles indicadores genéticos de comportamiento tumoral. La proteína RET se detectó en 23 de 36 muestras (63.8%), y el transcrito RET/PTC3 fue el más común. Se relacionó su presencia con los tumores de subtipo de mal pronóstico y con las muestras que presentaron invasión y/o metástasis. La proteína TRK se detectó en 25 de 36 muestras (69.4%), y se relacionó su presencia con los tumores que presentaron invasión y/o metástasis. NM23 se detectó en 15 muestras (55.5%) a nivel nuclear o citoplásmico, 12 muestras (44.5%) la presentaron en membrana o fueron negativas. Finalmente, CD44v6 se detectó en 19 de 26 muestras (73%) y se relacionó con los tumores que presentaron invasión y/o metástasis. Los resultados nos mostraron una alta expresión de los oncogenes *ret/ptc* y *trk-T1* en los CPT de pacientes mexicanos, y al rearreglo más oncogénico, RET/PTC3, en la mayoría de los tumores analizados. Debido a estos resultados, los oncogenes *ret/ptc* y *trk-T1* podrían ser utilizados como marcadores pronóstico en los CPT y de esta forma ayudar al médico clínico en un mejor tratamiento y seguimiento del paciente afectado por este tipo de neoplasia.

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas dos décadas del siglo XX, la investigación tanto básica como aplicada en el campo de las enfermedades humanas y en particular en el cáncer han progresado asombrosamente. El esfuerzo por conocer y entender esta compleja enfermedad ha traído como consecuencia la identificación de las bases más profundas en este proceso, llegando incluso hasta el nivel molecular [1].

Debido a los descubrimientos realizados en el campo de la biología y la genética molecular, se dice que el cáncer es una enfermedad genética la cual es provocada por los daños en el material genético (mutaciones) y específicamente en los genes involucrados en la regulación de los procesos normales de replicación y reparación del ácido desoxirribonucleico (DNA), junto con los genes de proliferación y diferenciación celular. Estos cambios pueden ser provocados por agentes ambientales (radiación), exposición a agentes químicos (asbestos), agentes biológicos (virus), y algunas veces por la herencia de algún gen alterado, al que se le llama cáncer familiar [2]. Los genes que controlan estos procesos y que tienen el potencial de provocar una neoplasia maligna se les conoce como proto-oncogenes, mientras que los genes con el potencial de bloquearlo se les llama genes supresores de tumor ó anti-oncogenes (Figura 1). Los proto-oncogenes al sufrir cambios en el control de su expresión debido a diversas mutaciones (puntuales, translocaciones, amplificaciones, inserciones, etc.), se comportan de forma anormal y es cuando se les nombra oncogenes, los cuales ya

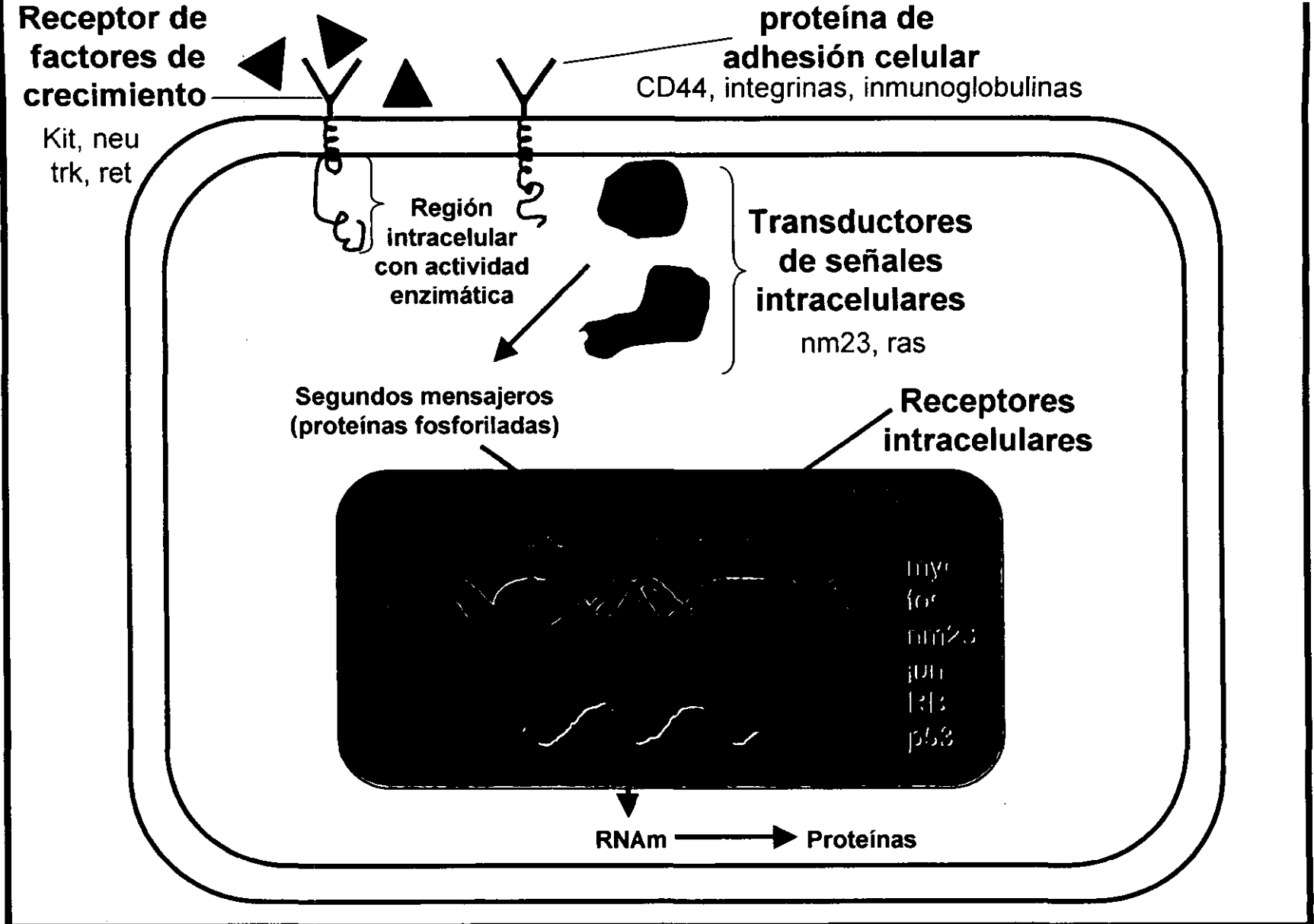


FIGURA 1.- Esquema de diferentes proteínas involucradas en la proliferación y diferenciación celular. Muchas de estas proteínas son codificadas por proto-oncogenes y genes supresores de tumor.

pueden cooperar para la formación de un tumor. Al mismo tiempo, los genes supresores de tumor, cuya función normalmente es la de gobernar la proliferación celular, al sufrir mutaciones (puntuales, deleciones, inserciones, etc.) que les provoquen la pérdida de su funcionamiento, hace que se pierda el control de freno de esta proliferación lo que también induce la transformación tumoral [3]. Finalmente, existe otro tipo de genes que participan en varios procesos de señalización, identificación, y degradación al exterior de la célula, que al sufrir mutaciones y desregulaciones se les ha relacionado con otorgar la capacidad a ciertas células tumorales de invadir tejido normal, pudiéndose mover de su tejido de origen y establecer una nueva colonia en cualquier otra parte del cuerpo. A este fenómeno se le conoce como metástasis o proceso metastásico (Figura 2). Este evento se inicia cuando varias células cancerosas se desprenden del tumor original, llamado tumor primario y comienza el proceso denominado invasión, en el cual la célula cancerosa atraviesa la matriz extracelular con objeto de llegar a vasos sanguíneos o linfáticos, y es ahí donde se lleva a cabo la fase de penetración o ingreso al vaso a través de su pared. Una vez dentro del torrente circulatorio, ya sea como resultado de procesos mitóticos o por asociación con otras células metastásicas presentes en el torrente sanguíneo se produce el fenómeno de agregación. Por último, las células salen del torrente circulatorio (evasión), atravesando nuevamente la matriz celular y originando la formación del tumor secundario [4].

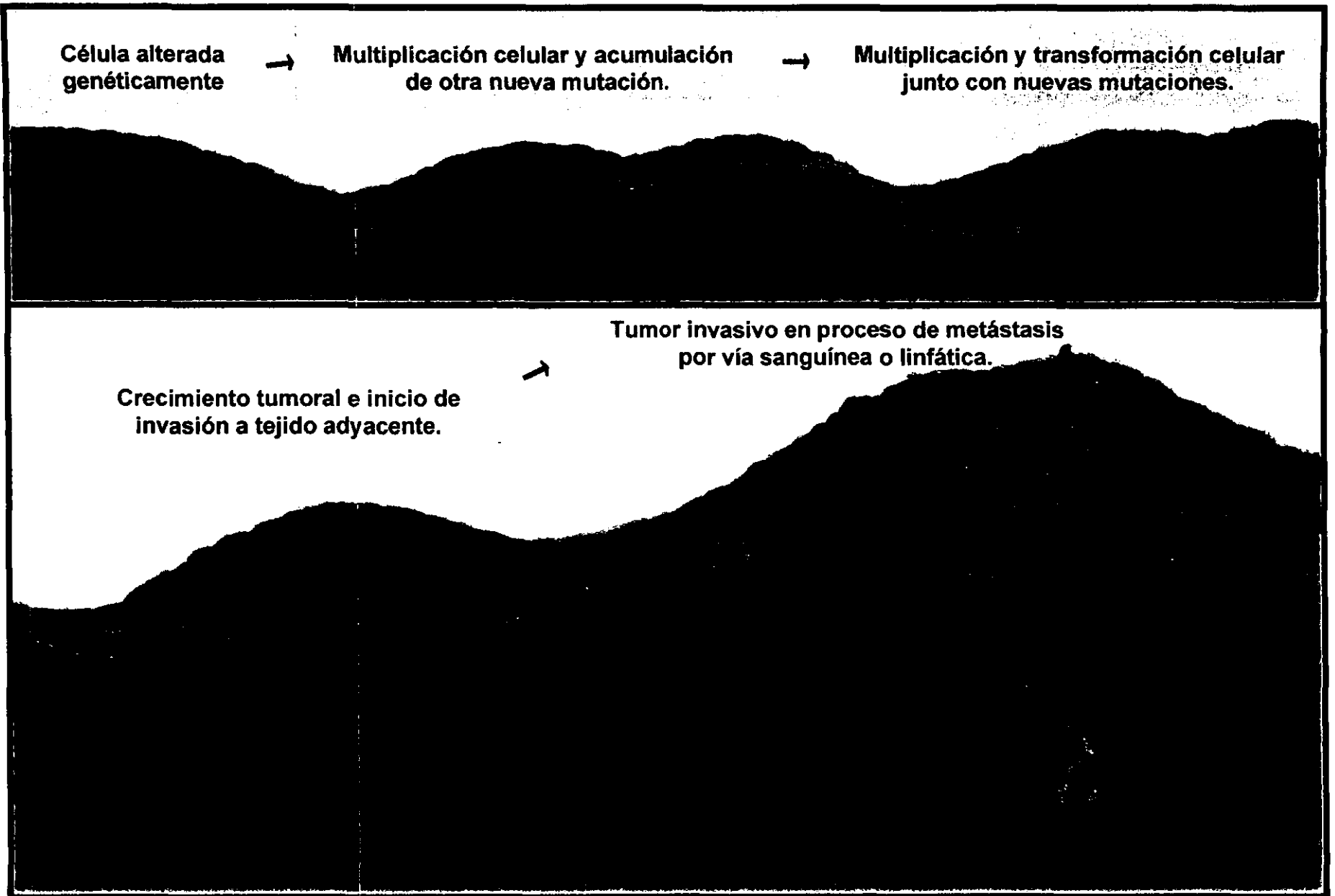


Figura 2.- Desarrollo en varias etapas de un tumor maligno a nivel epitelial, invasión y su migración metastásica.

Este tipo de cooperación entre oncogenes, ausencia de los genes supresores y genes relacionados a metástasis, sugiere que para que se de el proceso de malignización es necesario que sucedan fenómenos que ocurren a nivel de membrana, de citoplasma y dentro del núcleo celular [4].

LA GLÁNDULA TIROIDES

La tiroides es una glándula endocrina de origen endodérmico desarrollada a partir de una evaginación de la base de la lengua (*Foramen cecum*), y se encuentra localizada por delante de la tráquea y del esófago, y en íntima relación con los cartílagos de la laringe [5]. El folículo tiroideo es la unidad anatómica y funcional de la tiroides (Figura 3); tiene forma esférica y esta compuesta por una capa de células epiteliales cuboides, conocidas como células foliculares, estas células rodean el lumen folicular, que contiene un material llamado coloide, constituido en un 75 a 90% por tiroglobulina, proteína secretada por las células foliculares, y el 10 a 25% restante corresponde a otras proteínas. Los folículos se encuentran separados entre sí por pequeñas cantidades de tejido conectivo y por células "C" ó parafoliculares, productoras de tirocalcitonina y prostaglandinas, las cuales tienen un origen diferente al de las células foliculares ya que son de origen neuroendócrino [6]. Las células foliculares tienen las siguientes funciones primordiales: captar y transportar iodo, sintetizar tiroglobulina (TG) y secretarla hacia el coloide, separar las hormonas tiroideas de la molécula de TG y secretar las hormonas tiroideas a la circulación.

La tiroides tiene un importante papel en la regulación del metabolismo celular a través de la síntesis y secreción de 2 hormonas: la tetraiodotironina (T4) y la triiodotironina (T3); ambas hormonas se sintetizan en el coloide por iodización y condensación de moléculas de tirosina, difiriendo entre sí por un átomo de iodo. La T3 y T4 son enviadas a la circulación por exocitosis a través de microtúbulos y microfilamentos de la célula, éstas penetran en el citoplasma celular de sus tejidos blanco, y se unen a varios sitios específicos intracelulares. En el núcleo se unen a una proteína ácida no histona, que actúa sobre el DNA aumentando la síntesis de ácido ribonucleico (RNA) mensajero y ribosomal, esto induce la codificación de un gran número de proteínas como la hormona del crecimiento y la alfa-2-globulina. Las acciones de las hormonas tiroideas son varias ya que participan en la calorificación, el metabolismo, y el crecimiento, entre otras. Los aparatos y sistemas en donde influyen son diversos, como en la secreción gástrica, movilidad intestinal, reactividad muscular, maduración neuronal, síntesis de vitaminas y hemoglobina, etc. [7].

