

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Molecular

CÁNCER DEL EPITELIO FOLICULAR TIROIDEO.
IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS BIOLÓGICOS,
MARCADORES MOLECULARES Y NUEVAS DIANAS
TERAPÉUTICAS.

TESIS DOCTORAL

CRISTINA MONTERO CONDE

Madrid, 2008

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS

Programa de Genética del Cáncer Humano
Grupo de Cáncer Endocrino Hereditario

Directores:

Dra. Mercedes Robledo

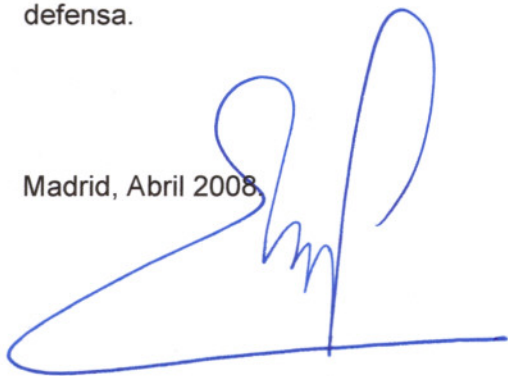
Dr. Dídac Mauricio

La Dra. Mercedes Robledo Batanero, jefa del grupo de Cáncer Endocrino Hereditario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, y el Dr Dídac Mauricio, jefe de Endocrinología del Hospital de Arnau de Vilanova,

CERTIFICAN: que Dña Cristina Montero Conde ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: *Cáncer del Epitelio Folicular Tiroideo. Identificación de Procesos Biológicos, Marcadores Moleculares y Nuevas Dianas Terapéuticas.*

Revisado el presente trabajo consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, Abril 2008.



Vº Bº del Director y Tutor de la Tesis:
Mercedes Robledo



Vº Bº del Codirector:
Dídac Mauricio

Estimados Señores,

Como jefa del grupo de Cáncer Endocrino Hereditario del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas y profesora honoraria de la Universidad Autónoma de Madrid, certifico que Dña Cristina Montero Conde ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título: *Cáncer del Epitelio Folicular Tiroideo. Identificación de Procesos Biológicos, Marcadores Moleculares y Nuevas Dianas Terapéuticas*. Los resultados de esta Tesis relativos a la firma molecular de pronóstico, fueron presentados en el 31st *Annual Meeting of European Thyroid Association*, y los correspondientes a la identificación de marcadores asociados a mutaciones tempranas y a la transición de adenoma a carcinoma folicular, serán presentados en el 33st *Annual Meeting of European Thyroid Association*. Este trabajo de Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Montero-Conde C**, Martín-Campos JM, Lerma E, Gimenez G, Martínez-Guitarte JL, Combalía N, Montaner D, Matías-Guiu X, Dopazo J, de Leiva A, Robledo M, Mauricio D. *Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information*. *Oncogene*. 2008 Mar 6;27(11):1554-61. Epub 2007 Sep 17. Premio GENZYME 2008 sobre Cáncer de Tiroides de la Fundación SEEN (Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición) y Mención de Honor en la Cuarta Edición del PREMIO SERGIO VIDAL para Investigadores Jóvenes en Biomedicina.
- Chiappetta G, De Marco C, Quintiero A, Califano D, Gherardi S, Malanga D, Scrima M, **Montero-Conde C**, Cito L, Monaco M, Motti ML, Pasquinelli R, Agosti V, Robledo M, Fusco A, Viglietto G. *Overexpression of the S-phase kinase-associated protein 2 in thyroid cancer*. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Jun;14(2):405-20.

En este momento Cristina Montero Conde está preparando otro manuscrito:

Montero-Conde C, Lerma E, Landa I, Giménez G, Combalía N, Montaner D, Letón R, Matías-Guiu X, Dopazo J, Mauricio D y Robledo M. *Functional profiling specifically related to BRAF, NRAS or RETPTC1 positive thyroid tumours of the follicular epithelia. [In progress]*

Cristina Montero ha desarrollado su actividad con gran responsabilidad, eficacia y entusiasmo. Su enorme inquietud, y su incansable búsqueda de conocimiento han propiciado en parte que una de las publicaciones haya sido merecedora del primer premio 2008 de la *Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición*, y de la mención de Honor del *Premio Vidal*. Por todos estos motivos y habiendo revisado el presente trabajo, considero que éste tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, Abril 2008.

Vº Bº del Director y Tutor de la Tesis:

Dra. Mercedes Robledo

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the bottom.

CÁNCER DEL EPITELIO FOLICULAR TIROIDEO.
IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS BIOLÓGICOS,
MARCADORES MOLECULARES Y NUEVAS DIANAS
TERAPÉUTICAS.

AGRADECIMIENTOS

Tengo que empezar los agradecimientos diciendo que si la vida es cuestión de suerte, yo me considero una persona afortunada. Conocí el CNIO gracias a que Orlando Domínguez me dio la oportunidad de realizar unas prácticas de laboratorio en el verano de 2002 junto con un gran grupo de profesionales. Después, una foto del *Annual Report* de ese mismo año, el sí de Mercedes Robledo y la concesión de una beca por parte del Gobierno Vasco, hicieron posible mi formación predoctoral en el grupo de Cáncer Endocrino Hereditario.

En estos cuatro años y pico, los miembros del Programa de Genética del Cáncer Humano me han enseñado mucho: técnicas, conocimientos sobre biología molecular, genética, cáncer,..., inglés, e incluso castellano gracias a las múltiples procedencias de los compañeros del Programa y a los debates casi diarios sobre palabras y dichos populares (y consiguientes comprobaciones en el diccionario de la RAE). Por todo esto, por vuestro compañerismo y generosidad, muchísimas gracias.

Especialmente tengo que agradecer al grupo de Cáncer Endocrino Hereditario: Alberto, Rocío, Cristina, Susanna, Íñigo, Elena, Javi y Meme, y a los que un día lo fueron: “la niña” Fátima, Sergio, Ruth y Emi (que aunque no fue formalmente de Endocrino, compartió con nosotros laboratorio, conocimientos y un sentido del humor único), que hayáis soportado pacientemente mis despistes, ruiditos y demás día a día, y que me hayáis ayudado en todo momento. Me habéis enseñado lo más difícil de todo, me habéis enseñado a aprender y me habéis enriquecido personalmente muchísimo. No os imagináis cuánto os voy a echar de menos.

Meme, no sólo me diste la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral, sino que me diste la oportunidad de conocer a Sergio. He disfrutado trabajando en tu grupo, te debo mucho.

Finalmente, gracias a Dídac Mauricio por sus consejos, comentarios y aclaraciones, y a los Departamentos de Endocrinología y Anatomía Patológica de los Hospitales de la Santa Creu i Sant Pau, Sabadell y Arnau de Vilanova (especialmente a Xavier Matías Guiu), así como a la Red de Bancos de Tumores coordinada por el CNIO y al grupo de bioinformática del CIPF, por hacer posible este trabajo de Tesis Doctoral.

Financiación del doctorando: Beca de Formación de Investigadores del Gobierno Vasco (BFI03.250).

*A Sergio y a mi familia
por su dedicación y apoyo incondicional*

ÍNDICE

ABSTRACT.....	9
ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 TIROIDES. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA. CONCEPTOS GENERALES.	15
1.2 CÁNCER DE TIROIDES.....	16
1.2.1 Aspectos generales.....	16
1.2.2 Diagnóstico.....	17
1.2.3 Carcinoma Papilar de Tiroides (PTC).....	19
1.2.3.1 <i>La variante folicular (FVPTC)</i>	20
1.2.3.2 <i>La variante esclerosante difusa (DSV)</i>	20
1.2.3.3 <i>La variante de células altas (TCV)</i>	20
1.2.4 Carcinoma Folicular de Tiroides (FTC).....	23
1.2.5 Carcinoma Anaplásico de Tiroides (ATC) o carcinoma indiferenciado de tiroides.	26
1.2.6 Carcinoma Pobremente Diferenciado de Tiroides (PDTC).	29
1.2.7 Cáncer de tiroides del epitelio folicular asociado a síndromes hereditarios	32
1.2.7.1 <i>Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) o Síndrome de Gardner</i>	32
1.2.7.2 <i>Síndrome de Cowden</i>	33
1.2.7.3 <i>Complejo de Carney</i>	33
1.3 TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO DEL CÁNCER DEL EPITELIO FOLICULAR TIROIDEO: PRESENTE Y FUTURO.	34
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	41
3.1 PACIENTES Y DATOS CLÍNICOS.	43
3.2 AISLAMIENTO DEL ARN.....	45
3.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS TEMPRANAS ASOCIADAS A LAS DIFERENTES PATOLOGÍAS TIROIDEAS.	46
3.3.1 Extracción del ADN de tejido congelado.	46
3.3.2 Cuantificación del ADN extraído.	47
3.3.3 Caracterización de las mutaciones puntuales en <i>BRAF</i> , <i>HRAS</i> , <i>NRAS</i> y <i>KRAS</i>	47
3.3.4 Estudio de los reordenamientos <i>RET/PTC1</i> , <i>RET/PTC3</i> y <i>PAX8/PPARγ</i>	49
3.3.5 Purificación de los fragmentos amplificados mediante PCR.	53
3.3.6 Secuenciación de los fragmentos purificados.	53
3.4 OBTENCIÓN DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE LAS MUESTRAS AISLADAS: AMPLIFICACIÓN DEL ARN MENSAJERO, MARCAJE, HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN.	54
3.4.1 Amplificación del ARN mensajero.....	54
3.4.2 Marcaje del ADN complementario a partir del ARN amplificado (ARNa).....	57
3.4.3 Hibridación y detección.....	60
3.4.4 La matriz de expresión Oncochip 12K.	62
3.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN OBTENIDOS CON LA PLATAFORMA ONCOCHIP 12K.....	63
3.5.1 Normalización y preprocesado de los datos de expresión.....	64
3.5.2 Identificación de los genes cuyos cambios de expresión se asocian a la pérdida de diferenciación y al aumento de la agresividad de los carcinomas tiroideos.	64
3.5.3 Perfil funcional del proceso de pérdida de diferenciación.	65
3.5.4 Identificación de un “predictor” de prognosis clínica.	67
3.5.5 Determinación de redes génicas asociadas de forma específica a las mutaciones tempranas más frecuentes de los tumores tiroideos.....	68

3.5.6	Identificación de genes involucrados en la evolución del adenoma folicular a carcinoma folicular tiroideo.....	69
3.6	VALIDACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA MATRIZ DE EXPRESIÓN ONCOCHIP 12K. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-PCR) Y BÚSQUEDAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
4	RESULTADOS.....	71
4.1	ESTUDIO DE LAS MUTACIONES TEMPRANAS.....	73
4.2	PERFIL DE EXPRESIÓN ESPECÍFICO DE CADA UNA DE LAS MUTACIONES TEMPRANAS ESTUDIADAS.	74
4.3	ESTUDIO DE LOS INTERACTOMAS PROTEICOS DEPENDIENTES DE LA MUTACIÓN TEMPRANA.....	88
4.4	DIFERENCIAS ENTRE EL CARCINOMA FOLICULAR Y EL ADENOMA FOLICULAR DE TIROIDES.....	89
4.5	GENES CUYOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN SE ASOCIAN A LA PÉRDIDA DE DIFERENCIACIÓN DE LOS TUMORES TIROIDEOS.....	93
4.6	PERFIL FUNCIONAL: RUTAS Y FAMILIAS GÉNICAS RELACIONADAS CON LA PROGRESIÓN Y MALIGNIDAD DEL CÁNCER DE TIROIDES.....	94
4.7	UN CLASIFICADOR DE PRONÓSTICO CLÍNICO PARA LOS TUMORES BIEN DIFERENCIADOS.....	96
4.8	VALIDACIÓN DE LOS DATOS DE EXPRESIÓN GÉNICA OBTENIDOS CON EL ONCOCHIP 12K.....	98
5	DISCUSIÓN.....	101
5.1	LAS MUTACIONES TEMPRANAS SE CORRELACIONAN CON LAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE LOS TUMORES TIROIDEOS Y DESVELAN EL ORIGEN DE LOS TUMORES POBREMENTE DIFERENCIADOS Y ANAPLÁSICOS.....	103
5.2	EL ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE ACUERDO A LA MUTACIÓN TEMPRANA, REVELA MARCADORES Y REDES PROTEICAS ESPECÍFICAMENTE RELACIONADOS CON LAS ALTERACIONES ESTUDIADAS.....	105
5.3	EL ESTUDIO DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE ACUERDO CON LA MUTACIÓN TEMPRANA REVELA UNA PROXIMIDAD GENÉTICA DE LA VARIANTE FOLICULAR DE LOS PTC A LOS FTC Y FA.....	109
5.3.1	La expresión diferencial de marcadores concretos determina eventos relacionados con la transición Adenoma Folicular a Carcinoma Folicular Tiroideo.....	111
5.4	DETERMINACIÓN DE PROCESOS Y MARCADORES GÉNICOS INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN Y PÉRDIDA DE DIFERENCIACIÓN DE LOS CARCINOMAS TIROIDEOS DEL EPITELIO FOLICULAR. NUEVAS POSIBILIDADES TERAPÉUTICAS.....	113
5.4.1	Los perfiles de expresión y el enriquecimiento funcional identifican las bases moleculares del proceso de pérdida de diferenciación de los tumores tiroideos.....	113
5.4.2	El análisis funcional y de las familias génicas revela rutas moleculares relacionadas con la progresión del cáncer de tiroides.....	114
5.4.3	Identificación de una firma molecular de pronóstico clínico para los tumores del epitelio folicular tiroideo.....	116
5.4.4	Implicaciones clínicas de los resultados.....	117
6	CONCLUSIONES.....	119
7	BIBLIOGRAFÍA.....	123
8	PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS.....	135
9	OTRAS PUBLICACIONES.....	163

ABSTRACT

Background

Well-differentiated thyroid carcinoma includes two subtypes: papillary carcinoma (PTC) and follicular carcinoma (FTC). Both subtypes are characterised by the presence of early mutations in genes involved in the RET/RAS/BRAF/MAPK signalling cascade. However, the molecular events which determine the histology and aetiology of each tumour class are still unknown. In addition, FTC can occur from a pre-existing follicular adenoma (FA), and it has been described that both pathologies share cytological and molecular features. This fact makes it difficult to distinguish between them preoperatively in the clinical setting. On the other hand, anaplastic thyroid carcinoma (ATC) is an undifferentiated neoplasia that commonly arises from dedifferentiation of previous well-differentiated carcinoma. ATC is one of the most aggressive solid malignancies, with a median survival of 4 to 12 months from the time of diagnosis. Despite new treatment strategies, this tumour still has a fatal outcome and requires innovative approaches leading to effective therapies. Thus, improved knowledge of the molecular basis of each thyroid tumour type could resolve these clinical problems and improve patient management and prognosis.

Aims

To identify molecular events involved in thyroid carcinogenesis and dedifferentiation and to determine the gene expression changes specifically associated with the early mutation type of thyroid tumours and the different histological subtypes. As a secondary objective, this work aimed to identify an expression profile related to poor prognosis.

Samples and Methods

57 thyroid tumours (7 anaplastic, 6 poorly-differentiated, 7 FTC, 24 PTC, 13 FA) and 3 normal tissue samples were firstly characterized for the presence of some of the early mutations related to thyroid tumorigenesis (RAS, BRAF, RET rearrangement or PAX8/PPARgamma translocation). They were then hybridized using the CNIO cDNA microarray (Oncochip 12K) platform. The expression profile data were analyzed with GEPAS software and additional bioinformatic tools according as required.

Results and Conclusions

A profile of 38 genes exhibited expression differences between FTC, FA and normal tissue (N). These genes are potentially involved in the transition from FA to FTC. One of these genes was *PTEN*, which has previously been related to FTC. It presented a significant under-expression for FTC and FA *versus* N, with the reduction of *PTEN* expression level being more severe in FTC than in FA. On the other hand, we detected specific gene regulation changes for each early mutation present in our series, and interestingly, a significant functional connection was identified within the specifically under-expressed gene set in NRAS positive tumours. In addition, a comparison of transcriptome between dedifferentiated and well-differentiated thyroid tumors identified 1,031 genes with >2-fold difference in absolute values and false discovery rate of <0.15. According to known molecular interaction and reaction networks, the products of these genes were mainly clustered in the MAPkinase signaling pathway, the TGF- β signaling pathway, focal adhesion and cell motility, activation of actin polymerization and cell cycle. An exhaustive search in several databases allowed us to identify various members of the matrix metalloproteinase, melanoma antigen A and collagen gene families within the up-regulated gene set. We also identified a prognosis classifier comprising just 30 transcripts with an overall accuracy of 95%. These findings may shed light on the molecular mechanisms involved in thyroid tumor processes, progression and dedifferentiation, and provide a potential predictor of prognosis as well as targets for new therapies.

ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNa: Ácido ribonucleico amplificado
- ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
- ARNmc: ARN mensajero complementario
- ATC: Carcinoma anaplásico de tiroides
- DEPC: agua dietilpirocarbonato
- DSV: Variante esclerosante difusa
- EST: secuencia expresada
- FA: adenoma folicular
- FAP: Poliposis Adenomatosa Familiar
- FDR: *false discovery rate*
- FTC: Carcinoma folicular de tiroides
- FVPTC: Variante folicular del carcinoma papilar de tiroides
- GO: Base de datos *Gene Ontology*
- KEGG pathway: Base de datos *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- N: Tejidos tiroideos normales.
- NPPTC: carcinomas tiroideos de buen pronóstico
- OMS (*WHO*): Organización Mundial de la Salud.
- PAAF: Punción-aspiración de aguja fina
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PDTC: Carcinomas de tiroides pobremente diferenciados
- PFP: reordenamiento PAX8/PPAR gamma
- PPTC: carcinomas tiroideos de mal pronóstico
- PTC: Carcinoma papilar de tiroides
- RET/PTC: Reordenamientos RET/PTC
- RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
- T3: Triyodotironina; thyroxina
- T4: Tetrayodotironina
- TCV: Variante de células altas del carcinoma papilar de tiroides
- TNM: T: tamaño del tumor, N: presencia/ausencia de invasión en los nódulos linfáticos próximos, M: presencia/ausencia de metástasis a distancia.
- Tg: Tiroglobulina
- TSH: Hormona estimulante del tiroides; hormona tirotrópica
- US: ultrasonografía
- WDTC: Carcinomas de tiroides bien diferenciados

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Tiroides. Anatomía e Histología. Conceptos Generales.

El tiroides es una glándula endocrina situada en la parte anterior del cuello. Está formado por dos lóbulos unidos por una porción estrecha de tejido denominado istmo, que le da una forma de escudo (*thyreos*, escudo; *eidos*, forma) (Diéguez *et al.*, 2007). Dichos lóbulos presentan una gran vascularización y una abundante red de vasos linfáticos cuya disposición favorece la distribución de las hormonas tiroideas a todo el organismo.

Desde el punto de vista histológico, la glándula tiroidea está delimitada por una cápsula gruesa de tejido conjuntivo por debajo de la cual, se dispone una capa interna más fina adherida al tejido glandular. A partir de esta última, se generan pequeños tabiques de tejido conjuntivo que penetran en la glándula y la dividen en lóbulos incompletos (Young *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta su estructura y función, este órgano está compuesto por vesículas o folículos cerrados de tamaño variable (15-500 μm de diámetro) con una cavidad central que contiene un material viscoso denominado coloide. El coloide está compuesto mayoritariamente por tiroglobulina (Tg), que es la proteína precursora de las hormonas tiroideas. Rodeando las cavidades se encuentran las células foliculares organizadas de forma regular en un epitelio monocapa que descansa sobre la lámina basal. Junto a éstas se encuentran las células parafoliculares o células C (Rozman, 1992).

Las células foliculares constituyen el 98% del contenido celular tiroideo. Son células epiteliales de origen endodérmico que se caracterizan por estar polarizadas (disponen de membrana basal y apical) y especializadas en la regulación, producción y secreción de las hormonas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Figura 1.1). Estas hormonas requieren yodo para su síntesis y sus funciones son: aumentar la tasa metabólica basal, intervenir en la síntesis proteica y aumentar la sensibilidad a las catecolaminas (tales como la adrenalina), además de ser fundamentales para el desarrollo y el crecimiento en la etapa fetal y neonatal (Young *et al.*, 2006).

Por otro lado, las células parafoliculares son células epiteliales originadas a partir de la cresta neural (ectodermo). Éstas carecen de polaridad y son las productoras de la calcitonina, hormona peptídica que participa en el metabolismo calcio-fósforo (Scheuba *et al.*, 1999).

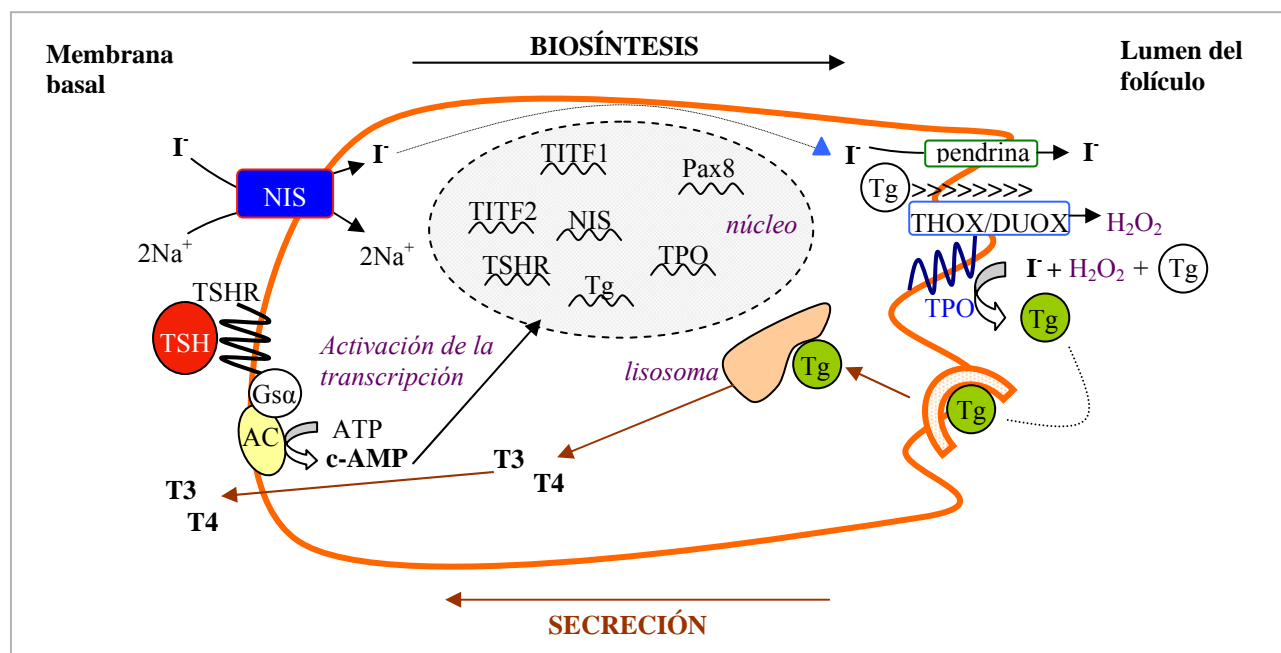


Figura 1.1: Representación esquemática de la biosíntesis y secreción de las hormonas tiroideas en una célula folicular del tiroides (basado en un esquema del Capítulo II del libro *Tiroides* (Diéguez and Yturriaga, 2007)).

TSH: hormona tirotrópica, TSHR: receptor de la hormona tirotrópica, Gs α : proteína activadora de la adenilato ciclasa; AC: adenilato ciclasa; cAMP: mensajero secundario; TITF1 (NKX2-1), TITF2 (FOXE1) y Pax8: factores de transcripción específicos de las células foliculares tiroideas; NIS: transportador activo de Na⁺/I⁻; Tg: tiroglobulina; Tg verde: tiroglobulina yodada; TPO: hidrógeno peróxido oxidoreductasa; Pendrina: transportador Cl⁻/yoduro; THOX/DUOX: oxidasas, generadoras de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), T3 y T4: hormonas tiroideas.

1.2 Cáncer de Tiroides.

1.2.1 Aspectos generales.

El cáncer de tiroides representa el 1% de todos los carcinomas en países desarrollados, siendo la incidencia anual de 122.000 nuevos casos en todo el mundo (DeLellis *et al.*, 2004). El cáncer de tiroides es la neoplasia más común del sistema endocrino y su gran variabilidad en cuanto a la forma de presentación, respuesta a tratamiento y evolución, constituye un problema desde el punto de vista patológico, quirúrgico y oncológico. Asimismo, algunos subtipos tumorales tiroideos se desarrollan como parte de síndromes hereditarios originados por distintas alteraciones genéticas, hecho que demuestra la complejidad de esta enfermedad (Harach *et al.*, 1999).

Además de por factores genéticos, el desarrollo de neoplasias tiroideas puede desencadenarse por factores ambientales y hormonales, debido esencialmente a que el funcionamiento del tiroides depende del aporte externo de yodo y de la regulación del sistema endocrino (Williams *et al.*, 1995). Los factores ambientales pueden ser genotóxicos

(que producen daño en el ADN), como el yodo radiactivo, y no genotóxicos, como la deficiencia de yodo en la dieta (que estimula la secreción de la hormona tirotrópica (TSH) (DeLellis *et al.*, 2004).

De acuerdo al origen celular de los tumores tiroideos, podemos hacer una primera clasificación de éstos en dos grandes grupos: carcinomas originados a partir de las células foliculares tiroideas y carcinomas originados a partir de las células parafoliculares. Los carcinomas de origen folicular a su vez se pueden subdividir en carcinomas bien diferenciados (WDTC), carcinomas pobremente diferenciados (PDTC), y en carcinomas anaplásicos o indiferenciados de tiroides (ATC). Los tumores bien diferenciados engloban dos subtipos de carcinoma: el carcinoma papilar de tiroides (PTC) y el carcinoma folicular de tiroides (FTC). Finalmente, los tumores de origen parafolicular sólo incluyen un subtipo: el carcinoma medular de tiroides (MTC) (DeLellis *et al.*, 2004).

La edad media de aparición del cáncer de tiroides varía en función del subtipo, siendo ésta de 45-50 años para los pacientes con PTC, de 50 años en los casos de FTC y MTC, y de 60 años para los pacientes diagnosticados de ATC (DeLellis *et al.*, 2004). Son numerosos los estudios que han demostrado que el cáncer de tiroides es de 2 a 4 veces más frecuente en mujeres que en hombres y que esta diferencia tiende a diluirse en las franjas de edad precoz y avanzada. Este hecho podría explicarse por la existencia de factores de susceptibilidad relacionados con receptores de hormonas sexuales (Papini *et al.*, 2002) o por las rutas moleculares que éstos activan.

1.2.2 Diagnóstico.

La exploración física y la historia familiar de los pacientes son herramientas fundamentales para una detección temprana de las neoplasias tiroideas. Los casos con uno o más nódulos tiroideos palpables, así como aquellos que, independientemente de la presencia o no de nódulos palpables, presentan antecedentes familiares de cáncer de tiroides o de Neoplasia Endocrina Múltiple tipo II (MENII), o antecedentes de irradiación cervical, son sometidos normalmente a ultrasonografía (*American Association of Clinical Endocrinologists-AACE*, (2006).

La ultrasonografía (US) es una técnica de imagen basada en ultrasonidos que permite la caracterización de los nódulos tiroideos y la valoración del riesgo de malignidad de los

mismos de acuerdo esencialmente, a los siguientes criterios: vascularización intra-nodal, irregularidad del margen y presencia de microcalcificaciones (AACE y el consenso europeo, 2006; Papini *et al.*, 2002). Esta estrategia es muy importante debido a la alta prevalencia de la patología nodular tiroidea, habiéndose descrito que entre el 3 y 7% de la población adulta presenta nódulos tiroideos palpables, de los cuales tan sólo el 5-10% son malignos (Frates *et al.*, 2005; Pacini *et al.*, 2006).

De esta manera, se practican estudios más exhaustivos sólo en los casos valorados como de riesgo de malignidad por la US, así como en aquellos con factores de riesgo clínico, o bien multinodulares, o benignos con crecimiento en el seguimiento (AACE y consenso europeo, 2006). Para todos ellos está indicada la punción aspiración con aguja fina (PAAF), que hasta el momento es la mejor herramienta diagnóstica pre-operatoria del cáncer de tiroides (Mazzaferri *et al.*, 1994). Esta técnica consiste en obtener pequeños fragmentos de tejido que son tratados como material citológico y analizados por patólogos en el microscopio óptico (Abele *et al.*, 1985). La interpretación de las extensiones citológicas permite determinar el grado de sospecha y el tipo de malignidad que padece el paciente en función de la cantidad de las células obtenidas, su forma de descamación, la morfología celular y nuclear, y la existencia o no de material extracelular (Oertel *et al.*, 2000). La mayor sensibilidad de esta técnica se obtiene en los casos de PTC, ATC y MTC. Además, ante una sospecha de MTC se realizan análisis bioquímicos (niveles de calcitonina basal y niveles de calcitonina tras estimulación con pentagastrina) que por sí mismos posibilitan el diagnóstico correcto de un 80% de casos, si bien se ha descrito un 7% de falsos positivos (Scheuba *et al.*, 1999).

Desafortunadamente, las aspiraciones muestran limitaciones, llegando a resultados indeterminados o de diagnóstico incorrecto en torno al 10-25% (Ravetto *et al.*, 2000). Las indeterminaciones se producen bien por el solapamiento de las características citológicas entre nódulos benignos como los adenomas foliculares y nódulos malignos como los carcinomas foliculares, o bien por la presencia de variabilidad morfológica de los núcleos en la citología (Shibru *et al.*, 2008). Por otro lado, los errores diagnósticos se generan por la focalidad de la malignidad dentro de casos aparentemente benignos o por interpretaciones desacertadas de las aspiraciones (Mazzanti *et al.*, 2004; Yeh *et al.*, 2004). Estos errores e indeterminaciones resultan críticas, ya que las decisiones de los clínicos dependen de las valoraciones citológicas, de manera que los falsos negativos pueden retrasar el tratamiento de la malignidad y por lo tanto, repercutir negativamente en la supervivencia del paciente (Tan *et al.*, 2007). Es preciso por tanto desarrollar tests pre-operatorios adicionales que

optimicen la capacidad actual de distinción entre nódulos benignos y malignos, lo que además de mejorar el pronóstico, reduciría los costes del manejo clínico de los pacientes con nódulos tiroideos. Probablemente, un mayor conocimiento molecular asociado a las características histopatológicas, la carcinogénesis y evolución de las distintas neoplasias tiroideas, sea crucial para resolver los problemas diagnósticos actuales. En este sentido, Pagedar y colaboradores (Pagedar *et al.*, 2008) han publicado recientemente un estudio prospectivo en el que a partir del material citológico de las aspiraciones, obtienen y analizan con éxito la expresión génica de marcadores previamente descritos en muestras postquirúrgicas. Aun siendo esta metodología de especial relevancia por su aplicabilidad directa en el diagnóstico pre-operatorio, la sensibilidad de los marcadores moleculares descritos hasta el momento es bastante controvertida (Ito *et al.*, 2005a; Mills *et al.*, 2005; Mora *et al.*, 2004; Sebesta *et al.*, 2001).

Por último, existen otras técnicas de imagen como la tomografía y la resonancia magnética que están indicadas para la valoración de la extensión local y a distancia de las neoplasias tiroideas (Cooper *et al.*, 2006).

1.2.3 Carcinoma Papilar de Tiroides (PTC).

El Carcinoma Papilar de Tiroides es un tumor epitelial maligno que muestra evidencias de diferenciación celular, manteniendo características propias de las células foliculares tiroideas (tales como la polaridad y producción de Tg) (DeLellis *et al.*, 2004). Es el carcinoma tiroideo más frecuente (80%), y presenta una supervivencia total superior al 90%. Su incidencia es tres veces superior en la mujer con respecto al hombre, aunque entre los pacientes mayores de 50 años y en los casos pediátricos la diferencia tiende a reducirse. En torno a un 3-7% de los PTCs son familiares (Corvi *et al.*, 2001), siendo ésta una forma más agresiva, habitualmente multifocal en origen y con una edad de aparición más temprana que las formas esporádicas (Alsanea *et al.*, 2000).

El PTC metastatiza preferentemente vía linfática favorecido en parte por la abundante red de vasos linfáticos que irrigan los lóbulos tiroideos, de manera que la presencia de metástasis en los ganglios cervicales en el momento del diagnóstico es bastante común. Además, esta neoplasia es multicéntrica en un 20% de los casos y bilateral en un tercio, ya sea en origen o por expansión linfática intraglandular. Las metástasis vía hematogénea son muy poco frecuentes (Schlumberger, 1998).

Desde el punto de vista histológico, el **PTC convencional o clásico** es un tumor de crecimiento lento, bien diferenciado y frecuentemente no encapsulado. El rasgo más característico es la presencia de papilas, formadas por un eje conjuntivo revestido por células epiteliales cúbicas con núcleos alargados y de borde irregular, muchos sin cromatina visible (de aspecto vacío) (Rozman, 1992), y con pequeños nucleolos adyacentes a la membrana nuclear. También son comunes los surcos y las inclusiones nucleares. Otras características propias de este subtipo tumoral son la formación de cuerpos de psamoma (calcificaciones) y la presencia de coloide y de células gigantes multinucleadas. Sin embargo, es necesario destacar que la entidad “PTC” engloba multitud de variantes con características histopatológicas y moleculares exclusivas, que difieren de las propias del PTC clásico y que permiten su identificación. Dentro de estas variantes son de especial interés por su frecuencia y características: la variante folicular (FVPTC), la esclerosante difusa (DSV) y la variante de células altas (TCV) (DeLellis *et al.*, 2004).

1.2.3.1 *La variante folicular (FVPTC)*

La característica principal de esta variante, que la diferencia de la clásica, es la formación de estructuras foliculares y no de papilas. Sin embargo, los núcleos celulares tienen las peculiaridades propias del PTC convencional, lo que permite diferenciar esta variante de otros tumores con el mismo patrón estructural (Zidan *et al.*, 2003).

1.2.3.2 *La variante esclerosante difusa (DSV)*

Esta variante tiene una mayor incidencia en pacientes jóvenes y se caracteriza por la sustitución del epitelio cuboidal por un epitelio escamoso (metaplasia escamosa), una infiltración linfocítica densa y abundantes cuerpos de psamoma. A pesar de la agresividad con la que se presenta, las metástasis locales son muy frecuentes y las distales se producen en un 25% de los pacientes, tiene un pronóstico favorable y muy similar al del PTC clásico (Fujimoto *et al.*, 1990).

1.2.3.3 *La variante de células altas (TCV)*

Está compuesta principalmente por células tres veces más altas que anchas, que pueden organizarse en estructuras papilares, trabeculares o en forma de cordón. La alta actividad mitótica, la presencia de necrosis y la frecuente expansión tumoral extratiroidal, hacen de esta variante de PTC una de las de peor pronóstico. Por estas características histopatológicas y por la alta incidencia de alteraciones moleculares

propias de formas agresivas (frecuencia de mutaciones en p53: 61%), algunos autores señalan esta variante como el siguiente nivel en el progreso del PTC clásico hacia la pérdida de la diferenciación y la agresividad (Figura 1.2) (Sywak *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista molecular, hasta el momento se han descrito 4 lesiones genéticas presentes en las fases tempranas de la tumorigénesis del PTC esporádico: reordenamientos cromosómicos (translocaciones balanceadas o inversiones) (Saenko *et al.*, 2003) que afectan a los receptores tirosina quinasa *RET* y *NTRK1*, y mutaciones activadoras en los proto-oncogenes: *RAS* y *BRAF*. Todas estas alteraciones activan la ruta de las MAP quinasas (*mitogen-activated protein kinases*) y son mutuamente excluyentes, es decir, no se da más de una en un mismo tumor (salvo que éste sea policlonal) (Knauf *et al.*, 2005; Nikiforova *et al.*, 2003).

Los genes *RET* y *NTRK1* codifican proteínas transmembrana receptoras de factores de crecimiento de la familia GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de la Glía) y del factor de crecimiento neural (NGF), respectivamente (Manie *et al.*, 2001). Su correcta transcripción y traducción son necesarias para el buen funcionamiento de las células parafoliculares tiroideas, y las formas nativas de estos receptores no se expresan en las células foliculares no neoplásicas. Los reordenamientos cromosómicos en los que participan, consisten en una recombinación entre la región 3' de los mismos (dominio tirosina quinasa intracelular) y la región 5' (promotor y dominio amino terminal) de un gen no relacionado que tiene la propiedad de expresarse de forma ubicua en las células foliculares tiroideas (Pierotti, 2001). Como resultado se genera una forma quimérica del receptor RET (conocida como RET/PTC) o del NTRK1, que se dispone en el citoplasma de las células foliculares y que no requiere del ligando para su activación (Kimura *et al.*, 2003). Hasta el momento se han descrito más de 15 reordenamientos (Tabla 1), que son específicos de PTC y que se cree podrían ser el evento iniciador del tumor (Castellone *et al.*, 2004; Santoro *et al.*, 1992). Se han encontrado este tipo de reordenamientos en la mayoría de los tumores pediátricos y de los tumores de pacientes expuestos a radiación externa durante la infancia, o a radiación ionizante después de desastres ambientales como el accidente nuclear de Chernobyl (Bounacer *et al.*, 1997; Nikiforov *et al.*, 1997). Sin embargo, la prevalencia de los reordenamientos RET/PTC es muy inferior (5-30%) en los casos adultos de PTC y variable según la serie estudiada (Pierotti *et al.*, 1995). Los reordenamientos de *NTRK1* son poco muy frecuentes (Melillo *et al.*, 2005) (Tabla 1.1).

El gen *BRAF* pertenece a la familia de las serin-treonin quinasas RAF, que incluye además los genes *ARAF* y *CRAF*. *BRAF* codifica la isoforma predominante en las células foliculares tiroideas y al igual que el resto de isotipos, activa la ruta de señalización de las MAP quinasas, ruta involucrada en el control y regulación de la apoptosis, inflamación, crecimiento celular y diferenciación (Chang *et al.*, 2001). Sin embargo, *BRAF* presenta una mayor actividad quinasa y afinidad por las proteínas diana de esta familia (MEK1 y MEK2), siendo más eficiente en la fosforilación de las mismas (Mikula *et al.*, 2001; Peyssonnaud *et al.*, 2001; Wojnowski *et al.*, 2000). La transversión de una timina por una adenina en el nucleótido 1799 (p.Val600Glu) de la secuencia de *BRAF*, es la alteración genética más común descrita en el PTC, llegando a alcanzar una frecuencia del 69% en algunas series (Kimura *et al.*, 2003). Afectando al siguiente amino ácido se ha descrito otra mutación puntual (p.Lys601Glu) y se estima que está presente en un 9% de casos (Trovisco *et al.*, 2004). Estas alteraciones moleculares están situadas en el dominio quinasa de la proteína y llevan a la sustitución de un residuo de Valina o Lisina, respectivamente, por uno de Glutamato, cuya carga negativa mimetiza la fosforilación de los residuos Treonina 599 y Serina 602, necesarios para la activación de BRAF (Nikiforova *et al.*, 2003). De esta manera, la actividad quinasa de la proteína mutante se incrementa de 10 a 12 veces con respecto la proteína nativa. La consecuencia es la activación constitutiva de los efectores de las quinasas MEK (ERK1 y 2) y por lo tanto de la ruta de las MAP quinasas (Davies *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista del significado clínico, varios estudios muestran una asociación entre la presencia de mutaciones en *BRAF* y un peor pronóstico (Lupi *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2005), aunque existe controversia en torno a esta idea.

Las lesiones activadoras en la familia de protooncogenes *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*) son exclusivas de la variante folicular de PTC, donde pueden alcanzar una prevalencia de hasta el 43% (Kimura *et al.*, 2003).

En último lugar, se han descrito otras alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo y evolución de estos carcinomas. Algunas de ellas son utilizadas como marcadores diferenciales en el diagnóstico post-operatorio y pronóstico de los PTCs mediante técnicas inmunohistoquímicas o moleculares (Tablas 1.2 y 1.3).

Tabla 1.1: Características de los diferentes reordenamientos involucrados en el desarrollo de PTC

Tipo de reordenamiento	Genes involucrados	Mecanismo del reordenamiento	Prevalencia*	Asociación con exposición a radiación	Referencias
RET/PTC1	<i>H4/D10S170</i> y <i>RET</i>	inv (10)(q11.2;q21)	60-70%	Ocasional	(Grieco <i>et al.</i> , 1994)
RET/PTC2	<i>PRKAR1A</i> y <i>RET</i>	t(10;17)(q11.2;q23)	<10%	Ocasional	(Sozzi <i>et al.</i> , 1994)
RET/PTC3 (y RET/PTC4)	<i>ELE1/RFG/ARA70</i> y <i>RET</i>	inv (10)(q11.2)	20-30%	muy fuerte	(Fugazzola <i>et al.</i> , 1996; Santoro <i>et al.</i> , 1994)
RET/PTC5	<i>GOLGA5</i> y <i>RET</i>	t(10;14)(q11.2;q?)	muy baja	Sí	(Rabes <i>et al.</i> , 1998)
RET/PTC6	<i>HTIF1</i> y <i>RET</i>	t(7;10)(q32;q11.2)	muy baja	Sí	(Klugbauer <i>et al.</i> , 1999)
RET/PTC7	<i>RFG7</i> y <i>RET</i>	t(1;10)(p13;q11.2)	muy baja	Sí	(Rabes <i>et al.</i> , 2000)
RET/ELKS	<i>ELKS</i> y <i>RET</i>	t(10;12)(q11.2;p13)	muy baja	No	(Nakata <i>et al.</i> , 1999)
RET/KTN1	<i>KTN1</i> y <i>RET</i>	t(10;14)(q11.2;q22.1)	muy baja	Sí	(Salassidis <i>et al.</i> , 2000)
RET/RFG8	<i>RFG8</i> y <i>RET</i>	t(10;18)(q11.2;q21-22)	muy baja	Sí	(Klugbauer <i>et al.</i> , 2000)
RET/PCM-1	<i>PCM-1</i> y <i>RET</i>	t(8;10)(p21-22;q11.2)	muy baja	Sí	(Corvi <i>et al.</i> , 2000)
RET/HOOK3	<i>HOOK3</i> y <i>RET</i>	t(8;10)(p11.21;q11.2)	muy baja	Sí	(Ciampi <i>et al.</i> , 2007)
AKAP9/BRAF	<i>AKAP9</i> y <i>BRAF</i>	inv (7)(q21-22q34)	muy baja	Sí	(Ciampi <i>et al.</i> , 2005)
H4/P TEN	<i>H4</i> y <i>P TEN</i>	inv (10)(q11.2;q22-23)	muy baja	Sí	(Puxeddu <i>et al.</i> , 2005)
TRK	<i>TPM3</i> y <i>NTRK1</i>	inv (1)(q21;q21-q22)	muy baja	Sí	(Beimfohr <i>et al.</i> , 1999)
TRK-T1, -T2, -2h	<i>TPR</i> y <i>NTRK1</i>	inv (1)(q21;q25)	muy baja	Ocasional	(Beimfohr <i>et al.</i> , 1999)
Trk-T3	<i>TFG</i> y <i>NTRK1</i>	t(1q;3)	muy baja	Ocasional	(Greco <i>et al.</i> , 1995)

* Frecuencia de cada reordenamiento con respecto el total de reordenamientos.

1.2.4 Carcinoma Folicular de Tiroides (FTC).

El carcinoma folicular de tiroides es un tumor epitelial maligno que muestra evidencias de diferenciación celular y carece de las características nucleares propias del PTC (DeLellis *et al.*, 2004). Constituye el 10% de las malignidades tiroideas (Greaves *et al.*, 2000), siendo su incidencia superior en las áreas yodo-deficientes. A diferencia del PTC, el FTC presenta: peor pronóstico (tasa de supervivencia a los cinco años de seguimiento del 40%), una edad de aparición más tardía y apenas se presenta en edades pediátricas. Se propaga vía hematológica, principalmente a pulmón y huesos, siendo un 20% la frecuencia de metástasis distal en el momento de diagnóstico del tumor. La expansión vía linfática es poco común (5%).

El FTC puede originarse a partir de una lesión precursora benigna: el adenoma folicular (FA). Ambas patologías presentan las mismas características citológicas y son los criterios de malignidad como: la invasión capsular, la infiltración del parénquima tiroideo vecino y la invasión vascular, los que permiten su diagnóstico diferencial. Desafortunadamente, la valoración de estas capacidades invasivas sólo se puede efectuar a partir de preparaciones histológicas, lo que imposibilita el diagnóstico pre-operatorio de estas lesiones a partir de las técnicas actuales (PAAF) (apartado de 1.2) (Mazzanti *et al.*, 2004).

Desde el punto de vista histológico, el FTC es un tumor invasivo, generalmente solitario, con características morfológicas variables que van desde la formación de estructuras foliculares

con coloide en su interior a patrones de crecimiento sólido o trabecular. La característica citológica más distintiva es la carencia de la atipia nuclear propia del PTC, gracias a la cual es posible diferenciar el FTC de la variante folicular de PTC, que también forma estructuras foliculares (apartado 1.2.3.1). Sin embargo, en ocasiones sólo un reducido número de células tumorales cumple los criterios nucleares característicos del PTC, lo que dificulta el diagnóstico distintivo entre FTC y FVPTC (Arora *et al.*, 2008).

Existen dos categorías de FTC en función del grado de invasión de la cápsula tiroidea: FTC mínimamente invasivo y FTC invasivo. El primero se caracteriza por una invasión focal de la cápsula y/o estructuras vasculares, mientras que el segundo presenta una amplia infiltración en el parénquima tiroideo y/o vascular.

Entre las alteraciones moleculares características de FTC, cabe destacar: las mutaciones puntuales en la familia de proto-oncogenes RAS (codones 12, 13 y 61 de K-RAS, H-RAS, N-RAS) y el reordenamiento PAX8/PPAR γ . Al igual que sucede en el PTC, estas alteraciones representan vías alternativas en el desarrollo temprano de los carcinomas foliculares, coincidiendo en el mismo tumor en casos excepcionales (Nikiforova *et al.*, 2003). Las mutaciones puntuales en RAS constituyen la única alteración molecular temprana compartida por varios tipos de patologías tiroideas: FTC, FVPTC y FA, que curiosamente presentan un rasgo histológico común, la arquitectura folicular. Teniendo en cuenta estas mutaciones, las más frecuentes son las que afectan al codón 61 de NRAS. La prevalencia de esta alteración varía según la serie estudiada (Bongarzone *et al.*, 1989; Capella *et al.*, 1996; Ezzat *et al.*, 1996; Karga *et al.*, 1991; Nikiforova *et al.*, 2003; Suarez *et al.*, 1988), siendo mayor en regiones geográficas yodo-deficientes (Shi *et al.*, 1991).

La activación oncogénica de NRAS está relacionada con una pérdida de la capacidad supresora de tumores de TGF- β (*transforming growth factor- β*) (Derynck *et al.*, 2001; Saha *et al.*, 2001). TGF- β engloba una familia de proteínas extracelulares involucradas en el control del ciclo celular, diferenciación, organización y programación de la muerte celular (Massague *et al.*, 2006). Estos ligandos median la fosforilación de los receptores T β RI y T β RII, seguida de la fosforilación de los factores de transcripción R-Smads, los cuales se acumulan en el núcleo y regulan la transcripción de proteínas necesarias para la parada del ciclo celular en la fase G1 (fase previa a la replicación del ADN). La activación oncogénica de Ras puede interrumpir esta actividad tumor-supresora esencialmente por medio de dos vías: 1) la ruta MEK/ERK, que lleva a un secuestro citoplasmático del efector nuclear de TGF- β : p27 (Kfir *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000), y 2) la ruta del factor Ral-GEF (*Ral-guanine*

nucleotide exchange factor), que impide la translocación nuclear de las Smads (Saha *et al.*, 2001).

La segunda alteración genética propia del FTC es el reordenamiento PAX8/PPAR γ , también conocido como *PPFP*. Se ha estimado que entre un 30-60% de los FTCs son positivos (Kroll *et al.*, 2000; Marques *et al.*, 2002; Nikiforova *et al.*, 2002) para la translocación t(2;3)(q13;p25), que genera un gen fusión compuesto por el promotor y el dominio de unión al ADN del factor de transcripción PAX8, y casi la secuencia completa de PPAR γ (dominio de unión al ADN, de unión a ligando, de dimerización y transactivación) (Kroll *et al.*, 2000). PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) es un miembro de la superfamilia de los receptores nucleares que forman heterodímeros con los receptores RXR (*retinoid X receptors*) y que activan la transcripción de genes específicos en respuesta a la unión de un ligando. Participa en diversas rutas biológicas implicadas en diferenciación, control del ciclo celular y apoptosis.

Merece la pena destacar que además PAX8 es un factor de transcripción específico de tiroides que desempeña un papel determinante en la génesis del mismo (Vilain *et al.*, 2001). El promotor de este gen regula la expresión de *PPFP*, cuyo efecto oncogénico viene determinado por su capacidad de inhibir la actividad de la proteína nativa PPAR γ , bien por competencia por los sitios de unión al ligando o por interferencia en la heterodimerización entre PPAR γ y RXR (Jpenberg *et al.*, 1997). Como resultado se produce la activación de la ruta de señalización de NFK β (Kato *et al.*, 2006), desencadenando la activación de la proliferación y la supresión de la respuesta apoptótica (Baud *et al.*, 2001). Asimismo, se cree que el reordenamiento puede inhibir la función natural de PAX8 por un mecanismo similar al que inhibe PPAR γ , y como consecuencia, alterar el control de la expresión de genes necesarios para la diferenciación de las células foliculares tiroideas, tales como el transportador de sodio-yodo (NIS) o los genes de la tiroglobulina (Espinoza *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2001).

A diferencia de las mutaciones en *RAS*, este reordenamiento parece ser poco frecuente en los adenomas foliculares, sin embargo, se han descrito series en las que esta alteración se produce en el 33% de los casos. Por otro lado, son varios los estudios que asocian la expresión de *PAX8/PPAR γ* con un fenotipo de mayor invasión vascular (Castro *et al.*, 2006).

Finalmente, existen otras alteraciones moleculares relacionadas con el desarrollo y evolución de estos carcinomas. Al igual que en el apartado anterior, se detallan en las tablas 1.2 y 1.3.

1.2.5 Carcinoma Anaplásico de Tiroides (ATC) o carcinoma indiferenciado de tiroides.

El carcinoma anaplásico de tiroides (ATC) es un tumor muy agresivo originado a partir de las células foliculares tiroideas. De acuerdo con su histología aparece total o parcialmente compuesto por células que han perdido la diferenciación, de manera que sólo es posible reconocer su origen gracias a marcadores inmunohistoquímicos específicos (positividad a la queratina), y al mantenimiento de características estructurales propias de una diferenciación epitelial previa (presencia de desmosomas y tonofilamentos) (DeLellis, 2006).

Es considerado uno de los tumores sólidos más agresivos y letales que afectan al hombre, su incidencia anual es de 1 ó 2/1.000.000 y representa el 5% de los carcinomas tiroideos. La tasa de mortalidad es superior al 90% y la media de supervivencia es de 6 meses desde el momento del diagnóstico. El pronóstico está sujeto al grado de invasión local y metástasis, la edad al diagnóstico, el tamaño de la lesión, y el género ya que, aunque aparece preferentemente en mujeres (ratio mujer:hombre = 2:1), los hombres presentan un peor pronóstico (Agrawal *et al.*, 1996; Are *et al.*, 2006; Demeter *et al.*, 1991). Estos tumores se caracterizan por un crecimiento rápido, llegando a duplicar su volumen en una semana. Suelen presentar áreas necróticas y hemorrágicas, así como una fuerte actividad mitótica, invasividad y un bajo ratio apoptótico (Patel *et al.*, 2006). La sintomatología que desencadenan (disfonía, disfagia, disnea, etc....) está relacionada con la compresión mecánica que ejerce la masa en crecimiento (Venkatesh *et al.*, 1990).

El ATC puede ser uni- o multi-nodular, con bilateralidad en más de un 25% de los casos. La invasión de los ganglios linfáticos cervicales es un hallazgo frecuente (40%), así como la de las estructuras adyacentes: músculo, traquea, laringe y esófago. La metástasis aparece en más de un 50% de los pacientes en el momento de la presentación y en un 25% adicional durante la evolución de la enfermedad. El pulmón es la localización principal de las metástasis distales (80%), seguido por los huesos (6-15%) y el cerebro (5-13%). Raramente, se han descrito metástasis cardíacas e intra-abdominales (Giuffrida *et al.*, 2001). En cuanto a una descripción meramente citológica, las células pueden ser gigantes o

fusiformes, apareciendo frecuentemente a la vez en un mismo tumor. Contienen de uno a múltiples núcleos hiper-cromáticos, el citoplasma suele ser eosinófilo y las figuras mitóticas muy frecuentes (DeLellis *et al.*, 2004).

La PAAF tiene asociada una alta sensibilidad en el diagnóstico del ATC, aunque en ocasiones se realizan punciones sobre áreas necróticas o hemorrágicas que imposibilitan la valoración, o sobre focos de tumores bien diferenciados que coexisten con el ATC y que enmascaran el diagnóstico (Giuffrida *et al.*, 2000; Us-Krasovec *et al.*, 1996) (como se indica en el apartado 1.2.2). De hecho, es habitual encontrar focos de tumores bien diferenciados o pobremente diferenciados, lo que apoya la teoría de que los ATCs se originan a partir de la transformación (pérdida de diferenciación) de un tumor bien diferenciado preexistente. Sin embargo, no se descarta que algunos casos aparezcan *de novo* (Lam *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 1999).

Algunos datos relativos a alteraciones moleculares indican que las mutaciones en BRAF y RAS parecen conferir una predisposición a desarrollar ATC. Aproximadamente el 15% de los carcinomas pobremente diferenciados y un mayor porcentaje de tumores indiferenciados son BRAF-positivos (Tabla 1.2). Esta condición genética está asociada a la presencia de un componente papilar en estos tumores. Asimismo, los ATC positivos para mutaciones en RAS con frecuencia presentan un componente folicular (Basolo *et al.*, 2000; Manenti *et al.*, 1994; Soares *et al.*, 2004; Trovisco *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2005). Estos hallazgos, nuevamente evidencian la progresión del ATC a partir de un tumor bien diferenciado preexistente. No obstante, son necesarias otras alteraciones para el desarrollo de estas neoplasias. Así, mutaciones en p53 y β -catenina (*CTNNB1*) se han relacionado con la carcinogénesis del ATC (Fagin *et al.*, 1993; Garcia-Rostan *et al.*, 1999).

P53 (cromosoma 17p13.1) codifica un factor de transcripción nuclear que consta de tres dominios funcionales esenciales: el dominio de transactivación N-terminal, el dominio de oligodimerización C-terminal, y el dominio de unión al ADN, donde se producen la mayor parte de las mutaciones (Olivier *et al.*, 2002). La proteína p53 juega un papel crucial en la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN, la senescencia y la apoptosis. Estos procesos biológicos se desencadenan por la unión de p53 a promotores que activan la transcripción de genes tales como *p21*, el cual está involucrado en la interrupción del ciclo celular en G₁, o como *Bax* y *PUMA* (factores antiapoptóticos) (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006). Otro gen diana de p53 es *Mdm2*, que es una ubiquitín-ligasa que se une a p53 por su dominio N-terminal provocando la inactivación, translocación citoplasmática y degradación

del mismo. La inducción de Mdm2 por p53 es la mayor retroalimentación negativa que restringe la función pro-apoptótica de p53 y que permite la reparación del daño celular. Además, p53 también regula la senescencia celular, de manera que se activa cuando se produce un acortamiento de los telómeros causados por las replicaciones celulares, bloqueando el ciclo celular y desencadenando la senescencia. Como consecuencia, la inactivación de p53 puede conducir a un incremento en la replicación celular, en las anomalías genéticas y en la adquisición de un fenotipo inmortal (Stewart *et al.*, 2006). Finalmente, p53 presenta varios posibles promotores y/o puntos internos de traducción que generan una serie de isoformas con el dominio N-terminal truncado. Estas isoformas actúan como dominantes negativos de la forma nativa de p53 (Malaguarnera *et al.*, 2007).

Merece la pena destacar que los productos mutados de p53 tienen una vida media significativamente superior a la forma nativa, y no son capaces de inducir el principal factor de degradación del mismo (Mdm2), lo que lleva a su acumulación en el núcleo. De este modo, una fuerte tinción nuclear de p53 en preparaciones inmunohistoquímicas es considerada una evidencia de inactivación de p53 y por lo tanto, un marcador de malignidad (Malaguarnera *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 1994) (Tabla 1.3). La inactivación de p53 también se ha relacionado con resistencia a la quimioterapia (Hassan *et al.*, 2006).

Las mutaciones inactivantes en el gen p53 son muy frecuentes en una gran variedad de tumores (50% de todas las malignidades humanas). Sin embargo sólo se han encontrado en un 10% de los carcinomas tiroideos (Olivier *et al.*, 2002), de los cuales un 60% corresponde a tumores anaplásicos (Fagin *et al.*, 1993). Por este motivo, se considera que p53 juega un papel importante en la pérdida de la diferenciación de la célula folicular tiroidea, y no en el desarrollo inicial del cáncer de tiroides.

Relacionadas con los ATC, se han descrito también mutaciones en el gen *CTNNB1* (cromosoma 3p21) (Garcia-Rostan *et al.*, 1999). *CTNNB1* codifica la proteína citoplasmática β -catenina, que se expresa de forma ubicua y que forma parte del complejo de adhesión intercelular dispuesto en la membrana basolateral de las células epiteliales. Su interacción con la E-cadherina (cadherina epitelial) permite mantener las uniones adherentes célula-célula, por lo que juega un papel crucial en la polaridad celular. La β -catenina libre es degradada rápidamente por un complejo multiproteico en el que participan APC y GSK-3 β , siendo la región comprendida entre los residuos Ser29 y Lys49 fundamental para este proceso (Takahashi-Yanaga *et al.*, 2007). Las mutaciones en el gen de la β -catenina afectan al exón 3 (Garcia-Rostan *et al.*, 1999), lugar donde se encuentran los

residuos de Ser y Thr (Ser33, Ser37 y Thr41) que específicamente fosforilan GSK-3 β para que la proteína sea reconocida por el proteosoma, de manera que estas alteraciones impiden su degradación y provocan una acumulación citoplasmática de la misma (Liu *et al.*, 2002). Los altos niveles citoplasmáticos de β -catenina activan la ruta de Wnt, que facilita su translocación nuclear (Semba *et al.*, 2000). Una vez en el núcleo, la β -catenina interacciona con el factor de transcripción TCF y otros co-factores activando la expresión de los genes de la ciclina D1, c-myc y metaloproteasa 7, relacionados con proliferación celular y metástasis (Willert *et al.*, 2006).

Asimismo, se han descrito otras alteraciones moleculares en ATC que afectan al ciclo celular y que podrían estar relacionadas con su mayor capacidad mitótica, tales como: infra-expresión de p27 y la inactivación de PTEN y p16, que regulan de forma negativa la proliferación celular (Gimm *et al.*, 2000) (Tablas 1.2 y 1.3).

Por último, son también significativas las alteraciones cromosómicas. Está establecido que el número medio de ganancias o pérdidas cromosómicas en el ATC es de 10 por caso, cuando en los tumores bien diferenciados se estima que es de uno aproximadamente (Wreesmann *et al.*, 2002)

1.2.6 Carcinoma Pobremente Diferenciado de Tiroides (PDTC).

Los carcinomas tiroideos pobremente diferenciados (PDTC) constituyen una entidad controvertida. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (DeLellis *et al.*, 2004), son neoplasias originadas a partir de las células foliculares del tiroides que por su comportamiento y morfología, ocupan una posición intermedia entre los tumores diferenciados (WDTC) y los que han perdido la diferenciación (ATC). La ambigüedad de esta patología así como la variabilidad en los criterios diagnósticos, dificultan la estimación de la prevalencia de la enfermedad.

Está aceptado que parte de estos tumores se originan a partir de una lesión precursora, que puede ser tanto un FTC como un PTC (Sobrinho-Simoes *et al.*, 2002). No obstante, no se descarta que la mayoría de los casos sean *de novo* al igual que sucede con los tumores anaplásicos (Pilotti *et al.*, 1997).

El PDTC suele presentar áreas necróticas e invasión local. También son habituales las metástasis a ganglios linfáticos, pulmón, y hueso, aunque menos frecuentes que en el ATC (Patel and Shaha, 2006).

La mayoría de los pacientes que desarrollan un PDTC mueren en los tres años siguientes al diagnóstico, debido principalmente a su extensión local y a las metástasis a distancia. El pronóstico depende del tamaño del tumor, el grado de invasión local y las metástasis, la cirugía aplicada y la respuesta al tratamiento con radio-yodo (Nishida *et al.*, 1999; Sobrinho-Simoes *et al.*, 2002). Sin embargo, todavía no se han identificado factores predictivos asociados a la histo-morfología y a las características genéticas de estos tumores.

Las características genéticas son más o menos próximas a las mencionadas para el ATC, según el grado de pérdida de diferenciación de las células foliculares neoplásicas (Tablas 1.2 y 1.3).

Tabla 1.2: Alteraciones moleculares asociadas al desarrollo temprano y evolución de los distintos subtipos tumorales originados a partir de las células foliculares tiroideas.

	WDTC		PDTC	ATC	Referencias
	PTC	FTC			
<i>BRAF</i>	29-69%	0%	0-13%	10-35%	(Kimura <i>et al.</i> , 2003)
<i>RET/PTC</i>	13-43%	0%	0-13%	0%	(Pierotti <i>et al.</i> , 1995)
<i>TRK</i>	5-13%	-	-	-	(Melillo <i>et al.</i> , 2005)
<i>H-N-K-RAS</i>	0-21%	40-53%	18-50%	20-60%	(Bongarzone <i>et al.</i> , 1989; Capella <i>et al.</i> , 1996; Ezzat <i>et al.</i> , 1996; Karga <i>et al.</i> , 1991; Kimura <i>et al.</i> , 2006)
<i>PAX8/PPARγ</i>	0%	25-63%	0%	0%	(Castro <i>et al.</i> , 2006)
<i>TP53</i>	0-11%	0-9%	17-38%	67-88%	(Dobashi <i>et al.</i> , 1993; Ruter <i>et al.</i> , 1996)
<i>WNT/ β-catenina</i>	0%	0%	0-25%	66%	(Garcia-Rostan <i>et al.</i> , 1999; Rocha <i>et al.</i> , 2003)
<i>PIK3CA</i>	12-15%	28-34%	?	42-54%	(Hou <i>et al.</i> , 2007)
<i>PTEN</i>	2%	7%	?	16%	(Hou <i>et al.</i> , 2007)
<i>APC</i>	Variante cribiforme	?	?	?	(Subramaniam <i>et al.</i> , 2007)

Tabla 1.3: Marcadores moleculares descritos en estudios de caracterización diferencial de los distintos subtipos tumorales del epitelio folicular tiroideo.

Marcador	Método de detección*	WDTC		PDTC	ATC	Referencias
		PTC	FTC			
<i>Tg (tiroglobulina)</i>	Inmunohistoquímica	++	++	focal	-	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>Ttf1 (factor de transcripción tiroideo)</i>	Inmunohistoquímica	++	++	+	-	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>Ck19 (citoqueratina 19)</i>	Inmunohistoquímica	++	focal	-	-	(Prasad <i>et al.</i> , 2005)
<i>Galectin-3</i>	Inmunohistoquímica	++	+	++	++	(Prasad <i>et al.</i> , 2005; Rodrigo <i>et al.</i> , 2006)
<i>c-Met</i>	Inmunohistoquímica	++	-	?	?	(Trovato <i>et al.</i> , 1999)
<i>COX-2 (ciclooxigenasa-2)</i>	RT-PCR	++	+	+	+	(Kim <i>et al.</i> , 2006)
<i>HMGI(Y)</i>	RT-PCR, Inmunohistoquímica	+	+	+	+	(Scala <i>et al.</i> , 2000)
<i>FN1 (fibronectina)</i>	RT-PCR, Inmunohistoquímica	++	+	++	++	(Huang <i>et al.</i> , 2001; Prasad <i>et al.</i> , 2005)
<i>CITED1</i>	Inmunohistoquímica	++	+	-	-	(Prasad <i>et al.</i> , 2005; Prasad <i>et al.</i> , 2004)
<i>Telomerasa</i>	RT-PCR, ensayo TRAP	+	+	++	++	(Ito <i>et al.</i> , 2005b; Mora and Lerma, 2004)
<i>HBME-1</i>	Inmunohistoquímica	++	+	-	-	(Barroeta <i>et al.</i> , 2006; Miettinen <i>et al.</i> , 1996)
<i>CD15</i>	Inmunohistoquímica	+	bajo	-	-	(Mai <i>et al.</i> , 2000; Miettinen and Karkkainen, 1996)
<i>CD44v6</i>	Inmunohistoquímica, RT-PCR	+	+	?	?	(Guarino <i>et al.</i> , 2005)
<i>Bcl-2</i>	Inmunohistoquímica	+	+	+	-	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>Cyclina D1</i>	Inmunohistoquímica	bajo	bajo	+	++	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>Vimentina</i>	Inmunohistoquímica	-	-	+	+	(Venkatesh <i>et al.</i> , 1990)
<i>p27</i>	Inmunohistoquímica	++	++	+	bajo	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>p53 (supresor tumoral)</i>	Inmunohistoquímica	bajo	bajo	+	++	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>Ki-67 (marcador de proliferación)</i>	Inmunohistoquímica	bajo	bajo	+	++	(DeLellis <i>et al.</i> , 2004)
<i>ECM1</i>	Matrices de expresión y RT-PCR	-	-	+	++	(Kebebew <i>et al.</i> , 2006)
<i>TMPRSS4</i>	Matrices de expresión y RT-PCR	-	-	+	++	(Kebebew <i>et al.</i> , 2006)
<i>ANGPT2</i>	Matrices de expresión y RT-PCR	-	-	+	++	(Kebebew <i>et al.</i> , 2006)
<i>TIMP1</i>	Matrices de expresión y RT-PCR	-	-	+	++	(Kebebew <i>et al.</i> , 2006)

*RT-PCR: reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa reversa.

Significado de la Inmunohistoquímica. *Bajo*: <10% de células positivas; *+*: 10-30% de células positivas, aproximadamente; *++*: positividad alta, >30% de células positivas.

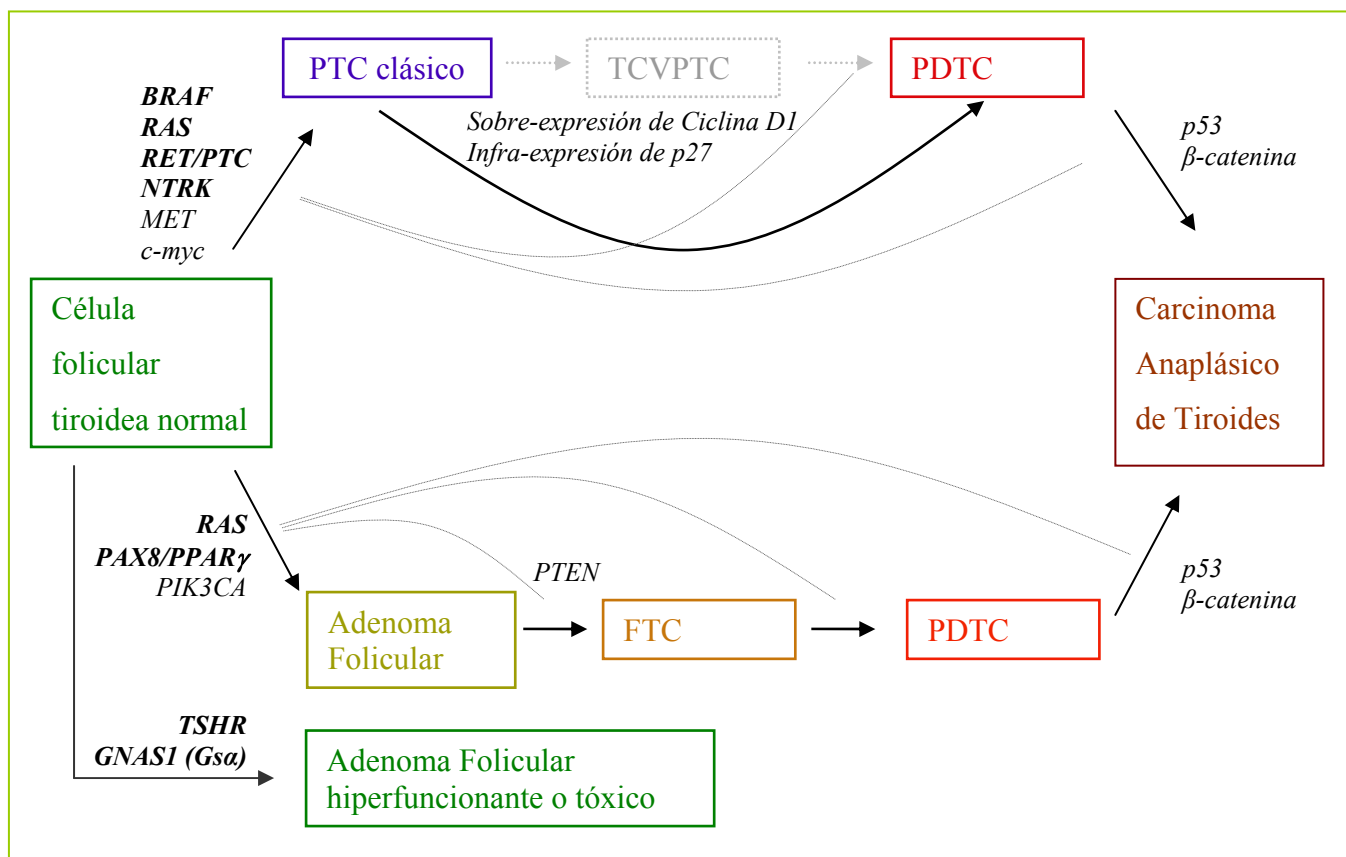


Figura 1.2: Modelo de progresión gradual del cáncer de tiroides del epitelio folicular.

* Línea gris discontinua: Modelos alternativos de progresión de los tumores tiroideos.

1.2.7 Cáncer de tiroides del epitelio folicular asociado a síndromes hereditarios

La gran mayoría de los tumores tiroideos de célula folicular tienen un carácter principalmente esporádico, y sólo una pequeña proporción, cercana a un 6% (Loh, 1997), es consecuencia de una alteración genética asociada a una mayor susceptibilidad a desarrollar carcinomas tiroideos. Así, encontramos agregaciones familiares de PTC, para las cuales no se conoce el gen responsable, y varios síndromes hereditarios, cuyo gen es conocido, asociados a una mayor susceptibilidad a desarrollar distintos subtipos de carcinoma tiroideo. Entre los síndromes hereditarios asociados a desarrollo de cáncer de tiroides destacan.

1.2.7.1 Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) o Síndrome de Gardner

La poliposis adenomatosa familiar es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por el desarrollo de cientos o miles de pólipos adenomatosos a lo largo del colón y recto. Entre el 1 y 2% de pacientes con FAP, desarrollan cáncer de

tiroides. Normalmente se trata de mujeres de jóvenes (≤ 30 años) en el momento del diagnóstico, que presentan un tumor papilar con patrón cribiforme (Lee *et al.*, 2004).

El FAP es causado por mutaciones germinales en el gen *APC* (adenomatous polyposis coli gene) (Nakamura *et al.*, 1991). *APC* codifica una proteína que participa en el complejo multiproteico ubiquitín-proteosómico que degrada la β -catenina libre presente en el citoplasma (apartado 1.2.4). Se cree que las mutaciones en *APC* generan una proteína truncada incapaz de degradar la β -catenina (Schneikert *et al.*, 2007)

Por otro lado, también se han descrito mutaciones somáticas en el gen *APC* en formas esporádicas de cáncer de tiroides (Tabla 1.2)

1.2.7.2 Síndrome de Cowden

El síndrome de Cowden es una enfermedad autosómica dominante caracterizada por la presencia de múltiples hamartomas, y una mayor prevalencia de cáncer de mama, endometrio y tiroides en los pacientes (Waite *et al.*, 2002), siendo esta vez el subtipo folicular el más frecuente. El gen involucrado en el desarrollo de este síndrome es *PTEN*. *PTEN* es un supresor tumoral localizado en el cromosoma 10q23.3 que antagoniza la ruta de señalización fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K)/Akt. El correcto funcionamiento de esta vía conduce a la parada el ciclo celular en G1 y/o a la apoptosis. El 80% de los pacientes con síndrome de Cowden son positivos para mutaciones germinales en *PTEN*. El 10% de estos pacientes desarrollan cáncer de tiroides folicular o adenomas foliculares que pueden evolucionar a carcinomas (Harach *et al.*, 1999).

Al igual que sucede con *APC*, también se han descrito mutaciones somáticas en el gen *PTEN*, así como en otros miembros de la ruta PI3K/Akt (*PIK3CA* y *RAS*) en las formas esporádicas de cáncer de tiroides (Hou *et al.*, 2007) (Tabla 1.2).

1.2.7.3 Complejo de Carney

El complejo de Carney es un síndrome multi-neoplásico donde los afectados pueden desarrollar adenomas o carcinomas foliculares, aunque con una frecuencia baja. Los genes relacionados con esta enfermedad son *CNC2* y *PRKARIA* (Sandrini *et al.*, 2002). Este último participa en el reordenamiento somático *RET/PTC2* descrito en carcinomas papilares esporádicos (Tabla 1.1)

1.3 **Tratamiento y seguimiento del cáncer del epitelio folicular tiroideo: presente y futuro.**

El tratamiento primario de los tumores diferenciados del epitelio folicular tiroideo no ha cambiado substancialmente en los últimos años. El procedimiento estándar consiste en una tiroidectomía total o casi total con resección de los ganglios afectados, administración posterior de dosis terapéuticas de radio-yodo (^{131}I) ($\geq 100\text{mCi}$) y tratamiento supresor de la hormona tireotropa (TSH) con L-tiroxina (L-T4) (DeLellis *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2006; Vini *et al.*, 2002). El ^{131}I destruye los focos microscópicos del tumor que puedan quedar tras la cirugía y repercute favorablemente sobre la tasa de recurrencias y supervivencia (Mazzaferri *et al.*, 2001).

A pesar del buen pronóstico de los pacientes con WDTC, entre el 20 y el 40% desarrollan recidivas incluso después de 10 años de seguimiento. Por este motivo, los clínicos están obligados a realizar un seguimiento post-operatorio periódico a los pacientes con estos tumores (Schlumberger, 1998). El seguimiento rutinario consiste en la palpación del cuello y ganglios, rastreos corporales totales con radio-yodo, exploraciones morfológicas de la región cervical, y determinación de los niveles de tiroglobulina sérica. Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los carcinomas diferenciados y sus metástasis de captar ^{131}I gracias a la expresión del transportador activo de Γ NIS, permitiendo detectar la extensión de la enfermedad con dosis bajas del radioisótopo (2-5mCi) (Pacini *et al.*, 2006). En caso de que se detecte tiroglobulina sérica durante el seguimiento (señal de presencia de enfermedad), y captación en el rastreo, se administra al paciente una dosis elevada de ^{131}I tras la estimulación de los restos tiroideos con hormona tirotrópica humana recombinante (*rhTSH*), o tras supresión del tratamiento con L-T4, lo que aumenta la sensibilidad de las células foliculares existentes a la captación y retención del radio-yodo. Posteriormente, se efectúa un nuevo rastreo y, si procediese, se trata quirúrgicamente (DeLellis *et al.*, 2004). El uso de *rhTSH* evita la necesidad de retirar el tratamiento supresor con L-T4 semanas antes de la administración de ^{131}I y por lo tanto, la posibilidad de que el paciente desarrolle hipotiroidismo sintomático (Robbins *et al.*, 2002; Rodrigo *et al.*, 2006). Un tratamiento repetido con ^{131}I (dosis acumulada $>600\text{mCi}$) aumenta el riesgo de los pacientes desarrollar leucemia o neoplasias secundarias (Pacini *et al.*, 2006). Posiblemente, la comprensión de los eventos moleculares y procesos biológicos relacionados con la recurrencia y metástasis de los WDTCs pueda facilitar un diagnóstico temprano de estas entidades, así como un manejo quirúrgico y un tratamiento más dirigido de los WDTC en general.

En el caso de los carcinomas pobremente diferenciados y sobre todo en los pacientes que desarrollan carcinomas indiferenciados, el tratamiento inicial es sólo paliativo (Are and Shaha, 2006). El papel de la cirugía en estos casos es controvertido y no altera el curso de la enfermedad, aunque en algunos pacientes podría prolongar levemente la supervivencia (Haigh *et al.*, 2001; Junor *et al.*, 1992). Asimismo, el tratamiento con radio-yodo es totalmente inefectivo debido a la baja o total pérdida de expresión de *NIS* y en líneas generales, la radioterapia externa tampoco es eficaz (Are and Shaha, 2006). En las últimas décadas se ha probado la quimioterapia monomodal (doxorubicina, entre otros) y multimodal (combinación de varios agentes como: paclitaxel y cisplatina) y nuevamente, la respuesta de los pacientes a los agentes quimioterapéuticos ha sido poco significativa (Ain *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 1974; Shimaoka *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1986). Por lo tanto, el mal pronóstico y la quimioresistencia de los ATC y PDTC hacen imprescindible la identificación de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de tratamientos más efectivos. Estos objetivos requieren un mayor conocimiento de los procesos biológicos y alteraciones moleculares involucrados en la carcinogénesis y etiología de los ATC y PDTC.