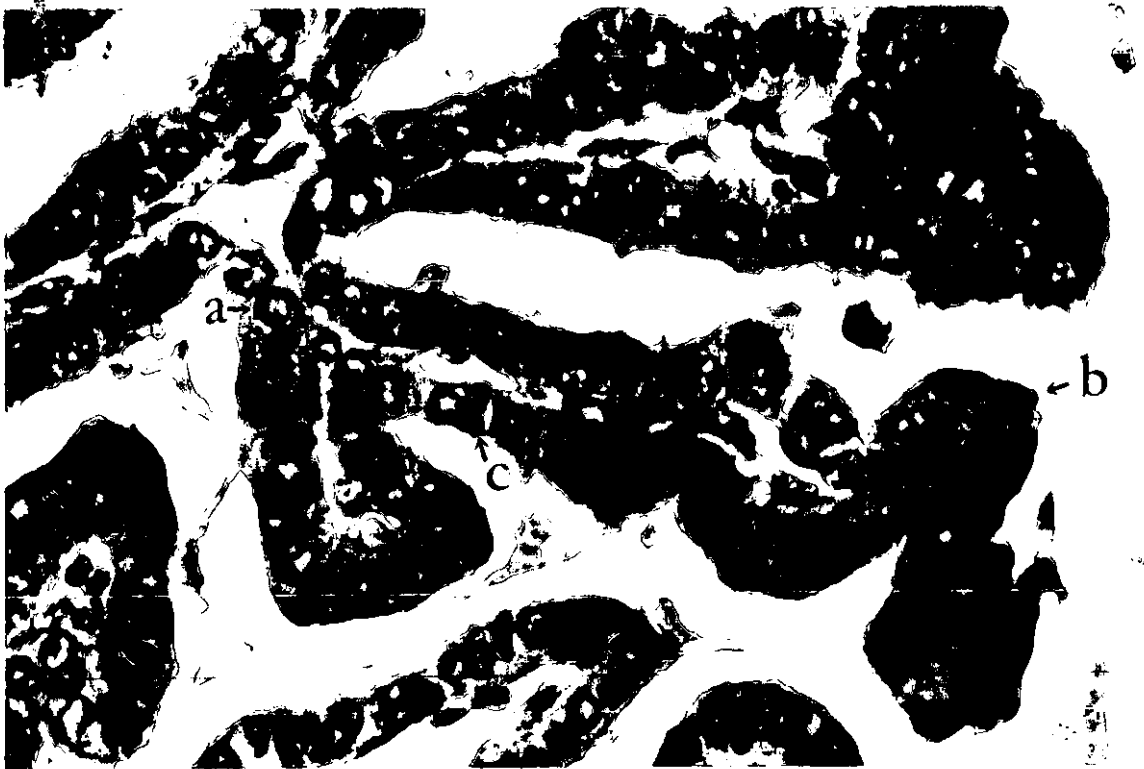
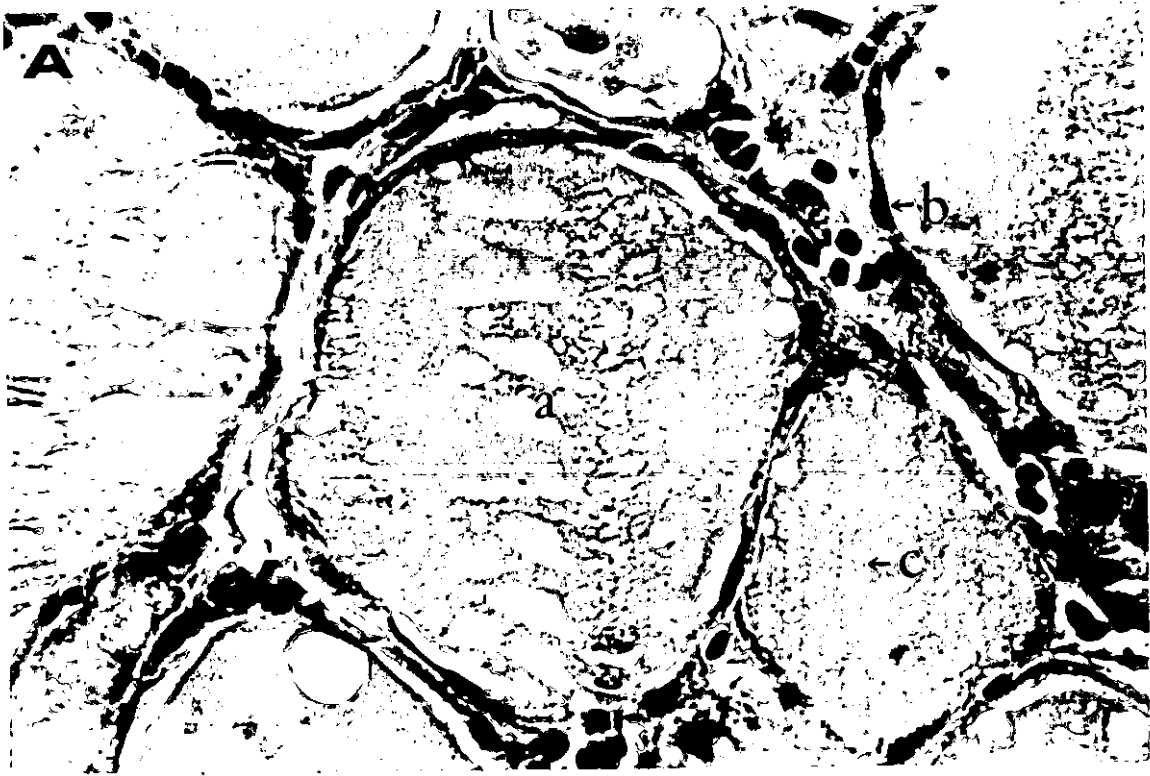


FIGURA 3.- Fotografías de cortes de tejido obtenidos de una glándula tiroides normal y un Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT). Tinción con Hematoxilina y Eosina. 200X.

A) Glándula tiroides normal: a) Folículo tiroideo, b) Célula folicular y c) Lumen folicular.

B) Carcinoma Papilar de Tiroides: a) Célula tumoral, b) Papila característica e c) inclusión o barra.

ANTECEDENTES

El cáncer de tiroides a nivel mundial, según datos provenientes del servicio de Salud Pública de los Institutos Nacionales de Salud (EUA), tiene una aparición de aproximadamente 45 nuevos casos al año por millón de habitantes [8]. En nuestro país, según datos publicados por la Secretaría de Salud, ocupa el décimo lugar con el 2.1% del total de las neoplasias malignas [9].

En la tiroides existe un gran espectro de lesiones neoplásicas y de acuerdo al tipo histológico, estas neoplasias se clasifican en: carcinomas medulares, papilares, foliculares, insulares y anaplásicos [10]. Existen estudios que indican que lesiones benignas como el bocio y algunos adenomas como el adenoma trabecular hialinizante, podrían ser lesiones precursoras del cáncer de tiroides [11,12]. De esta manera, junto con la gran variedad de subtipos morfológicos que presentan estas neoplasias, el cáncer de tiroides sugiere ser un buen modelo para el estudio del cáncer.

Hablando en particular del carcinoma papilar de tiroides (CPT o en inglés PTC), este representa el 70 % de los cánceres de tiroides, seguido por el medular con el 15% y correspondiendo el resto a los otros tipos histológicos (Figura 3 y 4) [8]. En el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, según información proporcionada por el Servicio de Cabeza y Cuello, se registran aproximadamente 30 nuevos casos al año de CPT. Esta neoplasia se ha

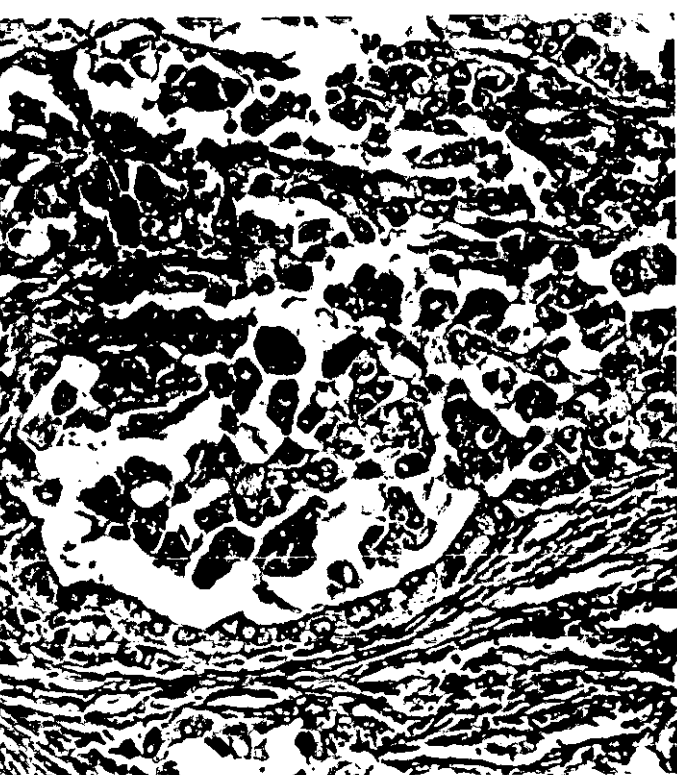
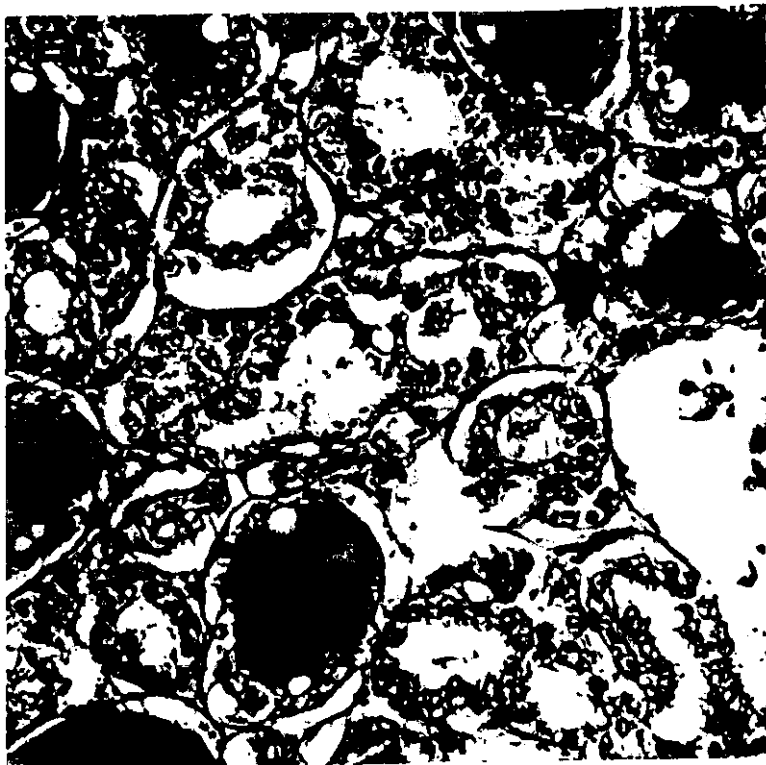


FIGURA 4.- Fotografías de varios cortes de tejido neoplásico con diferentes subtipos histológicos de CPT. A) CPT típico, B) CPT con patrón Follicular, C) CPT de Células Oncocíticas y D) CPT de Células altas. Tinción con Hematoxilina y Eosina. 200X.

considerado una lesión de baja malignidad, sin embargo, se ha observado que más de la mitad de los pacientes con CPT muestran invasión ganglionar [11], y que algunos subtipos morfológicos como el CPT de células altas, presentan un curso clínico más agresivo y un peor pronóstico que el tipo usual de CPT (Figura 4)[13], lo que indica que el estudio de este tipo de neoplasias debe profundizarse.

Mediante los nuevos métodos basados en técnicas de citogenética molecular como la Hibridación Genómica Comparativa (CGH) y el Análisis Espectral de cariotipos (SKY), se ha demostrado que existen diferentes alteraciones cromosómicas dentro de las cuales se han detectado ganancias de fragmentos cromosómicos o cromosomas completos en 1q, 5q, cromosoma 7, 17 y 21q; pérdidas cromosómicas en 16q y puntos de ruptura en los cromosomas 1q y 10q (Figura 5) [14,15]. A nivel de genes involucrados en este histotipo neoplásico, se encuentran los oncogenes ras, trk, myc, los genes supresores de tumor (anti-oncogenes) p53, Rb, y genes ligados a la progresión de potencial metastásico como nm23 y CD44. Más recientemente se ha observado un tipo de rearrreglo en el proto-oncogén ret muy ligado al carcinoma de tiroides, exclusivamente al histotipo papilar [16].

EL PROTO-ONCOGÉN ret

El proto-oncogén ret (REarreglo durante la Transfección), el cual se encuentra en el brazo largo del cromosoma 10 (q11.2), normalmente codifica para un receptor transmembranal con actividad tirosina-cinasa en el que su ligando es

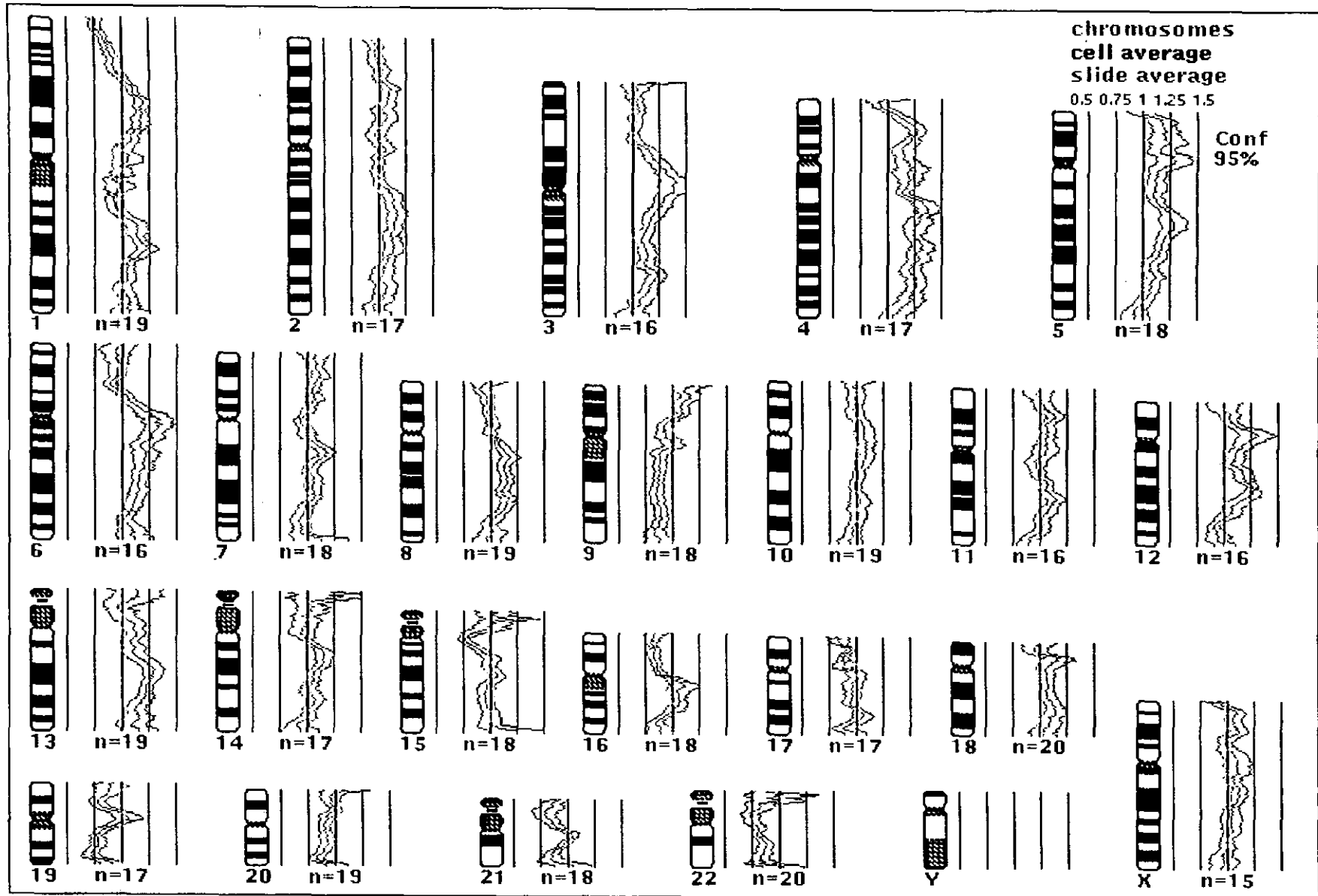
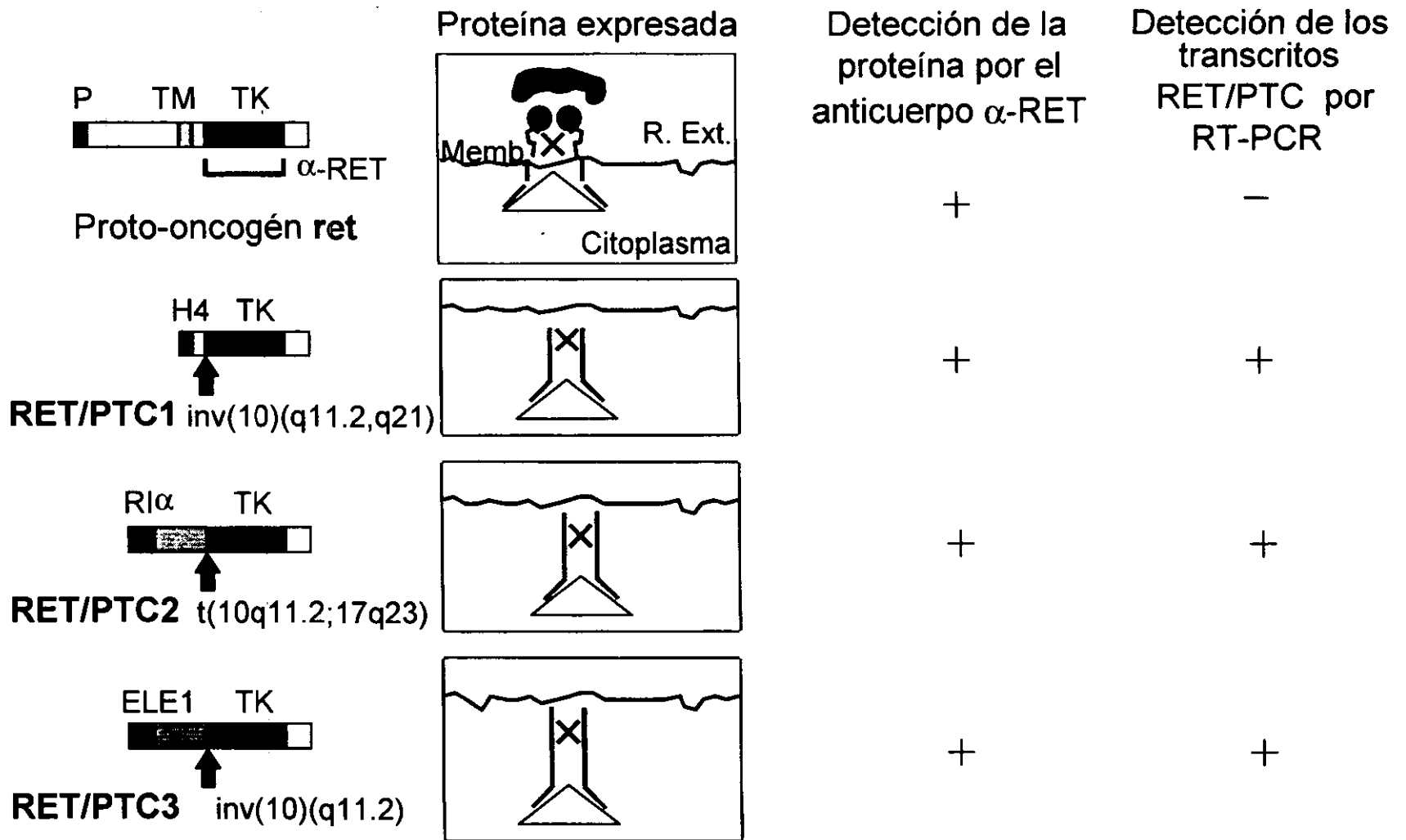