En este sentido, los recientes avances en las técnicas de biología molecular han facilitado el desarrollo de herramientas de alto rendimiento (*high-throughput approaches*) para el descubrimiento de nuevos marcadores tumorales. Éste es el caso de las matrices de expresión génica o *microarrays* de expresión, que en los últimos años han permitido identificar eventos moleculares relacionados con tipos tumorales concretos y procesos carcinogénicos específicos como: la angiogénesis, proliferación y metástasis (Glinsky, 2006). Numerosos estudios han demostrado el potencial de estas herramientas biotecnológicas en la determinación de firmas moleculares asociadas a diferentes características clínicas (Huang *et al.*, 2003; van de Vijver *et al.*, 2002), que además pueden tener una gran relevancia desde el punto de vista terapéutico.

Por consiguiente, el uso de estas plataformas de alto rendimiento, capaces de identificar combinaciones de marcadores moleculares, procesos biológicos o interactomas asociados a características clínicas concretas, abre la posibilidad de alcanzar una nueva era de conocimiento del cáncer de tiroides.

El objetivo principal de esta tesis fue identificar rutas de señalización y genes específicos relacionados con la carcinogénesis tiroidea, e identificar perfiles predictores de curso clínico. Éste se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- **Caracterización del evento mutacional temprano relacionado con el desarrollo de los tumores tiroideos.**
- **Identificación de genes y redes biológicas reguladas diferencialmente de acuerdo al evento mutacional primario.**
- **Definición del perfil molecular específico de los subtipos histológicos de cáncer de tiroides.**
- **Determinación de genes cuya expresión diferencial esté asociada a la transición del adenoma a carcinoma folicular tiroideo.**
- **Caracterización de marcadores moleculares y rutas biológicas implicadas en la pérdida de diferenciación celular y mal pronóstico de los tumores tiroideos.**
- **Identificación de predictores de mal pronóstico y metástasis de los tumores tiroideos.**
- **Identificación de nuevas dianas terapéuticas para la mejora de los tratamientos actuales.**

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 **Pacientes y datos clínicos.**

En el transcurso del estudio se consiguió reunir tejido congelado de 8 ATC, 6 PDTC, 46 WDTC (13 FTC y 33 PTC), y 21 FA correspondientes a tumores primarios de pacientes independientes no relacionados y procedentes de los hospitales de Santa Creu i Sant Pau, Sabadell, Arnau de Vilanova, y otros hospitales gracias a la colaboración de la Red de Bancos de Tumores, coordinada por el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Las características clínico-patológicas de los pacientes disponibles se detallan en la tabla 3.1.

Los tejidos fueron inmediatamente incluidos en Tissue-Tek® O.C.T.™ (Sakura, NL) y congelados tras la cirugía. Se almacenaron a -80 °C hasta el momento de la extracción del ARN y ADN. Asimismo, se recogieron cinco tejidos congelados de tiroides normal obtenidos a partir de laringuectomías de pacientes sin patología tiroidea previa, siendo la proporción hombre/mujer similar a la misma proporción observada en pacientes.

Tres patólogos evaluaron los bloques de tejido y determinaron de forma independiente el diagnóstico de cada uno de los tumores incluidos en el estudio, así como el porcentaje de células neoplásicas contenidas en cada espécimen. Para ello se cortó con el criotomo una sección de 5-7 µm de grosor de cada uno de los tejidos congelados, se colocó sobre un portaobjetos de cristal y se tiñó con hematoxilina-eosina (H&E). Los patólogos valoraron estas preparaciones histológicas mediante observación por el microscopio óptico.

El protocolo de tinción de las secciones con hematoxilina-eosina se detalla a continuación:

- 1.- Hidratar con etanol absoluto (2 minutos) y posteriormente con etanol al 95% (2 minutos)
- 2.- Lavar con agua destilada; 2 minutos.
- 3.- Teñir con hematoxilina de Mayer durante 15 minutos.
- 4.- Lavar con agua destilada; 2 minutos.
- 5.- Teñir con eosina durante 2 minutos.
- 6.- Eliminar los restos de eosina utilizando etanol al 70%.
- 7.- Deshidratar con pasos sucesivos de etanol al 96% (30 segundos), etanol absoluto (2 minutos) y xilol (dos lavados de 2 minutos cada uno).
- 8.- Montar un cubre sobre la preparación con Eukitt.

Nota: La tinción de las secciones de tejido congelado no requiere ningún paso previo para eliminar el medio de inclusión de las muestras, ya que el O.C.T.TM no interfiere ni en la tinción de los cortes, ni en la extracción del ARN y ADN.

Sólo las muestras con más de un 80% de contenido celular tumoral se incluyeron en el estudio.

Tabla 3.1: Características clínico-patológicas de los casos incluidos en este estudio.

Código	Tipo de tumor	Género ⁺	TNM estadio	Edad	Recidiva	Tiempo de seguimiento*
04T123	PTC	M	T3N1M0	78	Sí	49 m†
05T209	PTC	M	T3N1M0	46	Sí	18 a, 10 m
04T116	PTC	M	T2N0M0	54	No	24 m
04T100	PTC	H	T2N1M0	63	No	46 m
04T111	PTC	H	T1N0M0	56	No	8 a, 8 m
04T112	PTC	M	T2N1M0	36	No	6 a, 5 m
04T115	PTC	M	T2N0M0	41	No	36 m
04T117	PTC	M	T4N1M1	13	No	5 a
04T172	PTC	H	T3N0M0	70	No	31 m
04T223	PTC	M	T2N0M0	46	No	29 m
04T251	PTC	M	T2N0M0	53	No	37 m
05T204	PTC	H	T3N0M0	38	No	27 m
05T210	PTC	M	T2N0M0	40	No	30 m
05T215	PTC	M	T2N0M0	33	No	25 m
05T218	PTC	M	T1N0M0	25	No	18 m
05T219	PTC	H	T2N1M0	45	No	31 m
05T221	PTC	M	T1N0M0	47	No	36 m
05T223	PTC	M	T2N0M0	44	No	24 m
05T224	PTC	H	T1N0M0	45	No	38 m
05T225	PTC	M	T1N0M0	41	No	37 m
05T229	PTC	M	T2N0M0	24	No	12 m
05T230	PTC	H	T4N1M1	31	No	†**
04T233	PTC	M	T2N0M0	43	No	8 m
05T208	PTC	M	T3N0M0	26	No	28 m
04T106	FTC	H	T1N1M1	67	Sí	Perdido durante el seguimiento
04T250	FTC	M	T3N0M0	77	No	14 m
04T229	FTC	M	T3N0M0	33	No	41 m
04T231	FTC	M	T3N1M0	68	No	23 m
05T212	FTC	M	T2N0M0	44	No	50 m
05T153	FTC	H	T3N0M0	50	No	18 m
04T232	FTC	M	T2N0M0	45	No	13 m
04T99	PDTC	H	T3N1M1	65	Sí	36 m
04T97	PDTC	M	T4N1M1	82	Sí	12 m†
04T141	PDTC	M	T3N0M0	72	Sí	12 m
04T143	PDTC	M	T3N1M0	65	Sí	39 m†
04T144	PDTC	M	T2N0M0	75	Sí	36 m
05T205	PDTC	H	T4N1M0	74	Sí	8 m†
04T140	ATC	M	T4N1M0	82	Sí	6 m†
04T139	ATC	H	T4N1M0	57	Sí	8 a†
04T249	ATC	M	T4N1M1	72	Sí	2 m†
04T138	ATC	M	T4N1M1	75	Sí	2 m†
04T98	ATC	H	T4N1M1	60	Sí	5 m†
04T102	ATC	H	T4N1M1	73	Sí	7 m†
04T103	ATC	M	T4N1M1	68	Sí	9 m†
05T226	FA	M	-	27	No	no hubo seguimiento

Código	Tipo de tumor	Género ⁺	TNM estadio [‡]	Edad	Recidiva	Tiempo de seguimiento*
04T131	FA	M	-	30	No	no hubo seguimiento
04T127	FA	M	-	51	No	no hubo seguimiento
05T220	FA	M	-	38	No	no hubo seguimiento
05T228	FA	M	-	54	No	no hubo seguimiento
04T130	FA	M	-	28	No	3 a
04T132	FA	H	-	32	No	no hubo seguimiento
04T133	FA	H	-	67	No	6 a
04T134	FA	M	-	55	No	no hubo seguimiento
04T137	FA	M	-	40	No	no hubo seguimiento
04T224	FA	M	3,2 cm	25	No	no hubo seguimiento
04T226	FA	M	3 cm	39	No	no hubo seguimiento
04T228	FA ⊥	M	1,6 cm	45	No	13 m

*M: mujer; H: hombre

‡TNM: Sistema internacional de clasificación de los tumores malignos (UICC; *Internacional Union Against Cancer*). T: tamaño del tumor, N: presencia/ausencia de invasión en los nódulos linfáticos próximos, M: presencia/ausencia de metástasis a distancia.

*m: meses; a: años

** Fallecido por complicaciones quirúrgicas

† Pacientes que murieron

⊥ Este FA es del mismo paciente que el FTC 04T232.

3.2 Aislamiento del ARN.

Para la extracción de ARN se utilizaron entre 15 y 20 secciones de 20 µm de grosor de cada una de las piezas de tejido congelado incluido en O.C.T.TM El ARN se extrajo según el protocolo de TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH):

- 1.- Homogeneizar las secciones (50-100 mg de tejido aproximadamente) en 1 ml de TriReagent. Dejar a temperatura ambiente durante 5-15 minutos.
- 2.- Añadir 0,2 ml de cloroformo. Mezclar vigorosamente.
- 3.- Centrifugar durante 15 minutos a 4 °C y 12.000 g.
- 4.- Recuperar la fase acuosa y añadir 0,5 ml de isopropanol. Mezclar y dejar a -20 °C toda la noche. Centrifugar 20 minutos a 4°C y 12.000 g.
- 5.- Descartar el sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol al 75%. Centrifugar 5 minutos a 4°C y 12.000 g.
- 6.- Secar el sedimento durante 5-10 minutos.
- 7.- Resuspender en 12-15 µl de agua dietilpirocarbonato (DEPC). Usar 1 µl para cuantificar con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) y otro para testar la calidad del ARN con el bioanalizador de Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). El volumen sobrante fue conservado a -20 °C hasta su uso.

Las muestras degradadas (ARN mensajero <500 pares de bases), se extrajeron una segunda vez para descartar cualquier incidencia en el manejo del material biológico durante la primera extracción. A continuación, se testaron con el bioanalizador y aquellos casos que presentaron un perfil similar o igual al de la primera extracción, se excluyeron definitivamente del estudio.

3.3 Identificación de las alteraciones genéticas tempranas asociadas a las diferentes patologías tiroideas.

3.3.1 Extracción del ADN de tejido congelado.

Para la extracción del ADN se utilizaron entre 15 y 20 secciones de 20 µm de grosor de cada uno de los tejidos tumorales y adenomas incluidos en el estudio. La extracción de ADN de este material congelado e incluido en O.C.T.TM se realizó siguiendo el protocolo de extracción comercial *Dneasy Tissue Kit* (QIAGEN, USA), e incluyendo algunas modificaciones:

- 1.- Sumergir los cortes de tejido incluido en O.C.T.TM en 180 µl de solución *ATL*. Si hay mucha cantidad de tejido, puede doblarse el volumen de *ATL* y a partir de este paso duplicar todos los volúmenes de los pasos siguientes.
- 2.- Añadir 20 µl de *proteínasa K*. Mezclar con ayuda de un vortex e incubar con agitación en un termomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) a 55 °C hasta que el tejido esté completamente lisado. El tiempo de incubación puede variar entre 3 horas y toda la noche.
- 3.- Agitar con el vortex. Añadir 200 µl de solución *AL*, mezclar de nuevo con un vortex e incubar a 70 °C durante 10 minutos.
- 4.- Añadir 200µl de etanol absoluto y mezclar en el vortex.
- 5.- Pasar la mezcla a la columna de Qiagen colocada en un tubo recolector (si se ha duplicado el volumen de *ATL* en el primer paso, dividir la mezcla en dos partes iguales y pasar cada una por una columna). Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el tubo recolector con el sobrenadante.
- 6.- Colocar la columna en un tubo recolector nuevo y añadir 500 µl de la solución *AW1*. Centrifugar a 8.000 g durante 1 minuto. Descartar el tubo recolector con el sobrenadante.

7.- Ajustar la columna en un tercer tubo recolector y añadir 500 µl de solución *AW2*. Centrifugar a 14.000 g durante 3 minutos para secar completamente la membrana de la columna. Descartar el tubo recolector con el sobrenadante.

8.- Colocar la columna en un nuevo tubo limpio donde se va a eluir el ADN extraído. Añadir 200 µl de solución *AE* directamente sobre la membrana. Incubar a temperatura ambiente 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto para eluir. Opcionalmente, la elución se puede hacer en dos pasos de 100 µl de solución *AE* cada uno. También se puede eluir en menos volumen si se requiere que la solución de ADN esté concentrada o si se espera obtener poca cantidad de ADN.

3.3.2 Cuantificación del ADN extraído.

El ADN extraído se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, para lo que fue necesario 1 µl de la muestra original. En aquellos casos en los que la concentración fue superior a 1 µg/µl, se preparó una dilución 1/10 y se utilizó 1 µl de ésta para realizar la cuantificación y evitar una posible saturación de la medida.

3.3.3 Caracterización de las mutaciones puntuales en *BRAF*, *HRAS*, *NRAS* y *KRAS*.

El ADN genómico extraído según el apartado 3.3.1 fue utilizado para identificar mutaciones tempranas presentes en los tejidos tumorales y en los adenomas tiroideos incluidos en el estudio de los perfiles de expresión. Este análisis se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y fue necesario diseñar cebadores o *primers* específicos para cada uno de los fragmentos a amplificar. Las condiciones de la PCR, el tamaño de los amplicones y la secuencia de los cebadores para cada fragmento se detallan en la tabla 3.2.

La secuencia nucleotídica patrón de cada uno de los genes a estudiar se extrajo de la base de datos del proyecto *Ensembl* (Ensembl release 45; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/). El diseño de los cebadores se realizó a través de la herramienta bioinformática: *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), procurando que la temperatura de amplificación de todos los fragmentos fuera la misma. Además se comprobó que la secuencia genómica complementaria a estos oligos no presentara polimorfismos, y que el producto de la amplificación fuera únicamente el esperado mediante la herramienta

PCR *in-silico* disponible en el buscador UCSC (*University of California Santa Cruz*; <http://genome.brc.mcw.edu/>).

Todas las reacciones de PCRs incluyeron un tubo sin ADN (blanco) y se realizaron en un volumen final de 25 μ l, que contenía: 100 ng de ADN genómico, un 10% del volumen final de solución de PCR 10 X (cloruro potásico 50 mM, Tris 10 mM y cloruro de magnesio 1,5 mM), 200 mM de una mezcla de deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 20 pmoles de cada uno de los cebadores diseñados para flanquear los fragmentos a analizar y 1 unidad de Taq Polimerasa. La reacción se llevó a cabo en termocicladores Eppendorf (MasterCycler ep, Germany).

Las muestras amplificadas fueron testadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% (Metaphor, Biowhiter Molecular Applications), y teñido con bromuro de etidio (0,5 μ g/ml). Los tamaños de los productos amplificados fueron comparados con el marcador de peso molecular *Phi X174* digerido con *Hae III*, del cual se utilizaron 500 ng en cada electroforesis. Los productos amplificados del tamaño esperado fueron purificados y secuenciados como se indica en los apartados 3.3.5 y 3.3.6

Finalmente, y para confirmar experimentalmente que los alelos portadores de las mutaciones se expresaban, se hizo otra PCR con ADN complementario (ADNc) en un subgrupo de casos representativo de todos los tipos de patología tiroidea analizados. Para la mayor parte de los fragmentos hubo que diseñar cebadores nuevos, ya que los utilizados con el ADN tumoral se unían a las regiones intrónicas flanqueantes de los exones de interés. Las secuencias de estos nuevos cebadores y las condiciones de estas reacciones también se detallan en la tabla 3.2.

El ADNc se obtuvo por reacción de la transcriptasa inversa (o retrotranscriptasa) mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Añadir 1 μ g de ARN total aislado (apartado 3.2) a un tubo estéril de 200 μ l.
- 2.- Llevar el volumen a 10,6 μ l con agua DEPC. Estos dos pasos deben realizarse en hielo.
- 3.- Desnaturalizar la mezcla a 65-70 $^{\circ}$ C durante 5 minutos y después pasarla rápidamente a hielo.

4.- Preparar la mezcla de la reacción de retrotranscripción (multiplicar estos volúmenes por el número de muestras que se vayan a retrotranscribir más un exceso de un 8-10%):

<i>5X First Strand Buffer</i> (Invitrogen)	4 µl
DTT (0,1 M) (Invitrogen)	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Hexámeros “ <i>random</i> ” o aleatorios (0,5 µg/µl)	1 µl
<i>RNasin</i> (40 u/µl) o <i>RNaseOUT</i> (Ambion)	0,7 µl
<i>SuperScript II</i> (200 unidades (u) /µl) (Invitrogen)	0,7 µl

5.- Añadir 9,4 µl de mezcla de reacción por cada tubo con ARN.

6.- Mezclar sin vortex y centrifugar 1 segundo.

7.- Incubar durante 60-90 minutos a 42 °C.

3.3.4 Estudio de los reordenamientos *RET/PTC1*, *RET/PTC3* y *PAX8/PPAR γ* .

Los genes quiméricos *RET/PTC1* y *RET/PTC3* son el resultado de inversiones cromosómicas cuyos puntos de ruptura y reordenamiento varían entre casos. Esto dificulta el diseño de una única pareja de cebadores para cada tipo de alteración si se decide trabajar con ADN genómico. Sin embargo, todos estos puntos de corte-uniión se localizan en intrones concretos de los genes que participan en los reordenamientos (intrón 11 de *RET*, intrón 1 de *H4* e intrón 7 de *RFG/ELE1*) (Frattini *et al.*, 2004; Nikiforov *et al.*, 1999). Esto permite diseñar una única pareja de cebadores para cada reordenamiento siempre y cuando la PCR se haga a partir de ADN complementario.

El caso del reordenamiento *PAX8/PPAR γ* es más complejo, debido a que: los puntos de corte que afectan a la secuencia de *PAX8* se pueden encontrar en dos intrones distintos (intrón 7 ó 9), y *PAX8* presenta distintas posibilidades de corte-uniión de los exones en el procesamiento del ARN mensajero (*splicing* alternativo) (Nikiforova *et al.*, 2002). En consecuencia, su estudio y caracterización por PCR requieren el uso de ADN complementario y el diseño de distintas parejas de cebadores que detecten la expresión de las diferentes variantes del gen quimera.

Por estos motivos, el estudio de los reordenamientos se realizó a partir de ADN complementario obtenido por transcripción inversa (protocolo del apartado 3.3.3).

Asimismo, para evitar productos inespecíficos y aumentar la cantidad del amplicón generado, se decidió realizar una segunda PCR utilizando cebadores internos. Las condiciones de las PCRs, el tamaño de los amplicones y la secuencia de los cebadores para cada fragmento se detallan en la tabla 3.2. La preparación de todas las reacciones y la realización de las mismas se llevaron a cabo como se indica en el apartado anterior. Además, se retrotranscribió ARN de una línea celular humana con el reordenamiento *RET/PTC1* (TPC1) y se utilizó como control positivo en todas las PCRs de este reordenamiento.

Adicionalmente, se amplificó en paralelo un fragmento del ADNc del gen de la β -glucuronidasa (*GUSB*) (Tabla 3.2), que codifica una enzima lisosómica que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos humanos. Se testó junto con el resto de amplicones y se utilizó como control de calidad de la retrotranscripción y de la eficiencia del resto de reacciones.

La presencia o no de reordenamientos se determinó mediante electroforesis con gel de agarosa (apartado 3.3.3). Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados como se indica en los apartados 3.3.5 y 3.3.6

Las muestras en las que no se detectó producto de amplificación fueron consideradas negativas para el reordenamiento analizado.

Tabla 3.2: Secuencias de los cebadores, condiciones de la PCR y tamaño de los amplicones para cada uno de los fragmentos estudiados.

	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores (5' --> 3')	Tamaño del amplicón †	Condiciones de la PCR
BRAF exón 15 ADN genómico	BRAF_E15_F BRAF_E15_R	TTCATAATGCTTGGCTCTGATAGGA AGCATCTCAGGGCCAAAAA	235 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
BRAF exón 15 ADNc	BRAF_E15_ADNc_F BRAF_E15_ADNc_R	TATTCCACAAAGCCACAACCT CCCTGTTGTTGATGTTTGA	433 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 95 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (95 °C, 40"; 58 °C, 1'; 72 °C, 40") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
HRAS exón 1 ADN genómico	HRAS_E1_F HRAS_E1_R	CAGGAGACCCCTGTAGGAGGA CCTATCCTGGCTGTGTCCTG	227 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
HRAS exón 2 ADN genómico	HRAS_E2_F HRAS_E2_R	GATTCCACCCGGAAGCAGGT GATGGCAAAACACACACAGGA	141 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
HRAS exón 1 y 2 ADNc	HRAS_E1E2_F HRAS_E1E2_R	GGGGCAGGAGACCCCTGTAG GATGGCAAAACACACACAGGA	303 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x5, (94 °C, 30"; 56 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
NRAS exón 1 ADN genómico	NRAS_E1_F NRAS_E1_R	GTCACACTAGGGTTTTCATT TCATATTCATCTACAAAAGTGGT	210 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
NRAS exón 2 ADN genómico	NRAS_E2_F NRAS_E2_R	AGAAATGGGCTTGAATAGTT CCGCAAAATGACTTGCTAT	284 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
NRAS exón 1 y 2 ADNc	NRAS_E1E2_F NRAS_E1E2_R	GTGGAGCTTGAGGTTCTTGC TCCTTGTGGCAAAATCACAC	399 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
KRAS exón 1 ADN genómico	KRAS_E1_F KRAS_E1_R	GCCTGCTGAAATGACTGAA TTGGATCATATTCGTCCACA	167 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
KRAS exón 2 ADN genómico	KRAS_E2_F KRAS_E2_R	TAGTAATTGATGGAGAAACCTG ATTCAAATTTAAACCCACCTATA	177 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10 , (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'

3. Material y Métodos

	Nombre de los cebadores	Secuencia de los cebadores (5' --> 3')	Tamaño del amplicón †	Condiciones de la PCR
KRAS exón 1 y 2 ADNc	KRAS_E1E2_F	GAGGCCTGCTGAAAAATGACT	409 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10; (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
	KRAS_E1E2_R	TCCTGAGCCTGTTTTGTGTCT		
RET/PTC1	RET/PTC1_F	ATTGTCATCTCGCCGTTCC	275 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 45"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10; (94 °C, 45"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
	RET/PTC1_R	CCTGCTCTGCCCTTTCAGATGGAA	196 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10; (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
	RET/PTC1_F anidada*	TGCAGCAAGAGACAAGGTG		
	RET/PTC1_R anidada	GTTGCCCTTGACCACCTTTTCC	298 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 95 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (95 °C, 40"; 60 °C, 1'; 72 °C, 40") x10; (95 °C, 40"; 58 °C, 1'; 72 °C, 40") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 15'
RET/PTC3	RET/PTC3_F	GCACTTTGATGGCTCATGCTA	201 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 95 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (95 °C, 40"; 60 °C, 1'; 72 °C, 40") x10; (95 °C, 40"; 58 °C, 1'; 72 °C, 40") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 15'
	RET/PTC3_R	TTTTCCAAAATTCGCCCTTCTC		
	RET/PTC3_F anidada	TGGAGAAGAGGAGCTGTATCT	207 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 95 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (95 °C, 40"; 60 °C, 1'; 72 °C, 40") x10; (95 °C, 40"; 58 °C, 1'; 72 °C, 40") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 15'
	RET/PTC3_R anidada	AGGGAATTCACACTTTGGATC		
PAX8/PPARG	PAX8/PPARG_E7E1_F	GCCCTTGCTCAACAGCAC	252 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 95 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (95 °C, 40"; 60 °C, 1'; 72 °C, 40") x10; (95 °C, 40"; 58 °C, 1'; 72 °C, 40") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 15'
	PAX8/PPARG_E7E1_R	TCAAAAGGAGTGGGAGTGGTC		
	PAX8/PPARG_E8E1_F	AATGCCTTTCCCCATGCT	233 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 95 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (95 °C, 40"; 60 °C, 1'; 72 °C, 40") x10; (95 °C, 40"; 58 °C, 1'; 72 °C, 40") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 15'
	PAX8/PPARG_E8E1_R	TGCAACCACCTGGATCTGTTCC		
GUSB (control)	PAX8/PPARG_E9E1_F	AGGGCAGCTATGCCTCCT	171 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10; (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
	PAX8/PPARG_E9E1_R	TGCAACCACCTGGATCTGTTCC		
	GUS_F	AAACGATTGCAGGGTTTCAC	171 bp	<u>Desnaturalización inicial:</u> 94 °C, 5'; <u>Ciclos:</u> (94 °C, 30"; 60 °C, 30"; 72 °C, 30") x10; (94 °C, 30"; 58 °C, 30"; 72 °C, 30") x25; <u>Elongación final:</u> 72 °C, 10'
	GUS_R	CTCTCGTCGGTGACTGTTCA		

† El tamaño de los amplicones viene dado en pares de bases (bp)

*En las PCRs anidadas se utilizó 1µl del producto de la primera reacción.

3.3.5 Purificación de los fragmentos amplificados mediante PCR.

Para eliminar restos de cebadores y dNTPs no utilizados en la reacción de amplificación, se utilizó el kit *E.Z.N.A Cycle-Pure Kit* (Omega BioTek, USA). Los pasos a seguir fueron:

- 1.- Transferir el producto de PCR a un tubo limpio de 1,5 ml y añadir 5 volúmenes de solución *CP*. Homogenizar la mezcla.
- 2.- Colocar una columna *HiBind* en un tubo de 2 ml y aplicar en ella la mezcla del producto de PCR y de la solución *CP*. Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto y descartar el líquido recogido en el tubo.
- 3.- Lavar la columna añadiendo 700 μ l de *ADN wash buffer*. Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto y descartar el líquido recogido en el tubo de recolección.
- 4.- Realizar un segundo lavado con 700 μ l de *ADN wash buffer* y centrifugar 1 minuto a 12.000 g. Descartar el líquido.
- 5.- Centrifugar en vacío a 12.000 g durante 1 minuto para eliminar los restos de solución que impregnen la columna.
- 6.- Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 ml y añadir agua destilada precalentada a 70 °C directamente sobre la membrana (el volumen de elución guarda relación con la cantidad de amplificado de la que se parta). Centrifugar a 12.000 g durante 1 minuto.

3.3.6 Secuenciación de los fragmentos purificados.

Los productos de PCR purificados fueron secuenciados de forma automática utilizando terminadores fluorescentes Big Dye™ (Applied Biosystems, USA) y un secuenciador multicapilar ABI modelo 3730 (Applied Biosystems, USA).

Inicialmente, se realizó una reacción de secuenciación cíclica de 20 μ l de volumen final, con 10 pmoles del cebador elegido, 5% de DMSO, 4 μ l de Big Dye terminator, y 4-12 ng del producto purificado en función del tamaño del fragmento a secuenciar. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer, USA) y consistió en 10 ciclos de desnaturalización de la muestra a 95 °C durante 10 segundos, anillamiento de primers a 50° C durante 5 segundos y elongación a 60 °C durante 4 minutos.

El producto final de esta reacción fue purificado por ultrafiltración en columnas de Sephadex G-50 (Millipore), para ser analizado posteriormente mediante el secuenciador y visualizado gracias al software FinchTV v1.4 (Applied Biosystems, USA).

3.4 **Obtención de los perfiles de expresión de las muestras aisladas: amplificación del ARN mensajero, marcaje, hibridación y detección.**

El transcriptoma de los tumores, adenomas y tejidos normales incluidos en el estudio se obtuvo por hibridación competitiva entre el ADN complementario de cada uno de estos especímenes y un ADN complementario de referencia (*Universal Human Reference RNA*, Stratagene) común a todas las hibridaciones. Para ello fue necesario amplificar el ARN mensajero (ARNm) tanto de las muestras “problema” como de la muestra de referencia, marcar con el fluorocromo correspondiente cada uno de ellos, e hibridarlos de forma competitiva sobre la matriz de expresión Oncochip 12K generada en el CNIO (Figura 3.1).

A continuación se detallan cada uno de los pasos de este procedimiento.

3.4.1 **Amplificación del ARN mensajero.**

Retrotranscripción o transcripción inversa: síntesis del ADN complementario (ADNc)

El volumen final de esta reacción es de 10 μ l y son necesarios 4 μ g de ARN aislado según el apartado 3.2. El manejo de ARN requiere mantener las muestras a 4 °C en todo momento, exceptuando los tiempos de las incubaciones (esta advertencia ha de tenerse en cuenta en el desarrollo de cualquier protocolo).

- 1.- Mezclar 1 μ l de *oligo T7-dT* (0,5 μ g/ μ l, Ambion) y 4 μ g de ARN contenidos en 4,5 μ l de agua. Incubar durante 10 minutos a 70 °C y enfriar rápidamente en hielo.
- 3.- Mezclar 2 μ l de *5X first strand buffer*, 1 μ l de DTT (ditiotreitól), 0,1 M, 0,5 μ l de dNTPs (10 mM) y 0,5 μ l de *RNAsin* (40 unidades (u)/ μ l, Promega). Atemperar la mezcla a 42 °C durante 10 minutos.
- 4.- Mezclar los 5,5 μ l de *oligo T7-dT* y ARN, con los 4 μ l de la mezcla atemperada a 42 °C. Añadir 0,5 μ l de *Superscript II* (retro-transcriptasa) e incubar 1 hora a 42 °C

Síntesis de la segunda hebra de ADNc (Invitrogen, USA):

1.- Añadir a los 10 μ l de la reacción anterior:

Agua DEPC	45,5 μ l
5X Second-Strand Buffer	15 μ l
dNTPs (10 mM)	1,5 μ l
<i>E. Coli</i> DNA ligasa (10 u/ μ l)	0,5 μ l
DNA polimerasa I (10 u/ μ l)	2 μ l
RNAsa H (2 u/ μ l)	0,5 μ l

2.- Incubar a 16°C durante 2 horas.

3.- Añadir 1 μ l de *T4-DNA polimerasa*. Incubar 5 minutos a 16°C.

Lavado de la doble hebra de ADNc

1.- Pasar los 76 μ l de la reacción anterior a un tubo con resina (Phase Lock Gel Light 1,5 ml, Eppendorf)

2.- Añadir un volumen (76 μ l) de agua y 152 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico.

3.- Centrifugar en frío (4 °C) durante 5 minutos a 12.000 g.

4.- Pasar la fase acuosa (152 μ l, aproximadamente) a otro tubo y añadir 0,5 volúmenes de acetato amónico (NH₄Ac) 7,5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar y dejar toda la noche a -20 °C.

5.- Añadir 1 μ l de acrilamida lineal y centrifugar a 14.000 g durante 20 minutos.

6.- Descartar el sobrenadante y lavar con 500 μ l de etanol 75%.

7.- Centrifugar a 12.000 g durante 5 minutos, secar y resuspender en 8 μ l de agua.

Síntesis de ARN mensajero complementario (ARNmc) (MegaScript T7 kit, Ambion):

1.- Añadir a los 8 μ l de ADNc de doble hebra: 2 μ l de ATP, 2 μ l de CTP, 2 μ l de GTP y 2 μ l de UTP (75 mM). Una vez atemperado el *buffer T7* 10X, añadir al volumen anterior 2 μ l de esta solución y 2 μ l de *RNA polimerasa T7*.

2.- Incubar durante 14 horas a 37 °C.

3.- Pasar a hielo y añadir 1 μ l de desoxirribonucleasa libre de ribonucleasas (*RNAse-free DNase*). Incubar durante 15 minutos a 37 °C.

Purificación del ARNmc con columnas (RNeasy Mini kit, Qiagen):

- 1.- Llevar la muestra a un volumen final de 100 µl con agua DEPC (21 µl de muestra y 79 µl de agua).
- 2.- Añadir 350 µl de una dilución 1:100 de solución *RTL* (10 ml *RTL* + 100µl β-mercaptoetanol) y 250 µl de etanol absoluto. Realizar este paso a temperatura ambiente y en campana de flujo laminar.
- 3.- Mezclar todo y añadirlo a una columna de purificación.
- 4.- Centrifugar 30 segundos a 4 °C y 10.000 g.
- 5.- Pasar el producto eluido dos veces más por la columna.
- 6.- Cambiar de tubo recolector y añadir 500 µl de solución *RPE*.
- 7.- Centrifugar 30 segundos a 4 °C y 10.000 g.
- 8.- Repetir el lavado con *RPE*.
- 9.- Centrifugar 1 minuto a 4 °C y 12000 g para eliminar los restos de etanol.
- 10.- Pasar la columna a un tubo recolector limpio y añadir 50 µl de agua DEPC. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 12.000 g.
- 11.- Añadir otros 50 µl de agua, dejar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a 12000 g.
- 12.- Precipitar el ARNmc purificado con 0,5 volúmenes de NH₄Ac 7,5 M (50 µl) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (250 µl). Mezclar bien y dejar 1 hora a -80 °C o toda la noche a -20 °C.
- 13.- Centrifugar 30 minutos a 4 °C.
- 14.- Lavar con etanol 75% frío, centrifugar durante 5 minutos y secar el sedimento.
- 15.- Resuspender en 12-15 µl de agua DEPC. Usar 1 µl para cuantificar el ARNmc con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, y otro para testar la calidad del ARN por electroforesis en un gel de agarosa al 1% donde, a la vez que la muestra, se carga un marcador de peso molecular de ARN (*RNA Century-Plus Size Markers*, Ambion).
- 16.- El volumen sobrante conservarlo a -20 °C o a -80 °C hasta su uso.

El Nanodrop además de cuantificar las muestras, mide el ratio de absorbancia a las longitudes de onda: 260 y 280 nm, que es un parámetro indicativo del estado del ARN. De manera que se considera que una muestra con un ratio 260/280 entre 1,8 y 2,1 tiene una calidad aceptable. Además, este método se complementa con una electroforesis en la que se incluye un marcador de peso molecular de ARN (como se indica en el punto 15 de este apartado).

3.4.2 Marcaje del ADN complementario a partir del ARN amplificado (ARNA).

Para el marcaje del ADNc de las muestras problema y de la referencia son necesarios los siguientes reactivos:

- *Random hexamers*, 0,5 µg/µl, Promega
- *SuperScript II Rnasa H- Reverse Transcriptase* (con 0.1 M DTT y 5X *first strand cDNA synthesis buffer*), Invitrogen
- dNTPs: Fermentas dGTP, dCTP, dATP, dTTP
- *FluoroLoink Cy5-dUTP*, 25 nmol, Amersham
- *FluoroLoink Cy3-dUTP*, 25 nmol, Amersham
- *RNasin ribonuclease inhibitor* 10000 u, Promega
- Acetato sódico (NaOAc) 3 M pH 5,5, SIGMA
- Etanol absoluto MERCK
- *Microarray hybridization buffer*, SlideHyb #1 Ambion
- *Human COT-I DNA* (1 µg/µl), Invitrogen
- *RNA polyA* SIGMA
- *Yeast tRNA* (25 mg), Invitrogen
- *CyScribe GFX Purification Kit*, Amersham

Además, es conveniente preparar con anterioridad las siguientes soluciones:

- **Mezcla 50X dNTPs** (100 µl)

dATP 100 mM	25 µl
dCTP 100 mM	25 µl
dGTP 100 mM	25 µl
dTTP 100 mM	5 µl
Agua	20 µl
- **Solución de lavado del *Kit CyScribe GFX Purification***: añadir 40 ml de etanol absoluto a la botella de la solución de lavado incluida en el kit y mezclar bien.
- **Mezcla de agentes bloqueantes** (*RNA polyA* 5 µg/µl, *yeast tRNA* 2 µg/µl): a partir de las soluciones stock comerciales, preparar alícuotas de 100 µl *RNA poly A* y 40 µl de *yeast tRNA*. Almacenarlas a -20 °C. Cuando se vaya a hacer la hibridación, descongelar una alícuota de cada una y mezclarlas. Añadir 60 µl de agua y hacer alícuotas de 20 µl. Cada alícuota tiene el volumen necesario para 10 hibridaciones. Conservar las alícuotas restantes a -20 °C.

Una vez comprobados todos los reactivos y preparadas las mezclas y soluciones necesarias, se puede comenzar con el protocolo que se detalla a continuación:

Retrotranscripción

- 1.- Por cada hibridación prevista, mezclar en 2 tubos distintos:
 - 2,5 µg de ARN amplificado de la muestra de referencia y 3 µl de hexámeros aleatorios (*Random hexamers*, 1,5 µg).
 - 2,5 µg de ARN amplificado de la muestra problema y 3 µl de hexámeros aleatorios (1,5 µg).
- 2.- Desnaturalizar a 70 °C durante 5-10 minutos. Pasar a 4 °C y dejar 5 minutos en hielo.
- 3.- Preparar dos mezclas de reacción de retrotranscripción para cada fluoróforo:

<i>First strand Buffer</i>	5 µl
DTT (0,1 M)	2,5 µl
dNTPs (50X)	0,5 µl
<i>Cy3-dUTP/Cy5-dUTP</i> (10 mM)	1,5 µl
<i>RNasin</i> (40 u/µl)	0,75µl
<i>SuperScript II</i> (200 u/µl)	1,25 µl
- 4.- Mezclar y añadir 11,5 µl de cada mezcla a sus respectivas muestras de ARNa, de manera que a la muestra de referencia se le añada la mezcla con *Cy3-dUTP* y a la muestra problema la que contiene *Cy5-dUTP*.
- 5.- Mezclar sin vortex y centrifugar 1 segundo.
- 6.- Mantener 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Incubar 2 horas a 37 °C.

Degradación del ARN molde

- 1.- Añadir 12,5 µl de hidróxido sódico (NaOH) 0,1 N e incubar 10 minutos a 70 °C.
- 2.- Neutralizar el pH con 12,5 µl de ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N.

Purificación de la muestra marcada (CyScribe GFX Purification Kit, Amersham)

- 1.- Para cada ADNc usar una columna del kit de purificación CyScribe GFX (Amersham).
- 2.- Añadir 500 µl de *capture buffer* a cada columna.
- 3.- Transferir el ADNc a la columna.
- 4.- Mezclar suavemente con ayuda de una pipeta (aspirar 5 veces con la pipeta).
- 5.- Centrifugar inmediatamente a velocidad máxima durante 30 segundos. No dejar el ADNc en *capture buffer* más de 10 minutos porque se reduce el rendimiento.
- 6.- Eliminar el filtrado y añadir 600 µl de solución de lavado. Centrifugar a máxima velocidad 30 segundos. Eliminar el filtrado.
- 7.- Repetir el lavado dos veces más.
- 8.- Centrifugar la columna a velocidad máxima durante 10 segundos para eliminar el líquido remanente.
- 9.- Transferir las columnas GFX a un tubo nuevo y añadir 60 µl de solución de elución directamente sobre la matriz de cada columna. La solución debe cubrir toda la membrana. La recuperación se incrementa si se precalienta la solución a 65 °C.
- 10.- Dejar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto a máxima velocidad. Repetir la elución una vez.

Precipitación de la muestra marcada y purificada

- 1.- Mezclar concentraciones idénticas de los ADNc que se van a hibridar juntos (Cy3-referencia y Cy5-muestra problema).
- 2.- Añadir 30 µl de Human COT-1 DNA.
- 3.- Añadir 0,1 volúmenes de NaOAc 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto.
- 4.- Incubar a -20 °C al menos durante 20 minutos.
- 5.- Centrifugar a 4 °C durante 15 minutos.
- 6.- Eliminar el máximo posible de sobrenadante.
- 7.- Dejar secar 5 minutos a temperatura ambiente y resuspender en 42 µl de 1X *Ambion SlideHyb Hybridization Buffer* precalentado a 65 °C durante 15 minutos.
- 8.- Añadir 2 µl de agentes bloqueantes (*RNA polyA / yeast tRNA*).
- 9.- Desnaturalizar durante 3 minutos a 95 °C.
- 10.- Centrifugar 1 segundo y aplicar la mezcla de hibridación sobre la cara impresa del microarray prehibridado.

3.4.3 Hibridación y detección.

Previo a la hibridación es preciso lavar y desnaturalizar la matriz de clones que constituye el Oncochip 12K y que está impresa sobre un portaobjetos de cristal químicamente tratado. Para ello son necesarios los siguientes reactivos, soluciones y materiales:

- BSA (albúmina de suero bovino) 100 g SIGMA 6, SSC 20X y SDS 10%
- Gel de sílice con indicador PANREAC
- *Hybrislips* (cubre-objetos) SIGMA 22x60 mm ó 22x40
- Cámaras de hibridación CORNING
- Cajas opacas para 10 portas SHANDON
- **Solución SSC 20X:** Disolver 175 g de cloruro sódico y 88 g de citrato sódico en 500 ml de agua. Ajustar el pH a 7,0 con ácido clorhídrico 1 N. Llevar hasta 1 litro con agua.
- **Solución SDS 10%:** Disolver 10 g de dodecilsulfato sódico (SDS) en 100 ml
- **Solución de prehibridación:** mezclar secuencialmente 100 ml de agua, 40 ml de SSC 20X, 2 ml de SDS 10% y 400 µl de BSA 10% preparada previamente y repartida en alícuotas (guardar a -20 °C). Completar hasta 200 ml con agua.
- **Soluciones de lavado:** se preparan 2 litros de cada solución por cada serie de 8 cristales y se precientan las soluciones a la temperatura empleada en la hibridación. Solución-1: 200 ml de SSC 20X y 100 ml de SDS 10%. Completar con agua hasta los 2 litros. Solución-2: 50 ml de SSC 20X y 100 ml de SDS 10%. Completar con agua hasta los 2 litros.

Lavado de los cristales

Este lavado evita la formación de los “cometas” (puntos de hibridación cuya fluorescencia se extiende más allá del área correspondiente a dichos puntos) tras la hibridación.

- 1.- Incubar los cristales en SDS 0,1 % con agitación suave en un agitador orbital durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 2.- Repetir el lavado y enjuagarlos con agua.

Desnaturalización de las sondas

- 1.- Dejar los cristales en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.
- 2.- Enjuagar en agua a temperatura ambiente.
- 3.- Introducir cada cristal en un tubo tipo *Falcon* de 50 ml con la etiqueta del código de barras del cristal hacia abajo.
- 4.- Centrifugar durante 5 minutos a 800 g para secar los cristales.

Prehibridación

- 1.- Incubar los cristales en la solución de prehibridación durante 45-60 minutos a 65 °C.
- 2.- Lavar con agua a temperatura ambiente
- 3.- Desnaturalizar de nuevo hirviendo 2 minutos en agua.
- 4.- Lavar con agua a temperatura ambiente y volver a centrifugarlos en tubos *Falcon*.

Hibridación

- 1.- Colocar un par de gotas de agua en los extremos de las cámaras de hibridación para mantener la humedad durante el proceso.
- 2.- Depositar la mezcla de hibridación sobre la cara impresa del cristal. Colocarla en varias áreas del cristal para que la distribución sea homogénea.
- 3.- Colocar el cubre-objetos evitando que se formen burbujas. Las burbujas más pequeñas pueden desaparecer durante la hibridación.
- 4.- Colocar el cristal en la cámara de hibridación y sellar la cámara de manera estanca.
- 5.- Incubar durante 15-20 horas a 42 °C.

Lavados

Durante los lavados es de máxima importancia prevenir el secado de los cristales. También se recomienda proteger los cristales de la luz para evitar un descenso de la señal de los fluorocromos.

- 1.- Abrir la cámara de hibridación y sumergir cada cristal en 50 ml de solución-1 de lavado precalentado a 42 °C para despegar el cubre-objetos. Se recomienda agitar

- suavemente el cristal en la solución de lavado para facilitar el despegue del cubre.
- 2.- Lavar 15 minutos con 600 ml de solución-1. Dejar 10 minutos en el incubador a 42 °C y luego 5 minutos en el agitador orbital a temperatura ambiente.
 - 3.- Repetir dos veces el lavado con solución-1.
 - 4.- Hacer 3 lavados de 15 minutos con solución-2. Se deja 10 minutos a 42 °C con 600 ml de solución-2 y luego en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos.
 - 5.- Centrifugar en tubos Falcon de 50 ml durante 5 minutos a 800 g.
 - 6.- Proteger los cristales de la luz hasta escanearlos con el escáner *Scanarray 5000XL* (GSI Lumonics, Kanata, Ontario, Canadá). Se recomienda escanear cuanto antes por si es preciso hacer más lavados o repetir el escaneo, de manera que se pierda el mínimo de señal.

El escáner *Scanarray 5000XL* lee las señales emitidas por los fluoróforos Cy5 (cianina5) y Cy3 (cianina3) tras ser excitados por el láser del mismo a las longitudes de onda 635 nm y 532 nm, respectivamente. Como resultado, genera dos archivos con la extensión *gps*. Posteriormente, estos archivos son volcados en el programa GenePix Pro 5.1 junto con un fichero que indica la posición específica de cada uno de los clones incluidos en el Oncochip 12K. Esta plantilla de posición/clon es suministrada por la Unidad de Genómica del CNIO y es generada por el propio software del robot que imprime estas matrices de expresión “caseras”.

3.4.4 La matriz de expresión Oncochip 12K.

El Oncochip 12K es una matriz o *microarray* de ADN complementario generado por la Unidad de Genómica del CNIO. Está formado por 48 submatrices organizadas en 12 filas y 4 columnas, y cada subunidad contiene 576 puntos de hibridación dispuestos en 24 filas y 24 columnas. En total incluye 11.675 clones humanos (Research Genetics, Huntsville, AL) que representan 9.348 genes humanos y sub-secuencias de secuencias nucleotídicas que se transcriben pero que están aún sin caracterizar (expressed sequence tag o EST). Los genes representados en este microarray de expresión fueron seleccionados por su participación probada *in vitro* o *in silico* en el cáncer, por su relación con la respuesta a fármacos y/o por su expresión específica de tejido (<http://www.cnio.es/UserFiles/File/Biotecnologia/Genomica/>). Esta plataforma de alta

densidad, además, contiene controles internos de calidad y al menos, un duplicado por clon para garantizar la reproducibilidad y especificidad del ensayo.

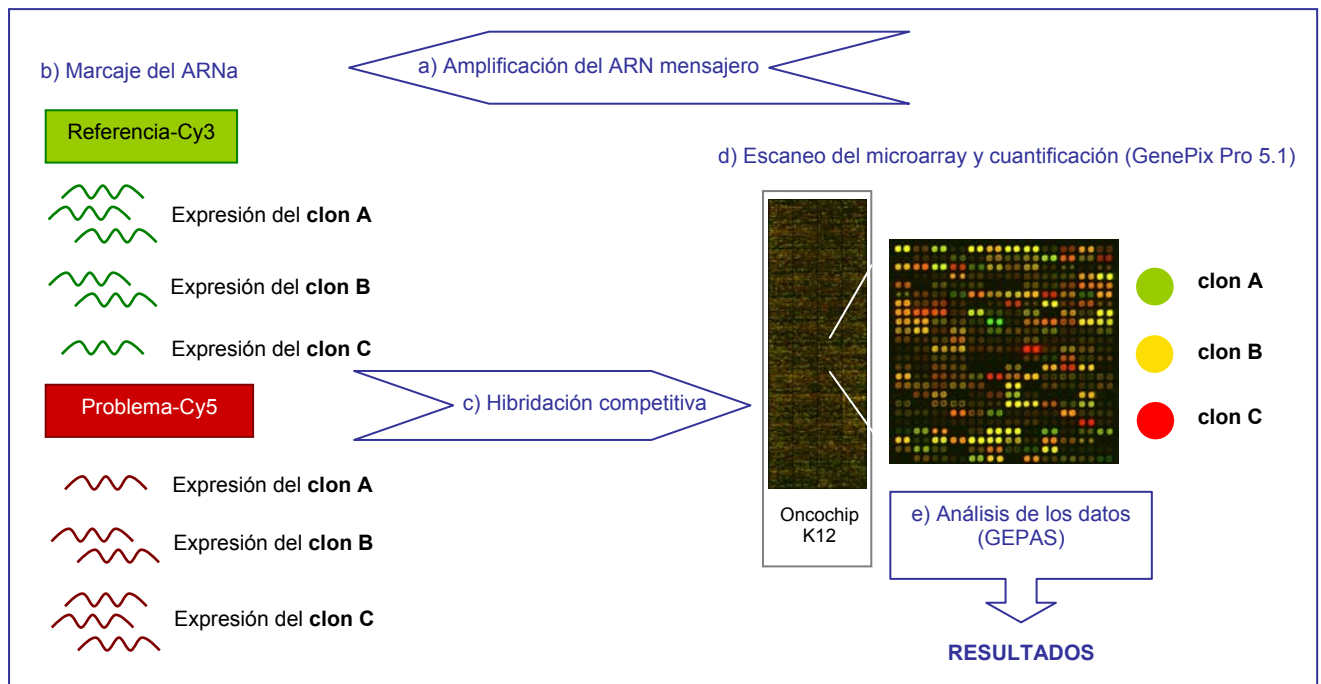


Figura 3.1: Esquema gráfico de los pasos principales para la obtención de los perfiles de expresión de las neoplasias tiroideas: a) Amplificación del ARN mensajero; b) Marcaje del ARN; c) Hibridación competitiva entre el ARN de una muestra problema y de una muestra referencia; d) Escaneo del microarray y cuantificación de las señales generadas por los dos fluorocromos para cada punto de la matriz. Estas señales pueden ser: verdes, amarillas o rojas, de forma que una señal verde indica que el clon hibridado se expresa más en la muestra de referencia que en la muestra problema (clon A), una señal roja justamente lo contrario (clon C), y una amarilla, señala que la expresión del clon en las dos muestras es muy similar (clon B); y e) Análisis mediante el software GEPAS para transformar los datos generados por el Oncochip 12K en resultados.

3.5 Análisis de los datos de expresión obtenidos con la plataforma Oncochip 12K.

La tecnología de los microarrays permite monitorizar los niveles de expresión de miles de genes en paralelo bajo diseños experimentales que incluyen distintas condiciones biológicas (Herrero *et al.*, 2003), representadas en este estudio por los diferentes subtipos de neoplasias tiroideas.

Los datos generados por estas herramientas de alta densidad se almacenan en tablas con miles de líneas, correspondientes a los datos de expresión de cada uno de los clones hibridados en la matriz, y columnas, cada una de las cuales representa el transcriptoma de una única muestra.

La transformación de estos datos en resultados con un significado biológico, requiere el uso de programas bioinformáticos diseñados para este fin concreto y el manejo de multitud de bases de datos con información funcional sobre los genes destacados durante el proceso de análisis.

En este apartado se detalla el procedimiento seguido para la normalización y preprocesado de los datos de expresión de los tejidos tiroideos incluidos en la tesis, así como las herramientas y programas empleados en los distintos análisis.

3.5.1 Normalización y preprocesado de los datos de expresión.

Mediante el programa de análisis GenePix Pro 5.1 se cuantificaron los ratios de los fluoróforos Cy5/Cy3 para cada uno de los puntos de la matriz de expresión y se transformaron logarítmicamente (logaritmo en base 2), con el fin de obtener una distribución simétrica de los datos. A continuación, se normalizaron siguiendo el método LOWESS (Al-Shahrour *et al.*, 2006) incluido en el programa de análisis de datos de expresión *GEPAS* (*Gene Expression Pattern Analysis Suite*, <http://gepas3.bioinfo.cipf.es/>). Además, se sustrajo la mitad de la media de la señal de fondo existente para cada uno de los puntos de hibridación del array, lo que evita sobrestimar las señales. Los puntos presentes en áreas defectuosas de la matriz, así como aquellos que presentaban morfología de halo o con intensidades (suma de las medias de los dos canales) menores a la suma de las medias del fondo, se consideraron valores perdidos. Las réplicas inconsistentes (aquéllas que distan de la mediana de las réplicas más del umbral establecido) se descartaron y se hizo media de los duplicados consistentes. Se eliminaron aquellos clones cuyos datos de expresión estuvieran perdidos en uno o más arrays dentro de la serie de casos analizada.

3.5.2 Identificación de los genes cuyos cambios de expresión se asocian a la pérdida de diferenciación y al aumento de la agresividad de los carcinomas tiroideos.

Para identificar transcritos específicamente relacionados con la pérdida de diferenciación de la célula folicular tiroidea, así como con el aumento de la agresividad de los carcinomas tiroideos, se realizaron comparaciones por pares de los perfiles de expresión de los tumores anaplásicos y los pobremente diferenciados frente a cada una de los subtipos de los tumores bien diferenciados (FTC y PTC). El estadístico utilizado para esta comparación fue

el test de la *t de Student* de la herramienta T-REX de GEPAS, que realiza un test de la *t* para las diferencias en la expresión media de cada uno de los clones al comparar dos grupos de arrays entre sí (Montaner *et al.*, 2006). Al tratarse de un test múltiple hubo que corregir los *p*-valores obtenidos para cada comparación, lo que se llevó a cabo con el método de control de los falsos positivos de Benjamini y Hochberg (*false discovery rate* o FDR) (Benjamini *et al.*, 1995). Este test ajusta el valor de la *p* en función del número de análisis que se esté realizando (en este caso el número de clones) y la posición que ocupe dicha *p* en el listado total de análisis ordenado de mayor a menor grado de significación: $FDR = \text{Valor de la } p \times (N^\circ \text{ de análisis} / \text{Posición en el listado de análisis según significación})$.

Aquellos clones que mostraron un FDR menor a 0,15 y una diferencia en la expresión entre las clases tumorales comparadas igual o mayor a 2 veces, se consideraron expresados de forma significativamente diferencial entre las dos clases comparadas.

De forma más concreta, se consideraron asociados a la pérdida de diferenciación, aquellos clones cuyas diferencias de expresión fueron significativas tanto en la comparación ATC/PDTC *versus* PTC, como en la de ATC/PDTC *versus* FTC, siendo el sentido de la expresión el mismo en ambos análisis (Figura 3.2).

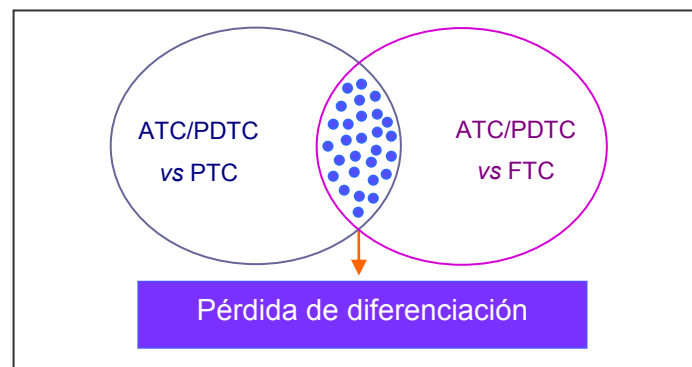


Figura 3.2: Esquema aclaratorio de la estrategia seguida para la identificación de genes cuya sobre- o sub-expresión se asocia de forma específica bien a la pérdida de diferenciación de los tumores ATC/PDTC, bien al subtipo tumoral PTC o al subtipo FTC.

3.5.3 Perfil funcional del proceso de pérdida de diferenciación.

Una de las estrategias más potentes en el descubrimiento de los procesos biológicos diferencialmente regulados entre clases tumorales es el análisis por *Gene Set Enrichment*

(GSEA) descrito por (Mootha *et al.*, 2003). GSEA se basa en el estudio de la distribución de conjuntos de genes con una misma característica funcional a lo largo de una lista de genes ordenados según su expresión diferencial entre dos clases de tejidos, situaciones clínicas u otras condiciones.

Asimismo, en este estudio se ordenaron los clones según su expresión diferencial entre ATC/PDTC y WDTC, corrigiendo mediante el programa bioestadístico Limma (Bioconductor, (Gentleman *et al.*, 2004) posibles efectos debidos a una distribución asimétrica del género y la edad entre las clases. Como este análisis fue más complejo que las situaciones para las que el programa GSEA estaba en principio destinado (estudios caso-control), se utilizaron los programas *FatiScan* y *el FatiGOplus*. Estas herramientas bioinformáticas están incorporadas al software *Babelomics* (Al-Shahrour *et al* 2006) (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es/>) y permiten evaluar diferentes términos biológicos extraídos de distintas bases de datos como: *Gene Ontology*, *KEGG pathways*, *Biocarta*, *Transfac*, *CisRed*, *miRbase targets*, y otras. A continuación se detallan las utilizadas en este análisis:

Gene Ontology (GO): es una base de datos diseñada con el fin de estandarizar la nomenclatura de los procesos biológicos, funciones moleculares y la localización subcelular de los productos de los genes conocidos. GO representa el conocimiento biológico como un árbol, de manera que los nodos superiores representan los conceptos más generales y los inferiores los más precisos.

KEGG pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes): es una colección de mapas de rutas generadas manualmente que representan el conocimiento existente sobre interacciones moleculares y redes de reacciones metabólicas, procesado de información genética, procesado de información ambiental, procesos celulares y enfermedades humanas.

Biocarta pathways: es un conjunto de modelos gráficos dinámicos que muestran cómo interaccionan las proteínas. Estos mapas se renuevan constantemente de acuerdo a nueva información proteómica.

Finalmente, se completó este estudio de enriquecimiento funcional de los genes expresados diferencialmente, con búsquedas exhaustivas en las bases de datos de bibliografía (PubMed) y de genes (Entrez Gene) del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos, www.ncbi.nlm.nih.gov/).

3.5.4 Identificación de un “predictor” de prognosis clínica.

Un predictor es una herramienta matemática que utiliza diferentes conjuntos de datos (los transcriptomas) correspondientes a diferentes clases de objetos (tumores tiroideos) para aprender a distinguir entre éstas clases. El aspecto más importante de este proceso de aprendizaje es la evaluación del clasificador generado. Esto se realiza mediante un procedimiento denominado validación cruzada.

En este sentido, se utilizó el programa *Prophet* (Medina *et al.*, 2007), incluido en el paquete de herramientas GEPAS para construir un clasificador de pronóstico clínico a partir de tumores primarios tiroideos. *Prophet* se basa en un esquema de validación cruzada especialmente diseñada para producir errores de validación imparciales e incorpora diferentes métodos para la selección de genes y la predicción. En este estudio, se utilizó el algoritmo SVM (Support Vector Machines) (Brown *et al.*, 2000) con el método *Kernel* de función de bases radiales para generar la regla de clasificación de los tumores, y el F-ratio para seleccionar el mínimo número de genes que mejor clasificaban los casos de acuerdo a la clase a la que debían pertenecer.

Este análisis se realizó a partir de los perfiles de expresión de todos los tumores anaplásicos, los pobremente diferenciados y los tumores bien diferenciados, clasificados de acuerdo a su pronóstico. De este modo, se consideraron carcinomas tiroideos de mal pronóstico (PPTC) los ATC, PDTC y los WDTC con recurrencia y/o metástasis en el seguimiento, y de buen pronóstico (NPPTC) los WDTC que no presentaron recurrencia ni metástasis en el seguimiento.

Los resultados de este predictor fueron visualizados con el programa *Tree View* de GEPAS (Herrero *et al.*, 2001) tras realizar un agrupamiento o *clustering* jerárquico no supervisado únicamente con los datos de expresión de los genes de la firma molecular. Para ello se utilizó la herramienta *Clustering* incluida en GEPAS, de manera que se utilizó la distancia euclídea para calcular las distancias entre los genes, y la correlación lineal para calcular las distancias entre los tumores. El método de clustering aplicado fue el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair-group method using arithmetic averages*).

3.5.5 Determinación de redes génicas asociadas de forma específica a las mutaciones tempranas más frecuentes de los tumores tiroideos.

Para llevar a cabo este análisis fue necesario comparar por pares los casos de acuerdo a la mutación temprana presente en éstos (*BRAF*, *RET/PTC1* o *NRAS*). Para ello se siguió la metodología explicada en el apartado 3.5.2, y se consideraron genes específicos de cada clase aquellos que se expresaban de forma diferencial (> 2 veces) todas las comparaciones por pares de una clase con respecto el resto. De esta forma, se obtuvo una lista de genes diferencialmente expresados y específicos para cada mutación analizada.

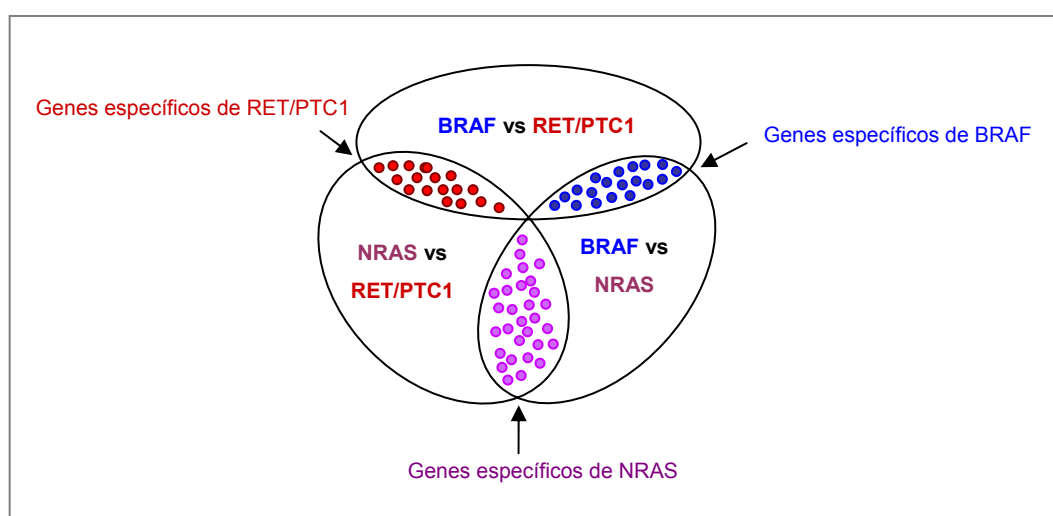


Figura 3.3: Esquema gráfico de la estrategia seguida para determinar los genes que se asocian de forma específica a cada tipo de tumor de acuerdo a la mutación temprana que presenten.

A continuación, se hizo un enriquecimiento funcional de estas listas de genes mediante la herramienta *SNOW* incluida en el programa *Babelomics* (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es>). *SNOW* permite chequear mediante el test de *Kolgomorov-Smirnov*, la existencia de un número significativo de interacciones proteicas para un grupo de genes preseleccionados con respecto un grupo de referencia. Para ello utiliza una base de datos de interactomas construida mediante el programa *PIANA* (*Protein Interactions and Network Analysis*), que permite integrar diferentes fuentes de información relativas a interacciones proteicas (Aragues *et al.*, 2006). Las bases de datos integradas son: *BIND* (*Biomolecular Interaction Network Database*), *DIP* (*Database of Interactin Proteins*), *RPD* (*Rice Proteome Database*) y *MIPS* (*Mammalian Protein-Protein Interaction Database*), así como interacciones descritas en publicaciones científicas.

Además, con esta herramienta se pueden identificar genes/proteínas (nodos) que estén muy centrados dentro del interactoma. Estos “nodos” concentran muchas conexiones interproteicas del interactoma, lo que les hace especialmente relevantes para el funcionamiento del sistema general de la célula.

Adicionalmente y para complementar el estudio anterior, se utilizó la base de datos STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, <http://string.embl.de/>). STRING es una base de datos de interacciones proteicas conocidas y predichas, que incluye asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales) y que integra la información relativa: al contexto genómico, experimentos de alta densidad, co-expresión y bibliografía de los genes/proteínas de interés (von Mering *et al.*, 2005).

Por otro lado, se realizó una comparación por pares de cada una de las series tumorales anteriores con una serie de 3 tejidos normales (N) de pacientes que no padecían ninguna patología tiroidea. Esto sirvió para reconocer qué genes específicos de cada tipo tumoral, además se expresaban diferencialmente con respecto el tejido normal y por lo tanto, se presentaban como buenos marcadores de tumor y de subtipo tumoral de acuerdo a la mutación.

Finalmente, se realizó un *clustering* jerárquico no supervisado (como se explica en el apartado anterior) con los datos de expresión de estos marcadores incluyendo todos los carcinomas bien diferenciados con o sin mutación, así como los adenomas.

3.5.6 Identificación de genes involucrados en la evolución del adenoma folicular a carcinoma folicular tiroideo.

Se analizaron por pares los perfiles de expresión de los FA, FTC y tejidos normales (N) siguiendo la metodología del apartado 3.5.2. Se consideró que aquellos genes que presentaran diferencias de expresión significativas ($FDR < 0,15$ y > 2 veces de diferencia de expresión) en la comparación FTC *versus* N o FA *versus* N, y a su vez, expresión diferencial superior a 2 veces en la comparación FA *versus* FTC, serían genes potencialmente involucrados en la carcinogénesis de los tumores foliculares.

Los perfiles de expresión de estos genes fueron visualizados con el programa *Tree View* de GEPAS (Herrero *et al.*, 2001) del mismo modo que en el apartado 3.5.4.

Para este estudio se incluyó el carcinoma folicular 05T216 no incluido en los análisis previos por tratarse de un carcinoma folicular oxifílico y RAS negativo, pero necesario en este caso para enriquecer la serie de FTC. Además, se excluyó el FTC_04T232, por presentar un diagnóstico controvertido (posible FVPTC).

3.6 Validación de los resultados obtenidos a partir de la matriz de expresión Oncochip 12K. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) y búsquedas bibliográficas.

En primer lugar, se validaron los resultados del array de expresión para el análisis de los ATC/PDTC frente a los WDTC mediante RT-PCR cuantitativa. Para ello, se seleccionaron cuatro genes al azar de la firma molecular de mal pronóstico y se analizó la expresión de cada uno en 22 de las 44 muestras incluidas en el estudio. La retrotranscripción del ARN a ADN complementario se llevó a cabo según se indica en el apartado 3.3.3, pero en este caso se utilizó *Oligo dT*₍₂₃₎ (SIGMA) en lugar de hexámeros aleatorios. Se emplearon sondas específicas de Applied Biosystems para cuantificar el producto amplificado y se usó el sistema de detección y cuantificación de *ABI Prism 7000*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, y los niveles relativos de ADNc se determinaron de acuerdo a la expresión del control interno gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada (*GAPDH*). Además, se utilizaron cinco controles de tejido normal tiroideo para generar las curvas estándar.

En segundo lugar, se realizó una validación bibliográfica. Ésta consistió en comprobar que los resultados de expresión obtenidos con el Oncochip 12K ratificaban la expresión de marcadores moleculares descritos en series independientes de tumores para los distintos tipos de carcinoma tiroideo.

4 RESULTADOS

La serie de casos incluida inicialmente en el estudio constaba de 81 tejidos independientes correspondientes a carcinomas tiroideos y adenomas foliculares. Sin embargo, los análisis finales se realizaron con sólo 57 tejidos (70,4%) (7 ATC, 6 PDTC, 7 FTC, 24 PTC y 13 FA). El resto (29,6%) fue excluido por su bajo contenido en células neoplásicas y/o una mala calidad del material biológico, o por tratarse de tumores oxifílicos (tumores con particularidades citológicas concretas que pueden presentar distintos patrones histológicos).

4.1 Estudio de las mutaciones tempranas.

Teniendo en cuenta los 57 tumores incluidos en el análisis, encontramos mutaciones en 28 de ellos (49,1%): 12 fueron positivos para mutaciones puntuales en el oncogen *NRAS* (42,9%), 12 para *BRAF* (42,9%) y 4 presentaron el reordenamiento *RET/PTC1* (14,3%) (Tabla 4.1). Los 5 PTC *NRAS* positivos fueron PTC variante folicular.

El estudio de las mutaciones en *BRAF* y *NRAS* a partir de ADN complementario, confirmó la expresión del alelo mutado en el 100% de los tumores testados que fueron positivos para dicha mutación en el ADN genómico. No se detectó el reordenamiento *PAX8/PPAR γ* entre las muestras susceptibles de tener esta alteración. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de este gen quimera entre los casos ya que no se dispuso de un control positivo para optimizar las condiciones de las PCRs relativas a este reordenamiento, y además, no se realizó ningún ensayo a partir del ADN genómico tumoral que confirmara la ausencia de esta mutación.

Tabla 4.1: Tumores positivos para alguna de las mutaciones tempranas analizadas y detalle de las mismas.

Código del Tumor	Subtipo del Tumor	Mutación
04T100	PTC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
04T103	ATC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
05T208	PTC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
04T229	FTC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
05T215	PTC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
05T218	PTC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
04T97	PDTC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
04T249	ATC	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
05T226	FA	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
04T131	FA	<i>NRAS p.Gln61Arg</i>
04T127	FA	<i>NRAS p.Gln61Leu</i>
05T220	FA	<i>NRAS p.Gln61Lys</i>
04T223	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
05T223	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>

Código del Tumor	Subtipo del Tumor	Mutación
05T224	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T112	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T115	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T123	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T251	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T111	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
05T210	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T233	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
05T205	PDTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
05T230	PTC	<i>BRAF p.Val600Glu</i>
04T138	ATC	<i>RET/PTC1</i>
05T229	PTC	<i>RET/PTC1</i>
04T116	PTC	<i>RET/PTC1</i>
04T117	PTC	<i>RET/PTC1</i>

4.2 Perfil de expresión específico de cada una de las mutaciones tempranas estudiadas.

Se asumió que los genes con expresión significativamente diferente tanto para la comparación de los tumores *BRAF* positivos frente a los *RET/PTC1* positivos, como para la comparación de los *BRAF* positivos frente a los *NRAS* positivos, estaban involucrados en los procesos biológicos activados por la mutación *BRAF p.Val600Glu* en la carcinogénesis de estas neoplasias, de acuerdo a la figura 3.3 (en la sección de Material y Métodos). De esta forma, se encontraron sólo 6 genes que se sobre-expresaban siempre en los tumores *BRAF* positivos y 7 que se sub-expresaban también siempre en los tumores *BRAF* positivos, con un $FDR < 0,15$ en ambas comparaciones (Tabla 4.2).

De igual modo se asumió para los tumores *RET/PTC1* positivos y *NRAS* positivos, de manera que se encontraron 16 genes sobre-expresados y 12 genes sub-expresados para los tumores *RET/PTC1* positivos ($FDR < 0,15$), y 68 genes sobre-expresados y 81 genes sub-expresados para los tumores *NRAS* ($FDR < 0,15$) (Tabla 4.2).

Tabla 4.2: Número de genes con un FDR <0,15 y >2 veces de diferencia de expresión en valor absoluto comunes a las comparaciones por pares de las clases tumorales de acuerdo a su genotipo.

	BRAF vs RET/PTC1	NRAS vs RET/PTC1	BRAF vs NRAS
BRAF vs RET/PTC1	59	28	13
NRAS vs RET/PTC1	28	392	149
BRAF vs NRAS	13	149	469

Negro: Número de genes diferencialmente expresados para cada una de las comparaciones; Rojo: genes específicos de los tumores RET/PTC1 positivos; Azul: genes específicos de los tumores BRAF positivos; Morado: genes específicos de los tumores NRAS positivos

En las tablas 4.3, 4.4 y 4.5 se muestran los genes específicos de cada mutación que además se expresaron diferencialmente con respecto el tejido normal. Además se incluyen genes que aun no llegando a un FDR<0,15 para alguna de las comparaciones específicas de mutación, pueden ser de interés teniendo en cuenta el número de veces que varía el valor de expresión entre clases para dichos genes. Asimismo, en la tabla 4.6 se exponen genes que presentaron diferencias de expresión tanto para los tumores BRAF positivos como para los RET/PTC1 positivos con respecto los NRAS positivos.

Finalmente, en la figura 4.1 se visualizan los perfiles de expresión de estos marcadores para todos los carcinomas bien diferenciados con o sin mutación, así como para los adenomas foliculares. De esta forma, es posible distinguir dos grupos principales entre los casos de acuerdo, fundamentalmente, a la arquitectura histológica: folicular o papilar

4. Resultados

Tabla 4.3: Genes involucrados en los procesos carcinogénicos de los tumores tiroideos BRAF positivos.

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene ^h)	BRAF vs RETPTC1		NRAS vs RETPTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N			
		estadístico*	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR		
CITED1	Cbp/p300-interacting transactivator 1 (Melanocyte-specific protein 1) (193 aa)	5,05⁺	0,06	2,80	0,10	<2 veces	>0,15	4,08	0,02	-0,26	0,92	1,48	0,51
CDK7	Cell division protein kinase 7 (EC 2.7.1.37) (CDK-activating kinase) (CAK) (TFIIH basal transcription factor complex kinase subunit) (39 kDa protein kinase) (P39 Mo15) (STK1) (CAK1) (346 aa)	4,96	0,06	2,82	0,10	<2 veces	>0,15	2,10	0,22	-0,61	0,79	0,42	0,89
PNMA1	Paraneoplastic antigen Ma1 (Neuron- and testis-specific protein 1) (37 kDa neuronal protein) (353 aa)	4,50	0,08	2,80	0,10	<2 veces	>0,15	4,96	0,01	1,45	0,52	1,69	0,42
DSC2	Desmocollin-2 precursor (Desmosomal glycoprotein II and III) (Desmocollin-3) (901 aa)	4,37	0,08	4,22	0,01	<2 veces	>0,15	1,04	0,61	-1,87	0,42	-2,26	0,25
TDRKH	Tudor and KH domain containing protein (561 aa)	3,28	0,20	2,85	0,10	<2 veces	>0,15	3,59	0,03	1,29	0,56	1,49	0,50
ABTB2	Ankyrin repeat and BTB/POZ domain containing protein 2 (839 aa)	3,17	0,20	5,45	0,00	<2 veces	>0,15	4,59	0,01	2,42	0,35	1,36	0,55
SGPL1	Sphingosine-1-phosphate lyase 1 (EC 4.1.2.27) (SP-lyase) (hSPL) (Sphingosine-1-phosphate aldolase) (561 aa)	3,02	0,25	3,10	0,07	<2 veces	>0,15	3,78	0,03	-0,12	0,96	0,08	0,99
MMP26	Matrix metalloproteinase-26 precursor (EC 3.4.24.-) (MMP-26) (Matrilysin-2) (Endometase) (261 aa)	2,93	0,27	2,88	0,09	<2 veces	>0,15	2,56	0,13	1,06	0,63	0,74	0,79
RXRA	Retinoic acid receptor RXR-alpha (Retinoid X receptor alpha) (453 aa)	2,73	0,30	2,88	0,09	<2 veces	>0,15	2,45	0,15	0,85	0,70	0,04	0,99
IK	Red protein (RER protein) (IK factor) (Cytokine IK) (556 aa)	2,60	0,33	3,17	0,06	<2 veces	>0,15	2,32	0,17	-0,24	0,92	-1,62	0,45
CALR	Calreticulin precursor (CRP55) (Calregulin) (HACBP) (ERp60) (grp60) (417 aa)	-2,68	0,31	-4,20	0,01	<2 veces	>0,15	-1,95	0,27	-0,97	0,66	-0,21	0,96

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAF vs RETPTC1		NRAS vs NRAS		NRAS vs RETPTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
SNAIL1	Zinc finger protein SNAIL1 (Snail protein homolog) (Sna protein) (264 aa)	-2,78	0,30	-2,51	0,15	<2 veces	>0,15	-8,14	0,00	-4,04	0,22	-3,11	0,10
WFS1	Wolframin (890 aa)	-2,79	0,30	-6,98	0,00	<2 veces	>0,15	-4,97	0,01	-2,70	0,31	-1,72	0,41
SYNE1	Nesprin-1 (Nuclear envelope spectrin repeat protein 1) (Synaptic nuclear envelope protein 1) (Syne-1) (Myocyte nuclear envelope protein 1) (Myne-1) (Enaptin) (8797 aa)	-3,33	0,19	-3,62	0,03	<2 veces	>0,15	-3,16	0,06	-2,12	0,38	-1,62	0,45
TGFB2	TGF-beta receptor type II precursor (EC 2.7.1.37) (TGFR-2) (TGF-beta type II receptor) (567 aa)	-4,38	0,08	-3,07	0,07	<2 veces	>0,15	-6,83	0,00	-4,34	0,22	-4,34	0,02
SGK1	Serine/threonine-protein kinase Sgk1 (EC 2.7.1.37) (Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1) (431 aa)	-4,40	0,08	-3,48	0,04	<2 veces	>0,15	-2,90	0,08	0,42	0,86	-0,35	0,91
STK25	Serine/threonine-protein kinase 25 (EC 2.7.1.37) (Sterile 20/oxidant stress-response kinase 1) (Ste20/oxidant stress response kinase 1) (SOK-1) (Ste20-like kinase) (426 aa)	-4,85	0,06	-3,94	0,02	<2 veces	>0,15	-0,56	0,81	0,10	0,96	0,41	0,89
CYR61	CYR61 protein precursor (Cysteine-rich, angiogenic inducer, 61) (Insulin-like growth factor-binding protein 10) (GIG1 protein) (381 aa)	-5,35	0,04	-2,75	0,11	<2 veces	>0,15	-0,75	0,73	0,81	0,72	0,32	0,92
MKMK2	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2 (EC 2.7.1.37) (MAP kinase signal-integrating kinase 2) (Mnk2) (465 aa)	-5,42	0,04	-3,43	0,05	<2 veces	>0,15	-1,18	0,55	0,78	0,73	0,62	0,82

* Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)

* Diferencias de expresión entre clases en número de veces. Si el valor es negativo quiere decir que ese gen se sub-expresa para la clase tumoral que se menciona primero en el enunciado de la columna correspondiente, y si es positivo es que se sobre-expresa para la misma clase tumoral.