FIGURA 5.- Cariograma de ganancias y pérdidas cromosómicas de una muestra de CPT mediante la técnica de Hibridación Genómica Comparativa (CGH).

el GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de una línea celular de la Glía, miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante) [17]. *ret* puede estar relacionado con la diferenciación neuronal, ya que este se expresa normalmente en la cresta neural de ratón durante la mitad de su gestación. Este gen fue inicialmente identificado como oncogén mediante experimentos de transfección, que indicaban que había sido activado por un rearrreglo originado durante el proceso de transfección [18]. Después se demostró que existen rearrreglos específicos del gen *ret in vivo*, los cuales fueron detectados únicamente en los CPTs, con base en lo cual, se les denominaron rearrreglos RET/PTC [16,18]. Cabe mencionar que existen dos estudios donde se ha encontrado el rearrreglo de forma regional en algunos adenomas, bocios y microcarcinomas, lo que podría indicar una relación mas cercana de estas lesiones con el CPT [19,20]. Estudios posteriores confirmaron que la activación del rearrreglo RET/PTC en Carcinoma Papilar (alteración somática) es de alrededor del 35% de los casos [21], aunque existen variaciones significativas en diferentes países, por ejemplo: Italia se presenta en un 33% [21], Estados Unidos con 17% [22] mientras que en Japón con 3% [22,23]. En la población latina y en particular en México, no existen estudios de este tipo desconociéndose la frecuencia de estos rearrreglos en nuestro país.

En los CPTs, *ret* puede rearrreglarse en tres formas (Figura 6): 1) RET/PTC1, generado por una inversión paracéntrica inv. (10)(q11q21), la cual ocurre en el extremo 5' del gen H4 (D10S170) y el extremo 3' del dominio tirosinasa de *ret* [16]. La caracterización de este evento muestra que el 60% de los



P= Promotor, TM= Región Transmembranal, TK= Región Tirosina-cinasa.

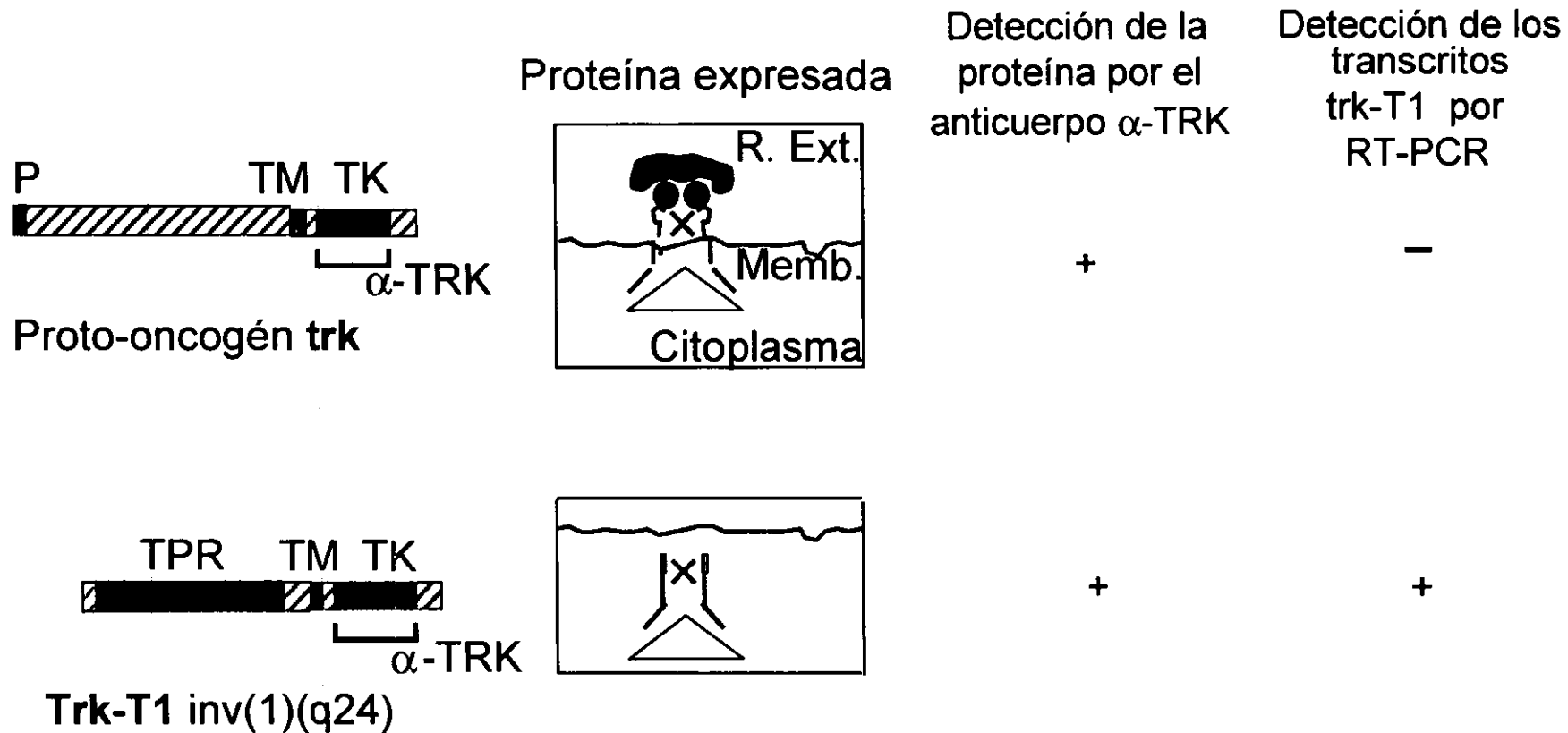
Figura 6.- Representación esquemática del proto-oncogen ret y los diferentes rearrreglos oncogénicos identificados.

casos de Carcinoma papilar, se deben a esta alteración mientras que el porcentaje restante se debe a los otros dos tipos [24]; 2) RET/PTC2 (5% de los casos), es un rearreglo creado por la fusión del extremo 3' de ret con la región regulatoria de la subunidad RI- α de la proteína-quinasa A (receptor intracelular de AMPcíclico), localizada en el cromosoma 17 (q23) [25] y 3) RET/PTC3 (35% de los casos) que es resultado de la fusión del extremo 3' de ret con el extremo 5' del gen RFG (Gen Fusionado a Ret), llamado RFG2/ELE1. Este rearreglo ocurre por una inversión paracéntrica en el cromosoma 10q11 [26]. Es importante notar que en los tres tipos de rearreglos RET/PTC, el punto de ruptura en el gen es el mismo (intrón 11) y que sus productos pueden encontrarse en el citoplasma fosforilando constitutivamente a proteínas debido a una autofosforilación donde aparentemente son regulados por fosfotirosina-fosfatasas [27].

EL PROTO-ONCOGEN *trk*

También en los carcinomas papilares de tiroides se ha visto involucrado otro proto-oncogén que codifica para un receptor transmembranal con actividad tirosina-quinasa, al cual se le llamó *trk* ó NTRK1 (Tropomiosin-receptor-quinasa, originalmente designado *oncD*). El ligando de este proto-oncogén es un factor de crecimiento nervioso (NGF), perteneciente a la familia de neurotrofinas [28]. *Trk* fue inicialmente detectado por una transfección en la línea celular 3T3 con DNA genómico de un carcinoma de colon [29]. Este gen se expresa en el sistema nervioso y es específico para una subpoblación de neuronas sensoriales

derivadas de la cresta neural [30]. Este gen se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (q23-q24) [31]. Se han reportado mutaciones puntuales en la región tirosina-cinasa de este proto-oncogén, trayendo como consecuencia una enfermedad autosómica recesiva llamada Insensibilidad Congénita al Dolor con Anhidrosis (CIPA) [32]. Debido a un rearrreglo intracromosómico con la región 5' del gen TPR (1q24), los productos quiméricos se encuentran en el citoplasma y pueden ser activados mediante la exposición a sustratos inusuales o también por un cambio conformacional de la proteína donde aparenta estar interaccionando con su ligando [29], a este oncogén se le llamó *trk-T1* (Figura 7). Se sugiere que el rearrreglo *trk-T1* es una alteración común en el CPT, donde en combinación con el rearrreglo *RET/PTC*, corresponden a la activación constitutiva de la actividad tirosina-cinasa de aproximadamente el 50% de los CPTs [29]. Esta relación entre *RET/PTC* y *trk-T1* se ha vuelto más estrecha, ya que a nivel de la cascada de fosforilación existen evidencias en la que algunas proteínas adaptadoras como *Shc* y *Grb2* participan directamente con la señalización de estos proto-oncogenes, así como de sus rearrreglos oncogénicos [33]. Ambas proteínas podrían compartir la misma cascada de fosforilación donde está involucrado el proto-oncogén *Ras*, y posteriormente divergir en algún punto de la cascada y así regularla de forma independiente [33]. Otro ejemplo es la predominancia de estos rearrreglos oncogénicos en los niños con CPT que estuvieron expuestos a la radiación del accidente de Chernobyl en 1986 [34].



P= Promotor, TM= Región Transmembranal, TK= Región Tirosina-cinasa.

Figura 7.- Representación esquemática del proto-oncogen trk y su rearreglo oncogénico identificado en cáncer de tiroides.

LA PROTEÍNA NM23

Por otro lado, la expresión del gen nm23 (No-Metastásico 23) ha sido asociada con un potencial bajo en metástasis y un mejor pronóstico en tumores malignos [35]. Este gen fue primeramente identificado en roedores debido a su baja expresión en líneas celulares de melanoma con gran potencial metastásico [36]. En tejidos humanos, dos genes de nm23 han sido identificados, nm23-H1 y nm23-H2, los cuales comparten una homología del 88% [37,38, 39], aunque recientemente se han identificado otros genes de la familia nm23 (nm23-H3 hasta nm23-H6) [40]. nm23-H1 y H2 se encuentran en el brazo largo del cromosoma 17 (q21.3) y codifican para una nucleósido difosfato-cinasa (NDP), la cual se expresa en la superficie celular, pero se ha encontrado también a nivel nuclear y a nivel citoplasmático [41]. La proteína NM23-H1 se ha encontrado fundamentalmente a nivel citoplásmico y en la membrana, mientras que NM23-H2 se ha localizado en forma de hexámero a nivel nuclear, donde puede unirse a la región promotora del proto-oncogén c-myc y regularlo transcripcionalmente *in vitro* [42]. La expresión ya sea del RNA o de la proteína NM23, han sido inversamente correlacionados con el desarrollo de metástasis o un curso clínico más agresivo en diferentes tipos de tumores. Amplificaciones y sobreexpresiones del gen nm23 han sido detectadas en neuroblastomas infantiles y en adenocarcinomas colorectales, donde se ha detectado una mutación puntual [43,44]. El mecanismo de NM23 en la participación de la diseminación metastásica es desconocido, al menos cinco propiedades bioquímicas han sido propuestas en las que la proteína puede ser importante en este efecto regulatorio: actividad como nucleósido difosfato-cinasa

(NDP) donde active proteínas G; producto de secreción; homología a proteínas GAP; actividad regulatoria transcripcional con secuencias similares a un zipper de leucina y recientemente se ha identificado una actividad de fosforilación distinta al de NDP [35].

En el cáncer de tiroides, se ha encontrado que los transcritos tanto de nm23-H1 como nm23-H2 se expresan ubicuamente tanto en el tejido normal de la tiroides como en los CPTs, pero en las metástasis a ganglios linfáticos el transcrito o la proteína de nm23-H1 no están presentes o se expresan débilmente, lo que indicaría una relación más directa de este gen con el comportamiento metastásico de los CPTs [45, 46]. Existen datos de una asociación entre la distribución subcelular de la proteína NM23 y la progresión de la enfermedad en los CPTs (Figura 8) [47]. La proteína se ha observado a nivel nuclear en un 93% de los tejidos normales de tiroides, declinando al 46% en tumores benignos, 29% en carcinomas primarios y 31% en lesiones con metástasis o con recurrencia. Contrariamente, cuando NM23 esta presente en la membrana celular no se encontró señal en tejidos normales de tiroides, aumentó un 15% en tumores benignos y 16% en carcinomas primarios, pero se elevó hasta un 33% en lesiones con metástasis. Por lo anterior, la progresión de esta enfermedad tiroidea esta acompañada por un decremento de la proteína NM23 a nivel nuclear y un aumento de ésta a nivel de la membrana celular [36].

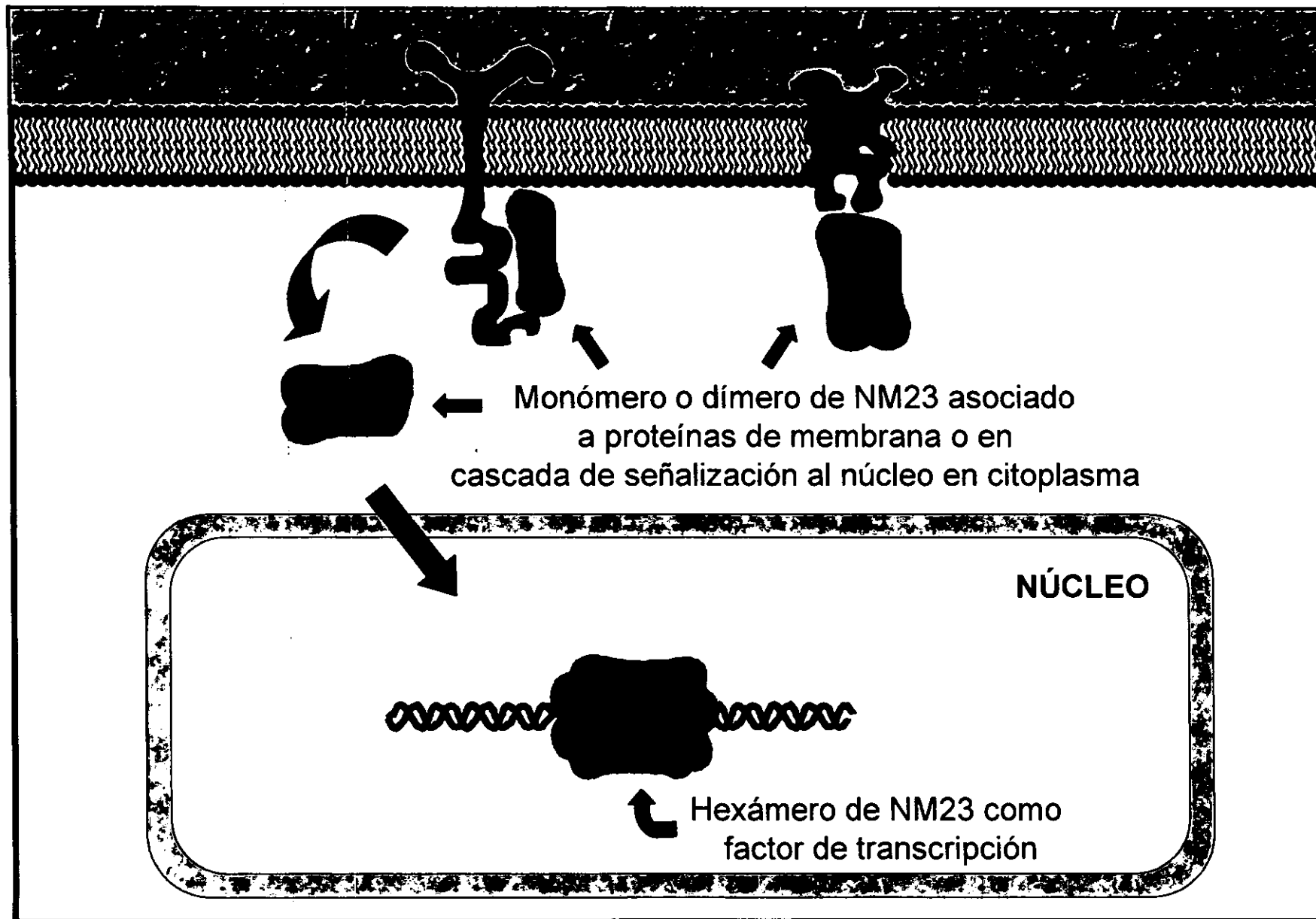


FIGURA 8.- Representación esquemática de los posibles sitios intracelulares de la proteína NM23 en células tumorales de un carcinoma papilar de tiroides.