* Leyenda del código de colores; rojo: genes sobre-expresados con FDR<0,15; naranja: genes sobre-expresados con FDR≥0,15; azul oscuro: genes sub-expresados con FDR<0,15; azul claro: genes sub-expresados con FDR≥0,15.

4. Resultados

Tabla 4.4: Genes involucrados en los procesos carcinogénicos de los tumores tiroideos NRAS positivos.

Gen	Descripción (según la base de datos <i>UniGene</i> ⁴)	BRAE vs RETPTC1		NRAS vs NRAS		NRAS vs RETPTC1		BRAE vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico*	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
FGF12	Fibroblast growth factor 12 (FGF-12) (Fibroblast growth factor homologous factor 1) (FHF-1) (Myocyte-activating factor) (243 aa)	<2 veces	>0,15	-4,55*	0,01	4,54	0,04	0,05	0,98	0,38	0,88	3,44	0,07
SFRS8	Splicing factor, arginine/serine-rich 8 (Suppressor of white apricot protein homolog) (951 aa)	<2 veces	>0,15	-4,43	0,01	4,38	0,04	-0,81	0,71	-0,56	0,81	1,52	0,49
TNIP1	Nef-associated factor 1 (Naf1) (TNFAIP3-interacting protein 1) (HIV-1 Nef interacting protein) (Viron-associated nuclear shuttling protein) (VAN) (hVAN) (Nip40-1) (638 aa)	<2 veces	>0,15	-2,64	0,13	4,03	0,05	0,61	0,79	-0,65	0,78	3,38	0,07
ABCC10	ATP-binding cassette, sub-family C, member 10 (1513 aa)	<2 veces	>0,15	-2,52	0,15	4,00	0,05	0,66	0,77	-0,79	0,73	2,80	0,14
VAV3	Vav-3 protein (847 aa)	<2 veces	>0,15	-4,58	0,01	3,97	0,05	-0,54	0,82	0,54	0,82	3,76	0,04
GNAS	Guanine nucleotide-binding protein G(s), alpha subunit (Adenylate cyclase-stimulating G alpha protein) (908 aa)	<2 veces	>0,15	-3,64	0,03	3,80	0,05	-0,46	0,86	-0,82	0,72	1,46	0,51
LOC90355 (C5orf30)	-	<2 veces	>0,15	-5,77	0,00	3,74	0,06	-0,76	0,73	-1,10	0,62	2,63	0,17
FOXO1A	Forkhead box protein O1A (Forkhead in rhabdomyosarcoma) (655 aa)	<2 veces	>0,15	-3,02	0,08	3,65	0,06	0,53	0,83	0,61	0,79	2,58	0,18
ESM1	Endothelial cell-specific molecule 1 precursor (ESM-1 secretory protein) (ESM-1) (184 aa)	<2 veces	>0,15	-3,36	0,05	3,34	0,08	1,80	0,32	1,14	0,61	3,91	0,13
CACNA2D2	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2 isoform b (1150 aa)	<2 veces	>0,15	-3,97	0,02	3,32	0,08	-0,39	0,88	-0,08	0,98	2,02	0,32
VLDLR	Very low-density lipoprotein receptor precursor (VLDL receptor) (873 aa)	<2 veces	>0,15	-5,60	0,00	3,26	0,08	-4,78	0,01	-1,96	0,41	2,21	0,26
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3 (Homeobox protein PBX3) (434 aa)	<2 veces	>0,15	-4,69	0,01	3,14	0,09	-0,41	0,87	0,41	0,87	5,19	0,01

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAf vs RETPTC1		NRAS vs RETPTC1		BRAf vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N			
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR		
UGT8	2-hydroxyacylsphingosine 1-beta-galactosyltransferase precursor (EC 2.4.1.45) (UDP-galactose-ceramide galactosyltransferase) (Ceramide UDP-galactosyltransferase) (Cerebroside synthase) (541 aa)	<2 veces	>0,15	-3,62	0,03	3,12	0,09	-1,67	0,36	-1,88	0,42	2,43	0,21
DJ159A19.3 (AHDC1)	-	<2 veces	>0,15	-3,64	0,03	2,90	0,12	-0,97	0,64	-0,64	0,79	2,42	0,22
COX8A	Cytochrome c oxidase polypeptide VIII-liver/heart, mitochondrial precursor (EC 1.9.3.1) (Cytochrome c oxidase subunit 8-2) (69 aa)	<2 veces	>0,15	-5,50	0,00	2,81	0,13	-1,29	0,51	-1,30	0,56	1,54	0,49
HPCA	Neuron specific calcium-binding protein hippocalcin (Calcium-binding protein BDR-2) (193 aa)#N/A	<2 veces	>0,15	-2,56	0,14	2,81	0,14	0,56	0,81	1,23	0,58	2,08	0,30
JAZF1	Juxtaposed with another zinc finger protein 1 (TAK1-interacting protein 27) (243 aa)	<2 veces	>0,15	-3,52	0,04	2,78	0,14	-0,84	0,70	-0,36	0,89	2,44	0,21
NEDD9	Enhancer of filamentation 1 (HEF1) (CRK-associated substrate-related protein) (CAS-L) (CasL) (p105) (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 9) (834 aa)	<2 veces	>0,15	2,70	0,11	-2,73	0,15	0,71	0,75	1,34	0,55	-3,42	0,07
IGFBP5	Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor (IGFBP-5) (IBP- 5) (IGF-binding protein 5) (272 aa)	<2 veces	>0,15	5,03	0,00	-2,77	0,14	-0,20	0,94	-0,11	0,96	-3,88	0,04
IGFBP6	Insulin-like growth factor binding protein 6 precursor (IGFBP-6) (IBP- 6) (IGF-binding protein 6) (240 aa)	<2 veces	>0,15	7,26	0,00	-2,78	0,14	6,64	0,00	1,87	0,42	-2,59	0,18
UBE2L6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L6 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase L6) (Ubiquitin carrier protein L6) (UbcH8) (Retinoic acid- induced gene B protein) (RIG-B) (153 aa)	<2 veces	>0,15	2,72	0,11	-2,89	0,12	-0,40	0,88	1,23	0,58	-2,72	0,15
PSMB9	Proteasome subunit beta type 9 precursor (EC 3.4.25.1) (Proteasome chain 7) (Macropain chain 7) (Multicatalytic endopeptidase complex chain 7) (RING12 protein) (Low molecular mass protein 2) (219 aa)	<2 veces	>0,15	4,57	0,01	-2,89	0,12	-0,71	0,75	-0,15	0,95	-5,54	0,01

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAFF vs RETPTC1		NRAS vs NRAS		BRAFF vs RETPTC1		NRAS vs RETPTC1		BRAFF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
TMOD1	Tropomodulin-1 (Erythrocyte tropomodulin) (E-Tmod) (359 aa)	<2 veces	>0,15	2,64	0,13	-3,21	0,09	-4,33	0,01	-4,16	0,22	-6,80	0,00		
GBP2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2 (GTP-binding protein 2) (HuGBP-2) (638 aa)	<2 veces	>0,15	5,19	0,00	-3,21	0,09	3,58	0,03	2,35	0,36	-2,19	0,27		
HNMT	Histamine N-methyltransferase (EC 2.1.1.8) (HMT) (292 aa)	<2 veces	>0,15	3,66	0,03	-3,32	0,08	0,68	0,76	0,54	0,82	-2,98	0,11		
S100A10	Calpactin I light chain (S100 calcium-binding protein A10) (Cellular ligand of annexin II) (97 aa)	<2 veces	>0,15	3,12	0,07	-3,72	0,06	1,31	0,50	2,03	0,40	-2,04	0,31		
IFI35	Interferon-induced 35 kDa protein (IFP 35) (288 aa)	<2 veces	>0,15	3,48	0,04	-3,86	0,05	-0,43	0,87	0,13	0,96	-1,56	0,48		
TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 (654 aa)	<2 veces	>0,15	2,62	0,13	-3,99	0,05	0,44	0,86	2,49	0,34	-2,69	0,16		
KRT10	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin 10) (K10) (CK 10) (584 aa)	<2 veces	>0,15	4,07	0,02	-4,15	0,04	2,33	0,17	2,55	0,33	-3,43	0,07		
RARRES3	Retinoic acid receptor responder protein 3 (Tazarotene-induced gene 3 protein) (RAR-responsive protein TIG3) (164 aa)	<2 veces	>0,15	4,84	0,00	-4,18	0,04	-0,03	0,99	0,33	0,90	-2,99	0,11		
MAP3K7IP1	Mitogen-activated protein kinase kinase 7 interacting protein 1 (TAK1-binding protein 1) (504 aa)	<2 veces	>0,15	2,76	0,11	-4,29	0,04	-1,12	0,58	0,19	0,94	-3,12	0,10		
GSN	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin) (AGEL) (782 aa)	<2 veces	>0,15	5,28	0,00	-4,33	0,04	-2,33	0,17	-3,20	0,26	-8,82	0,00		
CTSK	Cathepsin K precursor (EC 3.4.22.38) (Cathepsin O) (Cathepsin X) (329 aa)	<2 veces	>0,15	3,90	0,02	-4,34	0,04	0,33	0,90	0,46	0,85	-3,88	0,04		
IGFBP6	Insulin-like growth factor binding protein 6 precursor (IGFBP-6) (BP- 6) (IGF-binding protein 6) (240 aa)	<2 veces	>0,15	7,26	0,00	-2,78	0,14	6,64	0,00	1,87	0,42	-2,59	0,18		
UBE2L6	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L6 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase L6) (Ubiquitin carrier protein L6) (Ubch8) (Retinoic acid-induced gene B protein) (RIG-B) (153 aa)	<2 veces	>0,15	2,72	0,11	-2,89	0,12	-0,40	0,88	1,23	0,58	-2,72	0,15		

*Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)

*Diferencias de expresión entre clases en número de veces. Si el valor es negativo quiere decir que ese gen se sub-expresa para la clase tumoral que se menciona primero en el enunciado de la columna correspondiente, y si es positivo es que se sobre-expresa para la misma clase tumoral.

*Leyenda del código de colores; rojo: genes sobre-expresados con FDR<0,15; naranja: genes sobre-expresados con FDR≥0,15; azul oscuro: genes sub-expresados con FDR<0,15; azul claro: genes sub-expresados con FDR≥0,15.

Tabla 4.5: Genes involucrados en los procesos carcinogénicos de los tumores tiroideos RET/PTC1 positivos.

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene [®])	BRAF vs RETPTC1		BRAF vs NRAS		NRAS vs RETPTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico*	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
CCNL1	DNA replication licensing factor MCM2 (Minichromosome maintenance protein 2 homolog) (Nuclear protein BM28) (904 aa)	-5,07*	0,06	-0,90	0,70	-3,30	0,08	-0,14	0,95	1,40	0,53	0,23	0,95
CD84	CD84 antigen (leukocyte antigen) (345 aa)	-4,72	0,07	0,96	0,67	-3,84	0,05	1,95	0,27	6,02	0,20	0,21	0,96
SMURF1	Smad ubiquitination regulatory factor 1 (EC 6.3.2.-) (Ubiquitin-- protein ligase SMURF1) (Smad-specific E3 ubiquitin ligase 1) (hSMURF1) (757 aa)	-4,37	0,08	0,10	0,98	-3,50	0,07	0,84	0,69	4,16	0,22	0,62	0,82
AMPD3	AMP deaminase 3 (EC 3.5.4.6) (AMP deaminase isoform E) (Erythrocyte AMP deaminase) (776 aa)	-4,02	0,12	-1,11	0,61	-2,71	0,15	2,33	0,17	6,58	0,19	3,32	0,08
IL10RB	Interleukin-10 receptor beta chain precursor (IL-10R-B) (IL-10R2) (Cytokine receptor family 2 member 4) (Cytokine receptor class-II member 4) (CRF2-4) (325 aa)	-3,98	0,12	0,64	0,79	-3,72	0,06	0,93	0,65	2,29	0,36	0,60	0,83
LRCH1	Leucine-rich repeats and calponin homology domain containing protein 1 (Calponin homology domain containing protein 1) (Neuronal protein 81) (NP81) (799 aa)	-3,92	0,13	-0,52	0,83	-2,25	0,23	2,16	0,21	3,61	0,23	2,33	0,23
UBN1	ubiquitin 1 (1134 aa)	-3,89	0,13	-1,28	0,54	-3,07	0,10	0,26	0,92	2,09	0,39	0,72	0,79
FLJ12442	5'-nucleotidase domain containing 2 (NT5DC2)	-3,86	0,13	-0,35	0,90	-3,57	0,06	0,42	0,87	2,60	0,33	0,58	0,84
WDR1	WD repeat domain 1 (WDR1), transcript variant 1, mRNA (76 aa)	-3,65	0,15	0,79	0,73	-4,00	0,05	0,70	0,75	3,38	0,24	0,02	1,00

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAF vs RET/PTC1		BRAF vs NRAS		NRAS vs RET/PTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
MSH5	MutS protein homolog 5 (834 aa)	-3,43	0,17	-0,46	0,86	-3,34	0,08	5,56	0,00	8,54	0,15	6,12	0,00
JARID1A	Jumonji/ARID domain-containing protein 1A (Retinoblastoma-binding protein 2) (RBBP-2) (1719 aa)	-3,37	0,18	-0,20	0,95	-2,83	0,13	1,57	0,40	2,80	0,30	1,64	0,44
TRIB2	tribbles homolog 2 (343 aa)	-3,15	0,21	2,97	0,08	-4,59	0,04	1,82	0,31	3,92	0,22	-0,89	0,73
UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase L3) (Ubiquitin carrier protein L3) (UbcH7) (E2-F1) (L-Ubc) (190 aa)	-3,05	0,25	1,51	0,45	-3,31	0,08	2,05	0,24	4,02	0,22	0,25	0,94
CUGBP2	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2 isoform 1 (520 aa)	-2,82	0,29	2,55	0,14	-5,04	0,02	0,13	0,96	2,43	0,35	-1,64	0,44
GPNMB	Transmembrane glycoprotein NMB precursor (Transmembrane glycoprotein HGFIN) (560 aa)	-2,79	0,30	2,70	0,11	-6,53	0,01	1,76	0,33	3,67	0,23	0,08	0,99
ARPC1B	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B (ARP2/3 complex 41 kDa subunit) (p41-ARC) (372 aa)	-2,67	0,32	2,01	0,27	-4,38	0,04	2,12	0,22	5,28	0,20	-0,63	0,82
ARHGDI2	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Rho GDI 2) (Rho GDI beta) (Ly-GDI) (201 aa)	-2,66	0,32	0,47	0,86	-2,97	0,11	2,45	0,15	5,27	0,20	1,75	0,40
KIAA1212	Coiled-coil domain containing 88A (CCDC88A) (AKT-phosphorylation enhancer) (G[alpha]-interacting vesicle-associated protein) (Hook-related protein 1; girdin)	-2,63	0,33	0,25	0,94	-2,90	0,12	0,67	0,76	2,72	0,31	0,49	0,87
RAB31	Ras-related protein Rab-31 (Rab-22B) (194 aa)	-2,60	0,33	1,21	0,57	-3,37	0,07	0,70	0,75	3,31	0,25	-0,71	0,80
HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) (HIF1 alpha) (ARNT interacting protein) (Member of PAS protein 1) (MOP1) (826 aa)	-2,57	0,33	1,36	0,50	-3,96	0,05	0,89	0,67	2,09	0,39	0,33	0,92
PTPN1	Tyrosine-protein phosphatase, non-receptor type 1 (EC 3.1.3.48) (Protein-tyrosine phosphatase 1B) (PTP-1B) (435 aa)	-2,55	0,34	0,99	0,65	-3,09	0,10	1,67	0,36	3,26	0,25	0,83	0,75
FBXO11	F-box only protein 11 (Vitiligo-associated protein VIT-1) (843 aa)	-2,55	0,34	3,94	0,02	-5,66	0,02	1,07	0,60	2,06	0,39	-0,75	0,78

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAf vs RET/PTC1		BRAf vs NRAS		NRAS vs RET/PTC1		BRAf vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
S100A13	S100 calcium-binding protein A13 (98 aa)	-2,54	0,34	2,21	0,21	-4,63	0,03	0,94	0,65	3,19	0,26	-0,98	0,70
NUP62	Nucleoporin (62KDa)	-2,51	0,34	1,18	0,58	-2,90	0,12	1,79	0,32	4,94	0,21	0,13	0,97
ATP9A	Potential phospholipid-transporting ATPase IIA (EC 3.6.3.1) (ATPase class II type 9A) (ATPase IIA) (1047 aa)	2,63	0,33	-1,21	0,57	3,25	0,08	-4,14	0,02	-5,47	0,20	-2,24	0,26
HHEX	Homeobox protein PRH (Hematopoietically expressed homeobox) (Homeobox protein HEX) (270 aa)	2,64	0,32	-1,65	0,39	3,75	0,06	-1,60	0,39	-3,83	0,22	0,30	0,93
HABP4	hyaluronan binding protein 4 (413 aa)	2,69	0,31	-1,91	0,30	3,94	0,05	-1,79	0,32	-3,20	0,26	-0,71	0,80
LOC84661	DPY30	2,75	0,30	-1,10	0,62	3,45	0,07	-3,75	0,03	-5,72	0,20	-2,06	0,31
DCI	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor (EC 5.3.3.8) (Dodecenoyl-CoA isomerase) (Delta(3),delta(2)-enoyl-CoA isomerase) (D3,D2-enoyl-CoA isomerase) (302 aa)	2,79	0,30	-1,36	0,50	3,68	0,06	-0,73	0,74	-2,39	0,35	0,09	0,99
CLN5	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 (Protein CLN5) (407 aa)	2,81	0,29	-1,89	0,31	3,61	0,06	-3,94	0,02	-5,47	0,20	-1,78	0,39
GBAS	NipSnap2 protein (Glioblastoma amplified sequence) (286 aa)	2,90	0,27	-1,56	0,43	3,56	0,06	-4,55	0,01	-7,33	0,19	-1,33	0,56
CORT	Cortistatin precursor [Contains- Cortistatin-29; Cortistatin-17] (164 aa)	2,92	0,27	-1,21	0,57	3,75	0,06	-0,06	0,98	-2,15	0,38	0,95	0,72
PECI	Peroxisomal 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase (EC 5.3.3.8) (Dodecenoyl-CoA isomerase) (Delta(3),delta(2)-enoyl-CoA isomerase) (D3,D2-enoyl-CoA isomerase) (DBI-related protein 1) (DRS-1) (Hepatocellular carcinoma-associated antigen 88) (364 aa)	2,94	0,27	-1,05	0,63	3,25	0,08	-3,06	0,07	-5,27	0,20	-1,46	0,52

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos <i>Unigene</i>)	BRAF vs RET/PTC1		BRAF vs NRAS		NRAS vs RET/PTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
FLJ14007	AN1-type zinc finger protein 1 (ZFAND1) (268 aa)	3,18	0,20	-1,19	0,58	3,16	0,09	-4,32	0,01	-7,21	0,19	-2,06	0,31
FAF1	FAS-associated factor 1 (FAF1 protein) (hFAF1) (650 aa)	3,27	0,20	-0,73	0,76	3,00	0,11	2,69	0,11	-1,13	0,61	2,41	0,22
USP16	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16 (EC 3.1.2.15) (Ubiquitin thiolesterase 16) (Ubiquitin-specific processing protease 16) (Deubiquitinating enzyme 16) (Ubiquitin processing protease UBP-M) (823 aa)	3,35	0,18	-1,19	0,57	3,95	0,05	-1,90	0,29	-3,32	0,25	-1,13	0,65
MIRPL49	Mitochondrial 39S ribosomal protein L49 (L49mt) (MRP-L49) (NOF1 protein) (Neighbor of FAU) (NOF) (166 aa)	3,45	0,17	0,02	0,99	2,74	0,15	-1,55	0,41	-3,02	0,28	-1,45	0,52
PBX1	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1 (Homeobox protein PBX1) (Homeobox protein PRL) (430 aa)	3,56	0,16	-1,50	0,45	4,26	0,04	-1,10	0,58	-3,35	0,25	-0,01	1,00
MASP1	Complement-activating component of Ra-reactive factor precursor (EC 3.4.21.-) (Ra-reactive factor serine protease p100) (RaRF) (Mannan-binding lectin serine protease 1) (Mannose-binding protein associated serine protease) (MASP-1) [Contains- Complement-ac] (728 aa)	3,57	0,16	-0,08	0,98	3,42	0,07	-1,04	0,61	-2,29	0,36	-1,01	0,69
VPS13D	vacuolar protein sorting 13D isoform 1 (4393 aa)	3,75	0,14	1,99	0,27	2,78	0,14	-0,76	0,73	-2,32	0,36	-1,64	0,44
SMAD2	Mothers against decapentaplegic homolog 2 (SMAD2) (Mad-related protein 2) (hMAD-2) (JV18-1) (hSMAD2) (467 aa)	3,91	0,13	-0,31	0,92	3,41	0,07	-0,66	0,77	-4,83	0,22	-0,26	0,94
DNAJA2	DnaJ homolog subfamily A member 2 (HIRA-interacting protein 4) (Cell cycle progression restoration gene 3 protein) (Dnj3) (412 aa)	4,07	0,11	-1,31	0,52	4,57	0,04	-1,98	0,26	-3,73	0,22	-1,15	0,64

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAF vs RET/PTC1		BRAF vs NRAS		NRAS vs RET/PTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
CRSP9	Cofactor required for Sp1 transcriptional activation subunit 9 (Transcriptional coactivator CRSP33) (RNA polymerase transcriptional regulation mediator subunit 7 homolog) (hMED7) (Activator-recruited cofactor 34 kDa component) (ARC34) (233 aa)	4,09	0,11	-0,33	0,91	2,89	0,12	-2,19	0,20	-3,37	0,24	-1,92	0,35
KIAA1394	-	4,26	0,09	0,69	0,78	3,82	0,05	1,35	0,48	-2,73	0,31	0,73	0,79
NT5C3	Cytosolic 5'-nucleotidase III (EC 3.1.3.5) (cN-III) (Pyrimidine 5'-nucleotidase 1) (P5N-1) (P5N-1) (PN-1) (Uridine 5' monophosphate hydrolase 1) (p36) (336 aa)	4,65	0,07	-0,42	0,87	3,41	0,07	1,95	0,27	-1,23	0,58	1,88	0,36
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1 (NuMA protein) (SP-H antigen) (2115 aa)	4,81	0,06	-1,17	0,58	3,86	0,05	-2,26	0,19	-5,04	0,21	-0,85	0,75
S100A14	S100 calcium-binding protein A14 (S114) (104 aa)	4,84	0,06	2,10	0,24	2,72	0,15	2,51	0,14	-1,42	0,53	0,84	0,75
MSH2	DNA mismatch repair protein Msh2 (MutS protein homolog 2) (934 aa)	6,28	0,03	0,42	0,87	6,35	0,01	2,83	0,09	-1,21	0,59	2,60	0,17
CCNH	Cyclin H (MO15-associated protein) (p37) (p34) (323 aa)	8,35	0,00	0,07	0,98	4,41	0,04	-0,17	0,95	-2,02	0,40	-0,19	0,96

Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene).

*Diferencias de expresión entre clases en número de veces. Si el valor es negativo quiere decir que ese gen se sub-expresa para la clase tumoral que se menciona primero en el enunciado de la columna correspondiente, y si es positivo es que se sobre-expresa para la misma clase tumoral.

*Leyenda del código de colores: rojo: genes sobre-expresados con FDR<0,15; naranja: genes sobre-expresados con FDR≥0,15; azul oscuro: genes sub-expresados con FDR<0,15; azul claro: genes sub-expresados con FDR≥0,15.

4. Resultados

Tabla 4.6. Genes comunes diferencialmente expresados tanto en los tumores RET/PTC1 positivos como en los BRAF positivos con respecto los tumores NRAS positivos y con respecto el tejido normal.

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAF vs RET/PTC1		NRAS vs NRAS		NRAS vs RET/PTC1		BRAF vs N		RET/PTC1 vs N	
		estadístico*	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
PPARGC1A	Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PPAR gamma coactivator-1 alpha) (PPARGC-1 alpha) (798 aa)	-1,98	0,46	-6,54*	0,00	5,19	0,02	-11,02	0,00	-9,57	0,15
CDON	surface glycoprotein, Ig superfamily member (1264 aa)	-1,92	0,47	-6,23	0,00	4,38	0,04	-6,32	0,00	-4,14	0,22
DIO1	Type I iodothyronine deiodinase ((Type-I 5'deiodinase) (DIO1) (249 aa)	-0,66	0,82	-4,76	0,00	3,43	0,07	-5,84	0,00	-4,41	0,22
AGTR1	Type-1 angiotensin II receptor (AT1) (AT1AR) (359 aa)	-1,37	0,62	-4,22	0,01	3,34	0,08	-5,48	0,00	-4,46	0,22
SCGB2A1	Mammaglobin B precursor (Mammaglobin-2) (Secretoglobin family 2A member 1) (95 aa)	1,25	0,65	-3,07	0,07	3,39	0,07	-5,14	0,00	-5,44	0,20
MAOB	Amine oxidase [flavin-containing] B (Monoamine oxidase type B) (520 aa)	-0,54	0,86	-3,23	0,06	3,06	0,10	-3,90	0,02	-3,74	0,22
LIPG	Endothelial lipase precursor (Endothelial cell-derived lipase) (EDL) (EL) (500 aa)	1,47	0,60	-3,33	0,05	4,57	0,04	-3,28	0,05	-4,12	0,22
SERPINA1	Alpha-1-antitrypsin precursor (Alpha-1 protease inhibitor) (418 aa)	1,59	0,55	8,31	0,00	-3,89	0,05	15,48	0,00	4,55	0,22
FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4 precursor (FGFR-4) (802 aa)	1,17	0,67	6,17	0,00	-5,47	0,02	6,95	0,00	6,35	0,20
MCAM	Cell surface glycoprotein MUC18 precursor (Melanoma-associated antigen MUC18) (CD146 antigen) (Melanoma adhesion molecule) (646 aa)	-0,16	0,97	4,35	0,01	-5,80	0,02	6,08	0,00	7,64	0,18
LTA4H	Leukotriene A-4 hydrolase (Leukotriene A(4) hydrolase) (611 aa)	-0,55	0,86	3,37	0,05	-3,72	0,06	5,13	0,00	5,40	0,20
CBFB	Core-binding factor, beta subunit (CBF-beta) (PEBP2-beta) (SL3/AKV core-binding factor beta subunit) (182 aa)	-0,53	0,86	3,30	0,05	-4,29	0,04	5,06	0,00	6,17	0,20
FYN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Fyn (EC 2.7.1.112) (p59-Fyn) (Protooncogene Syn) (SLK) (537 aa)	0,31	0,93	4,11	0,02	-3,16	0,09	4,85	0,01	3,67	0,23

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos Unigene)	BRAF vs RET/PTC1		NRAS vs RET/PTC1		BRAF vs NRAS		NRAS vs RET/PTC1		BRAF vs NRAS		RET/PTC1 vs N		NRAS vs N	
		estadístico*	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
<i>INHBB</i>	Inhibin beta B chain precursor (Activin beta-B chain) (407 aa)	-0.63	0.83	4.03	0.02	-3.45	0.07	4.65	0.01	3.73	0.22	0.15	0.97		
<i>SEC23A</i>	Protein transport protein Sec23A (SEC23-related protein A) (765 aa)	-1.11	0.69	3.33	0.05	-2.73	0.15	4.42	0.01	3.64	0.23	1.66	0.44		
<i>CDK9</i>	Cell division protein kinase 9 (Cyclin-dependent kinase 9) (Serine/threonine-protein kinase PITALRE) (C-2K) (372 aa)	-0.04	0.99	3.16	0.06	-3.19	0.09	4.31	0.01	4.33	0.22	1.87	0.36		
<i>TRIM14</i>	Tripartite motif protein 14 (444 aa)	-0.37	0.92	3.42	0.05	-3.51	0.06	3.59	0.03	3.61	0.23	-0.73	0.79		

*Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)

*Diferencias de expresión entre clases en número de veces. Si el valor es negativo quiere decir que ese gen se sub-expresa para la clase tumoral que se menciona primero en el enunciado de la columna correspondiente, y si es positivo es que se sobre-expresa para la misma clase tumoral.

*Leyenda del código de colores; rojo: genes sobre-expresados con FDR<0,15; naranja: genes sobre-expresados con FDR<0,15; azul oscuro: genes sub-expresados con FDR<0,15; azul claro: genes sub-expresados con FDR≥0,15.

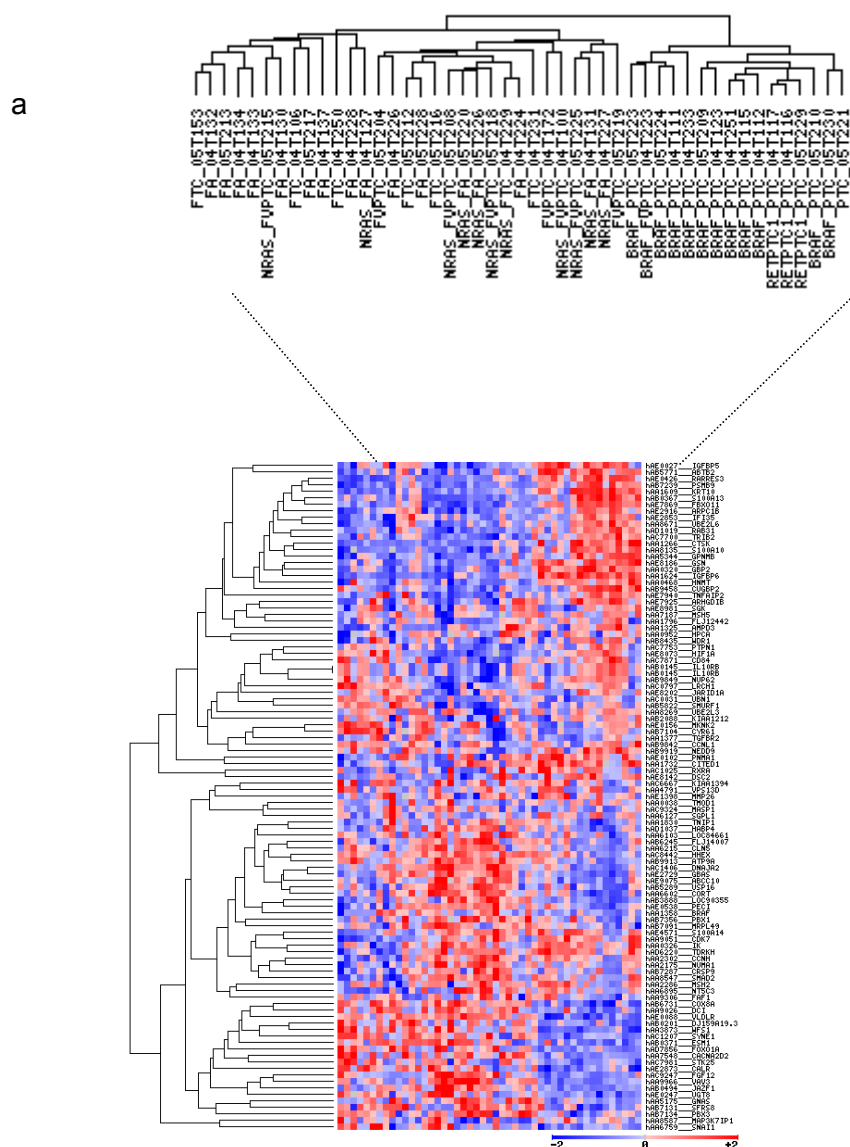


Figura 4.1: Visualización de los perfiles de expresión de los marcadores asociados a mutación mediante un *clustering* no supervisado de todos los tumores bien diferenciados con o sin mutación. Las columnas representan los tumores y las filas los genes. (a) Ampliación del árbol que agrupa los casos. Se observan dos ramas principales: la de la izquierda, que contiene todos los tumores NRAS positivos, así como los FA, FTC y FVPTC sin mutación, y la rama de la derecha, que agrupa todos los casos BRAF positivos, los RETPTC1, y un PTC sin mutación.

Leyenda de la barra de color: el color azul oscuro y el color rojo representan sub- y sobre-expresión, respectivamente, siendo la referencia 0 y el rango de la representación de -2 a +2.

4.3 Estudio de los interactomas proteicos dependientes de la mutación temprana.

El enriquecimiento funcional de las listas de genes obtenidas en el apartado anterior mediante la herramienta *SNOW*, incluida en *GEPAS*, permitió encontrar interacciones entre

los genes diferencialmente regulados, así como genes/proteínas centrados dentro de los interactomas generados de acuerdo a las distintas mutaciones tempranas.

Sin embargo, tan sólo los interactomas de los genes sub-expresados para NRAS presentaron una significación $<0,05$ para el test de Kolgomorov-Smirnov. Dentro de éstos, cabe destacar por su tamaño el compuesto por: *UBE4B*, *TNFRSF12A*, *TNFRSF10D*, *TCL1B*, *RPL3*, *RELA*, *PTPN14*, *PSMB9*, *NFKBIE*, *NEDD9*, *MVP*, *MLL*, *MAP3K7IP1*, *MAP3K5*, *KRT10*, *JAK3*, *ITGB2*, *IL7R*, *IL16*, *IGHG3*, *IFNGR1*, *IFNAR2*, *IFI16*, *HNRPF*, *HLA-G*, *HLA-E*, *GSN*, *FGFR4*, *FBXO11*, *F10*, *EPHA4*, *CSF2RB*, *CSF1* y *CD40*.

Los genes/proteínas más centrados dentro de este interactoma fueron: *RELA*, *HLA-G*, *ITGB2*, *MAP3K5* y *NFKBIE*.

4.4 **Diferencias entre el carcinoma folicular y el adenoma folicular de tiroides.**

Se encontraron muy pocos genes con un FDR menor de 0,15 para las comparaciones FTC *versus* tejido normal (N) y, sobre todo, FA *versus* FTC. Sin embargo, hubo un gran número de genes que presentaron diferencias de expresión superiores a 2 para estas mismas comparaciones (Tabla 4.7).

Luego a pesar del valor del FDR, en la tabla 4.8 se destacan los genes que además de presentar las mayores diferencias de expresión entre los FA y los FTC (y por lo tanto, los menores FDR), presentan elevadas diferencias de expresión bien para la comparación FTC frente a N, o bien para la comparación FA frente a N.

La visualización de los perfiles de expresión de estos genes para los casos estudiados, permite apreciar las diferencias de expresión de éstos entre el tejido normal, los adenomas foliculares y los carcinomas (Figura 4.2).

Tabla 4.7: Número de genes sobre- e sub-expresados para las comparaciones FA versus N, FTC versus N y FA versus FTC, según un FDR<0,15 o según una diferencia de expresión, dada en número de veces, mayor de 2.

FDR<0,15			
	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados	Diferencias de expresión mínima*
FTC vs N	19	83	4,49
FA vs N	594	527	2,59
FA vs FTC	1	0	5,76
>2 veces			
	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados	FDR máximo⁺
FTC vs N	538	678	0,48
FA vs N	981	857	0,28
FA vs FTC	422	333	0,62

* Número de veces mínimo de diferencias de expresión de los genes que cumplen el criterio FDR<0,15 para cada una de las comparaciones.

⁺ FDR máximo que presentan aquellos genes con una diferencia de expresión mayor de 2 veces para cada una de las comparaciones.

Tabla 4.8: Genes con mayor probabilidad de participar en los procesos carcinogénicos involucrados en la evolución del adenoma folicular al carcinoma folicular tiroideo.