LA PROTEÍNA TRANSMEMBRANAL CD44

La proteína CD44 es una molécula de adhesión celular involucrada en las interacciones célula-célula y célula-matriz. Al mismo tiempo, se le ha visto relacionada con las características de invasión y metástasis de células cancerosas [48]. La familia CD44 de receptores transmembranales se origina de un solo gen localizado en el cromosoma 11. Debido al mecanismo de splicing alternativo (corte y empalme) en sus 10 exones, existen 20 diferentes isoformas de la proteína CD44 (variante 1 a variante 10) (Figura 9) [49]. Uno de los ligandos de este receptor es una citocina llamada Eta-1 la cual induce quimiotaxis celular, lo que podría afectar la migración y crecimiento de la célula neoplásica promoviendo la formación de metástasis [50]. Expresiones aberrantes de las variantes de CD44, como la variante 6 y la variante 7-8, indican una pérdida del control de splicing en células transformadas y han sido asociadas con metástasis y un pobre pronóstico en varios cánceres. La expresión específica de CD44 variante 6 (CD44v6), ha sido correlacionada con una gran probabilidad de invasión vascular y una sobrevivencia muy pobre en pacientes con cáncer cervical, lo que hace de esta variante un buen marcador pronóstico en el comportamiento de estas neoplasias [48]. En el cáncer de tiroides y en particular en los CPT, se ha observado una expresión constante de la proteína CD44, y en particular de la variante 6 localizada en la membrana plasmática [51]. En otro estudio más detallado, se observó una desregulación de la maquinaria de splicing alternativo en los CPT, ya que aumentó la cantidad de transcritos de CD44v6 y la disminución de la proteína estandar (CD44s) (Figura 9) [52]. Por último, parece existir cierta relación entre

esta proteína CD44v6 y la edad del paciente con CPT, debido a que al tener mayor edad puede ser más agresivo el comportamiento del tumor [53].

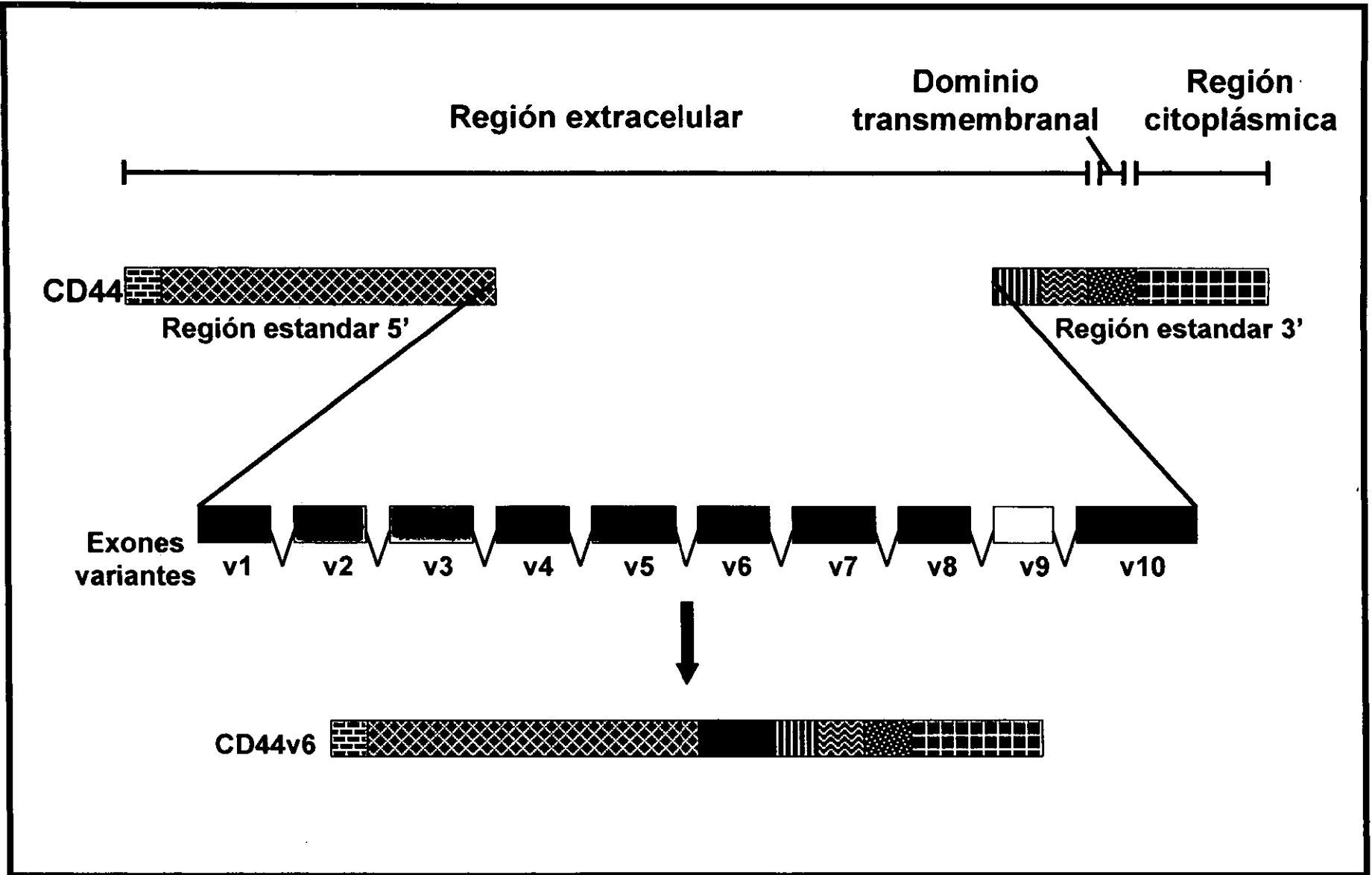


FIGURA 9.- Representación esquemática del gen CD44 junto con su región estándar y sus múltiples sitios de corte y empalme (Splicing).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El carcinoma papilar de tiroides presenta un amplio espectro de subtipos morfológicos que van desde los microcarcinomas encontrados en autopsias de personas asintomáticas, hasta los carcinomas papilares de células altas con un comportamiento muy agresivo, pasando por los carcinomas papilares del subtipo folicular, células oxifílicas y del tipo usual [5]. Actualmente en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, el diagnóstico de los carcinomas papilares se realiza de manera tardía, cuando la neoplasia es invasiva y el curso clínico y pronóstico del paciente es incierto.

Se ha demostrado que a nivel mundial entre el 10 al 50% de los casos de CPT se presentan rearrreglos cromosómicos en los proto-oncogenes *ret* y *trk* [26]. Al mismo tiempo la proteína NM23 se ha localizado a nivel nuclear ó citoplásmico en un mayor porcentaje de los carcinomas papilares tiroideos no agresivos, mientras que su localización en membrana ó su ausencia es más común en los carcinomas papilares de mal pronóstico [36]. Por último, la variante 6 de la proteína membranal CD44, involucrada en adhesión celular, ha sido asociada con metástasis y un pobre pronóstico en varios cánceres y en particular en los CPT [51]. En varios países se han realizado estudios de estos oncogenes y genes ligados a la progresión de metástasis de forma individual, obteniéndose datos aislados y parciales, por lo que resultaría de gran importancia poder realizar un estudio donde se pueda observar la posible relación y cooperación entre estos

genes y poder correlacionarlos con un comportamiento o subtipo histológico del CPT en particular. Hasta el momento, no existen reportes donde se estudien 2 proteínas tan relacionadas al comportamiento de invasión y metástasis como NM23 y CD44v6, en conjunto con 2 oncogenes tan importantes en la carcinogénesis de la glándula tiroides como ret y trk. Este estudio es de gran ayuda para poder entender la relación a nivel molecular de estas proteínas, y así poder llegar a tener un indicador pronóstico del comportamiento tumoral que le indique al médico de manera más temprana el posible curso clínico del paciente.

OBJETIVO GENERAL

Buscar una posible correlación y/o cooperación entre la expresión de los oncogenes RET/PTC1, RET/PTC2, RET/PTC3, trk-T1, las proteínas NM23 y CD44 variante 6 y el comportamiento y subtipos histológicos del carcinoma papilar tiroideo en el curso clínico del paciente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar mediante la técnica de inmunohistoquímica, aquellos casos de carcinomas papilares tiroideos, que expresen las proteínas RET, TRK y CD44 variante 6.
- 2.- Determinar mediante la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), los tipos de rearrreglos RET/PTC1, RET/PTC2, RET/PTC3 y trk-T1 en los casos positivos de expresión de las proteínas RET y TRK.
- 3.- Identificar el sitio de expresión de la proteína NM23 ya sea a nivel nuclear, a nivel citoplásmico, a nivel de membrana o su ausencia, en todos los casos de carcinoma papilar tiroideo, mediante la técnica de inmunohistoquímica.

METODOLOGÍA

Tejidos y Muestras.

Las 36 muestras de CPT que fueron utilizadas para la detección de los rearrreglos RET/PTC, trk-T1, las proteínas RET, TRK, NM23 y CD44 variante 6, junto con las 12 muestras utilizadas como controles (2 carcinomas medulares tiroideos, 2 adenomas tiroideos, 2 bocios nodulares tiroideos, 2 tejidos normales de tiroides, 2 carcinomas de mama y un tejido normal de cervix) fueron proporcionadas por dos instituciones. En el caso de tejidos incluidos en parafina (35 muestras), fueron adquiridos por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, gracias a la colaboración de la Patóloga Dra. Alejandra Mantilla. Las 13 muestras restantes de tejido congelado y en parafina fueron adquiridas gracias al Servicio de Patología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, y en particular al apoyo otorgado por el Dr. Rogelio Hernández-Pando. Las muestras fueron seleccionadas debido a su comportamiento, tomando como tumores agresivos, aquellos que presentaron metástasis a ganglios linfáticos, daño a tejidos adyacentes y metástasis distantes; mientras que las muestras de CPT con un comportamiento no agresivo fueron aquellas extraídas de autopsias de pacientes asintomáticos (microcarcinomas) y tumores bien localizados que no presentaron metástasis y sin ruptura de la cápsula tiroidea. En cuanto a los criterios de subtipos histológicos de

estos tumores, fueron determinados por dos patólogos por separado, los cuales tomaron como subtipos de mal pronóstico aquellos que presentaron en más del 75% del corte histológico a células altas o a células con cambios oxifílicos, mientras que los subtipos de buen pronóstico fueron los tumores con papilas típicas y los que presentaron un CPT con patrón folicular (Figura 4). La localización intracelular de la proteína NM23 fue dividida en dos grupos (como ya se mencionó en el artículo de Luo et al. 1993 [47]), ya que anteriormente se ha encontrado cierta relación entre la localización de NM23 en membrana o su ausencia y la presencia de tumores de CPT metastásicos, así como la presencia de NM23 en núcleo o citoplasma en tumores no agresivos.

Extracción y purificación de RNA por el método de trizol a partir de cortes histológicos de tejidos incluidos en parafina y tejido congelado.

La extracción y purificación del RNA se llevó a cabo por la metodología de trizol [54]. Brevemente, un corte histológico de 8 a 10 μm se desparafinó en xilol por 20 min. a 37°C. Después se centrifugó a 12,000 g por 10 min. y se lavó en etanol absoluto. El tejido ya sea desparafinado o congelado se resuspendió en 200 μl de Trizol (GIBCO) y se incubó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se agregó 0.1ml de acetato de sodio 2 M, 1ml de fenol saturado y 0.2 ml. de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), esta suspensión se agitó vigorosamente y se dejó en hielo durante 15 min. La muestra se centrifugó a 10,000 g por 20 min. a 4°C. Después de la centrifugación, el RNA se encontró presente en la fase

acuosa, mientras que el DNA y las proteínas estaban en la interfase y en la fase fenólica, respectivamente. La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio y se mezcló con 1 ml de isopropanol a -20°C durante 1 hora para precipitar el RNA. Se centrifugó durante 20 min. a 10,000 g a 4°C. Después de la obtención de la pastilla de RNA, se lavó en 0.5 ml. de etanol al 70% y se volvió a centrifugar. Por último, la pastilla se resuspendió en una solución de EDTA 1mM pH 8.0 y se almacenó a -20°C. La calidad y concentración del RNA fue determinado por espectrofotometría y corrimiento en geles de agarosa desnaturalizante.

Detección de las proteínas RET, TRK, CD44 variante 6 y NM23 por la técnica de inmunohistoquímica en cortes de tejido incluido en parafina.

Se utilizaron cortes histológicos de 5 µm, los cuales fueron desparafinados a 70°C por 30 min., seguidos por dos baños en xilol. Posteriormente se hidrataron en un tren de alcoholes a diferentes porcentajes (100, 90, 70 y 30%), hasta PBS 1X. Se inhibió la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y 70% metanol durante 10 min., lavándose en PBS 1X. El tejido se bloqueó con suero no inmune de cerdo al 10% por 30 min. y se incubó con los anticuerpos específicos contra las proteínas RET [55], TRK, CD44v6 y NM23 [38] (1:100) respectivamente, durante toda la noche en una cámara húmeda. Posteriormente se lavó con PBS 1X y se incubó con el anticuerpo cabra-anti conejo-peroxidasa (1:50) durante 1hr. La detección se realizó con 6 mg de diaminobencidina mas 100 µl de peróxido de hidrógeno al 3% en 10 ml de TE. Los tejidos se

contratiñieron con hematoxilina, se deshidrataron en el tren de alcoholes y se montaron en un medio permanente. Como control negativo interno se utilizó tanto un anticuerpo primario irrelevante (anti-TrpE de E. Coli, dilución 1:250, DAKO Co.) así como la omisión del anticuerpo primario.

Detección de los rearrreglos RET/PTC y trk-T1 por la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

El RNA purificado, se sometió a la reacción de transcripción reversa y amplificación del producto de PCR, mediante la utilización de oligonucleótidos específicos, según las condiciones de reacción reportadas por Kawasaki [56]. La secuencia del oligonucleótido utilizado para reconocer la región tirosina-cinasa del transcrito del proto-oncogén ret, así como también de los diferentes rearrreglos es el siguiente: retc1F (exon 12): 5'-TGGGAATTCCCTCGGAAGAA-3' (tamaño del amplificado 234pb). Para los diferentes rearrreglos RET/PTC, los oligonucleótidos son los siguientes: RET/PTC1 (exon de H4): 5'-ATTGTCATCTCGCCGTTC-3' (amplificado de 330pb); RET/PTC2 (exon de R1 α): 5'-TATCGCAGGAGAGACTGTGAT-3' (amplificado de 365pb); RET/PTC3 (exon de ele1): 5'-AAGCAAACCTGCCAGTGG-3' (amplificado de 404pb); y el nucleótido reverso tanto para el transcrito de ret como para los diferentes rearrreglos es: retc2R (exon 13): 5'-TGCTTCAGGACGTTGAAC-3' [55]. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para reconocer la región tirosina-cinasa del rearrreglo trk-T1 son los siguientes: TRK7F: 5'-CGGGACATCGTGCTCAAGTG-3'

(amplificado de 655pb); y el nucleótido reverso: TRK8R: 5'-AGCTTGCCGTAGGTGAAGAT-3' [57]. El RNA fue retrotranscrito con la enzima transcriptasa reversa MMLV y un oligonucleótido dT, mediante un ciclo de 25°C por 10 min., 42°C por 60 min., 99°C por 5 min. y 4°C por 5 min., posteriormente se pasó a hielo. Después, al producto se le adicionó por separado los oligonucleótidos que reconocen a los diferentes genes y se le sometió a la amplificación con las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 58°C por 2 min. y 72°C por 2 min. El producto de amplificación fue sujeto a electroforesis en gel de agarosa y analizado con un equipo de visualización de DNA Eagle Eye II. Como control positivo de la técnica de PCR, se utilizó un plásmido (pSV2) que contiene clonado el cDNA del proto-oncogen ret, donde se amplificó la región tirosina-cinasa. El control negativo interno fue la omisión de RNA.

El análisis estadístico.

Con respecto al análisis estadístico, se realizó un estudio no paramétrico con el método de Chi cuadrada para determinar las posibles relaciones entre los resultados obtenidos y las características de los tumores, gracias al apoyo de la Dra. Dulce María Hernández, Investigadora del área de Epidemiología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

RESULTADOS

Se estudiaron 36 muestras de tejido tumoral de pacientes con Carcinoma Papilar de Tiroides con diferentes subtipos histológicos (Tabla 1). Del total de los CPT estudiados, 23 muestras fueron de tejido incluido en parafina, mientras que 13 muestras fueron de tejido congelado. Al mismo tiempo se utilizaron como controles positivos para la detección de RET y Trk-T1: 2 tejidos tumorales de Carcinoma Medular de Tiroides (los cuales deben de presentar inmunopositividad para la proteína RET y TRK a nivel de membrana citoplasmática debido a su origen de células parafoliculares), y 2 tejidos tiroideos normales donde la tinción debe estar presente en células parafoliculares (origen neuroendocrino) exclusivamente [58]. Como controles negativos fueron utilizados 3 adenomas y 2 bocios tiroideos en los que ya se ha reportado anteriormente la ausencia de las proteínas RET y Trk-T1[21]. Estos controles fueron utilizados tanto para la técnica de inmunohistoquímica como para la técnica de Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Para la detección de las proteínas NM23 y CD44v6, se utilizaron como controles positivos un carcinoma de mama y un tejido normal de epidermis respectivamente (los cuales deben ser positivos para cada proteína según estudios previos)[46, 49], mientras que un tejido normal de cervix fue utilizado como control negativo.

Expresión elevada de la proteína RET, así como del transcrito oncogénico RET/PTC3 en muestras de Carcinoma Papilar de Tiroides.

En la detección de la proteína RET mediante la técnica de inmunohistoquímica se encontró inmunotinción positiva en 23 muestras de las 36 estudiadas lo que representa el 63.8% (Figura 10). En cuanto a la comparación de resultados, los diferentes subtipos histológicos así como los datos clínicos de los pacientes, se resumen en la tabla 2. De estas 23 muestras inmunopositivas, únicamente en 9 tejidos frescos fue adecuada la obtención de RNA total para poder aplicar la técnica de RT-PCR. Ocho de nueve muestras (88.9%) fueron positivas para la amplificación del transcrito quimérico RET/PTC3, mientras que solo una muestra (11.1%) fue positiva para el transcrito formado por la translocación RET/PTC2 (Figura 11).

Expresión elevada del transcrito y proteína del oncogén trk en muestras de Carcinoma Papilar de Tiroides.

Por otra parte, también se detectó la expresión a nivel de transcrito y proteína de otro oncogén involucrado en la carcinogénesis de la tiroides llamado trk-T1. Al igual que el oncogén ret, trk es un receptor de membrana tirosina-cinasa el cual sufre un rearrreglo cromosómico, dando como consecuencia una sobreexpresión y desregulación funcional. La inmunodetección de esta proteína oncogénica TRK estuvo presente en 25 de las 36 muestras (69.4%) (Figura 12), y

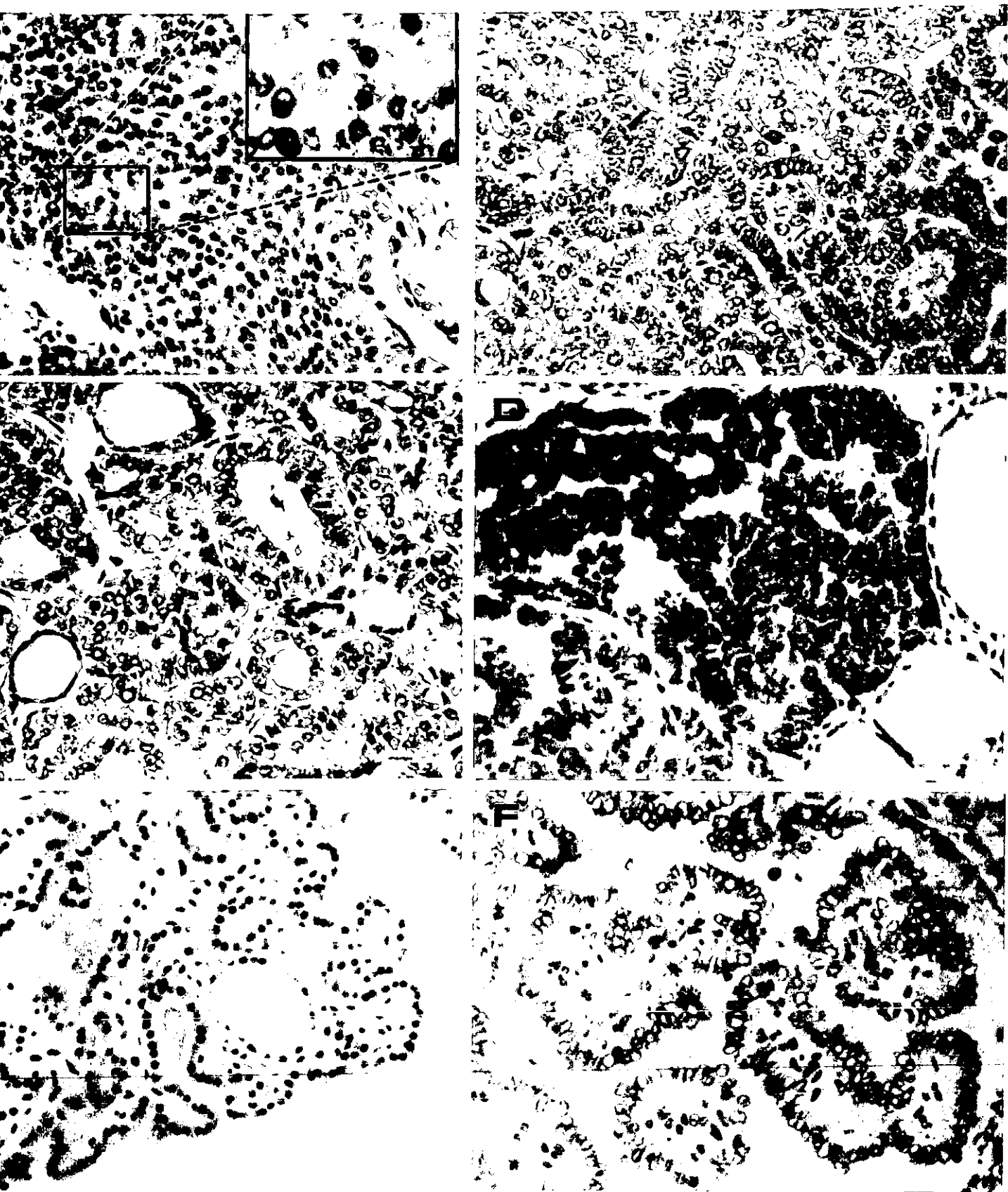


FIGURA 10.- Inmunodetección de la proteína RET en diferentes muestras de CPT, junto con sus controles. A) Control positivo para el anticuerpo α -RET sobre un corte de Carcinoma Medular de Tiroides, B) CPT típico positivo para la proteína RET, C) CPT con patrón folicular positivo para la proteína RET, D) CPT de células altas positivo para la proteína RET, E) Control negativo sobre un corte de Adenoma Folicular de Tiroides (neoplasia benigna) y F) Control interno de un corte de CPT típico donde se aplicó toda la metodología de Inmunohistoquímica, pero sin el anticuerpo α -RET. Aumentos de 200X y 400X respectivamente.

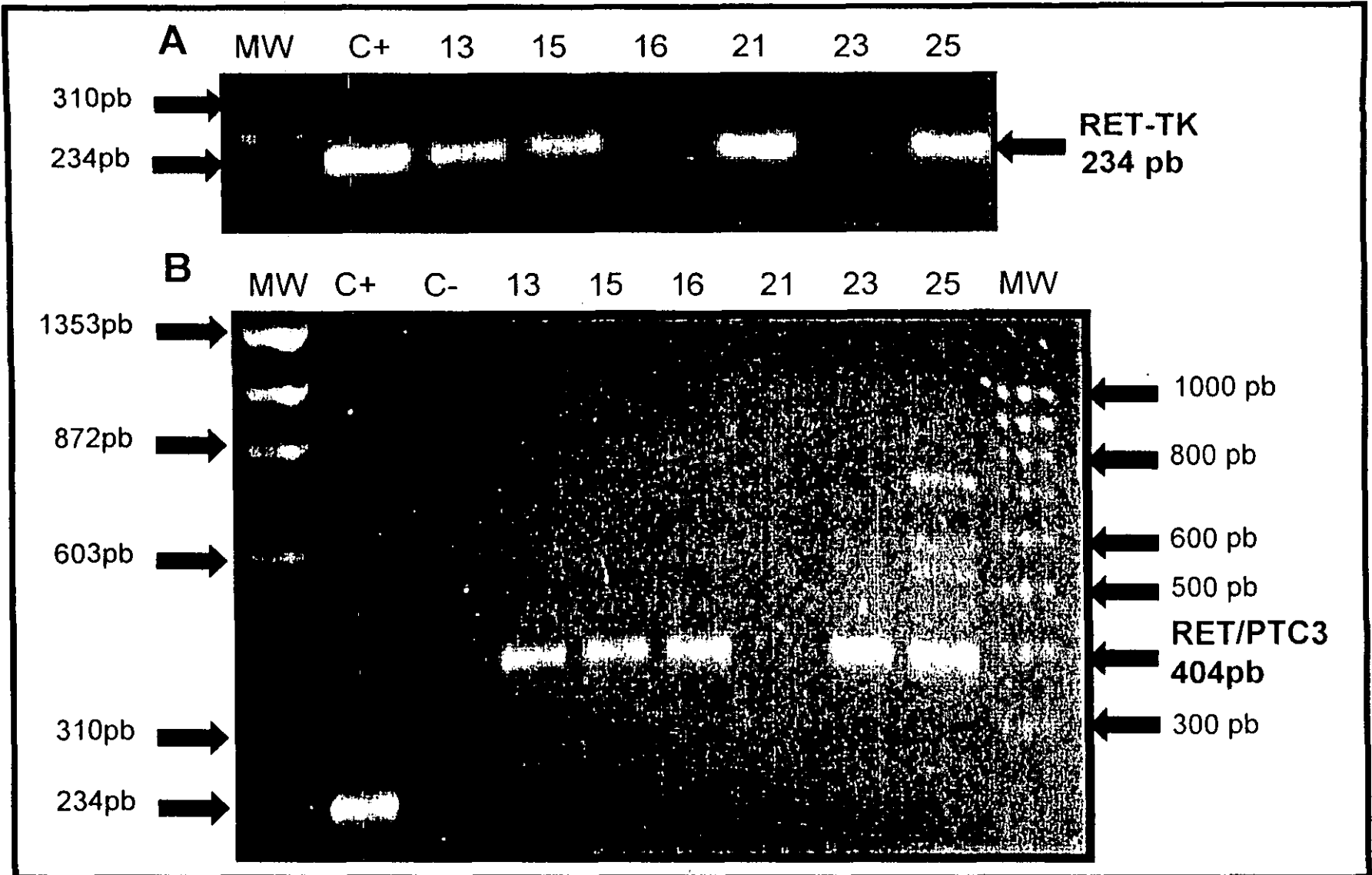


Figura 11.- Amplificación de los transcritos quiméricos RET/PTC de varias muestras de CPT mediante la técnica de RT-PCR. A) Amplificación de la región tirosina-cinasa del proto-oncogén ret y B) amplificación del transcrito quimérico RET/PTC3 en muestras positivas para la proteína RET.

al realizar la amplificación de la región tirosina-cinasa del transcrito *trk-T1*, se encontraron coincidencias en las inmunodetecciones de la proteína y sus transcritos, ya que en 8 muestras donde existió inmunodetección, también hubo amplificación del transcrito *trk-T1* (Figura 13), mientras que 4 muestras negativas para TRK no se encontró amplificación de su transcrito. La comparación de estos resultados con los datos clínicos y subtipos histológicos se encuentran en la tabla 2.

Coexpresión elevada a nivel protéico de los oncogenes *ret* y *trk* en muestras de Carcinoma Papilar de Tiroides.

Al realizar la comparación de la presencia de las proteínas oncogénicas RET y Trk-T1 en las muestras estudiadas, encontramos que 17 de ellas (47.2%) presentaron co-expresión de RET como Trk-T1, 6 muestras (16.6%) presentaron únicamente a RET y 8 (22.2%) a la proteína Trk-T1, solo 5 muestras (13.8%) no presentaron inmunoreacción a ninguna de las dos proteínas. Estos resultados son interesantes ya que casi la mitad de los casos aquí estudiados presentaron tanto a la proteína RET como a Trk-T1 (47.2%), lo que nos indicaría que podría existir una posible cooperación entre estos dos genes como ya se ha reportado previamente [33].

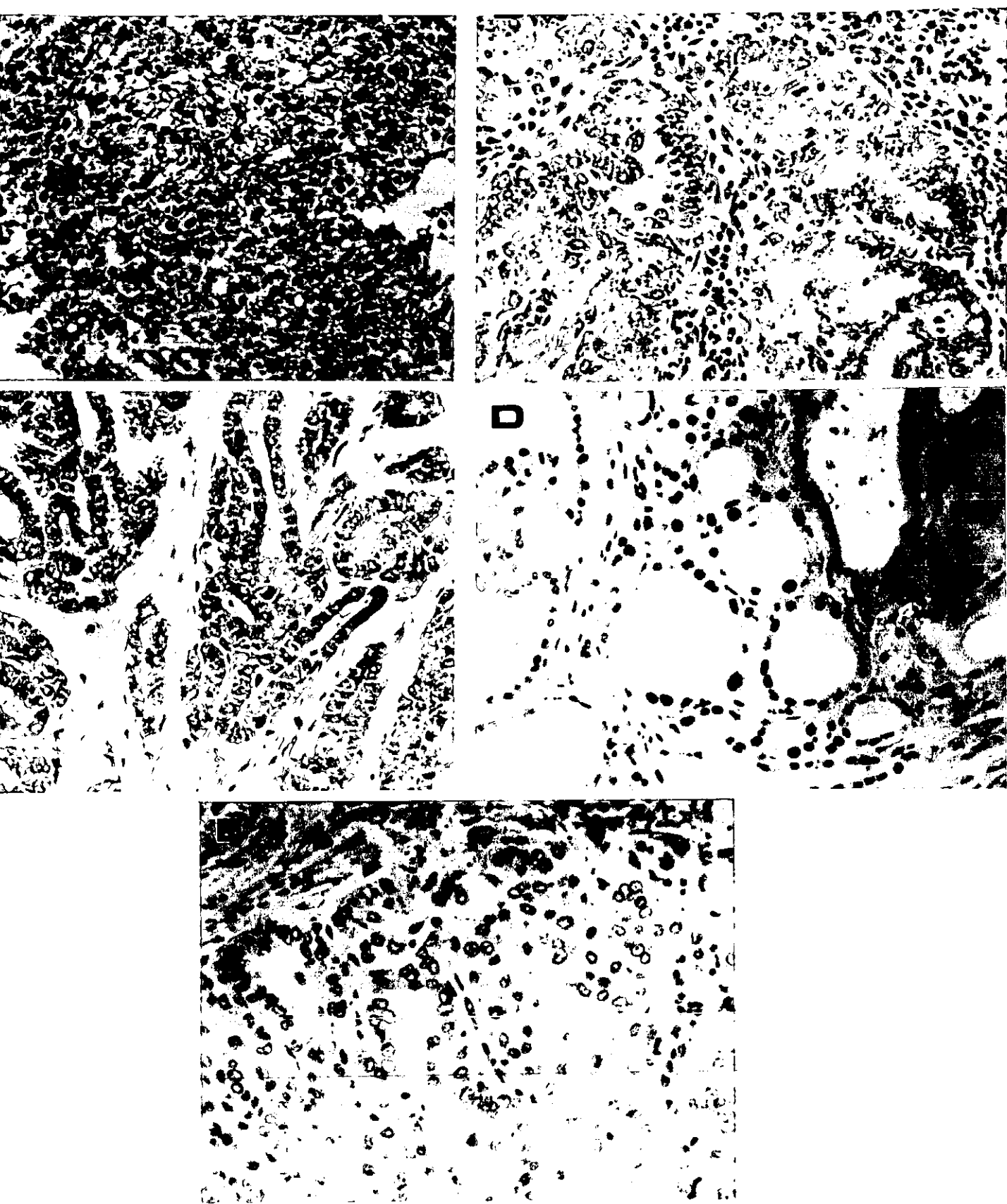


FIGURA 12.- Inmunodetección de la proteína TRK en diferentes muestras de CPT, junto con sus controles. A) Control positivo para el anticuerpo α -TRK sobre un corte de Carcinoma Medular de Tiroides, B) CPT de células oncocíticas positivo para la proteína TRK, C) CPT con patrón folicular positivo para la proteína TRK, D) Control negativo para el anticuerpo α -TRK sobre un Adenoma Folicular de Tiroides (neoplasia benigna) y E) Control interno de un corte de CPT de células oncocíticas donde se aplicó toda la metodología de Inmunohistoquímica, pero sin el anticuerpo α -TRK. Aumentos de 200X y 400X respectivamente.