Gen	Descripción (según la base de datos <i>Unigene</i> [#])	FA vs N		FTC vs N		FA vs FTC	
		estadístico*	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
<i>MXI1</i>	<i>MAX interacting protein 1 (MXI1 protein)</i>	0,80	0,71	7,21⁺	0,04	-3,42	0,43
<i>MEP1A</i>	<i>Meprin A alpha-subunit precursor (EC 3.4.24.18) (Endopeptidase-2) (N- benzoyl-L-tyrosyl-P-amino-benzoic acid hydrolase alpha subunit) (PABA)</i>	2,54	0,16	5,03	0,11	-2,62	0,47
<i>CIP29</i>	<i>Proliferation associated cytokine-inducible protein CIP29</i>	1,50	0,43	4,32	0,16	-3,44	0,43
<i>SERF1A</i>	<i>Small EDRK-rich factor 1a (110 aa)</i>	-0,04	0,99	3,71	0,21	-4,96	0,24
<i>MGC23909</i>	<i>TMEM167</i>	1,22	0,54	2,84	0,33	-4,21	0,25
<i>AUTS2</i>	<i>Autism susceptibility gene 2 protein</i>	0,01	1,00	2,83	0,33	-4,06	0,25
<i>POLH</i>	<i>DNA polymerase theta (EC 2.7.7.7) (DNA polymerase eta) (2741 aa)</i>	6,20	0,00	1,36	0,66	5,76	0,15
<i>RBL1</i>	<i>Retinoblastoma-like protein 1 (107 kDa retinoblastoma-associated protein) (PRB1) (P107) (1068 aa)</i>	4,54	0,02	0,22	0,96	3,80	0,36
<i>THBD</i>	<i>Thrombomodulin precursor (TM) (Fetomodulin) (CD141 antigen)</i>	-0,89	0,67	-2,75	0,34	4,51	0,24
<i>LOC283267</i>	-	-0,15	0,96	-3,05	0,30	4,02	0,25
<i>KLF4</i>	<i>Kruppel-like factor 4 (Epithelial zinc-finger protein EZF) (Gut- enriched Krueppel-like factor)</i>	-0,15	0,95	-3,21	0,27	4,31	0,25
<i>SPAG5</i>	<i>Sperm-associated antigen 5 (Astrin) (Mitotic spindle associated protein p126) (MAP126) (Deepest)</i>	0,10	0,97	-3,95	0,20	4,28	0,25
<i>MX2</i>	<i>Interferon-induced GTP-binding protein Mx2 (Interferon-regulated resistance GTP-binding protein MxB) (p78-related protein)</i>	-2,47	0,17	-4,04	0,19	2,91	0,44
<i>STOM</i>	<i>Erythrocyte band 7 integral membrane protein (Stomatin) (Protein 7.2b)</i>	-1,46	0,45	-4,15	0,18	2,52	0,49
<i>DUSP1</i>	<i>Dual specificity protein phosphatase 1 (EC 3.1.3.48) (EC 3.1.3.16) (MAP kinase phosphatase-1) (MKP-1) (Protein-tyrosine phosphatase CL100) (Dual specificity protein phosphatase hVH1)</i>	-1,19	0,55	-4,30	0,16	3,52	0,40
<i>COL15A1</i>	<i>Collagen, type XV, alpha 1</i>	-2,45	0,17	-4,58	0,14	2,52	0,49
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase PTEN (EC 3.1.3.67) (Mutated in multiple advanced cancers 1)</i>	-3,17	0,08	-4,73	0,13	2,58	0,47
<i>WRN</i>	<i>Werner syndrome helicase</i>	-2,87	0,11	-4,77	0,13	2,67	0,47
<i>LYZ</i>	<i>Lysozyme C precursor (EC 3.2.1.17) (1,4-beta-N-acetylmuramidase C)</i>	-1,70	0,37	-4,78	0,13	2,94	0,44
<i>IL7R</i>	<i>Interleukin-7 receptor alpha chain precursor (IL-7R-alpha) (CDw127) (CD127 antigen)</i>	-3,38	0,06	-4,80	0,13	2,61	0,47
<i>PHPT1</i>	<i>14 kDa phosphohistidine phosphatase (EC 3.1.3.-) (Phosphohistidine phosphatase 1) (Protein janus-A homolog)</i>	-2,55	0,16	-4,84	0,13	2,69	0,47

4. Resultados

Gen	Descripción (según la base de datos <i>Unigene</i>)	FA vs N		FTC vs N		FA vs FTC	
		estadístico	FDR	estadístico	FDR	estadístico	FDR
CSDA	DNA-binding protein A (Cold shock domain protein A) (Single-strand DNA binding protein NF-GMB)	-3,25	0,07	-5,40	0,09	2,76	0,47
MET	Hepatocyte growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112) (Met proto- oncogene tyrosine kinase) (c-met) (HGF receptor) (HGF-SF receptor)	-1,76	0,34	-5,42	0,09	2,52	0,49
SNAI2	Zinc finger protein SLUG (Neural crest transcription factor Slug) (Snail homolog 2)	-2,08	0,25	-5,62	0,08	3,39	0,43
EBNA1BP2	Probable rRNA processing protein EBP2 (EBNA1 binding protein 2) (Nucleolar protein p40)	-3,52	0,05	-5,84	0,06	2,62	0,47
APOL2	Apolipoprotein-L2 (Apolipoprotein L-II) (ApoL-II)	-4,10	0,03	-5,93	0,06	3,18	0,44
VANGL1	Vang-like protein 1 (Van Gogh-like protein 1) (Strabismus 2) (Loop- tail protein 2 homolog) (LPP2)	-2,86	0,11	-5,98	0,06	3,36	0,44
MAOB	Amine oxidase [flavin-containing] B (EC 1.4.3.4) (Monoamine oxidase type B) (MAO-B)	-2,18	0,23	-6,02	0,06	4,77	0,24
S100B	S-100 calcium-binding protein beta subunit (S-100 protein, beta chain)	-4,60	0,01	-6,59	0,04	2,98	0,44
PDE2A	cGMP-dependent 3',5'-cyclic phosphodiesterase (EC 3.1.4.17) (Cyclic GMP stimulated phosphodiesterase) (CGS-PDE) (cGSPDE)	-2,28	0,21	-6,77	0,04	3,48	0,43
GBP1	Interferon-induced guanylate-binding protein 1 (GTP-binding protein 1) (Guanine nucleotide-binding protein 1) (HuGBP-1)	-1,89	0,30	-6,91	0,04	4,69	0,24
TGFBR2	TGF-beta receptor type II precursor (EC 2.7.1.37) (TGFR-2) (TGF-beta type II receptor)	-4,65	0,01	-7,00	0,04	3,52	0,40
IFITM1	Interferon-induced transmembrane protein 1 (Interferon-induced protein 17) (Interferon-inducible protein 9-27) (Leu-13 antigen) (CD225 antigen)	-5,81	0,00	-7,68	0,03	3,12	0,44
GBP2	Interferon-induced guanylate-binding protein 2 (GTP-binding protein 2) (Guanine nucleotide-binding protein 2) (HuGBP-2)	-3,26	0,07	-8,22	0,03	4,67	0,24
CD3D	T-cell surface glycoprotein CD3 delta chain precursor (T-cell receptor T3 delta chain)	-4,14	0,02	-8,62	0,03	3,45	0,43
FBLN5	Fibulin-5 precursor (FIBL-5) (Developmental arteries and neural crest EGF-like protein) (Dance) (Urine p50 protein) (UP50)	-6,76	0,00	-9,99	0,01	3,26	0,44
SLC43A3	solute carrier family 43, member 3	-4,65	0,01	-11,87	0,01	3,79	0,36
GSN	Gelsolin precursor (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin) (AGEL)	-9,25	0,00	-14,81	0,00	3,09	0,44

*Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)

*Diferencias de expresión entre clases en número de veces. Si el valor es negativo quiere decir que ese gen se sub-expresa para la clase tumoral que se menciona primero en el enunciado de la columna correspondiente, y si es positivo es que se sobre-expresa para la misma clase tumoral.

†Leyenda del código de colores; rojo: genes sobre-expresados con FDR<0,15; naranja: genes sobre-expresados con FDR≥0,15; azul oscuro: genes sub-expresados con FDR<0,15; azul claro: genes sub-expresados con FDR≥0,15.

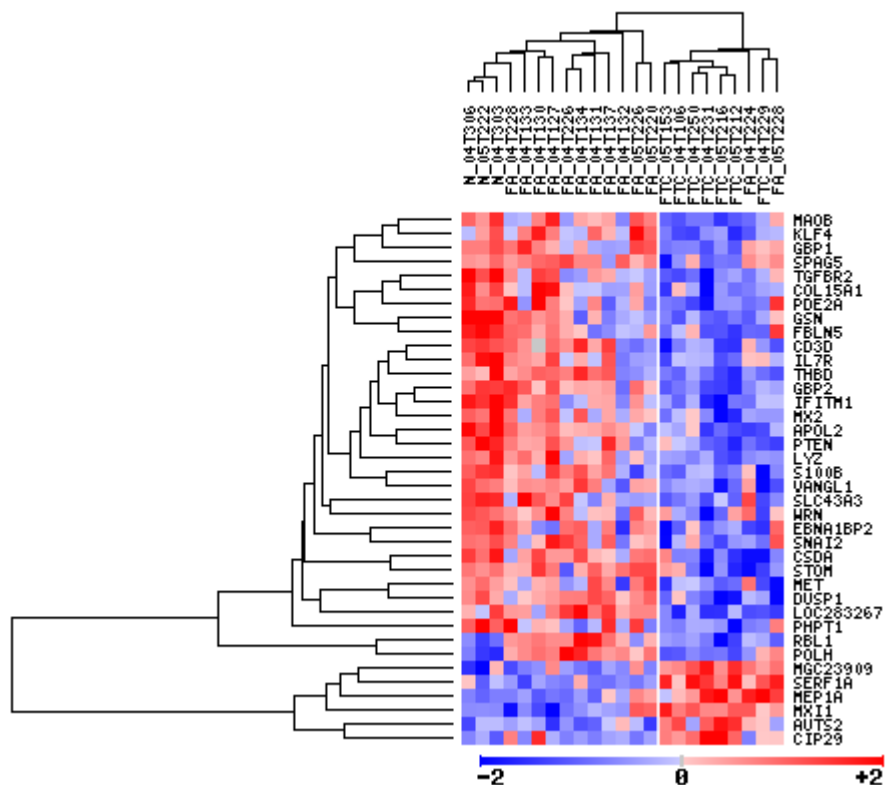


Figura 4.2: Visualización de los perfiles de expresión de los genes posiblemente asociados a la transición FA → FTC (tabla 4.7) mediante un *clustering* no supervisado. Las columnas representan los tumores y las filas los genes. En el árbol que agrupa los casos se observan dos ramas principales: la de la izquierda, que contiene los tres tejidos normales más 11 de los 13 adenomas foliculares, y la de la derecha, que agrupa los 7 carcinomas foliculares y los dos adenomas restantes. Cabe destacar que el FTC_04T229 se trata de un FTC mínimamente invasivo.

Leyenda de la barra de color: el color azul oscuro y el color rojo representan sub- y sobre-expresión, respectivamente, siendo la referencia 0 y el rango de la representación de -2 a +2.

4.5 **Genes cuyos cambios de expresión se asocian a la pérdida de diferenciación de los tumores tiroideos.**

Se asumió que los genes cuya expresión era significativamente diferente tanto en la comparación ATC/PDTC frente a FTC, como en la comparación ATC/PDTC frente a PTC, estaban relacionados con la pérdida de diferenciación y la agresividad clínica. Aquellos genes que únicamente se expresaron de forma diferencial en una de estas comparaciones se supuso que estaba relacionado con la etología específica de cada una de las clases que compone los tumores bien diferenciados.

Teniendo en cuenta sólo los transcritos comunes a ambas comparaciones por pares, se observó que 742 clones correspondientes a 594 genes y 83 ESTs estaban sobre-expresados, y que 678 clones correspondientes a 535 genes y 78 ESTs estaban sub-expresados en los ATC/PDTC.

4.6 Perfil funcional: rutas y familias génicas relacionadas con la progresión y malignidad del cáncer de tiroides.

Se aplicó el test de FatiScan para el análisis del enriquecimiento funcional del perfil transcripcional diferencial obtenido tras la comparación de ATC/PDTC *versus* WDTC. Así, entre los transcritos sobre-expresados, se observó una sobre-representación significativa (p-valor ajustado <0,05) de genes involucrados en la "progresión del ciclo celular". Este término de *Gene Ontology*, engloba otros términos más específicos tales como: la mitosis, la replicación y reparación del ADN, procesos basados en los filamentos de actina y los microtúbulos, y la reorganización cromosómica y la biogénesis, que de forma independiente también fueron significativos.

El estudio adicional de las funciones biológicas de los genes diferencialmente expresados en ATC/PDTC reveló que entre éstos, había un enriquecimiento de varias rutas y términos de KEGG. Es de resaltar que rutas de señalización como la de las MAP quinasas, la de TGF- β , la de WNT, la adhesión focal y movilidad celular, y la activación de la polimerización presentaron sobre-expresión de genes clave para la activación de estas vías, así como sub-expresión de inhibidores de la transducción de la señal de los mismos procesos. La tabla 4.9 muestra los genes diferencialmente expresados dentro de estas categorías funcionales (FDR<0,15; >2 veces de expresión diferencial). Asimismo, se observó que algunos de los genes con un patrón similar de transcripción (significativamente sobre- o sub- expresados para ATC/PDTC), pertenecían a la misma familia de genes (Tabla 4.10).

Tabla 4.9: Rutas de KEGG enriquecidas con genes sobre- y sub- expresados (FDR <0,15 y diferencias de expresión en valor absoluto >2 veces) en ATC/PDTC versus PTC y FTC.

Términos KEGG	Genes sobre-expresados	Genes sub-expresados
Ruta de señalización de las MAP quinasas	<i>AKT2, SOS1, FGFR1, MAPK12, ATF4, STMN1, MYC, ELK1, TGFB2, RAC1, HRAS, CRKL, ARRB2, MINK1, TGFB2, NRAS, MAP4K4, MKNK1, MAPK8IP1, CDC25B, MAP2K3, PRKCA y MAP3K8</i>	<i>PLA2G6, NF1, CASP2, DUSP14 y CASP9</i>
Ciclo celular	<i>MCM7, MAD2L1, CDK2, PKMYT1, HDAC2, ORC6L, CDKN2C, GSK3B, E2F2, MCM10, CCNA2, TGFB2, MCM6, CCNB2, BUB1, CCNE1, CDC25A, CDC6, CDC25B, MCM3, PRKDC y CDC2</i>	-
Adhesión focal	<i>ABI2, ARPC1B, MYH10, PFN1, SOS1, FGFR1, ARPC3, GNA13, ITGA5, RAC1, HRAS, SSH1, CRKL, ACTN2, DIAPH3, NRAS, ITGA11, VIL1, F2R y PIK3CD</i>	<i>ARHGAP5, PPP1CA y PAK3</i>
Regulación del citoesqueleto de actina	<i>ABI2, ARPC1B, MYH10, PFN1, SOS1, FGFR1, ARPC3, GNA13, ITGA5, RAC1, HRAS, SSH1, CRKL, ACTN2, DIAPH3, NRAS, ITGA11, VIL1, F2R y PIK3CD</i>	<i>PPP1CA, AVIL y PAK3</i>
Ruta de señalización de TGFβ	<i>GDF5, THBS1, MYC, FST, TGFB2, SMURF1, TGFB2, RBX1 y IFNG</i>	<i>PPP2CB, ID1, SMAD7, ID2, BMPR1A, ZFYVE16 y ID4</i>
Ruta de señalización de WNT	<i>WNT5B, WNT8B, GSK3B, MYC, VANGL1, RAC1, RBX1, PRKCA y DVL3</i>	<i>PPP2CB, SIAH1, CXXC4 y FZD5</i>

Tabla 4.10: Principales familias génicas enriquecidas con genes sobre- y sub- expresados en ATC/PDTC versus PTC y FTC. El nombre de las familias procede de la base de datos *Entrez Gene* y de información obtenida a través de *PubMed*.

Familia Génica	Símbolo del Gen
Familias génicas con genes sobre-expresados	
Familia de las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP)	<i>MMP1, MMP2, MMP10, MMP11, MMP19 y MMP25</i>
Familias Alpha, beta y gamma tubulinas	<i>TUBG2, TUBB5, TUBB, TUBA8, TUBA6, TUBA3 y TUBA1</i>
Familia de los enzimas E2 ubiquitin-conjugantes	<i>UBE2C, UBE2T, UBE2I, UBE2V2 y UBE2V1</i>
Familia A de los antígenos del melanoma	<i>MAGEA1, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA6, MAGEA8, MAGEA10 y MAGEA11</i>
Familia de las ciclinas involucradas en la transcripción	<i>CCNE1, CCNB2 y CCNA2</i>
Familia de las proteínas centroméricas	<i>CENPA, CENPB, CENPE y CENPF</i>
Familia de las lamininas de la matriz extracelular de glicoproteínas	<i>LAMB1, LAMA3, y LMNA y el mediador de la interacción entre laminina B y cromatina (LBR)</i>
Familia del colágeno	<i>COL12A1, COL6A3, COL6A2 y COL1A1</i>
Familia de las proteínas <i>DEAD box</i>	<i>DDX11, DDX55, DDX39, DDX21 y DDX10</i>
Familia de las quemoquinas X	<i>CXCL10, CXCL11 y CXCL3</i>
Familia de las proteínas relacionadas con la actina (ARPs)	<i>ACTRT1, ACTL7B, ARPC3 y ARPC1B</i>
Familia de los factores proteicos de transformación del crecimiento	<i>TGFBR2, TGFB2, TBG4 y TGFB11</i>
Superfamilia de receptores y ligandos de los factores de necrosis tumoral	Receptores: <i>TNFRSF6B, TNFRSF19L</i> ; Ligandos: <i>TNFSF7, TNFSF13B y TNFSF11</i>
Familia de quinasas relacionadas con <i>NIMA (never in mitosis gene a)</i>	<i>NEK2, NEK3 y NEK6</i>
Familias génicas con genes sub-expresados	
Familia de las fosfatasas 2	<i>PPP2R5C, PPP2R5A y PPP2CB</i>
Familia de las proteínas dominante negativo <i>helix-loop-helix</i>	<i>ID1, ID2 y ID4</i>
Familia de las proteínas <i>Heat-shock</i>	<i>DNAJC4, DNAJB5 y DNAJB2,</i>
Familia de proteínas aldehído deshidrogenasas:	<i>ALDH9A1, ALDH6A1, ALDH3A2 y ALDH1A1</i>
Superfamilia de cadherinas integrantes de membrana que median la adhesión célula-célula dependiente de calcio	<i>CDH1 y CDH12</i>

4.7 Un clasificador de pronóstico clínico para los tumores bien diferenciados.

Mediante el algoritmo de aprendizaje SVM y el método de selección de genes F-ratio, el programa *Prophet* definió una regla de predicción pronóstica compuesta por sólo 30 transcritos, de los cuales 23 correspondieron a genes (Tabla 4.11) y 6 a ESTs. Este clasificador presentó un error de validación cruzada para la serie tumoral analizada del 0,0455% (Figura 4.3a), de forma que la predicción de la clase pronóstica fue aparentemente incorrecta en tan sólo dos casos.

El análisis jerárquico no supervisado utilizando el conjunto de genes seleccionados por el predictor permitió visualizar la discriminación entre los tumores con diferente pronóstico clínico (Figura 4.3b).

Tabla 4.11: Detalles de los 23 genes de la firma de pronóstico clínico identificada con el programa Prophet.

Símbolo del gen	Descripción (según la base de datos Unigene [#])	Cr ¹	Inicio (pb)	Fin (pb)	Hebra	PPTC versus NPPTC ^{2,3}	FDR-ajustado
ANLN	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	7	36202672	36266638	1	5,85	9,58E-05
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	17	73721944	73732372	1	6,00	7,03E-05
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	20	43874662	43879001	1	8,08	1,94E-06
CENPA	Centromere protein A, 17kDa	2	26898803	26935583	1	5,98	7,25E-05
CCNB2	Cyclin B2	15	57184612	57204535	1	6,74	1,35E-05
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	15	89310279	89338808	-1	6,75	1,35E-05
NUSAP1	Nucleolar and spindle associated protein 1	15	39412380	39460535	1	5,78	1,09E-04
ASPM	Asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)	1	193785111	193847224	-1	7,54	3,89E-06
D2S448	interleukin 1 receptor antagonist	2	1605957	1718575	-1	7,10	8,04E-06
DIAPH3	Diaphanous homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	13	59246299	59636042	-1	6,18	4,88E-05
RRM2	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	2	10213331	10221218	1	5,73	1,15E-04
C10orf3	Chromosome 10 open reading frame 3. CEP55, centrosomal protein 55kDa	10	95246386	95278837	1	5,80	1,06E-04
SIAH1	Seven in absentia homolog 1	16	46951950	46976717	-1	-6,64	1,76E-05
SH3BGR2	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	6	80397719	80470088	1	-6,15	5,15E-05
C6orf209	Chromosome 6 open reading frame 209	6	70442472	70563609	-1	-8,06	1,94E-06
SDK2	Sidekick homolog 2 (chicken)	17	68842119	68945808	-1	-6,98	8,50E-06
APLP2	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	11	129445011	129519910	1	-7,08	8,04E-06
PTPRN2	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	7	156831227	157879837	-1	-7,69	2,92E-06
NCRMS	Non-coding RNA in rhabdomyosarcoma (RMS)	12	96382930	96482924	1	-6,03	6,60E-05
C7orf23	Chromosome 7 open reading frame 23	7	86470131	86493682	-1	-7,42	4,67E-06
PDK2	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2. The reference sequence status is provisional	17	45527695	45543421	1	-6,38	3,13E-05
ORMDL3	ORM1-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	17	35330822	35337380	-1	-7,05	8,04E-06
PPAP2B	Phosphatidic acid phosphatase type 2B	1	56671960	56757154	-1	-6,77	1,35E-05

[#]Base de datos del NCBI que da una visión organizada del transcriptoma de diferentes especies (www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene)

¹Cr, cromosoma; ² PPTC, carcinomas tiroideos de mal pronóstico y NPPTC, carcinomas tiroideos sin recurrencia ni metástasis durante el seguimiento; ³ Diferencias en la expresión de los genes de la firma molecular medidas en números de veces con respecto PPTC, al comparar los PPTC frente a los NPPTC.

a

Clase real \ Clase predicha	PPTC	NPPTC	Error
PPTC	16	0	0
NPPTC	2	26	0,0714

Error Total: 0.0455

b

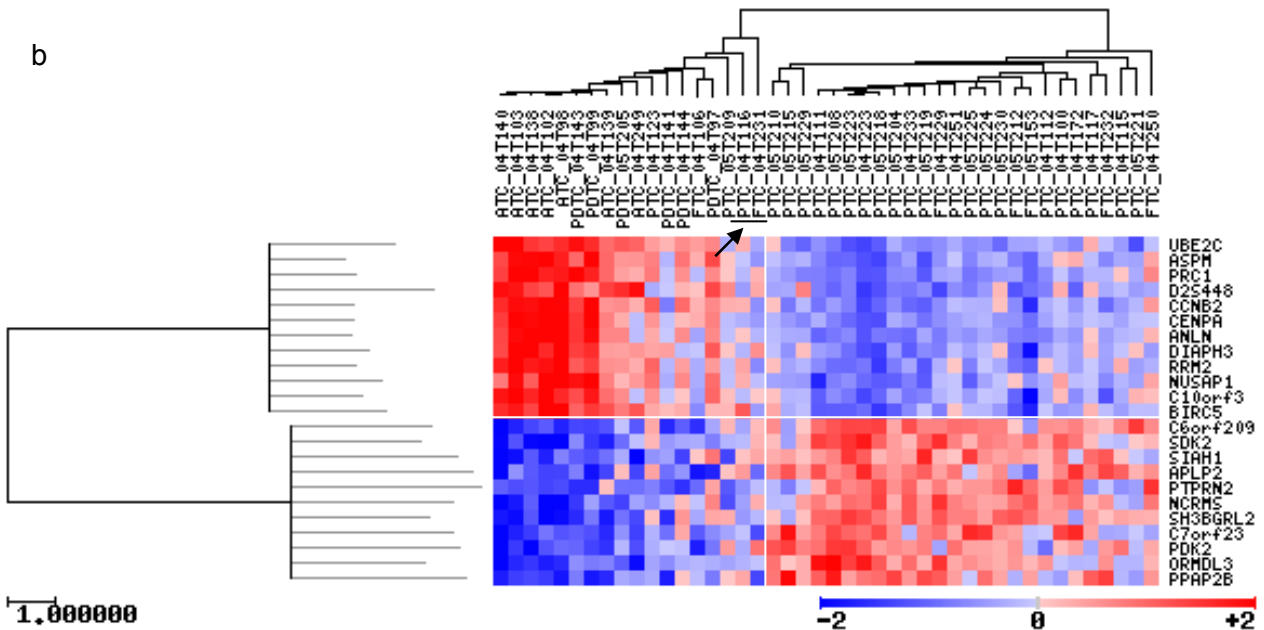


Figura 4.3: (a) Matriz de confusión del clasificador generado por Prophet. Los dos casos clasificados *a priori* de forma incorrecta fueron PTC_04T116 y FTC_04T231 (flecha negra), (b) Clustering no supervisado: las columnas representan los tumores y las filas los genes del clasificador. La rama de la izquierda incluye todos los tumores de mal pronóstico y la de la derecha incluye sólo los casos de buen pronóstico.

Legenda de la barra de color: el color azul oscuro y el color rojo representan sub- y sobre-expresión, respectivamente, siendo la referencia 0 y el rango de la representación de -2 a +2.

4.8 Validación de los datos de expresión génica obtenidos con el Oncochip 12K.

La validación experimental de los resultados obtenidos con la micromatriz de expresión se realizó sobre 2 ATC, 3 PDTC, y 17 WDTC (3 FTC y 14 PTC) mediante sondas TaqMan prediseñadas para cuatro de los genes seleccionados por el clasificador de pronóstico clínico: *UBE2C* (ubiquitin-conjugating enzyme E2C), survivina o *BIRC5* (efector cell peptidase receptor1), anillina o *ANLN* (actin-binding protein) y *CENPA* (centromere protein A). Todos ellos mostraron una mayor expresión en los casos ATC y PDTC con respecto WDTC y por lo tanto, validaron la plataforma de alta densidad Oncochip 12K.

Asimismo, los resultados de expresión de esta serie confirmaron varios marcadores moleculares previamente descritos en series independientes de cáncer de tiroides (Giordano *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2001; Motti *et al.*, 2005; Onda *et al.*, 2004; Pallante *et al.*, 2005; Prasad *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2003; Sorrentino *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2005) (Tabla 4.12).

Tabla 4.12: Genes con expresión diferencial específica de los subtipos o procesos tumorales estudiados, que han sido descritos previamente como marcadores de dichas clases o procesos.

<i>Genes sobre-expresados en ATC/PDTC</i>		<i>Genes sub-expresados en ATC/PDTC</i>	
<i>Símbolo del Gen</i>	<i>Breve Descripción</i>	<i>Símbolo del Gen</i>	<i>Breve Descripción</i>
<i>UBE2C</i>	enzima ubiquitin-conjugante E2C	<i>CDH1</i>	Cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (epitelial)
<i>S100A4</i>	Proteína A4 de unión al calcio (calvasculina, metastasina)	<i>TG</i>	Tiroglobulina
<i>STK5</i>	Aurora quinasa B	<i>PAX8</i>	Factor de transcripción de la familia PAX
<i>Genes sobre-expresados en los tumores BRAF positivos</i>		<i>Genes sub-expresados en los tumores BRAF positivos</i>	
<i>Símbolo del Gen</i>	<i>Breve Descripción</i>	<i>Símbolo del Gen</i>	<i>Breve Descripción</i>
<i>CITED1</i>	Transactivador 1 <i>Cbp/p300-interacting</i>	<i>TPO</i>	Hidrógeno peróxido oxidoreductasa
<i>FN1</i>	Fibronectina		
		<i>Genes sub-expresados en FTC</i>	
		<i>Símbolo del Gen</i>	<i>Breve Descripción</i>
		<i>PTEN</i>	Fosfatasa 3 fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato

La tecnología de alta densidad de las micromatrices de expresión se ha convertido en una herramienta eficaz para la identificación de genes y grupos de genes con un patrón de expresión diferencial, de acuerdo a unas condiciones experimentales concretas. Dado que las patologías tiroideas son entidades complejas y de gran variabilidad, constituyen un buen modelo donde aplicar estas herramientas. De este modo, en los últimos años, se han utilizado para estudiar tanto patologías tiroideas benignas (nódulos tiroideos hiperfuncionantes y adenomas foliculares), como malignas (carcinomas papilares, carcinomas foliculares y en menor medida, carcinomas pobremente diferenciados y anaplásicos) con el fin de identificar los eventos genéticos específicos de cada tipo de enfermedad, así como las rutas de señalización involucradas o afectadas en el desarrollo de las mismas (Aldred *et al.*, 2004; Barden *et al.*, 2003; Chevillard *et al.*, 2004; Delys *et al.*, 2007; Eszlinger *et al.*, 2005; Eszlinger *et al.*, 2004; Finley *et al.*, 2004; Giordano *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2001; Jarzab *et al.*, 2005; Lui *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005; Yano *et al.*, 2004).

En este sentido, este estudio ha confirmado resultados previos y esclarecido varios puntos con respecto a marcadores moleculares, procesos biológicos, redes proteicas y familias génicas relacionadas con los diferentes subtipos de neoplasias tiroideas. Asimismo, se han identificado rutas moleculares concretas relacionadas con la compleja red de procesos involucrados en la transformación de estas patologías. A continuación, se discuten estos resultados.

5.1 Las mutaciones tempranas se correlacionan con las características fenotípicas de los tumores tiroideos y desvelan el origen de los tumores pobremente diferenciados y anaplásicos.

Los tumores del epitelio folicular tiroideo abarcan un amplio espectro de fenotipos, características biológicas y clínicas, que parecen estar directamente relacionados con diferentes eventos moleculares. En este sentido, la identificación de las mutaciones activantes de la ruta de transducción de señales RET/RAS/BRAF/MAPK ha representado uno de los grandes avances en el conocimiento molecular de esta patología, que incluye múltiples entidades. Tal es el caso de las mutaciones tempranas en los genes *NRAS*, *BRAF* y el reordenamiento *RET/PTC1*. Las dos últimas son características de los carcinomas

papilares tiroideos y rara vez aparecen en la variante folicular de los PTC. De acuerdo a la literatura, en torno a un 5% de los casos BRAF positivos son FVPTC (Nikiforova *et al.*, 2003), y en nuestra serie sólo se detectó en 1 caso de variante folicular (FVPTC_04T223).

De forma global, el 45,8% (11/24) de los PTC bien diferenciados presentó la mutación BRAF p.Val600Glu, elevándose el porcentaje al 66,7% (10/15) al excluir los PTC variante folicular. Si hacemos la misma consideración con el resto de las mutaciones, es decir, teniendo en cuenta sólo las variantes donde *a priori* existe posibilidad de encontrar dichas alteraciones, la frecuencia de *RET/PTC1* pasó del **12,5%** (3/24) al 20% (3/15) al excluir los FVPTC, y la de *NRAS* del **20,8%** (5/24) al 55,6% (5/9) si sólo tenemos en cuenta los FVPTC. Probablemente, junto con los factores geográficos y ambientales, la forma de calcular el porcentaje de aparición de estas mutaciones y la representación heterogénea de los distintos subtipos de PTC, sean las causas de la gran amplitud de los rangos de frecuencias descritas en diferentes series. En cualquier caso y a pesar del tamaño de la serie, nuestro estudio se ajustó a los rangos establecidos para dichas mutaciones: BRAF, 29-74% (Kimura *et al.*, 2003; Nikiforova *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2004); *RET/PTC1*, 5-30% (Pierotti *et al.*, 1995); *NRAS*, 0-43% (Kimura *et al.*, 2003).

En relación a nuestra serie de FTC y FA, cabe mencionar que la frecuencia de mutaciones de *NRAS* fue del 14,3% (1/7) y 30,8% (4/13), respectivamente. Estos porcentajes también se ajustaron a los rangos previamente descritos (17-53% para los FTC y 9-48% para los FA) (Hou *et al.*, 2007; Nikiforova *et al.*, 2003). El hecho de que las mutaciones en *NRAS* sean compartidas por los adenomas foliculares, los carcinomas foliculares y la variante folicular de los PTC, sugiere que está relacionada con el patrón folicular de crecimiento, y por tanto no sorprende que no esté presente en los PTC clásicos y otras variantes de patrón no folicular.

Finalmente, el estudio de las mutaciones tempranas en los carcinomas pobremente diferenciados y en los anaplásicos, nos permitió identificar la naturaleza de la lesión precursora de algunas de estas neoplasias. Así, 2 ATC (04T103 y 04T249), y 1 PDTC (04T97) fueron positivos para la mutación *NRAS* p.Gln61Arg, lo que apunta hacia un origen folicular desde el punto de vista histológico. Por otro lado, el PDTC 05T205 fue positivo para la mutación BRAF p.Val600Glu, indicando que este último procedía de un PTC. Además, la valoración del corte histológico permitió localizar focos celulares con características nucleares similares a las del PTC. Cabe destacar el hallazgo de un ATC (04T138) con expresión del reordenamiento *RET/PTC1*, aunque su expresión fue más débil que en los

casos PTC bien diferenciados positivos para esta alteración. Normalmente, los reordenamientos RET/PTC se asocian a un pronóstico favorable y se cree que la progresión de un PTC portador de reordenamiento a formas pobremente diferenciadas, implica la reducción de su expresión (Tallini *et al.*, 1998). Sin embargo, también se han descrito casos de ATC que mantienen la expresión del gen quimera (Lai *et al.*, 2005). Por último, 3 de los PDTC (04T141, 04T143 y 04T144), a pesar de ser negativos para las alteraciones moleculares analizadas, presentaron por valoración de los cortes histológicos focos de atipia nuclear propia de los PTC, en el primer caso, y una arquitectura folicular propia de los FTC o de los FVPTC, en los dos últimos. Así pudo definirse la naturaleza de la lesión precursora del 61,5% (8/13) de los ATC/PDTC estudiados, mientras que en el resto de casos (1 PDTC y 4 ATC) no pudimos descartar un origen *de novo* (Lam *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 1999; Pilotti *et al.*, 1997), si bien hay que mencionar que no dispusimos de material biológico de los ATC 04T139 y 04T140 para realizar este estudio.

5.2 El análisis de los perfiles de expresión de acuerdo a la mutación temprana, revela marcadores y redes proteicas específicamente relacionados con las alteraciones estudiadas.

Las mutaciones en NRAS, BRAF y el reordenamiento RET/PTC1 son alteraciones *a priori* funcionalmente similares, ya que todas ellas activan la ruta de señalización de las MAPquinasas (Kimura *et al.*, 2003). Sin embargo, como se discute en el apartado anterior, hemos observado que existe una correlación genotipo/fenotipo relacionada con la mutación específica, y ensayos *in vitro* demuestran que estas oncoproteínas no son completamente equivalentes (Melillo *et al.*, 2005). En los últimos años se han publicado varios estudios en distintos tipos de tumores sólidos donde la correlación entre los perfiles de expresión y la presencia/ausencia de mutaciones concretas, ha permitido identificar cambios transcripcionales asociados a cada genotipo (Bertucci *et al.*, 2004; Jazaeri *et al.*, 2002; Pavey *et al.*, 2004). En relación al cáncer de tiroides, han sido pocos los trabajos publicados que plantean diferencias de acuerdo a la mutación temprana presente en los tumores (Frattoni *et al.*, 2004; Giordano *et al.*, 2005), posiblemente por la variabilidad de esta patología, la sub-estratificación de las muestras y la dificultad de conseguir un número de casos adecuado.

En este sentido y dada la influencia del tipo de mutación primaria en el desarrollo y evolución de distintas neoplasias, se decidió realizar un estudio específico de expresión de

acuerdo al genotipo concreto de los tumores, independientemente del grado de diferenciación del tumor o de su clasificación según los criterios de la OMS (DeLellis *et al.*, 2004). Los resultados mostraron una asociación del genotipo con cambios específicos en la regulación génica. Hay que destacar que el número de genes con expresión diferencial observado fue modesto, sobre todo para la comparación entre los tumores BRAF positivos y los RET/PTC1 positivos. Una posible explicación es el reducido número de casos RET/PTC1 positivos, que conlleva en sí un bajo poder estadístico en todas las comparaciones en las que participa (como también se observó al comparar esta clase con los tejidos normales). Sin embargo, esta limitación estuvo condicionada por la clase tumoral con la que se enfrentó la clase RET/PTC1 positiva para cada una de las comparaciones. De este modo, en la tabla 4.2 se observa que mientras que la comparación NRAS *versus* RET/PTC1 generó 392 genes diferencialmente expresados (FDR<0,15, >2 veces de diferencias de expresión en valor absoluto), la comparación BRAF *versus* RET/PTC1 generó 59. Esto puede deberse a que tanto la clase de tumores BRAF positivos como la clase de tumores RET/PTC1 positivos están integradas por casos que comparten un mismo patrón histológico, o al menos en su origen lo compartieron, de forma que las diferencias son más sutiles cuando se comparan estas clases entre sí, que cuando se compara con tumores NRAS positivos, que morfológicamente son distintos. Asimismo, estudios citogenéticos y trabajos en modelos animales (Knauf *et al.*, 2005; Saavedra *et al.*, 2000; Wreesmann *et al.*, 2004) indican que la naturaleza de las mutaciones implicadas en la patología tiroidea no es la misma. De esta manera, las mutaciones RET/PTC1 y BRAF se ajustan a un modelo de alteración “activante dominante”, con un fondo genómico estable y, por el contrario, mutaciones en la familia de proto-oncogenes RAS se asocian a un modelo con múltiples mutaciones activantes y pérdidas de función de supresores tumorales en un entorno genómico complejo (Saavedra *et al.*, 2000). Posiblemente, esta sea la razón por la que los tumores RAS positivos presentan un mayor número de genes específicos diferencialmente expresados.

En lo que respecta a los genes individuales, en este estudio se confirma la asociación específica a mutación o al patrón histológico de varios de los genes señalados en el trabajo de Giordano *et al* (Giordano *et al.*, 2005) como: *CACNA2D2*, *HLF*, *VAV3*, *SERPINA1*, *S100A10*, *NUMA1*, *DCI*, *HHEX*, *SCGB2A1* y *DIO1* (Tablas 4.3, 4.4, 4.6). Sin embargo, existen controversias en la interpretación de alguno de estos resultados debido a que, a diferencia del presente estudio, en el trabajo de Giordano no se aporta la información relativa a la expresión de los genes específicos de mutación con respecto al tejido normal. Así, los genes *SCGB2A1* y *DIO1*, que Giordano *et al* marcan como sobre-expresados en los

casos NRAS positivos, nosotros los marcamos como sub-expresados tanto en los tumores BRAF positivos como en los RET/PTC1 positivos. Esto es porque *SCGB2A1* y *DIO1* no presentan diferencias de expresión para los tumores NRAS positivos con respecto al tejido normal, y en cambio sí para las clases BRAF y RET/PTC1. Luego las alteraciones en la regulación génica de estos genes son específicas de los PTC con patrón de crecimiento papilar (BRAF y RET/PTC1 positivos) (Tabla 4.6). Lo mismo sucede con *SERPINA1*, puesto que en el estudio de Giordano se considera como un gen sub-expresado en los casos NRAS positivos y, sin embargo, estuvo sobre-expresado en los BRAF y RET/PTC1 positivos de nuestra serie, no presentando relevancia alguna para los NRAS positivos. Esto es de gran importancia, dado que el conocimiento de la expresión diferencial de estos tumores asociada de forma específica a cada una de las mutaciones, nos puede permitir comprender mejor la biología de estas patologías y ayudarnos en el diseño de terapias dirigidas y efectivas. Por lo tanto, es fundamental una interpretación correcta de los resultados.

Por otra parte, hay resultados que apuntan en la misma dirección. En este sentido, cabe destacar la sub-expresión específica de *NUMA1* en los casos RET/PTC1 positivos, gen que codifica una proteína esencial para el mantenimiento de la integridad nuclear y la formación del huso mitótico (Du *et al.*, 2001) y que ha sido identificada tanto en el trabajo de Giordano *et al* como en este estudio. Otro gen sub-expresado de forma específica en los RET/PTC1 es la ciclina *CCNH*. Este gen codifica una proteína que junto con CDK7 y MAT1 constituye el complejo quinasa dependiente de ciclina del factor multiproteico TFIIH, que juega un papel importante en el control del ciclo celular, de la transcripción y en la reparación del ADN (Eki *et al.*, 1998; Ford *et al.*, 2000). Por el contrario, en los BRAF positivos, uno de los componentes del mismo complejo (*CDK7*) está sobre-expresado de forma específica. Por lo tanto, este complejo parece tener una función bimodal en los carcinomas con patrón papilar de acuerdo al genotipo.