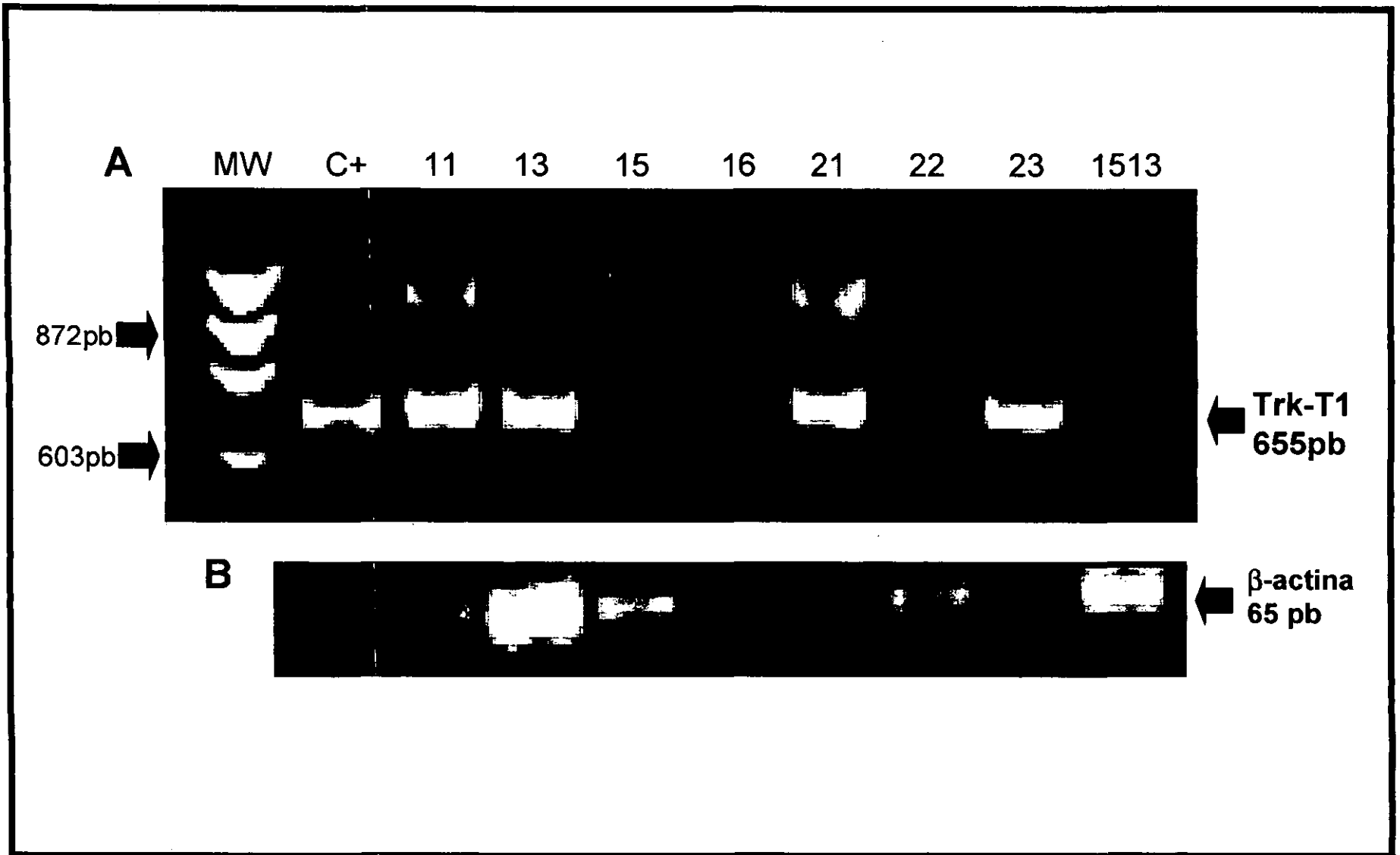


Figura 13.- Amplificación de los transcritos quiméricos *trk-T1* en muestras de CPT mediante la técnica de RT-PCR. A) Amplificación de la región tirosina-cinasa del transcrito quimérico *trk-T1* de muestras positivas para la proteína TRK y B) amplificación del transcrito del gen de β -actina como control positivo.

Detección y localización de la proteína NM23 en diferentes tumores de Carcinoma Papilar de Tiroides.

Debido a que la mayoría de los tumores de CPT estudiados presentaron invasividad y/o metástasis locales o distantes, consideramos importante estudiar algunos genes que expresen proteínas relacionadas con metástasis como NM23, ya que en otros tumores su presencia, localización o ausencia a nivel protéico parece relacionarse con el comportamiento del tumor. En cuanto a la detección y localización de la proteína NM23 en este trabajo, se estudiaron 27 muestras de las cuales 15 (55.5%) mostraron positividad a nivel nuclear ó citoplásmico, mientras que en 12 muestras (44.5%) se localizó la proteína NM23 a nivel de membrana ó fueron completamente negativas para la inmunodetección (Figura 14). La comparación de estos resultados con los datos clínicos y subtipos histológicos se encuentran en la tabla 2.

Detección elevada de la proteína CD44 variante 6 en Carcinomas Papilares tiroideos.

Por último, consideramos también importante estudiar otro gen que exprese una proteína relacionada a metástasis como la molécula CD44. Esta proteína de membrana, donde una de sus funciones es el de reconocimiento célula-célula ó célula-matriz extracelular, parece estar involucrada con un comportamiento agresivo en varios tumores sólidos. El gen sufre varios eventos de "splicing"

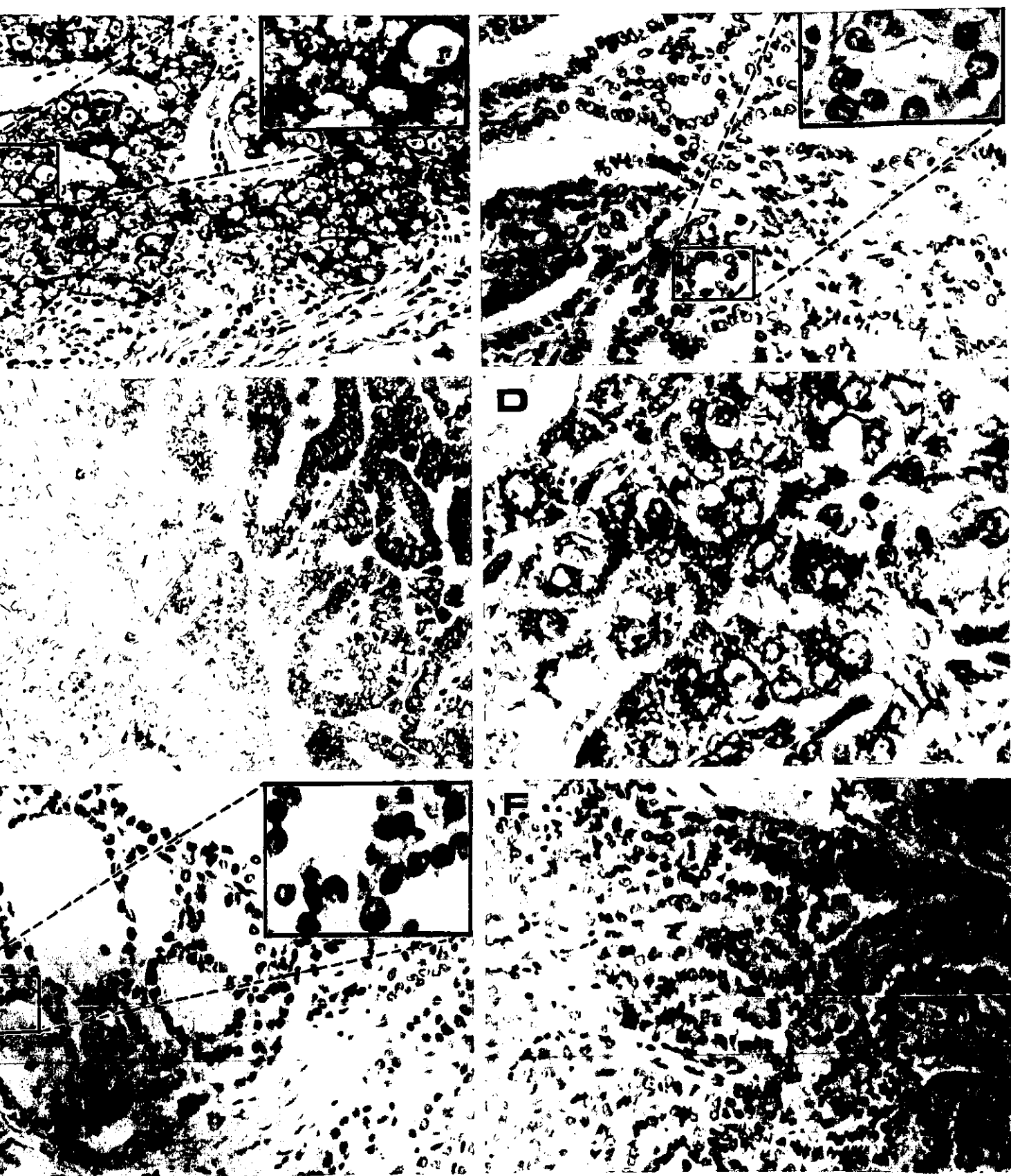


FIGURA 14.- Inmunodetección de la proteína NM23 en diferentes muestras de CPT, junto con sus controles. A) Control positivo para el anticuerpo α -NM23 sobre un corte de Carcinoma de Mama, B) CPT típico positivo a nivel nuclear para la proteína NM23, C) CPT típico positivo a nivel citoplásmico para la proteína NM23, D) CPT típico positivo a nivel de membrana citoplásmica para la proteína NM23, E) CPT con patrón foliolar negativo para la proteína NM23 y F) Control interno de un corte de CPT típico donde se aplicó toda la metodología de inmunohistoquímica, pero sin el anticuerpo α -NM23. Aumentos de 200X y 400X.

alternativo (corte y empalme) dando origen a 10 diferentes variantes de la proteína (v1-v10). En los CPT existen estudios donde involucran a la variante 6 como posible proteína involucrada en metástasis. En este estudio, se analizaron solo 26 muestras de CPT para detectar la presencia de CD44 variante 6 (CD44v6). Diecinueve muestras (73%) fueron positivas para la inmunotinción de la variante 6, mientras que solo 7 (27%) fueron negativas para esta proteína (Figura 15).

Al comparar la presencia de la proteína CD44v6 y la localización ó ausencia de la proteína NM23, se encontró que 11 tumores (44%) presentaron la co-expresión de ambas proteínas y en particular a NM23 en núcleo o citoplasma, mientras que 7 muestras (28%) solo presentaron a CD44v6 y NM23 a nivel de membrana citoplásmica ó la ausencia de esta última. Solo 4 tumores (16%) fueron negativos para CD44v6 y NM23 en membrana o ausente; y por último, 3 muestras (12%) fueron negativas para CD44v6 y positivas a nivel nuclear ó citoplásmico de NM23. Estos resultados también son interesantes ya que parece haber alguna relación entre la aparición de la proteína CD44v6 y la presencia de NM23 a nivel nuclear o citoplásmico. Este hallazgo podría sugerir una posible cooperación a nivel molecular entre estas proteínas ya sea directa ó indirectamente.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando una chi-cuadrada para la obtención de las posibles relaciones significativas entre la detección de las proteínas oncogénicas RET, TRK, las proteínas ligadas a

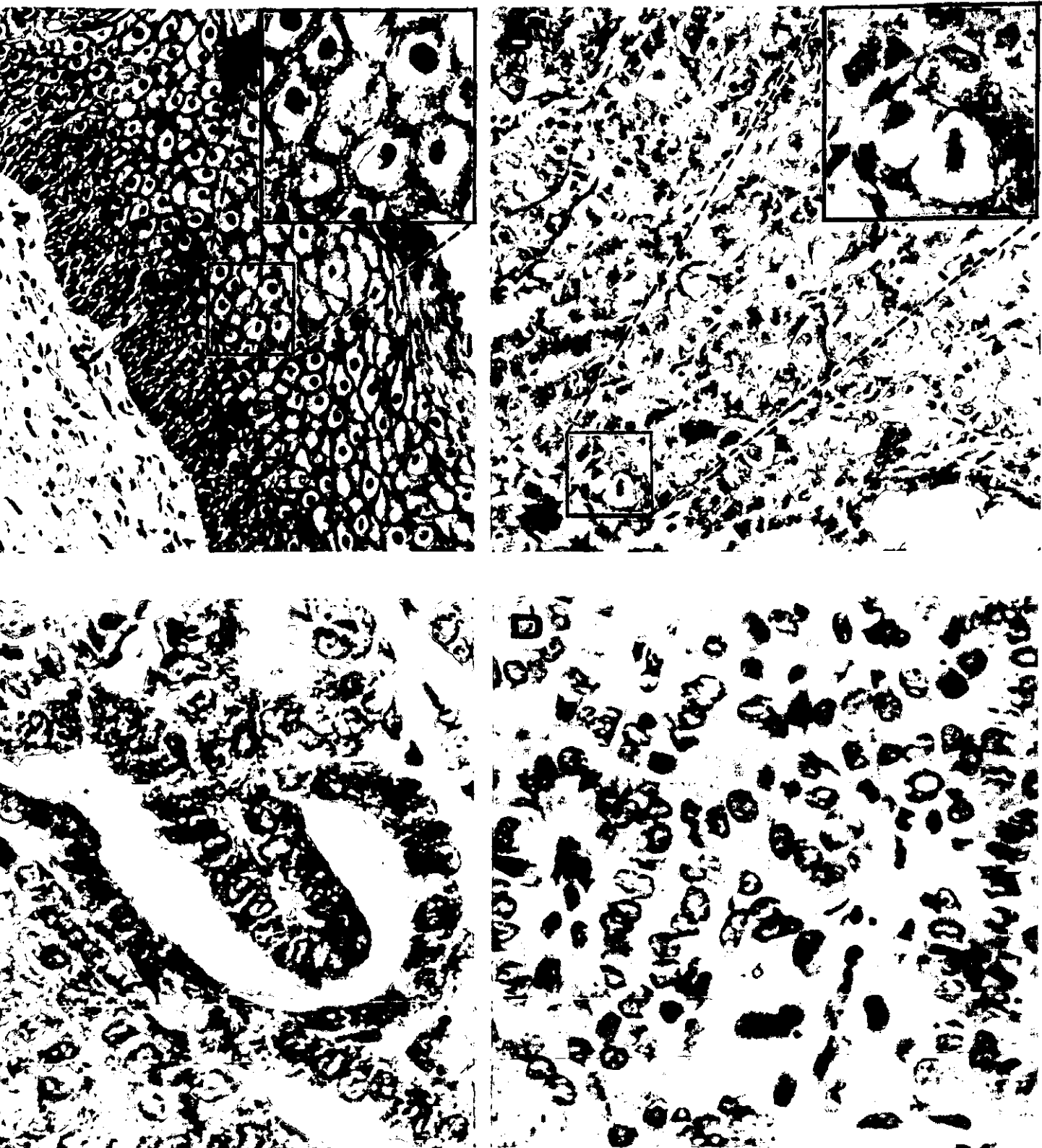


FIGURA 15.- Inmunodetección de la proteína CD44v6 en diferentes muestras de CPT, junto con sus controles. A) Control positivo para el anticuerpo α -CD44v6 sobre un corte de Cervix normal, B) CPT típico positivo a nivel de membrana citoplásmica para la proteína CD44v6, C) CPT con patrón folicular positivo para la proteína CD44v6 y D) Control interno de un corte de CPT típico donde se aplicó toda la metodología de Inmunohistoquímica, pero sin el anticuerpo α -CD44v6. Aumentos de 200X y 400X respectivamente.

metástasis NM23, CD44v6 y los diferentes subtipos histológicos, así como varios datos clínicos como el comportamiento del tumor, edad, sexo y lugar de residencia. Se observó que los subtipos histológicos considerados de mal pronóstico como el de células altas u oncocíticas, tienen un $OR=5.87$ ($0.57 < OR < 144.03$) para a la proteína RET, o sea que es casi 6 veces más frecuente la presencia de esta oncoproteína en subtipos de mal pronóstico con respecto a los subtipos con patrón folicular ó típico. Respecto a los resultados obtenidos de los datos clínicos de los pacientes que presentaron invasión y/o metástasis en comparación con los pacientes con tumores bien encapsulados o microcarcinomas, tienen un $OR=4.7$ ($0.62 < OR < 40.80$) con respecto a la presencia de la proteína TRK , un $OR=2.3$ ($0.34 < OR < 16.12$) con respecto a la presencia de la proteína RET y un $OR=2.3$ ($0.18 < OR < 30.31$) con respecto a la presencia de la proteína CD44 variante 6.

Por último, el análisis de los datos clínicos de edad, sexo y lugar de residencia, presentaron también algunas diferencias. Los pacientes menores de 50 años mostraron una frecuencia mayor en la presencia de CD44v6 de casi 3 veces más en comparación a las personas mayores a 50 años, ya que se observó una $OR=2.86$ ($0.30 < OR < 31.78$). En relación con el sexo de los pacientes, se obtuvo una diferencia entre las mujeres y los hombres con respecto a la proteína nm23, ya que se encontró una $OR=5.25$ ($0.36 < OR < 157.65$) lo que significa que es 5 veces más frecuente localizar esta proteína a nivel de membrana citoplásmica o la ausencia completa de nm23 en los pacientes del sexo masculino en comparación al sexo femenino. Esto trae como consecuencia

un posible incremento en la agresividad del tumor en estos casos. Y con lo que respecta al lugar de residencia, se encontró una $OR=5.25$ ($0.84 < OR < 36.46$) con respecto a la proteína RET y otro $OR=3.81$ ($0.55 < OR < 28.98$) con respecto a la proteína TRK en los pacientes radicados en el Distrito Federal y área metropolitana, lo cual podría indicarnos que existe una posible asociación en la aparición de estas dos proteínas oncogénicas y los factores ambientales, como la contaminación y la exposición a mutágenos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la posible relación entre la expresión de los oncogenes RET/PTC, TRK-T1, las proteínas ligadas a metástasis: NM23, CD44v6 y algunos datos clínicos, así como los subtipos histológicos de pacientes con Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT).

Se decidió utilizar las técnicas de Inmunohistoquímica y Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para la detección de la expresión tanto a nivel protéico de NM23 y CD44v6 como de transcritos de los proto-oncogenes *ret* y *trk* debido a varios aspectos. Las ventajas de la técnica inmunológica es primordialmente la utilización de tejido incluido en parafina para estudios retrospectivos (archivos patológicos), así como de la localización celular de las proteínas estudiadas. Una de las desventajas de esta técnica es su sensibilidad, ya que se necesita de cierta cantidad de proteína para su detección. Esta desventaja es cubierta por la RT-PCR, ya que con una mínima cantidad de transcritos de los genes estudiados, es posible amplificarlos y reconocer específicamente que tipo de mutación presentan, aunque la cantidad y calidad de RNA es fundamental para un resultado óptimo.

En lo que respecta a nuestros resultados, fue importante determinar la frecuencia con que se presentó la proteína RET, así como de sus rearrreglos específicos en las muestras de CPT en nuestro país, ya que en estudios

anteriores se ha observado una gran heterogeneidad en la activación de este proto-oncogén. Esta gran variabilidad se ha relacionado a varios aspectos: diferentes técnicas utilizadas, predisposición racial, exposición a factores carcinogénicos, alimentación, etc. En este estudio en particular, encontramos a la proteína RET en 23 muestras de 36 estudiadas lo que representa el 63.8%, mientras que el transcrito oncogénico de mayor frecuencia fue RET/PTC3 en 8 de 9 muestras estudiadas (88.9%). Este resultado fue muy interesante ya que demuestra que en la población mexicana la activación de este oncogén es muy común en comparación con otros estudios realizados en otros países. Al mismo tiempo, al comparar las características histológicas y el comportamiento de los tumores positivos o negativos en la expresión de este oncogén, se encontró que la activación de ret en los subtipos histológicos considerados de mal pronóstico fue casi 6 veces más frecuente (OR=5.87) que en los tumores con subtipos de buen pronóstico. En los pacientes que presentaron invasión y/o metástasis fue 2 veces más frecuente (OR=2.3) la activación de RET, y con lo que respecta al lugar de residencia fue 5 veces más frecuente su activación (OR=5.25) en los pacientes que viven en el Distrito Federal y área metropolitana que los del interior de la República. Estudios *in vitro* donde se transfectó el oncogén RET/PTC1 en cultivos primarios de células tiroideas, se observaron cambios morfológicos del tipo papilar, lo que indica una fuerte asociación de este oncogén y el CPT [59]. En nuestros análisis, RET/PTC sí parece estar implicado en la morfología de los CPT, y muy en particular con los subtipos histológicos de mal pronóstico. Otro dato interesante es la implicación de este oncogén en los tumores más invasivos y/o metastásicos, ya que en estudios de animales transgénicos el rearreglo

RET/PTC3 en particular, es el único que produce un tumor tiroideo del tipo papilar y al mismo tiempo presenta metástasis a ganglios linfáticos [60]. En nuestros resultados encontramos casi en la mayoría de los tumores estudiados el rearreglo RET/PTC3, lo que nos indicaría un comportamiento más agresivo de estos tumores en comparación con otros que tengan un rearreglo diferente. En cuanto al lugar de residencia de los pacientes, nos parecería muy interesante poder relacionar la exposición a contaminantes de los pacientes del Distrito Federal y área metropolitana y la aparición de este oncogén, pero debido a la falta de información y al tamaño de muestra es muy difícil poder llegar a relacionar estos dos eventos. Solo existen reportes muy claros de la aparición de estos rearreglos oncogénicos de ret y trk en niños expuestos a ciertas cantidades de Yodo 131 debido al accidente de la planta nuclear de Chernobyl en 1986 [34].

Por otra parte, la proteína TRK fue encontrada en 25 de las 36 muestras estudiadas, lo que representa el 69.4%. En la detección de su transcrito por RT-PCR, se encontró siempre una coincidencia en las inmunodetecciones como en la amplificación del transcrito de trk-T1. Este alto porcentaje de activación de trk-T1 junto con RET/PTC nos muestra la gran importancia que tienen estos dos oncogenes en la carcinogénesis de los tumores estudiados, y de esta forma apoya los estudios anteriores donde se resalta la activación de proteínas involucradas en la cascada de fosforilación en los tumores de la glándula tiroides. En cuanto a la comparación de las características histológicas, el comportamiento de los tumores y la expresión de trk-T1, se encontró que la activación de trk en los pacientes que presentaron invasión y/o metástasis fue casi 5 veces más frecuente

(OR=4.7) en comparación con los bien encapsulados; y con lo que respecta al lugar de residencia fue casi 4 veces más frecuente su activación (OR=3.81) en los pacientes que viven en el Distrito Federal y área metropolitana que los del interior de la República. Estos análisis también nos hablan de que este oncogén podría estar involucrado en el comportamiento del tumor junto con el oncogén RET/PTC ya que en reportes anteriores se ha visto una correlación entre la co-expresión de estos oncogenes y un pronóstico menos favorable para el paciente [61]. Al igual que en el análisis estadístico de ret, nos parecería interesante poder relacionar la exposición a contaminantes y mutágenos que podrían sufrir los pacientes del Distrito Federal y área metropolitana y la activación de trk-T1, pero debido a lo anteriormente explicado, es muy difícil poder llegar a relacionar estos factores ambientales y la mutación de un gen en particular.

En cuanto a los resultados obtenidos de las proteínas asociadas a metástasis, se detectó la proteína NM23 a nivel nuclear o citoplásmico en 15 de 27 muestras estudiadas lo que representa el 55.5%, mientras que en 12 muestras (44.5%) se localizó la proteína a nivel de membrana ó fueron completamente negativas para la inmunodetección. Aunque el anticuerpo utilizado puede reconocer tanto a la proteína NM23-H1 como a NM23-H2, la localización de la inmunotinción a nivel intracelular es importante ya que parece que la proteína NM23-H1 es la mayormente involucrada en los CPT debido a que se localiza en citoplasma o en membrana y es precisamente donde se ve un patrón diferencial de la expresión de este gen en los diferentes tumores estudiados. Este resultado respalda los reportes anteriores donde se le involucra mayormente a NM23-H1 en

la invasividad y metástasis de los tumores tiroideos del tipo papilar [46]. Al realizar el análisis estadístico, se encontró 5 veces más frecuente (OR=5.25) a esta proteína a nivel de membrana citoplásmica o su ausencia completa en los pacientes del sexo masculino en comparación del sexo femenino, lo que podría suponer mayor agresividad de los tumores en los pacientes varones. Hasta la fecha, no existe ningún reporte que apoye la relación entre la expresión de nm23 y el sexo del paciente, por lo que sería interesante realizar otro estudio más a fondo sobre esta proteína y su posible relación con el sexo del paciente.

Por último, se detectó a la proteína CD44v6 a nivel de membrana citoplásmica en 19 muestras de 26 estudiadas lo que representa el 73% de las muestras estudiadas. Este alto porcentaje apoya estudios anteriores donde se ha implicado esta variante en el proceso de metástasis en diferentes tumores, y una gran frecuencia particularmente en los CPT [62]. En los CPT, se ha reportado una desregulación en la maquinaria de splicing alternativo donde el aumento de la variante 6 en los histotipos papilares se presenta al mismo tiempo que la disminución de la CD44 estándar [52]. Otro dato muy interesante es la posible "mímica" del comportamiento de células tumorales del CPT con la migración de los linfocitos a ganglios linfáticos, ya que se ha visto una relación de CD44v6 como un marcador "homing" en estas células hematopoyéticas y al encontrarse también en las células metastásicas de CPT, podría ayudarnos a entender uno de los comportamientos tan característicos de metástasis a ganglios linfáticos que se presenta comúnmente en este tipo de tumores tiroideos [63]. En cuanto al análisis estadístico, se observó una frecuencia 2 veces mayor (OR=2.3) en la aparición de

CD44v6 y las muestras que presentaban invasión y/o metástasis. Otro dato fue encontrar a esta proteína 3 veces más frecuente (OR=2.86) en los pacientes menores de 50 años, en comparación con los pacientes de mayor edad. Estos resultados nos indican una posible relación entre la presencia de CD44v6 y el comportamiento del tumor, lo que apoyaría la importancia que tiene esta molécula en la agresividad de los CPT. Hasta el momento no existe ningún reporte donde se relacione la edad del paciente y la aparición de esta variante, pero sería importante realizar estudios más a fondo y con un mayor número de muestras para poder aseverar la existencia de esta relación. Solamente parece existir cierta relación en cuanto a la edad de los paciente con CPT y los oncogenes ret y trk en algunos reportes anteriores [57], aunque en este estudio en particular no observamos dicha relación.

Aunque en este estudio se trabajó con un número de muestras no lo suficientemente amplia como para ser estadísticamente significativa (ya que el valor de p fue mayor a 0.05 en todos los casos), sí nos permite tener una idea parcial, así como un patrón diferencial sobre la posible participación de estos genes en este particular tipo de neoplasia tanto en su morfología histológica como en su comportamiento.

Al analizar todos los resultados anteriores, podemos llegar a tener un panorama más amplio sobre la importancia de ciertos oncogenes y proteínas asociadas a metástasis y su interacción con las características morfológicas y de comportamiento de los CPT. Trabajos donde puedan estudiarse al mismo tiempo

varios genes involucrados en diferentes mecanismos moleculares son de mucha importancia debido a que pueden observarse posibles cooperaciones entre ellos ya sea de forma directa o indirectamente, y así poder utilizarlos posteriormente como marcadores pronóstico a nivel molecular. Finalmente, todos los conocimientos obtenidos deben de poder ser útiles para los clínicos y así poder ayudar al paciente que es la meta primordial.

ANEXO

En forma paralela al presente trabajo, se realizó el análisis de alteraciones cromosómicas de las muestras de CPT mediante la técnica de CGH. En estudios anteriores los cuales analizaron diferentes tumores de CPT de pacientes que no estuvieron expuestos a radiaciones, se detectaron pocos desbalances cromosómicos, encontrándose fundamentalmente ganancias cromosómicas en los brazos y cromosomas 1q, 5q, 7, 17 y 21q [14]. Para el caso de pacientes expuestos a radiaciones ya sea por radioterapias o por accidentes nucleares, las alteraciones se incrementan tanto en ganancias como pérdidas donde se involucran los cromosomas 1, 2, 9, 13 y dos sitios calientes en el 1q y 10q [15]. En este momento, nuestros resultados preliminares (obtenidos en colaboración con el Dr. Mario Hermsem de la Vrije Universitat en Ámsterdam, Holanda) en el estudio de los desbalances cromosómicos de 6 CPT, observamos las siguientes alteraciones cromosómicas: ganancias en los cromosomas 4, 6q y pérdidas en 1p, 9q, 16p, 19 y 22q (Figura 5). Estos resultados son muy interesantes, ya que coinciden más con los encontrados en estudios de pacientes expuestos a radiación, aunque los pacientes estudiados no tienen ningún antecedente de tratamientos radioterapéuticos o exposición a radiaciones no controladas. También resulta importante remarcar que la frecuencia de pacientes estudiados que tienen el oncogen RET/PTC es casi la misma que en estudios de pacientes expuestos a radiaciones. Esta diferencia en los resultados podría ser debida a diversos factores tales como: diferencia en razas (background genético), factores ambientales no detectados (o que pasen desapercibidos) entre otros.

CONCLUSIONES

- 1.- Existe una alta expresión de los oncogenes ret y trk en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo (CPT) obtenidas del Hospital de Oncología, CMN SXXI y de Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, en comparación con otras poblaciones.
- 2.- Se encontró el transcrito oncogénico RET/PTC3 en casi la mayoría de las muestras de Carcinoma Papilar de Tiroides.
- 3.- Se detectó una co-expresión de los oncogenes ret y trk en casi la mitad de los Carcinomas Papilares de tiroides estudiados.
- 4.- Se encontró una localización diferencial a nivel intracelular de la proteína NM23 en los diferentes carcinomas papilares tiroideos.
- 5.- Existe una expresión de la proteína asociada a metástasis CD44v6 a nivel de membrana plasmática en la mayoría de las muestras de carcinoma papilar de tiroides.
- 6.- La aparición de la proteína RET fue casi 6 veces mayor en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo con un subtipo histológico de mal pronóstico, que en los subtipos de buen pronóstico.

7.- La aparición de las proteínas RET, TRK y CD44v6 fue mayor en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo que presentaron invasión y/o metástasis, en comparación con los tumores bien encapsulados o microcarcinomas.

8.- La aparición de la proteína CD44v6 fue casi 3 veces mayor en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo de pacientes menores de 50 años, que en pacientes con mayor edad.

9.- La aparición de la proteína NM23 fue 5 veces mayor en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo de pacientes del sexo masculino, que en pacientes del sexo femenino.

10.- La aparición de las proteínas RET y TRK fue mayor en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo de pacientes radicados en el Distrito Federal y área metropolitana, que en pacientes del interior de la República.