Otro de los genes que se sobre-expresa en los tumores BRAF positivos es *CITED1*. La sobre-expresión de este gen, que codifica una proteína reguladora de la transcripción de proteínas nucleares, se ha asociado con el PTC en varios trabajos basados en perfiles de expresión y en paneles de marcadores inmunohistoquímicos (Aldred *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2005), pero nunca antes con la presencia de la mutación en BRAF. Según nuestros resultados, los tumores BRAF positivos presentan de forma homogénea sobre-expresión significativa de *CITED1*, mientras que los RET/PTC1 positivos muestran niveles de expresión similares a los del tiroides normal. Estos resultados podrían indicar que

la sobre-expresión de *CITED1* es una consecuencia de la actividad oncogénica de *BRAF*, aunque hasta la fecha no se ha descrito una conexión funcional que apoye esta hipótesis.

Por otro lado, hay genes ampliamente relacionados en la literatura con los PTC que no pudieron ser confirmados para el estudio específico de mutaciones ya que no superaron los filtros del pre-procesado para el conjunto de casos *NRAS* positivos. Sin embargo, sí se pudieron analizar para las comparaciones en las que no participó dicha clase de tumores. Tal es el caso del gen de la fibronectina *FN1* (Huang *et al.*, 2001), con sobre-expresión en los casos *BRAF* positivos (FDR=0,0005 y 7,2 veces de diferencia de expresión con respecto N) y *RET/PTC1* positivos (FDR= 0,19, 7 veces de diferencia de expresión con respecto N), o del gen de la tiroperoxidasa *TPO* (Durante *et al.*, 2007; Giordano *et al.*, 2005), sub-expresado únicamente en los tumores *BRAF* positivos (FDR= 0,0016 y 6 veces de diferencia de expresión con respecto el tejido normal).

Dentro de los genes específicos de *NRAS*, cabe mencionar la sobre-expresión de *GNAS1*. Este gen codifica la subunidad alfa de la proteína heterodimérica $Gs\alpha$ que acopla TSHR (receptor de la hormona tirotrópica) con la adenilato ciclasa, activando así la vía del AMP cíclico (Figura 1.1). Cabe destacar que esta vía $Gs\alpha$ /AMPcíclico ha sido relacionada con la activación de *RAS* (Pak *et al.*, 2002), de manera que la sobre-estimulación de la cascada del AMP cíclico podría potenciar la actividad de una proteína *RAS* oncogénica o tener una relación directa con la presencia de mutaciones en esta familia de proto-oncogenes.

Finalmente, la herramienta bioinformática SNOW (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es>) nos permitió integrar los resultados de los perfiles de expresión con los datos de interacciones proteicas registradas en distintas bases de datos que recogen únicamente anotaciones experimentales. Los resultados más interesantes fueron los relativos a los genes sub-expresados de forma específica en los casos *NRAS* positivos. Estos análisis mostraron que los productos de dichos genes estaban en un entorno significativamente conectado, destacando la presencia de un componente inter-proteico de gran tamaño en el que se pudieron identificar varios receptores de citoquinas (TNFRSF12A, TNFRSF10D, CD40, IL7R, CSF2RB, IFNAR2 e IFNGR1), y dos antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad MHC (*Major histocompatibility complex*): HLA-E y HLA-G. Esto es de gran interés, ya que la reducción selectiva de la expresión tanto de epítomos del complejo MHC como de receptores de citoquinas (Marincola *et al.*, 2003; Natali *et al.*, 1989), se han mostrado como mecanismos por los que las células tumorales eluden la respuesta inmune y la infiltración linfocítica intratumoral que ésta conlleva (Dranoff, 2004). De acuerdo con esto,

las características funcionales de esta red inter-proteica podrían tener relación con alguno de los aspectos fenotípicos y etiológicos de los tumores NRAS positivos. Éstos pueden ser: la menor presencia de infiltración linfocítica en los tumores con patrón folicular con respecto las neoplasias portadoras de mutaciones BRAF y RET/PTC1 (los PTC con patrón de crecimiento papilar) (Schlumberger, 1998), y la ausencia de mutaciones en la familia de proto-oncogenes RAS en patologías tiroideas asociadas a procesos inflamatorios crónicos y por lo tanto, a respuestas inmunes prolongadas. Este es el caso de la tiroiditis linfocítica de Hashimoto, donde se ha observado expresión del reordenamiento RET/PTC1 (Rhoden *et al.*, 2006), y de forma más inusual, se ha asociado también al desarrollo de PTC BRAF positivos (Sargent *et al.*, 2006).

Estos hallazgos contribuyen a la identificación de los mecanismos moleculares complejos que determinan los distintos comportamientos clínicos de los tumores tiroideos y podrían ser de interés en el diseño de terapias dirigidas y efectivas.

5.3 El estudio de los perfiles de expresión de acuerdo con la mutación temprana revela una proximidad genética de la variante folicular de los PTC a los FTC y FA.

La variante folicular de los PTC es una entidad controvertida. Si bien fue reclasificada en 1980 como un subtipo de los PTC por su comportamiento clínico general de acuerdo a estudios de seguimiento a corto plazo (Chem *et al.*, 1977; Hawk *et al.*, 1976), son varios los trabajos que sugieren que algunos FVPTC podrían mimetizar las características patológicas de los FTC (mayor frecuencia de encapsulación y diseminación hematológica, y una menor frecuencia de metástasis linfáticas con respecto los PTC clásicos (Jain *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2003). Desde el punto de vista molecular, los FVPTC comparten con los FTC y los FA las mutaciones tempranas en la familia de proto-oncogenes RAS, pero se desconocen qué otras alteraciones pueden determinar sus características fenotípicas.

En este sentido, en la figura 4.1 de resultados observamos que todos los FVPTC, independientemente de que tengan o no mutación en NRAS, se agrupan con los FA y los FTC (con la excepción de un caso FVPTC BRAF-positivo que se agrupa con el resto de PTC). Dado que el comportamiento genético de los FVPTC NRAS negativos es más próximo al de los tumores FA/FTC/FVPTC NRAS positivos que al de los PTC BRAF y RET/PTC1 positivos, es probable que el tipo de mutación temprana que presenten aquellos,

sea funcionalmente similar a las mutaciones en NRAS y, del mismo modo, se ajuste a un modelo con un entorno genómico complejo (Saavedra *et al.*, 2000).

De esta manera, se ha descrito en la literatura que los FVPTC comparten un patrón de aberraciones cromosómicas con los FTC y FA, a diferencia de los PTC clásicos (Wreesmann *et al.*, 2004). En este sentido, entre los genes específicos para NRAS positivos independientemente del subtipo, se encontró una sub-expresión significativa del gen *MAP3K7IP1* (*TAB1*), que está localizado en el brazo largo del cromosoma 22 (22q13.1), una región cromosómica habitualmente perdida en los FTC, FA y FVPTC (Kitamura *et al.*, 2001; Wreesmann *et al.*, 2004). Además, *MAP3K7IP1* codifica una proteína necesaria para la autofosforilización y activación de p38 α (Ge *et al.*, 2003), lo que es de especial interés dado que p38 α inhibe *in vitro* la actividad oncogénica de RAS (Qi *et al.*, 2007). Luego la pérdida de *MAP3K7IP1* podría favorecer la proliferación celular mediada por RAS. Por otro lado, se encontró sobre-expresión de los genes *LOC90355* (*C5orf30*), *FOXO1A* y *UGT8* que están localizados en las bandas cromosómicas 5q21.1, 13q14.1 y 4q26, respectivamente, todas ellas regiones comúnmente ganadas en los FTC, FA y FVPTC (Wreesmann *et al.*, 2004).

Estas alteraciones en la expresión génica podrían ser la consecuencia funcional de los desórdenes cromosómicos presentes en este tipo de tumores. No obstante, se requiere una validación de estos resultados en una serie independiente, así como un estudio citogenético para corroborar la relación sobre/sub- expresión de estos genes con una ganancia/pérdida de regiones cromosómicas concretas en los tumores con arquitectura folicular.

En lo que respecta a una reclasificación de los FVPTC como FA/FTC, hay que tener en cuenta que esto tendría grandes implicaciones pronósticas y terapéuticas, sobre todo en los casos FVPTC sin invasión capsular ni vascular o metástasis. Estos casos podrían ser reclasificados como FA, independientemente de la presencia de factores pronósticos adversos (edad de diagnóstico superior a los 45 años o un tamaño de la lesión mayor de 4 cm) y, por consiguiente, no sería necesaria la tiroidectomía completa o la administración de radioyodo (Wreesmann *et al.*, 2004). Por lo tanto, a pesar de las evidencias observadas en distintos trabajos, incluido este, son totalmente necesarios estudios en series extensas con seguimientos clínicos largos para establecer una categoría definitiva de los FVPTC.

5.3.1 La expresión diferencial de marcadores concretos determina eventos relacionados con la transición Adenoma Folicular a Carcinoma Folicular Tiroideo.

Los adenomas y carcinomas foliculares constituyen dos entidades tumorales altamente relacionadas por sus similitudes citológicas e histológicas, pero con marcadas diferencias clínicas. La detección de carcinomas tiroideos dentro de lesiones benignas pre-existentes y la correspondencia de alteraciones moleculares entre los FA y los FTC (Arora *et al.*, 2008), apoyan la teoría del desarrollo del FTC a partir de una transformación carcinogénica de un FA pre-maligno. En este apartado se muestran qué alteraciones genéticas podrían estar involucradas en este proceso de acuerdo a la literatura y a los resultados del análisis de los transcriptomas de nuestra serie de FTC y FA.

Tanto estudios en modelo murinos (Saavedra *et al.*, 2000), como la presencia de los oncogenes RAS y reordenamientos PAX8/PPAR γ en los FA (Castro *et al.*, 2006; Nikiforova *et al.*, 2003), parecen indicar que estas alteraciones no tienen el suficiente potencial para desencadenar una transformación carcinogénica. En este sentido, recientemente se han identificado alteraciones genéticas en algunos FTC que no se han observado en ningún FA, hasta el momento, y que pueden coexistir con mutaciones tempranas como NRAS pGln61Arg (Hou *et al.*, 2007). Este es el caso de las mutaciones inactivantes o deleciones del supresor tumoral *PTEN*, que al igual que otras alteraciones genéticas todavía sin identificar, podrían colaborar con las mutaciones tempranas en el desarrollo de los FTC.

Fue particularmente interesante observar una reducción significativa de la expresión de *PTEN* en los FTC con respecto al tejido normal, siendo esta sub-expresión mayor en los FTC que en los FA, lo que confirmaría lo expuesto anteriormente. Asimismo, cabe destacar la sub-expresión del gen *WRN* en los FTC. Este gen codifica una helicasa de la subfamilia de proteínas RecQ, cuyas mutaciones son la causa del *síndrome de Werner*. Este síndrome autosómico recesivo se caracteriza por un envejecimiento prematuro y una mayor incidencia de distintos tumores, entre ellos los tiroideos (Goto *et al.*, 1996). De hecho, Ishikawa *et al.* (Ishikawa *et al.*, 1999) en un estudio retrospectivo, muestran una incidencia significativamente superior de FTC entre los pacientes con síndrome de Werner con respecto a la población no afecta. Con estos antecedentes y dado que otros genes causales de síndromes hereditarios asociados a desarrollo de cáncer de tiroides, como *APC*, *PTEN* o *PRKARIA* (apartado 1.2.7), participan activamente en el desarrollo de los carcinomas

tiroideos esporádicos, cabe esperar que la inactivación de *WRN* sea de especial relevancia en la carcinogénesis de los FTC esporádicos.

Otros genes sub-expresados en los FTC y que pueden ser de interés son: *DUSP1* y *MET*. *DUSP1* (*MKP1*) codifica una proteína fosfatasa que defosforila los residuos fosfotreonina y fosfotirosina de las MAPquinasas activas, su transcripción está regulada directamente por p53 y se ha señalado como efector de este último en la regulación negativa de las MAPquinasas (Li *et al.*, 2003). De esta manera, la pérdida de la expresión de *DUSP1* puede ser fundamental para la proliferación de los FTC y la transformación carcinogénica de los FA. Por último, el gen *MET* codifica un proto-oncogen habitualmente sobre-expresado en los PTC y más específicamente, en la variante de células altas (Nardone *et al.*, 2003; Xing, 2007). Sin embargo y de forma sorprendente, son varios los estudios que muestran la pérdida alélica del *locus* donde se encuentra este gen (7q31) como un evento frecuente en los FTC (Kitamura *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1998). Más aún, en un estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH) de *MET* para una serie de FA, FTC, PTC y ATC, se observó que esta alteración era exclusiva de los FTC y de los ATC (Trovato *et al.*, 1999). De esta manera, la sub-expresión de *MET* detectada en nuestra serie de FTC con respecto los FA y los N, podría ser debida a una pérdida alélica. Estos hallazgos son de gran relevancia, ya que no sólo indican que la expresión de *MET* es una vía divergente entre los PTC y los FTC, sino que además, su pérdida juega un papel clave en la transformación carcinogénica de los FA.

Es necesario validar estos resultados en series independientes de tumores tiroideos. Asimismo, el diseño y desarrollo de estudios moleculares como la búsqueda de mutaciones puntuales, análisis de grandes deleciones y de pérdidas alélicas para estos genes y sus *loci*, nos podrían revelar las causas de su expresión diferencial entre los FTC y los FA. Sería de gran interés hacer extensivo este estudio a los PTC variante folicular, que como se señala en el apartado anterior tienen un comportamiento molecular muy similar al de los FTC y FA.

Finalmente, en lo que respecta al *clustering* no supervisado de los FA, los FTC y tejidos normales, se observó que dos adenomas foliculares (05T228 y 04T224) se agrupaban con el FTC mínimamente invasivo 04T229 y en general, parecían estar más próximos a los FTC. Esto podría indicar que estos FA presentan un espectro de alteraciones moleculares cercana a la transformación carcinogénica, que hace que su expresión génica sea más próxima a los FTC que al resto de lesiones benignas.

5.4 Determinación de procesos y marcadores génicos involucrados en la progresión y pérdida de diferenciación de los carcinomas tiroideos del epitelio folicular. Nuevas posibilidades terapéuticas.

Hasta la fecha son pocos los estudios publicados sobre perfiles de expresión en carcinomas anaplásicos y pobremente diferenciados, y éstos se basan en ensayos con líneas celulares debido a la dificultad de obtener tejido congelado de estos tumores (Onda *et al.*, 2004). Sin embargo, las líneas celulares adquieren propiedades únicas durante el proceso de inmortalización, de manera que los resultados de estos estudios *in vitro* deben extrapolarse con cautela al ámbito de los pacientes.

En este estudio se maneja una de las series más grandes descritas en la literatura de carcinomas tiroideos primarios con diferentes grados de diferenciación (7ATC, 6PDTC, 31WDTC). Esto, junto con el manejo de nuevas herramientas bioinformáticas capaces de resolver los límites que plantean los análisis múltiples y un tamaño muestral relativamente pequeño, ha permitido obtener resultados que podrían repercutir significativamente en el manejo clínico de los pacientes con ATC/PDTC y en el diseño de terapias más dirigidas.

5.4.1 Los perfiles de expresión y el enriquecimiento funcional identifican las bases moleculares del proceso de pérdida de diferenciación de los tumores tiroideos.

En primer lugar, se encontró una sobre-regulación del ciclo celular gracias al análisis funcional del perfil de expresión específico de ATC/PDTC, lo que coincide con la agresividad de estos tumores. Además, el análisis relacionado con la pérdida de diferenciación confirmó una sobre- y sub- expresión de genes previamente descritos como marcadores de mal pronóstico para cáncer de tiroides (Motti *et al.*, 2005; Onda *et al.*, 2004; Pallante *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2003; Sorrentino *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2005; Tabla 4.9).

Más aún, el perfil transcripcional de los ATC/PDTC mostró alteraciones en la expresión génica previamente asociadas con mal pronóstico en distintos tipos de tumores (Glinsky, 2006), tales como el incremento de la expresión de: miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (*BIRC5*), activadores de proteínas de control del huso mitótico

(*BUB1*, *BUB3*, *KNTC2*, *MAD2* (*MAD2L1*), *PLK4* y *AURORA A* (*STK6*)) y genes relacionadas con el control del ciclo celular (*CCNB2*, *CCNA2* y *CDC2*).

Finalmente, encontramos que nuestra serie de ATC/PDTC tenía una sub-regulación de genes cuyos productos son críticos para la síntesis de las hormonas tiroideas, como el gen *ARRB2*, que codifica una proteína (*β -arrestin 2*) implicada en la desensibilización de los receptores de la hormona tirotrópica (TSHR) (Voigt *et al.*, 2000), *RAB5A*, cuya proteína participa en la producción de tiroglobulina (TG; (Croizet-Berger *et al.*, 2002), y la sub-expresión de *TG* y *PAX8*, que también se han observado previamente en otras series de ATC/PDTC (Onda *et al.*, 2004). Más aún, el gen relacionado con la morfogénesis y diferenciación de la glándula tiroidea, *HHEX*, estaba igualmente sub-expresado. Todos estos datos son consistentes con una ruta de señalización de la TSHR alterada y una pérdida de la función específica de la célula folicular tiroidea en el cáncer de tiroides pobremente diferenciado y anaplásico.

5.4.2 El análisis funcional y de las familias génicas revela rutas moleculares relacionadas con la progresión del cáncer de tiroides.

Observamos que la ruta de señalización de las MAPquinasas (ruta en la que se localizan las lesiones moleculares involucradas en el desarrollo de los WDTC; (Nikiforova *et al.*, 2003), estaba fuertemente afectada en los ATC/PDTC, presentando una sobre-expresión de genes clave para la traducción de la señal y sub-expresión de varios reguladores negativos (Tabla 4.9). La desregulación de esta vía es crítica para la evolución de las neoplasias tiroideas, y su restauración podría constituir una solución terapéutica prometedora para los pacientes con carcinomas tiroideos agresivos.

Otras rutas de señalización que presentaron alteraciones significativas, fueron la ruta de TGF- β , la de adhesión focal y la de regulación del citoesqueleto de actina, estando todas ellas interconectadas como se muestra a continuación. La ruta de señalización de TGF- β se ha asociado con el proceso de transición del epitelio a mesénquima (EMT) en estadios tardíos del cáncer (Siegel *et al.*, 2003) y más recientemente, con invasión en PTC (Vasko *et al.*, 2007). El EMT es un proceso de pasos múltiples que implica la disolución de las uniones adherentes y las uniones estrechas célula-célula (*tight junctions*), así como la reorganización del citoesqueleto, la pérdida de la polaridad de la célula epitelial, la represión de marcadores epiteliales y la sobre-regulación de proteínas mesenquimales (Grunert *et al.*,

2003). En nuestra serie de ATC/PDTC, se observó una sobre-expresión de la ubiquitín ligasa E3 *SMURF1* que se une a la proteína RhoA, provocando la disolución de las uniones estrechas intercelulares y el remodelamiento del citoesqueleto (Tabla 4.9) (Ozdamar *et al.*, 2005). Mas aún, el perfil transcripcional ATC/PDTC mostró una sobre-expresión de *TWIST1* y una sub-expresión de *CDH1*, ambos importantes reguladores de la transición epitelio-mesénquima en los procesos metastáticos e invasivos (Yang *et al.*, 2004; Zavadil *et al.*, 2005). Asimismo, varios genes codificantes de proteínas mesenquimales (miembros de la familia de proteínas de colágeno y laminina; Tabla 4.10) están sobre-expresados, lo que se ha relacionado previamente con invasión tumoral y angiogénesis (Sherman-Baust *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006). También se detectó una sobre-expresión de varios genes de la familia de las metaloproteasas (MMP), que codifican enzimas asociadas a la degradación de los componentes de la membrana basal del epitelio, la sobre-regulación de la ruta de TGF- β y la capacidad invasiva del tumor (Chambers *et al.*, 1997).

Otras proteínas relacionadas con invasión son las quemoquinas. Éstas se han detectado en un amplio rango de tumores y se ha sugerido que presentan un patrón de expresión específico de tumor (Slettenaar *et al.*, 2006). En este estudio se observó que *CXCL3*, *CXCL10* y *CXCL11* estaban sobre-expresadas de forma significativa para ATC/PDTC. Además, la transcripción de *CXCL10* y *CXCL11* está inducida por el interferón- γ que, a su vez, mostró sobre-expresión en estos tumores.

Cabe destacar que además se detectó una sobre-expresión de la subfamilia de antígenos MAGEA (MAGEA1–4, MAGEA6, MAGEA8 y MAGEA10–11). Estos genes junto con otros miembros de la familia de antígenos MAGE, se expresan únicamente en placenta y en células germinales de testículo, pero sirven como marcadores tumorales de numerosos tipos de neoplasias (Andrade *et al.*, 2008). Asimismo, se ha propuesto que los niveles de expresión de los antígenos derivados de MAGE se correlacionan con una mayor agresividad y con la adquisición de resistencia a agentes quimioterapéuticos como el paclitaxel y doxorubicina (Duan *et al.*, 2003). Esta mayor agresividad y la resistencia a estos fármacos son características propias de los PDTC/ATC, de manera que una inmunoterapia anti-MAGE podría beneficiar a los pacientes que desarrollan estos tumores. De hecho, este tratamiento ya se ha aplicado a pacientes con tumores no tiroideos y los resultados obtenidos parecen prometedores (Burgdorf *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2007).

5.4.3 Identificación de una firma molecular de pronóstico clínico para los tumores del epitelio folicular tiroideo.

En los últimos años, se han propuesto numerosos algoritmos matemáticos con el fin de encontrar firmas moleculares con un reducido número de marcadores, capaces de discriminar características clínicas concretas (Huang *et al.*, 2003; van de Vijver *et al.*, 2002). Sin embargo, estas herramientas presentan, frecuentemente, errores relacionados con sesgos en el procedimiento de selección de los genes, que llevan a una subestimación de los fallos de predicción (Ambroise *et al.*, 2002). En este sentido, en este estudio se utilizó el programa Prophet (Medina *et al.*, 2007), una herramienta que incluye una estrategia de validación cruzada que genera errores de estimación sin sesgo. Mediante esta herramienta, obtuvimos una firma molecular de 23 genes (Tabla 4.11) y 6 ESTs que pueden distinguir correctamente los ATC/PDTC y los WDTC recurrentes de los WDTC de buen pronóstico. Fue de especial interés un caso de PTC diagnosticado como variante esclerosante difusa (DSVPTC) (04T117), con un TNM T4N1M1, que fue clasificado por la firma molecular como un tumor de buen pronóstico. DSV es una variante poco común de los PTC, que se caracteriza por una edad de aparición temprana (edad media, 29 años frente a los 45 de los PTC clásicos), tumores de mayor tamaño y una mayor incidencia de metástasis a los ganglios linfáticos cervicales que la variante clásica de PTC (80% *versus* 43%) (como se indica en el apartado 1.2.3.2). Sin embargo, presenta un pronóstico muy similar al de la variante clásica de PTC (la supervivencia total media es del 93%, (Fujimoto *et al.*, 1990; Lam *et al.*, 2006). Además, el estudio de mutaciones tempranas mostró que el tumor expresaba el reordenamiento RET/PTC1, una alteración frecuente entre este subtipo de carcinomas (Sheu *et al.*, 2007), que podría estar asociado a un pronóstico favorable (apartado 5.1) (Tallini *et al.*, 2001). Este paciente se mantiene libre de enfermedad actualmente (5 años de seguimiento)

Por otro lado, sólo dos casos de WDTC (FTC_04T231 y PTC_04T116), libres de enfermedad hasta el momento, fueron clasificados como tumores de mal pronóstico. Estos pacientes tuvieron un seguimiento de dos años aproximadamente, y no se puede descartar una futura recaída. De manera que, a pesar de ser necesarias series independientes de tumores tiroideos para validar esta firma molecular, estos resultados son de gran interés dado su aplicabilidad en el diagnóstico y el diseño de tratamientos dirigidos.

5.4.4 Implicaciones clínicas de los resultados.

A pesar de los avances realizados en los últimos años, los tratamientos alternativos a las terapias convencionales no han proporcionado mejoras significativas en el pronóstico de los pacientes con tumores tiroideos agresivos y por tanto, sigue sin haber una solución efectiva para estos casos (Muresan *et al.*, 2008). En este sentido, en este estudio se ha identificado por primera vez procesos biológicos, rutas moleculares y marcadores específicamente implicados en el pronóstico de los carcinomas tiroideos, que podrían ser objeto de diseño de nuevas terapias más efectivas. Estos hallazgos, a su vez, podrían contribuir significativamente a la mejora en la predicción de los casos recurrentes incluso a partir del material citológico preoperatorio, así como a la estratificación de los pacientes para un tratamiento y seguimiento específico.

- I. Las mutaciones tempranas se asocian con las características fenotípicas de los tumores tiroideos y desvelan el origen de los tumores pobremente diferenciados y anaplásicos.
- II. El análisis de los transcriptomas relativos a las diferentes mutaciones tempranas, revela marcadores y redes proteicas específicamente relacionadas con dichas alteraciones. Este hecho puede tener especial repercusión en el diseño de tratamientos más dirigidos y eficaces según el tipo de tumor.
- III. El análisis de los perfiles de expresión dependiente de mutación identifica una proximidad genética entre la variante folicular de los PTC y los FTC/FA. A pesar de ser necesarios estudios adicionales en series extensas con seguimientos prolongados, estos resultados podrían tener repercusión en revisiones futuras de la clasificación de los tumores tiroideos por la OMS.
- IV. La expresión diferencial de marcadores concretos determina varios eventos potencialmente relacionados con la transición de Adenoma Folicular a Carcinoma Folicular Tiroideo. Esto es de gran interés dada la dificultad existente en la distinción preoperatoria de estos tumores y por lo tanto, la repercusión clínica que esto representa en el manejo específico de los pacientes.
- V. El enriquecimiento funcional de los perfiles de expresión identifica varios procesos y marcadores genéticos involucrados en la progresión y pérdida de diferenciación de los carcinomas tiroideos del epitelio folicular.
- VI. La identificación de una firma molecular de pronóstico clínico para los tumores del epitelio folicular tiroideo, puede mejorar en el futuro el manejo clínico de los pacientes y señala dianas terapéuticas para el diseño de nuevos tratamientos.

- (2006). American Association of Clinical Endocrinologists and Associazione Medici Endocrinologi medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocr Pract* **12**: 63-102.
- Abele JS, Miller TR, King EB, Lowhagen T. (1985). Smearing techniques for the concentration of particles from fine needle aspiration biopsy. *Diagn Cytopathol* **1**: 59-65.
- Agrawal S, Rao RS, Parikh DM, Parikh HK, Borges AM, Sampat MB. (1996). Histologic trends in thyroid cancer 1969-1993: a clinico-pathologic analysis of the relative proportion of anaplastic carcinoma of the thyroid. *J Surg Oncol* **63**: 251-5.
- Ain KB, Egorin MJ, DeSimone PA. (2000). Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with paclitaxel: phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group. *Thyroid* **10**: 587-94.
- Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, Pellegata NS, Gimm O, Jhiang S, Davuluri RV, de la Chapelle A, Eng C. (2004). Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. *J Clin Oncol* **22**: 3531-9.
- Alsanea O, Wada N, Ain K, Wong M, Taylor K, Ituarte PH, Treseler PA, Weier HU, Freimer N, Siperstein AE, Duh QY, Takami H, Clark OH. (2000). Is familial non-medullary thyroid carcinoma more aggressive than sporadic thyroid cancer? A multicenter series. *Surgery* **128**: 1043-50;discussion 1050-1.
- Al-Shahrour F, Minguez P, Tarraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, Conde L, Blaschke C, Vera J, Dopazo J. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res* **34**: W472-6.
- Ambrose C, McLachlan GJ. (2002). Selection bias in gene extraction on the basis of microarray gene-expression data. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6562-6.
- Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW. (2008). Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun* **8**: 2.
- Aragues R, Jaeggi D, Oliva B. (2006). PIANA: protein interactions and network analysis. *Bioinformatics* **22**: 1015-7.
- Are C, Shaha AR. (2006). Anaplastic thyroid carcinoma: biology, pathogenesis, prognostic factors, and treatment approaches. *Ann Surg Oncol* **13**: 453-64.
- Arora N, Scognamiglio T, Zhu B, Fahey TJ. (2008). Do Benign Thyroid Nodules Have Malignant Potential? An Evidence-Based Review. *World J Surg*.
- Barden CB, Shister KW, Zhu B, Guiter G, Greenblatt DY, Zeiger MA, Fahey TJ, 3rd. (2003). Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Cancer Res* **9**: 1792-800.
- Barroeta JE, Baloch ZW, Lal P, Pasha TL, Zhang PJ, LiVolsi VA. (2006). Diagnostic value of differential expression of CK19, Galectin-3, HBME-1, ERK, RET, and p16 in benign and malignant follicular-derived lesions of the thyroid: an immunohistochemical tissue microarray analysis. *Endocr Pathol* **17**: 225-34.
- Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, Iacconi P, Miccoli P, Pacini F. (2000). N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid* **10**: 19-23.
- Baud V, Karin M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* **11**: 372-7.
- Beimfohr C, Klugbauer S, Demidchik EP, Lengfelder E, Rabes HM. (1999). NTRK1 re-arrangement in papillary thyroid carcinomas of children after the Chernobyl reactor accident. *Int J Cancer* **80**: 842-7.
- Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B MET* **57**: 289-300.
- Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adelaide J, Geneix J, Bachelart L, Finetti P, Koki A, Hermitte F, Hassoun J, Debono S, Viens P, Fert V, Jacquemier J, Birnbaum D. (2004). Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene* **23**: 2564-75.
- Bongarzone I, Pierotti MA, Monzini N, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, Pilotti S, Grieco M, Santoro M, Fusco A, et al. (1989). High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* **4**: 1457-62.
- Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, Suarez HG. (1997). High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements, in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene* **15**: 1263-73.
- Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, Ares M, Jr., Haussler D. (2000). Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 262-7.

- Burgdorf SK, Fischer A, Claesson MH, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Rosenberg J. (2006). Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *J Exp Clin Cancer Res* **25**: 201-6.
- Capella G, Matias-Guiu X, Ampudia X, de Leiva A, Perucho M, Prat J. (1996). Ras oncogene mutations in thyroid tumors: polymerase chain reaction-restriction-fragment-length polymorphism analysis from paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* **5**: 45-52.
- Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Carlomagno F, Basolo F, Faviana P, Kruhoffer M, Orntoft T, Russell JP, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Melillo RM. (2004). Functional expression of the CXCR4 chemokine receptor is induced by RET/PTC oncogenes and is a common event in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **23**: 5958-67.
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhaes J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simoes M. (2006). PAX8-PPARgamma rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 213-20.
- Chambers AF, Matrisian LM. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1260-70.
- Chang L, Karin M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**: 37-40.
- Chem KT, Rosai J. (1977). Follicular variant of thyroid papillary carcinoma: a clinicopathologic study of six cases. *Am J Surg Pathol* **1**: 123-30.
- Chevillard S, Ugolin N, Vielh P, Ory K, Levalois C, Elliott D, Clayman GL, El-Naggar AK. (2004). Gene expression profiling of differentiated thyroid neoplasms: diagnostic and clinical implications. *Clin Cancer Res* **10**: 6586-97.
- Ciampi R, Giordano TJ, Wikenheiser-Brokamp K, Koenig RJ, Nikiforov YE. (2007). HOOK3-RET: a novel type of RET/PTC rearrangement in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **14**: 445-52.
- Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Gandhi M, Zhu Z, Nikiforova MN, Rabes HM, Fagin JA, Nikiforov YE. (2005). Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest* **115**: 94-101.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, Mazzaferri EL, McIver B, Sherman SI, Tuttle RM. (2006). Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* **16**: 109-42.
- Corvi R, Berger N, Balczon R, Romeo G. (2000). RET/PCM-1: a novel fusion gene in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* **19**: 4236-42.
- Corvi R, Lesueur F, Martinez-Alfaro M, Zini M, Decaussin M, Murat A, Romeo G. (2001). RET rearrangements in familial papillary thyroid carcinomas. *Cancer Lett* **170**: 191-8.
- Croizet-Berger K, Daumerie C, Couvreur M, Courtoy PJ, van den Hove MF. (2002). The endocytic catalysts, Rab5a and Rab7, are tandem regulators of thyroid hormone production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8277-82.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949-54.
- DeLellis RA. (2006). Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* **94**: 662-9.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. *WHO Classification. Tumours of Endocrine Organs*. IARC Press: Lyon.
- Delys L, Detours V, Franc B, Thomas G, Bogdanova T, Tronko M, Libert F, Dumont JE, Maenhaut C. (2007). Gene expression and the biological phenotype of papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **26**: 7894-903.
- Demeter JG, De Jong SA, Lawrence AM, Paloyan E. (1991). Anaplastic thyroid carcinoma: risk factors and outcome. *Surgery* **110**: 956-61; discussion 961-3.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* **29**: 117-29.
- Diéguez C, Yturriaga R. *Tiroides*, 2ª edn. McGraw-Hill.
- Dobashi Y, Sakamoto A, Sugimura H, Mernyei M, Mori M, Oyama T, Machinami R. (1993). Overexpression of p53 as a possible prognostic factor in human thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* **17**: 375-81.
- Dranoff G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**: 11-22.
- Du Q, Stukenberg PT, Macara IG. (2001). A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat Cell Biol* **3**: 1069-75.
- Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV. (2003). Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **9**: 2778-85.
- Durante C, Puxeddu E, Ferretti E, Morisi R, Moretti S, Bruno R, Barbi F, Avenia N, Scipioni A, Verrienti A, Tosi E, Cavaliere A, Gulino A, Filetti S, Russo D. (2007). BRAF mutations in papillary thyroid carcinomas inhibit genes involved in iodine metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 2840-3.
- Eki T, Okumura K, Abe M, Kagotani K, Taguchi H, Murakami Y, Pan ZQ, Hanaoka F. (1998). Mapping of the human genes encoding cyclin H (CCNH) and the CDK-activating kinase (CAK) assembly factor MAT1 (MNAT1) to chromosome bands 5q13.3-q14 and 14q23, respectively. *Genomics* **47**: 115-20.

- Espinoza CR, Schmitt TL, Loos U. (2001). Thyroid transcription factor 1 and Pax8 synergistically activate the promoter of the human thyroglobulin gene. *J Mol Endocrinol* **27**: 59-67.
- Eszlinger M, Krohn K, Berger K, Lauter J, Kropf S, Beck M, Fuhrer D, Paschke R. (2005). Gene expression analysis reveals evidence for increased expression of cell cycle-associated genes and Gq-protein-protein kinase C signaling in cold thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 1163-70.
- Eszlinger M, Krohn K, Frenzel R, Kropf S, Tonjes A, Paschke R. (2004). Gene expression analysis reveals evidence for inactivation of the TGF-beta signaling cascade in autonomously functioning thyroid nodules. *Oncogene* **23**: 795-804.
- Ezzat S, Zheng L, Kolenda J, Safarian A, Freeman JL, Asa SL. (1996). Prevalence of activating ras mutations in morphologically characterized thyroid nodules. *Thyroid* **6**: 409-16.
- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. (1993). High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* **91**: 179-84.
- Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey TJ, 3rd. (2004). Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3214-23.
- Ford BN, Ruttan CC, Kyle VL, Brackley ME, Glickman BW. (2000). Identification of single nucleotide polymorphisms in human DNA repair genes. *Carcinogenesis* **21**: 1977-81.
- Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN. (2005). Management of thyroid nodules detected at US: Society of Radiologists in Ultrasound consensus conference statement. *Radiology* **237**: 794-800.
- Frattini M, Ferrario C, Bressan P, Balestra D, De Cecco L, Mondellini P, Bongarzone I, Collini P, Gariboldi M, Pilotti S, Pierotti MA, Greco A. (2004). Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* **23**: 7436-40.
- Fugazzola L, Pierotti MA, Vigano E, Pacini F, Vorontsova TV, Bongarzone I. (1996). Molecular and biochemical analysis of RET/PTC4, a novel oncogenic rearrangement between RET and ELE1 genes, in a post-Chernobyl papillary thyroid cancer. *Oncogene* **13**: 1093-7.
- Fujimoto Y, Obara T, Ito Y, Kodama T, Aiba M, Yamaguchi K. (1990). Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. Clinical importance, surgical treatment, and follow-up study. *Cancer* **66**: 2306-12.
- Garcia-Rostan G, Tallini G, Herrero A, D'Aquila TG, Carcangiu ML, Rimm DL. (1999). Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res* **59**: 1811-5.
- Ge B, Xiong X, Jing Q, Mosley JL, Filose A, Bian D, Huang S, Han J. (2003). TAB1beta (transforming growth factor-beta-activated protein kinase 1-binding protein 1beta), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38alpha but not TAK1. *J Biol Chem* **278**: 2286-93.
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80.
- Gimm O, Perren A, Weng LP, Marsh DJ, Yeh JJ, Ziebold U, Gil E, Hinze R, Delbridge L, Lees JA, Mutter GL, Robinson BG, Komminoth P, Dralle H, Eng C. (2000). Differential nuclear and cytoplasmic expression of PTEN in normal thyroid tissue, and benign and malignant epithelial thyroid tumors. *Am J Pathol* **156**: 1693-700.
- Giordano TJ, Kuick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, Zhu Z, Ciampi R, Roh M, Shedden K, Gauger P, Doherty G, Thompson NW, Hanash S, Koenig RJ, Nikiforov YE. (2005). Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation-specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene* **24**: 6646-56.
- Giuffrida D, Gharib H. (2000). Anaplastic thyroid carcinoma: current diagnosis and treatment. *Ann Oncol* **11**: 1083-9.
- Giuffrida D, Gharib H. (2001). Cardiac metastasis from primary anaplastic thyroid carcinoma: report of three cases and a review of the literature. *Endocr Relat Cancer* **8**: 71-3.
- Glinsky GV. (2006). Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway. *Cell Cycle* **5**: 1208-16.
- Goto M, Miller RW, Ishikawa Y, Sugano H. (1996). Excess of rare cancers in Werner syndrome (adult progeria). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**: 239-46.
- Gottlieb JA, Hill CS, Jr. (1974). Chemotherapy of thyroid cancer with adriamycin. Experience with 30 patients. *N Engl J Med* **290**: 193-7.
- Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, Groshen S, Singer P, Lopresti J, Martin SE. (2000). Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer* **90**: 335-41.
- Greco A, Mariani C, Miranda C, Lupas A, Pagliardini S, Pomati M, Pierotti MA. (1995). The DNA rearrangement that generates the TRK-T3 oncogene involves a novel gene on chromosome 3 whose product has a potential coiled-coil domain. *Mol Cell Biol* **15**: 6118-27.
- Grieco M, Cerrato A, Santoro M, Fusco A, Melillo RM, Vecchio G. (1994). Cloning and characterization of H4 (D10S170), a gene involved in RET rearrangements in vivo. *Oncogene* **9**: 2531-5.
- Grunert S, Jechlinger M, Beug H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 657-65.