TABLA 1

NÚMERO	CLAVE	SEXO	EDAD (años)	PROCEDENCIA	SUBTIPO HISTOLÓGICO	COMPORTAMIENTO TUMORAL
1	130-96	F	45	Guerrero	Típico	Invasión y metástasis
2	132-96	F	77	D.F.	Típico	Invasión y metástasis
3	210-96	F	60	Metepéc Méx.	Patrón Folicular	Metástasis
4	212-96	M	58	D.F.	Típico	Sin invasión o metástasis
5	214-96	F	52	D.F.	Cambios oxifílicos	Invasión y metástasis
6	215-96	M	64	Michoacán	Patrón Folicular	Sin invasión o metástasis
7	437-97	F	72	D.F.	Típico	Invasión y metástasis
8	438-97	M	71	D.F.	Típico	Invasión
9	439-97	F	34	D.F.	Típico	Invasión
10	441-97	F	33	Edo. de México	Típico	Invasión
11	442-97	F	53	D.F.	Patrón Folicular	Invasión
12	443-97	F	47	D.F.	Patrón Folicular	Metástasis
13	446-97	M	33	D.F.	Cambios oxifílicos	Sin invasión o metástasis
14	450-97	F	46	Edo. de México	Células altas	Sin invasión o metástasis
15	451-97	F	78	Guerrero	Típico	Sin invasión o metástasis
16	452-97	F	69	Edo. de México	Células altas	Metástasis
17	453-97	F	38	D.F.	Típico	Invasión y metástasis
18	457-97	F	51	D.F.	Cambios oxifílicos	Invasión
19	458-97	F	41	Edo. de México	Típico	Invasión y metástasis
20	459-97	F	44	D.F.	Típico	Invasión y metástasis
21	460-97	F	28	D.F.	Típico	Invasión y metástasis
22	463-97	F	29	D.F.	Cambios oxifílicos	Invasión
23	464-97	F	51	D.F.	Células altas	Invasión
24	Q97-1981	F	54	D.F.	Típico	Invasión
25	Q97-978	F	33	D.F.	Patrón Folicular	Invasión y metástasis
26	Q97-58	F	S.I.	S.I.	Típico	S.I.
27	Q97-91	F	S.I.	S.I.	Típico	S.I.
28	Q97-172	F	38	D.F.	Típico	Sin invasión o metástasis
29	Q97-159	F	32	Edo. de México	Típico	Invasión
30	Q97-806	F	S.I.	S.I.	Típico	S.I.
31	Q97-1470	F	71	Guerrero	Cambios oxifílicos	Invasión
32	Q98-1083	F	36	Aguascalientes	Típico	Invasión
33	Q98-1106	F	23	D.F.	Patrón Folicular	Sin invasión o metástasis
34	Q98-67	S.I.	S.I.	S.I.	Típico	S.I.
35	Q98-105	M	28	Puebla	Células altas	Invasión
36	Q98-1268	F	19	Oaxaca	Típico	Sin invasión o metástasis

Sexo: F= Femenino; M= Masculino

S.I.= Sin Información.

TABLA 2

	Número de casos	RET + (%)	TRK + (%)	NM23 nuclear o citoplasma + (%)	NM23 membrana + o negativo (%)	CD44v6 + (%)
SEXO						
Mujer	30	20/30 (66.6%)	21/30 (70%)	14/22 (64%)	8/22 (36%)	16/22 (73%)
Hombre	5	2/5 (40%)	3/5 (60%)	1/4 (25%)	3/4 (75%)	2/3 (66.6%)
GRUPO DE EDADES						
< 50	12	8/12 (66.6%)	9/12 (75%)	6/11 (54%)	5/11 (46%)	10/12 (83.3%)
≥ 51	13	8/13 (62%)	10/13 (77%)	7/13 (54%)	6/13 (46%)	7/11 (63.6%)
PROCEDENCIA						
D.F y Area Metropolitana	24	8/24 (75%)	18/24 (73%)	9/19 (48%)	10/19 (52%)	13/18 (72.2%)
Interior de la República	8	1/8 (12.5%)	4/8 (50%)	4/4 (100%)	0 (0%)	3/4 (75%)
SUBTIPOS HISTOLÓGICOS						
Típico y patrón Folicular	26	15/26 (58%)	18/26 (70%)	10/20 (50%)	10/20 (50%)	15/20 (75%)
Células Altas y Oxifílicas	9	8/9 (89%)	7/9 (78%)	5/7 (71%)	2/7 (29%)	4/6 (66.6%)
COMPORTAMIENTO TUMORAL						
Bien encapsulado	8	4/8 (50%)	4/8 (50%)	3/5 (60%)	2/5 (40%)	3/5 (60%)
Invasión y/o metástasis	23	16/23 (70%)	19/23 (83%)	10/19 (52%)	9/19 (48%)	14/18 (78%)

REFERENCIAS

- 1.-Weinberg A.R. (1996) How cancer arises. *Scientific American* 275: 32-40.
- 2.-Trichopoulos D., Li P.F. and J.D. Hunter (1996) What causes cancer. *Scientific American* 275: 50-57.
- 3.-Bishop M.J. (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311.
- 4.-Lewin B. (1994) *Genes V*. Oxford University Press, USA. Capítulo 39, 1181-1185pp.
- 5.-Pardo M.J. (1992) *Anatomía patológica especial*. Doyma, Barcelona España. 1055p.
- 6.-Robbins S.L., Contran R.S. and V. Kumar (1994) *Pathologic basis of disease*. W.B. Saunders Co., USA. 1400p.
- 7.-Flores F. y A. Cabeza de Flores (1990) *Endocrinología*. Méndez Cervantes, México. 639p.
- 8.- Goodfellow P. and SA. Well (1995) Review. Ret gene and its implications for cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 1515- 1523.
- 9.-Kuri P., Mendez R., Macías C.G., De la Garza J.G., Mohar A., Meneses A., Ángeles A., Chávez L. y R.L. Fernández (1997) *Registro Histopatológico de Neoplasias en México*. Dirección General de Epidemiología, México. 157p.

10.- Szanto J., Vincze B., Sinkovics I., Karika Z., Daubner K., Peter I., Kazatsav I. and S. Eckhardt (1989) Postoperative thyroglobulin level determination to follow up patients with highly differentiated thyroid cancer. *Oncology* 46: 99-104.

11.- Takahashi M., Ritz J. and GM. Cooper (1985) Activation of a novel human transforming gene RET by DNA rearrangement. *Cell* 42: 581-588.

12.- Carney JA., Ryan J. and JR. Goellner (1987) Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 11: 583-591.

13.- Johnson TL., Lloyd RV., Thompson NW., Beierwaltes WH. And JC. Sisson (1988) Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 12: 22-27.

14.- Hemmer S., Wasenius VM., Knuutila S., Franssila K. and H. Joensuu (1999) DNA Copy Number Changes in Thyroid Carcinoma. *Am J Pathol* 154: 1539-1547.

15.- Zitzelsberger H., Lehmann L., Hieber L., Weier HUG., Janish C., Fung J., Negele T., Spelsberg F., Lengfelder E., Demidchik EP., Salassidis K., Kellerer AM., Werner M. and M. Bauchinger. (1999) Cytogenetic Changes in Radiation-induced Tumors of the Thyroid. *Cancer Res* 59: 135-140.

16.- Grieco M., Santoro M., Berlingieri MT., Donghi R., Pierotti MA., Della Porta G., Fusco A. and G. Vecchio (1988) Molecular cloning of PTC, a new oncogene found

activated in human thyroid papillary carcinoma and their lymph node metastases. Ann NY Acad Sci 551: 380-381.

17.- Worby CA., Vega QC., Zhao Y., Chao HJ., Seas Holtz AF. And JE. Dixon (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the ret receptor and activates mitogen-activated protein kinase. J Biol Chemistry 271: 23619-23622.

18.- Ceccherini I., Bocciardi R., Yin L., Pasini B., Hofstra RMW., Takahashi M. and G. Romeo (1993) Exon structure and flanking intronic sequences of the human ret proto-oncogene. Biochem Biophys Res Comm 196: 1288-1295.

19.- Ishizaka Y., Kobayashi S., Ushijima T., Sugimura T. and M. Nagao (1991) Detection of RET TPC/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. Oncogene 6: 1667-1672.

20.- Jhiang SM., Caruso DR. and GL. Mazzaferri (1991) Detection of the PTC oncogene in human thyroid cancers. Clin Res 39: 376A.

21.- Santoro M., Carlomagno F., Hay ID., Herrmann MA., Grieco M., Melillo R., Pierotti MA., Bongarzone I., Della Porta G., Berger N., Peix JL., Paulin CH., Fabien N., Vecchio G., Jenkins RB. and A. Fusco (1992) Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. J Clin Invest 89: 1517-1522.

22.- Wajjwalku W., Nakamura S., Hasegawa Y., Miyazaki K., Satoh Y., Funahashi H., Matsuyama M. and M. Takahashi (1992) Low frequency of rearrangements of the RET and TRK proto-oncogene in japanese thyroid papillary carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 83: 671-675.

23.- Ishizaka Y., Itoh F., Tahira T., Ikeda I., Sugimura T. and J. Tucker (1989) Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene* 4: 1519-1521.

24.- Bongarzone I., Monzini N., Borrello MG., Carcano C., Ferraresi G., Arighi E., Mondellini P., Della Porta G. and MA. Pierotti (1993) Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of ret tyrosine kinase and the regulatory subunit R1 α of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol* 13: 358-360.

25.- Santoro M., Dathan NA., Berlingieri MT., Bongarzone I., Paulin C., Grieco M., Pierotti MA., Vecchio G. and A. Fusco (1994) Molecular characterization of RET/PTC3, a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* 9: 509-516.

26.- Fabien N., Paulin C., Santoro M., Berger N., Grieco M., Galvain D., Barbier Y., Dubois PM. and A. Fusco (1992) Detection of the ret oncogene activation in

human papillary thyroid carcinomas by in situ hybridisation. Br J Cancer 66: 1094-1098.

27.- Lanzi C., Borrello MG., Bongarzone I., Migliazza A., Fusco A., Grieco M., Santoro M., Gambetta RA., Zunino F., Della Porta G. and MA. Pierotti (1992) Identification of the product of two oncogenic re-arranged forms of the ret proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. Oncogene 7: 1189-1194.

28.- Farid NR., Shi Y. and M. Zou (1994) Molecular basis of thyroid cancer. Endocr Rev 15: 202-232.

29.- Pulciani S., Santos E., Lauver AV., Long LK., Aaronson SA. and M. Barbacid (1982) Oncogenes in solid human tumors. Nature 300: 539-42.

30.- Martin-Zanca D., Barbacid M. and LF. Parada (1990) Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. Genes Devel 4: 683-694.

31.- Weier HU., Rhein AP., Shadravan F., Collins C. and D. Polikoff (1995) Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence *in Situ* hybridization (FISH), and computer-assisted microscopy. Genomics 26: 390-393.

32.- Indo Y., Tsuruta M., Hayashida Y., Karim MA., Otha K., Kawano T., Mitsubuchi H., Tonoki H., Awaya Y. And I. Matsuda (1996) Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. Nat Genet 13: 485-8.

33.- Borrello MG., Pelicci G., Arighi E., De Filippis L., Greco A., Bongarzone I., Rizzetti MA., Pelicci PG. And MA. Pierotti (1994) The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine Kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. Oncogene 9: 1661-1668.

34.- Beimfohr C., Klugbauer S., Demidchik EP., Lengfelder E. And HM. Rabes (1999) NTRK1 re-arrangement in papillary thyroid carcinomas of children after the chernobyl reactor accident. Int J Cancer 80: 842-847.

35.- Bertheau P., De la Rosa A., Steeg PS. and MJ. Merino (1994) NM23 protein in neoplastic and nonneoplastic thyroid tissues. Am J Pathol 145: 26-32.

36.- Steeg PS., Bevilacqua G., Kopper L., Thorgeirsson UP., Talmadge JB., Liotta LA. and ME. Sobel (1988) Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potencial. J Natl Cancer Inst 80: 200-204.

37.- Rosengard AM., Krutzsch HC., Shearn A., Biggs JR., Barker E., Margulies IMK., King CK., Liotta LA. And PS. Steeg (1989) Reduced NM23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant *drosophila* development. Nature 342: 177-180.

38.- Stahl JA., Leone A., Rosengard AM., Porter L., King CR. and PS. Steeg (1991) Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 51: 445-449.

39.- Cipollini G., Berti A., Fiore L., Rainaldi G., Basolo F., Merlo G., Bevilacqua G. And MA. Caligo (1997) Down-regulation of the nm23.h1 gene inhibits cell proliferation. *Int J Cancer* 73: 297-302.

40.- Tsuiki H., Nitta M., Furuya A., Hanai N., Fujiwara T., Inagaki M., Kochi M., Ushio Y., Saya H. and H. Nakamura (1999) A novel human nucleoside diphosphate (NDP) kinase, Nm23-H6, localizes in mitochondria and affects cytokinesis. *J Cell Biochem* 2: 254-69.

41.- Urano T., Furukawa K. and H. Shiku (1993) Expression of NM23/NDP proteins on the cell surface. *Oncogene* 8: 1371-1376.

42.- Webb PA., Perisic O., Mendola CHE., Backer JM. And RL. Williams (1995) The crystal structure of a human nucleoside diphosphate kinase, NM23-H2. *J mol Biol* 251: 574-587.

43.- Leone A., Seeger RC., Hong CM., Hu YY., Arboleda MJ., Brodeur GM., Stram D., Slamon DJ. and PS. Steeg (1993) Evidence for nm23 RNA over expression,

48.- Kainz CH., Kohlberger P., Sliutz G., Tempfer C., Heinzl H., Reinthaller A., Breitenecker G. and H. Koelbl(1995) Splice variants of CD44 in human Cervical Cancer Stage IB to IIB. *Gynecol Oncol* 57: 383-387.

49.- Tölg C., Hofmann M., Herrlich P. and H. Ponta (1993) Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids Res* 21: 1225-1229.

50.- Weber GF., Ashkar S., Glimcher MJ and H. Cantor (1996) Receptor-ligand interaction between CD44 and Osteopontin (Eta-1). *Science* 271: 509-512.

51.- Figge J., Del Rosario AD., Gerasimov G., Dedov I., Bronstein M., Troshina K., Alexandrova G., Kallakury BVS., Bui HX., Bratslavsky G. and JS. Ross (1994) Preferential Expression of the cell adhesion molecule CD44 in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol* 61: 203-211.

52.- Ermak G., Gerasimov G., Troshina K., Jennings T., Robinson L., Ross JS. and J. Figge (1995) Deregulated alternative splicing of CD44 messenger RNA transcripts in neoplastic and nonneoplastic lesions of the human thyroid. *Cancer Res* 55: 4594-4598.

53.- Kurozumi K., Nakao K., Nishida T., Nakahara M., Ogino N. and M. Tsujimoto (1998) Significance of biologic aggressiveness and proliferating activity in papillary thyroid carcinoma. *World J surg* 22: 1237-1242.

- 54.- Chomczynski P., and Sacchi N.(1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- 55.- Viglietto G., Chiappetta G., Martínez-Tello FJ., Fukunaga FH., Tallini G., Rigopoulou D., Visconti R., Mastro A., Santoro M. and A. Fusco (1995) RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene* 11: 1207-1210.
- 56.- Kawasaki ES. (1990) A guide to methods and applications. In PCR protocols amplification of RNA. Academic Press, Inc. San Diego USA, 21-38 pp.
- 57.- Bongarzone I., Fugazzola L., Vigneri P., Mariani L., Mondellini P., Pacini F., Basolo F., Pinchera A., Pilotti S. and MA. Pierotti (1996) Age related activation of tyrosine-kinase receptor proto-oncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocr Metabol* 81: 2006-2009.
- 58.- Nakamura T., Ishizaka Y., Nagao M., Hara M. and T. Ishikawa (1994) Expression of the ret proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. *J Pathol* 172: 255-260.
- 59.- Fischer AH., Bond JA., Taysavang P., Battles OE. and D Wynford-Thomas (1998) Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure. *Am J Pathol* 153: 1443-1450.

60.- Powell DJ., Russell J., Nibu K., Li G., Rhee E., Liao M., Goldstein M., Keane WM., Santoro M., Fusco A. and JL. Rothstein (1998) The RET/PTC3 oncogene: Metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res* 58: 5523-5528.

61.- Bongarzone I., Vigneri P., Mariani L., Collini P., Pilotti S. and MA. Pierotti (1998) RET/NTRK1 Rearrangements in thyroid gland tumors of the papillary carcinoma family: Correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 4: 223-228.

62.- Ermak G., Jennings T., Robinson L., Ross JS. and J Figge (1996) Restricted Patterns of CD44 variant exon expression in human papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 56: 1037-1042.

63.- Arch R., Wirth K., Hofmann M., Ponta H., Matzku S., Herrlich P. and M. Zoller (1992) Participation in normal immune responses of a metastasis-inducing splice variant of CD44. *Science* 257: 682-685.