- Guarino V, Faviana P, Salvatore G, Castellone MD, Cirafici AM, De Falco V, Celetti A, Giannini R, Basolo F, Melillo RM, Santoro M. (2005). Osteopontin is overexpressed in human papillary thyroid carcinomas and enhances thyroid carcinoma cell invasiveness. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 5270-8.
- Haigh PI, Ituarte PH, Wu HS, Treseler PA, Posner MD, Quivey JM, Duh QY, Clark OH. (2001). Completely resected anaplastic thyroid carcinoma combined with adjuvant chemotherapy and irradiation is associated with prolonged survival. *Cancer* **91**: 2335-42.
- Harach HR, Soubeyran I, Brown A, Bonneau D, Longy M. (1999). Thyroid pathologic findings in patients with Cowden disease. *Ann Diagn Pathol* **3**: 331-40.
- Hassan I, Wunderlich A, Burchert A, Hoffmann S, Zielke A. (2006). Antisense p53 oligonucleotides inhibit proliferation and induce chemosensitivity in follicular thyroid cancer cells. *Anticancer Res* **26**: 1171-6.
- Hawk WA, Hazard JB. (1976). The many appearances of papillary carcinoma of the thyroid. *Cleve Clin Q* **43**: 207-15.
- Herrero J, Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Mateos A, Vaquerizas JM, Santoyo J, Dopazo J. (2003). GEPAS: A web-based resource for microarray gene expression data analysis. *Nucleic Acids Res* **31**: 3461-7.
- Herrero J, Valencia A, Dopazo J. (2001). A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* **17**: 126-36.
- Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, Wang Y, Trink A, El-Naggar AK, Tallini G, Vasko V, Xing M. (2007). Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 1161-70.
- Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF, Bild A, Iversen ES, Liao M, Chen CM, West M, Nevins JR, Huang AT. (2003). Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* **361**: 1590-6.
- Huang Y, Prasad M, Lemon WJ, Hampel H, Wright FA, Kornacker K, LiVolsi V, Frankel W, Kloos RT, Eng C, Pellegata NS, de la Chapelle A. (2001). Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15044-9.
- Ishikawa Y, Sugano H, Matsumoto T, Furuichi Y, Miller RW, Goto M. (1999). Unusual features of thyroid carcinomas in Japanese patients with Werner syndrome and possible genotype-phenotype relations to cell type and race. *Cancer* **85**: 1345-52.
- Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kakudo K, Kuma K, Miyauchi A. (2005a). HBME-1 expression in follicular tumor of the thyroid: an investigation of whether it can be used as a marker to diagnose follicular carcinoma. *Anticancer Res* **25**: 179-82.
- Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Miyauchi A. (2005b). Telomerase activity in thyroid neoplasms evaluated by the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Anticancer Res* **25**: 509-14.
- Jain M, Khan A, Patwardhan N, Reale F, Safran M. (2001). Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a comparative study of histopathologic features and cytology results in 141 patients. *Endocr Pract* **7**: 79-84.
- Jarzab B, Wiench M, Fujarewicz K, Simek K, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, Wloch J, Czarniecka A, Chmielik E, Lange D, Pawlaczek A, Szpak S, Gubala E, Swierniak A. (2005). Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* **65**: 1587-97.
- Jazaeri AA, Yee CJ, Sotiriou C, Brantley KR, Boyd J, Liu ET. (2002). Gene expression profiles of BRCA1-linked, BRCA2-linked, and sporadic ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* **94**: 990-1000.
- Jpenberg AI, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. (1997). Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* **272**: 20108-17.
- Junor EJ, Paul J, Reed NS. (1992). Anaplastic thyroid carcinoma: 91 patients treated by surgery and radiotherapy. *Eur J Surg Oncol* **18**: 83-8.
- Karga H, Lee JK, Vickery AL, Jr., Thor A, Gaz RD, Jameson JL. (1991). Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* **73**: 832-6.
- Kato Y, Ying H, Zhao L, Furuya F, Araki O, Willingham MC, Cheng SY. (2006). PPARgamma insufficiency promotes follicular thyroid carcinogenesis via activation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Oncogene* **25**: 2736-47.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, McMillan A. (2006). Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms. *Cancer* **106**: 2592-7.
- Kfir S, Ehrlich M, Goldshmid A, Liu X, Kloog Y, Henis YI. (2005). Pathway- and expression level-dependent effects of oncogenic N-Ras: p27(Kip1) mislocalization by the Ral-GEF pathway and Erk-mediated interference with Smad signaling. *Mol Cell Biol* **25**: 8239-50.
- Kim KH, Kim SH, Back JH, Park MJ, Kim JM. (2006). Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in thyroid neoplasms and their clinicopathological correlation. *J Korean Med Sci* **21**: 1064-9.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **63**: 1454-7.
- Kitamura Y, Shimizu K, Ito K, Tanaka S, Emi M. (2001). Allelotyping of follicular thyroid carcinoma: frequent allelic losses in chromosome arms 7q, 11p, and 22q. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4268-72.

- Klugbauer S, Jauch A, Lengfelder E, Demidchik E, Rabes HM. (2000). A novel type of RET rearrangement (PTC8) in childhood papillary thyroid carcinomas and characterization of the involved gene (RFG8). *Cancer Res* **60**: 7028-32.
- Klugbauer S, Rabes HM. (1999). The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* **18**: 4388-93.
- Knauf JA, Ma X, Smith EP, Zhang L, Mitsutake N, Liao XH, Refetoff S, Nikiforov YE, Fagin JA. (2005). Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res* **65**: 4238-45.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. (2000). PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science* **289**: 1357-60.
- Lai ML, Faa G, Serra S, Senes G, Daniele GM, Boi F, Mariotti S, Beauchemin M, Asa SL. (2005). Rhabdoid tumor of the thyroid gland: a variant of anaplastic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* **129**: e55-7.
- Lam AK, Lo CY. (2006). Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: a 35-year comparative study at a single institution. *Ann Surg Oncol* **13**: 176-81.
- Lam KY, Lo CY, Chan KW, Wan KY. (2000). Insular and anaplastic carcinoma of the thyroid: a 45-year comparative study at a single institution and a review of the significance of p53 and p21. *Ann Surg* **231**: 329-38.
- Lee S, Hong SW, Shin SJ, Kim YM, Rhee Y, Jeon BI, Moon WC, Oh MR, Lim SK. (2004). Papillary thyroid carcinoma associated with familial adenomatous polyposis: molecular analysis of pathogenesis in a family and review of the literature. *Endocr J* **51**: 317-23.
- Li M, Zhou JY, Ge Y, Matherly LH, Wu GS. (2003). The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *J Biol Chem* **278**: 41059-68.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**: 837-47.
- Liu X, Sun Y, Ehrlich M, Lu T, Kloog Y, Weinberg RA, Lodish HF, Henis YI. (2000). Disruption of TGF-beta growth inhibition by oncogenic ras is linked to p27Kip1 mislocalization. *Oncogene* **19**: 5926-35.
- Lo CY, Lam KY, Wan KY. (1999). Anaplastic carcinoma of the thyroid. *Am J Surg* **177**: 337-9.
- Loh KC. (1997). Familial nonmedullary thyroid carcinoma: a meta-review of case series. *Thyroid* **7**: 107-13.
- Lui WO, Foukakis T, Liden J, Thoppe SR, Dwight T, Hoog A, Zedenius J, Wallin G, Reimers M, Larsson C. (2005). Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPAR(gamma) fusion oncogene. *Oncogene* **24**: 1467-76.
- Lupi C, Giannini R, Ugolini C, Proietti A, Berti P, Minuto M, Materazzi G, Elisei R, Santoro M, Miccoli P, Basolo F. (2007). Association of BRAF V600E mutation with poor clinicopathological outcomes in 500 consecutive cases of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **92**: 4085-90.
- Mai KT, Ford JC, Yazdi HM, Perkins DG, Commons AS. (2000). Immunohistochemical study of papillary thyroid carcinoma and possible papillary thyroid carcinoma-related benign thyroid nodules. *Pathol Res Pract* **196**: 533-40.
- Malaguarnera R, Vella V, Vigneri R, Frasca F. (2007). p53 family proteins in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* **14**: 43-60.
- Manenti G, Pilotti S, Re FC, Della Porta G, Pierotti MA. (1994). Selective activation of ras oncogenes in follicular and undifferentiated thyroid carcinomas. *Eur J Cancer* **30A**: 987-93.
- Manie S, Santoro M, Fusco A, Billaud M. (2001). The RET receptor: function in development and dysfunction in congenital malformation. *Trends Genet* **17**: 580-9.
- Marincola FM, Wang E, Herlyn M, Seliger B, Ferrone S. (2003). Tumors as elusive targets of T-cell-based active immunotherapy. *Trends Immunol* **24**: 335-42.
- Marques AR, Espadilha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. (2002). Expression of PAX8-PPAR gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 3947-52.
- Massague J, Gomis RR. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett* **580**: 2811-20.
- Mazzaferrri EL, Jhiang SM. (1994). Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* **97**: 418-28.
- Mazzaferrri EL, Kloos RT. (2001). Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1447-63.
- Mazzanti C, Zeiger MA, Costouros NG, Umbricht C, Westra WH, Smith D, Somervell H, Bevilacqua G, Alexander HR, Libutti SK. (2004). Using gene expression profiling to differentiate benign versus malignant thyroid tumors. *Cancer Res* **64**: 2898-903.
- Medina I, Montaner D, Tarraga J, Dopazo J. (2007). Prophet, a web-based tool for class prediction using microarray data. *Bioinformatics* **23**: 390-1.
- Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruhoffer M, Orntoft T, Fusco A, Santoro M. (2005). The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest* **115**: 1068-81.
- Miettinen M, Karkkainen P. (1996). Differential reactivity of HBME-1 and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours. Preferential reactivity with malignant tumours. *Virchows Arch* **429**: 213-9.
- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccarini M. (2001). Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *Embo J* **20**: 1952-62.

- Mills LJ, Poller DN, Yiangou C. (2005). Galectin-3 is not useful in thyroid FNA. *Cytopathology* **16**: 132-8.
- Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L, Minguez P, Vera J, Mukherjee S, Valls J, Pujana MA, Alloza E, Herrero J, Al-Shahrour F, Dopazo J. (2006). Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* **34**: W486-91.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstrale M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**: 267-73.
- Mora J, Lerma E. (2004). Telomerase activity in thyroid fine needle aspirates. *Acta Cytol* **48**: 818-24.
- Motti ML, Califano D, Baldassarre G, Celetti A, Merolla F, Forzati F, Napolitano M, Tavernise B, Fusco A, Viglietto G. (2005). Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas. *Carcinogenesis* **26**: 1021-34.
- Muresan MM, Olivier P, Leclere J, Sirveaux F, Brunaud L, Klein M, Zarnegar R, Weryha G. (2008). Bone metastases from differentiated thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **15**: 37-49.
- Murray-Zmijewski F, Lane DP, Bourdon JC. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* **13**: 962-72.
- Nakamura Y, Nishisho I, Kinzler KW, Vogelstein B, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Nagase H. (1991). Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in familial polyposis coli patients and sporadic colorectal tumors. *Princess Takamatsu Symp* **22**: 285-92.
- Nakata T, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M. (1999). Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **25**: 97-103.
- Nardone HC, Ziober AF, LiVolsi VA, Mandel SJ, Baloch ZW, Weber RS, Mick R, Ziober BL. (2003). c-Met expression in tall cell variant papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer* **98**: 1386-93.
- Natali PG, Nicotra MR, Bigotti A, Ventura I, Marcenaro L, Giacomini P, Russo C. (1989). Selective changes in expression of HLA class I polymorphic determinants in human solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6719-23.
- Nikiforov YE, Koshoffer A, Nikiforova M, Stringer J, Fagin JA. (1999). Chromosomal breakpoint positions suggest a direct role for radiation in inducing illegitimate recombination between the ELE1 and RET genes in radiation-induced thyroid carcinomas. *Oncogene* **18**: 6330-4.
- Nikiforov YE, Rowland JM, Bove KE, Monforte-Munoz H, Fagin JA. (1997). Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* **57**: 1690-4.
- Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, Kroll TG, Nikiforov YE. (2002). PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* **26**: 1016-23.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 5399-404.
- Nishida T, Katayama S, Tsujimoto M, Nakamura J, Matsuda H. (1999). Clinicopathological significance of poorly differentiated thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* **23**: 205-11.
- Oertel YC, Oertel JE. (2000). Thyroid cytology and histology. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **14**: 541-57.
- Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R. (1999). The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol* **19**: 2051-60.
- Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**: 607-14.
- Onda M, Emi M, Yoshida A, Miyamoto S, Akaishi J, Asaka S, Mizutani K, Shimizu K, Nagahama M, Ito K, Tanaka T, Tsunoda T. (2004). Comprehensive gene expression profiling of anaplastic thyroid cancers with cDNA microarray of 25 344 genes. *Endocr Relat Cancer* **11**: 843-54.
- Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **307**: 1603-9.
- Pacini F, Schlumberger M, Dralle H, Elisei R, Smit JW, Wiersinga W. (2006). European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium. *Eur J Endocrinol* **154**: 787-803.
- Pagedar NA, Chen DH, Wasman JK, Savvides P, Schluchter MD, Wilhelm SM, Lavertu P. (2008). Molecular Classification of Thyroid Nodules by Cytology. *Laryngoscope* **118**: 692-696.
- Pak Y, Pham N, Rotin D. (2002). Direct binding of the beta1 adrenergic receptor to the cyclic AMP-dependent guanine nucleotide exchange factor CNrasGEF leads to Ras activation. *Mol Cell Biol* **22**: 7942-52.
- Pallante P, Berlingieri MT, Troncone G, Kruhoffer M, Orntoft TF, Viglietto G, Caleo A, Migliaccio I, Decaussin-Petrucci M, Santoro M, Palombini L, Fusco A. (2005). Ubch10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* **93**: 464-71.

- Papini E, Guglielmi R, Bianchini A, Crescenzi A, Taccogna S, Nardi F, Panunzi C, Rinaldi R, Toscano V, Pacella CM. (2002). Risk of malignancy in nonpalpable thyroid nodules: predictive value of ultrasound and color-Doppler features. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 1941-6.
- Patel KN, Shaha AR. (2006). Poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer. *Cancer Control* **13**: 119-28.
- Pavey S, Johansson P, Packer L, Taylor J, Stark M, Pollock PM, Walker GJ, Boyle GM, Harper U, Cozzi SJ, Hansen K, Yudit L, Schmidt C, Hersey P, Ellem KA, O'Rourke MG, Parsons PG, Meltzer P, Ringner M, Hayward NK. (2004). Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature. *Oncogene* **23**: 4060-7.
- Peyssonnaud C, Eychene A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* **93**: 53-62.
- Pierotti MA. (2001). Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: a recombination or death dilemma. *Cancer Lett* **166**: 1-7.
- Pierotti MA, Bongarzone I, Borrello MG, Mariani C, Miranda C, Sozzi G, Greco A. (1995). Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *J Endocrinol Invest* **18**: 130-3.
- Pilotti S, Collini P, Mariani L, Placucci M, Bongarzone I, Vigneri P, Cipriani S, Falcetta F, Miceli R, Pierotti MA, Rilke F. (1997). Insular carcinoma: a distinct de novo entity among follicular carcinomas of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* **21**: 1466-73.
- Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. (2005). Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. *Mod Pathol* **18**: 48-57.
- Prasad ML, Pellegata NS, Kloos RT, Barbacioru C, Huang Y, de la Chapelle A. (2004). CITED1 protein expression suggests Papillary Thyroid Carcinoma in high throughput tissue microarray-based study. *Thyroid* **14**: 169-75.
- Puxeddu E, Zhao G, Stringer JR, Medvedovic M, Moretti S, Fagin JA. (2005). Characterization of novel non-clonal intrachromosomal rearrangements between the H4 and PTEN genes (H4/PTEN) in human thyroid cell lines and papillary thyroid cancer specimens. *Mutat Res* **570**: 17-32.
- Qi X, Pohl NM, Loesch M, Hou S, Li R, Qin JZ, Cuenda A, Chen G. (2007). p38alpha antagonizes p38gamma activity through c-Jun-dependent ubiquitin-proteasome pathways in regulating Ras transformation and stress response. *J Biol Chem* **282**: 31398-408.
- Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, Klugbauer S. (2000). Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res* **6**: 1093-103.
- Rabes HM, Klugbauer S. (1998). Molecular genetics of childhood papillary thyroid carcinomas after irradiation: high prevalence of RET rearrangement. *Recent Results Cancer Res* **154**: 248-64.
- Ravetto C, Colombo L, Dottorini ME. (2000). Usefulness of fine-needle aspiration in the diagnosis of thyroid carcinoma: a retrospective study in 37,895 patients. *Cancer* **90**: 357-63.
- Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, Qumsiyeh MB, Rothstein JL, Fusco A, Santoro M, Zitzelsberger H, Tallini G. (2006). RET/papillary thyroid cancer rearrangement in nonneoplastic thyrocytes: follicular cells of Hashimoto's thyroiditis share low-level recombination events with a subset of papillary carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 2414-23.
- Robbins RJ, Larson SM, Sinha N, Shaha A, Divgi C, Pentlow KS, Ghossein R, Tuttle RM. (2002). A retrospective review of the effectiveness of recombinant human TSH as a preparation for radioiodine thyroid remnant ablation. *J Nucl Med* **43**: 1482-8.
- Rocha AS, Soares P, Fonseca E, Cameselle-Teijeiro J, Oliveira MC, Sobrinho-Simoes M. (2003). E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology* **42**: 580-7.
- Rodrigo JP, Rinaldo A, Devaney KO, Shaha AR, Ferlito A. (2006). Molecular diagnostic methods in the diagnosis and follow-up of well-differentiated thyroid carcinoma. *Head Neck* **28**: 1032-9.
- Rozman C. *Tratado de Medicina Interna Farreras-Rozman*, 12a edn. Doyma: Barcelona.
- Ruter A, Dreifus J, Jones M, Nishiyama R, Lennquist S. (1996). Overexpression of p53 in tall cell variants of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* **120**: 1046-50.
- Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, Stambrook PJ, Fagin JA. (2000). The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene* **19**: 3948-54.
- Saenko V, Rogounovitch T, Shimizu-Yoshida Y, Abrosimov A, Lushnikov E, Roumiantsev P, Matsumoto N, Nakashima M, Meirmanov S, Ohtsuru A, Namba H, Tsyb A, Yamashita S. (2003). Novel tumorigenic rearrangement, Delta rfp/ret, in a papillary thyroid carcinoma from externally irradiated patient. *Mutat Res* **527**: 81-90.
- Saha D, Datta PK, Beauchamp RD. (2001). Oncogenic ras represses transforming growth factor-beta /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* **276**: 29531-7.
- Salassidis K, Bruch J, Zitzelsberger H, Lengfelder E, Kellerer AM, Bauchinger M. (2000). Translocation t(10;14)(q11.2;q22.1) fusing the kinetin to the RET gene creates a novel rearranged form (PTC8) of the RET proto-oncogene in radiation-induced childhood papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **60**: 2786-9.
- Sandrini F, Matyakhina L, Sarlis NJ, Kirschner LS, Farmakidis C, Gimm O, Stratakis CA. (2002). Regulatory subunit type I-alpha of protein kinase A (PRKAR1A): a tumor-suppressor gene for sporadic thyroid cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **35**: 182-92.

- Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Della Porta G, Berger N, et al. (1992). Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* **89**: 1517-22.
- Santoro M, Dathan NA, Berlingieri MT, Bongarzone I, Paulin C, Grieco M, Pierotti MA, Vecchio G, Fusco A. (1994). Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene* **9**: 509-16.
- Sargent R, LiVolsi V, Murphy J, Mantha G, Hunt JL. (2006). BRAF mutation is unusual in chronic lymphocytic thyroiditis-associated papillary thyroid carcinomas and absent in non-neoplastic nuclear atypia of thyroiditis. *Endocr Pathol* **17**: 235-41.
- Scala S, Portella G, Fedele M, Chiappetta G, Fusco A. (2000). Adenovirus-mediated suppression of HMGI(Y) protein synthesis as potential therapy of human malignant neoplasias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 4256-61.
- Scheuba C, Kaserer K, Weinhausl A, Pandev R, Kaider A, Passler C, Prager G, Vierhapper H, Haas OA, Niederle B. (1999). Is medullary thyroid cancer predictable? A prospective study of 86 patients with abnormal pentagastrin tests. *Surgery* **126**: 1089-95; discussion 1096.
- Schlumberger MJ. (1998). Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* **338**: 297-306.
- Schmitt TL, Espinoza CR, Loos U. (2001). Transcriptional regulation of the human sodium/iodide symporter gene by Pax8 and TTF-1. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109**: 27-31.
- Schneikert J, Grohmann A, Behrens J. (2007). Truncated APC regulates the transcriptional activity of beta-catenin in a cell cycle dependent manner. *Hum Mol Genet* **16**: 199-209.
- Sebesta J, Brown T, Williard W, Dehart MJ, Aldous W, Kavolius J, Azarow K. (2001). Does telomerase activity add to the value of fine needle aspirations in evaluating thyroid nodules? *Am J Surg* **181**: 420-2.
- Semba S, Kusumi R, Moriya T, Sasano H. (2000). Nuclear Accumulation of B-Catenin in Human Endocrine Tumors: Association with Ki-67 (MIB-1) Proliferative Activity. *Endocr Pathol* **11**: 243-250.
- Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ. (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* **3**: 377-86.
- Sheu SY, Schwertheim S, Worm K, Grabellus F, Schmid KW. (2007). Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma: lack of BRAF mutation but occurrence of RET/PTC rearrangements. *Mod Pathol* **20**: 779-87.
- Shi YF, Zou MJ, Schmidt H, Juhasz F, Stensky V, Robb D, Farid NR. (1991). High rates of ras codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res* **51**: 2690-3.
- Shibru D, Chung KW, Kebebew E. (2008). Recent developments in the clinical application of thyroid cancer biomarkers. *Curr Opin Oncol* **20**: 13-8.
- Shimaoka K, Schoenfeld DA, DeWys WD, Creech RH, DeConti R. (1985). A randomized trial of doxorubicin versus doxorubicin plus cisplatin in patients with advanced thyroid carcinoma. *Cancer* **56**: 2155-60.
- Siegel PM, Massague J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 807-21.
- Slettenaar VI, Wilson JL. (2006). The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv Drug Deliv Rev* **58**: 962-74.
- Soares P, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simoes M. (1994). Immunohistochemical detection of p53 in differentiated, poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid. *Histopathology* **24**: 205-10.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Feijao T, Rebocho AP, Fonseca E, Vieira de Castro I, Cameselle-Teijeiro J, Cardoso-Oliveira M, Sobrinho-Simoes M. (2004). BRAF mutations typical of papillary thyroid carcinoma are more frequently detected in undifferentiated than in insular and insular-like poorly differentiated carcinomas. *Virchows Arch* **444**: 572-6.
- Sobrinho-Simoes M, Sambade C, Fonseca E, Soares P. (2002). Poorly differentiated carcinomas of the thyroid gland: a review of the clinicopathologic features of a series of 28 cases of a heterogeneous, clinically aggressive group of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* **10**: 123-31.
- Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V, Spalletti-Cernia D, Laccetti P, Linardopoulos S, Chieffi P, Fusco A, Portella G. (2005). Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 928-35.
- Sozzi G, Bongarzone I, Miozzo M, Borrello MG, Blutti MG, Pilotti S, Della Porta G, Pierotti MA. (1994). A t(10;17) translocation creates the RET/PTC2 chimeric transforming sequence in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **9**: 244-50.
- Stewart SA, Weinberg RA. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 531-57.
- Suarez HG, Du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Tubiana M, Parmentier C, Monier R. (1988). Detection of activated ras oncogenes in human thyroid carcinomas. *Oncogene* **2**: 403-6.
- Subramaniam MM, Putti TC, Anuar D, Chong PY, Shah N, Salto-Tellez M, Soong R. (2007). Clonal characterization of sporadic cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma by laser microdissection-based APC mutation analysis. *Am J Clin Pathol* **128**: 994-1001.
- Sywak M, Pasieka JL, Ogilvie T. (2004). A review of thyroid cancer with intermediate differentiation. *J Surg Oncol* **86**: 44-54.

- Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. (2007). The Wnt/beta-catenin signaling pathway as a target in drug discovery. *J Pharmacol Sci* **104**: 293-302.
- Tallini G, Asa SL. (2001). RET oncogene activation in papillary thyroid carcinoma. *Adv Anat Pathol* **8**: 345-54.
- Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, Carcangiu ML, Fusco A. (1998). RET/PTC oncogene activation defines a subset of papillary thyroid carcinomas lacking evidence of progression to poorly differentiated or undifferentiated tumor phenotypes. *Clin Cancer Res* **4**: 287-94.
- Tan YY, Kebebew E, Reiff E, Caron NR, Ogilvie JB, Duh QY, Clark OH, Ljung BM, Miller T. (2007). Does routine consultation of thyroid fine-needle aspiration cytology change surgical management? *J Am Coll Surg* **205**: 8-12.
- Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y. (2006). Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* **12**: 3716-22.
- Trovato M, Fraggetta F, Villari D, Batolo D, Mackey K, Trimarchi F, Benvenga S. (1999). Loss of heterozygosity of the long arm of chromosome 7 in follicular and anaplastic thyroid cancer, but not in papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 3235-40.
- Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Maximo V, Silva P, Magalhaes J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simoes M. (2004). BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* **202**: 247-51.
- Ueda Y, Shimizu K, Itoh T, Fuji N, Naito K, Shiozaki A, Yamamoto Y, Shimizu T, Iwamoto A, Tamai H, Yamagishi H. (2007). Induction of peptide-specific immune response in patients with primary malignant melanoma of the esophagus after immunotherapy using dendritic cells pulsed with MAGE peptides. *Jpn J Clin Oncol* **37**: 140-5.
- Us-Krasovec M, Golouh R, Auersperg M, Besic N, Ruparcic-Oblak L. (1996). Anaplastic thyroid carcinoma in fine needle aspirates. *Acta Cytol* **40**: 953-8.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* **347**: 1999-2009.
- Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S, Larin A, Savchenko V, Francis GL, de la Chapelle A, Saji M, Ringel MD. (2007). Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2803-8.
- Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Samaan NA. (1990). Anaplastic carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* **66**: 321-30.
- Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G. (2001). Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 234-8.
- Vini L, Harmer C. (2002). Management of thyroid cancer. *Lancet Oncol* **3**: 407-14.
- Voigt C, Holzapfel H, Paschke R. (2000). Expression of beta-arrestins in toxic and cold thyroid nodules. *FEBS Lett* **486**: 208-12.
- von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, Jouffre N, Huynen MA, Bork P. (2005). STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res* **33**: D433-7.
- Waite KA, Eng C. (2002). Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* **70**: 829-44.
- Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, Schuppert F, Broelsch CE, Ringel MD, Eng C. (2005). Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 2512-21.
- Willert K, Jones KA. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* **20**: 1394-404.
- Williams PL, Warwick R, Dyson M, Bannister LH. *GRAY. Anatomia.*, 37 edn. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro.
- Williams SD, Birch R, Einhorn LH. (1986). Phase II evaluation of doxorubicin plus cisplatin in advanced thyroid cancer: a Southeastern Cancer Study Group Trial. *Cancer Treat Rep* **70**: 405-7.
- Wojnowski L, Stancato LF, Lerner AC, Rapp UR, Zimmer A. (2000). Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* **91**: 97-104.
- Wreesmann VB, Ghossein RA, Hezel M, Banerjee D, Shaha AR, Tuttle RM, Shah JP, Rao PH, Singh B. (2004). Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: genome-wide appraisal of a controversial entity. *Genes Chromosomes Cancer* **40**: 355-64.
- Wreesmann VB, Ghossein RA, Patel SG, Harris CP, Schnaser EA, Shaha AR, Tuttle RM, Shah JP, Rao PH, Singh B. (2002). Genome-wide appraisal of thyroid cancer progression. *Am J Pathol* **161**: 1549-56.
- Xing M. (2007). BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* **28**: 742-62.
- Xing M, Westra WH, Tufano RP, Cohen Y, Rosenbaum E, Rhoden KJ, Carson KA, Vasko V, Larin A, Tallini G, Tolaney S, Holt EH, Hui P, Umbricht CB, Basaria S, Ewertz M, Tufano AP, Califano JA, Ringel MD, Zeiger MA, Sidransky D, Ladenson PW. (2005). BRAF mutation predicts a poorer clinical prognosis for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 6373-9.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**: 927-39.

- Yano Y, Uematsu N, Yashiro T, Hara H, Ueno E, Miwa M, Tsujimoto G, Aiyoshi Y, Uchida K. (2004). Gene expression profiling identifies platelet-derived growth factor as a diagnostic molecular marker for papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 2035-43.
- Yeh MW, Demircan O, Ituarte P, Clark OH. (2004). False-negative fine-needle aspiration cytology results delay treatment and adversely affect outcome in patients with thyroid carcinoma. *Thyroid* **14**: 207-15.
- Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. *Wheater's ' Functional Histology -A Text and Colour Atlas.*, 5th edn. Churchill Livingstone.
- Zavadil J, Bottinger EP. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**: 5764-74.
- Zhang JS, Nelson M, McIver B, Hay ID, Goellner JR, Grant CS, Eberhardt NL, Smith DI. (1998). Differential loss of heterozygosity at 7q31.2 in follicular and papillary thyroid tumors. *Oncogene* **17**: 789-93.
- Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. (2003). Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* **120**: 71-7.
- Zidan J, Karen D, Stein M, Rosenblatt E, Basher W, Kuten A. (2003). Pure versus follicular variant of papillary thyroid carcinoma: clinical features, prognostic factors, treatment, and survival. *Cancer* **97**: 1181-5.
- Zou M, Al-Baradie RS, Al-Hindi H, Farid NR, Shi Y. (2005). S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* **93**: 1277-84.

8 PUBLICACIONES
RELACIONADAS CON LA TESIS

Premio **GENZYME 2008 SOBRE CÁNCER DE TIROIDES** de la **FUNDACION SEEN** (Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición) para el trabajo: "MOLECULAR PROFILING RELATED TO POOR PROGNOSIS IN THYROID CARCINOMA. COMBINING GENE EXPRESSION DATA AND BIOLOGICAL INFORMATION. ONCOGENE 27:1554-1561, 2008".

MENCIÓN DE HONOR en la Cuarta Edición del **PREMIO SERGIO VIDAL** para investigadores jóvenes en biomedicina por la excelencia del trabajo "MOLECULAR PROFILING RELATED TO POOR PROGNOSIS IN THYROID CARCINOMA. COMBINING GENE EXPRESSION DATA AND BIOLOGICAL INFORMATION. ONCOGENE 27:1554-1561, 2008".

ORIGINAL ARTICLE

Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information

C Montero-Conde¹, JM Martín-Campos^{2,3}, E Lerma⁴, G Gimenez⁵, JL Martínez-Guitarte⁶, N Combalía⁷, D Montaner⁸, X Matías-Guiu⁶, J Dopazo^{8,9,10}, A de Leiva^{11,12}, M Robledo^{1,9} and D Mauricio^{11,13}

¹Hereditary Endocrine Cancer Research Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid, Spain; ²Research Institute, Santa Creu and Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain; ³Biochemistry and Molecular Biology Department, Autonomous University of Barcelona (UAB), Barcelona, Spain; ⁴Pathology Service, Santa Creu and Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain; ⁵Endocrinology Unit, Hospital of Sabadell, Spain; ⁶Department of Pathology and Molecular Genetics, Arnau de Vilanova Hospital (IRBLLEIDA), Lleida, Spain; ⁷Pathology Service, Hospital of Sabadell, Spain; ⁸Bioinformatics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain; ⁹ISCIII Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Spain; ¹⁰Functional Genomics Node INB, Spain; ¹¹Department of Endocrinology and Nutrition, Santa Creu and Sant Pau Hospital, Barcelona, Spain; ¹²ISCIII CIBER-BBN, Spain and ¹³Department of Endocrinology, Arnau de Vilanova Hospital (IRBLLEIDA), Lleida, Spain

Undifferentiated and poorly differentiated thyroid tumors are responsible for more than half of thyroid cancer patient deaths in spite of their low incidence. Conventional treatments do not obtain substantial benefits, and the lack of alternative approaches limits patient survival. Additionally, the absence of prognostic markers for well-differentiated tumors complicates patient-specific treatments and favors the progression of recurrent forms. In order to recognize the molecular basis involved in tumor dedifferentiation and identify potential markers for thyroid cancer prognosis prediction, we analysed the expression profile of 44 thyroid primary tumors with different degrees of dedifferentiation and aggressiveness using cDNA microarrays. Transcriptome comparison of dedifferentiated and well-differentiated thyroid tumors identified 1031 genes with >2-fold difference in absolute values and false discovery rate of <0.15. According to known molecular interaction and reaction networks, the products of these genes were mainly clustered in the MAPkinase signaling pathway, the TGF- β signaling pathway, focal adhesion and cell motility, activation of actin polymerization and cell cycle. An exhaustive search in several databases allowed us to identify various members of the matrix metalloproteinase, melanoma antigen A and collagen gene families within the upregulated gene set. We also identified a prognosis classifier comprising just 30 transcripts with an overall accuracy of 95%. These findings may clarify the molecular mechanisms involved in thyroid tumor dedifferentiation and provide a potential prognosis predictor as well as targets for new therapies.

Oncogene advance online publication, 17 September 2007;
doi:10.1038/sj.onc.1210792

Keywords: anaplastic thyroid cancer; functional profile; molecular signature

Introduction

Approximately 122 000 new cases of thyroid carcinoma are diagnosed each year worldwide, and more than 90% have a follicular cell origin. Malignant tumors of thyroid follicular cells have been classified either as well-differentiated thyroid carcinoma (WDTC), which is composed of papillary and follicular thyroid carcinoma (PTC and FTC, respectively), or as undifferentiated/anaplastic thyroid carcinoma (ATC). The majority of WDTC are indolent malignancies with a 10-year survival of up to 90% (Randolph and Daniels, 2002). In contrast, ATC is one of the most aggressive human malignancies. Despite its low frequency (<5% of all thyroid carcinomas), ATC is responsible for more than half of thyroid carcinoma deaths, with a mean survival of 6 months after diagnosis (Ain, 1999). However, several studies (Sakamoto *et al.*, 1983; Sobrinho-Simoes *et al.*, 2002) confirm the existence of a class of tumors intermediate between WDTC and ATC, namely poorly differentiated thyroid carcinomas (PDTC), which represent entities in progress from a pre-existing WDTC to ATC, often with a similar outcome as ATC.

Primary treatment of follicular cell-derived tumors, which has not substantially changed in recent decades, is mainly based on surgical treatment, ablative ¹³¹I treatment, and suppressive L-thyroxine administration (Vini and Harmer, 2002). Benefits obtained from

Correspondence: Dr M Robledo, Hereditary Endocrine Cancer Group Leader, Spanish National Cancer Centre, Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain and Dr D Mauricio, Department of Endocrinology, Arnau de Vilanova Hospital, Av. Alcalde Rovira Roure 80, E-25198 Lleida, Spain.

E-mails: mrobledo@cnio.es and dmauricio@arnau.scs.es

Received 9 May 2007; revised 13 July 2007; accepted 9 August 2007

chemotherapy and radiation therapy remain only marginal (Cooper *et al.*, 2006), and metastases, recurrent disease and poorly differentiated/anaplastic tumors still pose major challenges to clinicians. There is a lack of alternative treatments for tumors with a poor response to conventional treatment, or those with a poor degree of differentiation. We are thus in need of new approaches that may lead to improved disease management. Microarray analysis of gene-expression patterns has provided a way to identify molecular events related to specific tumor types and to specific cancer processes, such as metastasis, proliferation and angiogenesis (Glinsky, 2006). Numerous studies also have demonstrated its potential for the identification of molecular signatures associated with different clinical features (van de Vijver *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003), that could help identify novel targets for therapy.

In the present study, using one of the largest series of frozen thyroid carcinoma tumors published to date, we have carried out an extensive microarray analysis followed by an innovative bioinformatics approach, the GEPAS package (Montaner *et al.*, 2006; <http://www.gepas.org>), to process and interpret the results taking into account the clinical data. We have compared the gene-expression profiles, obtained using the CNIO Oncochip, of ATC and PDTC cases versus WDTC samples. We first selected the genes differentially expressed in ATC/PDTC versus FTC and ATC/PDTC versus PTC, as representing dedifferentiation and clinical aggressiveness features, and analysed their functional implications by identifying molecular pathways involved. We were able to define cellular processes important for malignant progression of thyroid cancer. Moreover, we found a prognosis signature that recognizes not only undifferentiated and poorly differentiated tumors, but also recurrent and metastatic WDTC. These results may provide new perspectives for diagnosis, treatment and design of new therapeutic strategies for thyroid carcinoma patients with poor prognosis.

Results

Differential gene expression related to tumor dedifferentiation

Genes found differentially expressed in the two pairwise comparisons ATC/PDTC versus FTC and ATC/PDTC versus PTC, were assumed to be functionally related to dedifferentiation and clinical aggressiveness. Genes differentially expressed in only one of the comparisons were supposed to be related to the specific etiology of each WDTC class.

Taking into account only transcripts common to both pairwise comparisons, 742 clones corresponding to 594 genes and 83 ESTs were overexpressed and 678 clones corresponding to 535 genes and 78 ESTs were underexpressed in the ATC/PDTC tumor set.

Functional profiling: pathways and gene families involved in malignancy progression in thyroid cancer

The FatiScan test for gene set enrichment analysis was applied to analyse the transcriptional profiles of ATC/PDTC versus WDTC. We observed a significant upregulation of the biological process 'cell cycle progression' (adjusted P -value < 0.05), and a downregulation of hormone biosynthesis, a thyroid-specific function (adjusted P -value < 0.05). 'Cell cycle progression' includes mitosis, DNA replication and repair, microtubule and actin-filament-based processes, and chromosome reorganization and biogenesis.

The additional analysis of gene biological function revealed gene enrichment in several pathways and KEGG terms. Interestingly, the MAPkinase signaling pathway, the TGF- β signaling pathway, 'focal adhesion and cell motility', and 'activation of actin polymerization' presented an overexpression of core genes for pathway activation and an underexpression for inhibitors of the same processes. Table 1 shows the differentially expressed genes (FDR < 0.15, > 2-fold) within these functional categories. We also found that some of the regulated genes with similar transcription

Table 1 Enriched KEGG pathways with over- and underexpressed genes (FDR-adjusted < 0.15 and differences in absolute values > 2-fold) in ATC/PDTC versus PTC and versus FTC

KEGG pathway term	Overexpressed genes	Underexpressed genes
MAPK signaling pathway	<i>AKT2, SOS1, FGFR1, MAPK12, ATF4, STMN1, MYC, ELK1, TGFB2, RAC1, HRAS, CRKL, ARRB2, MINK1, TGFB2, NRAS, MAP4K4, MKNK1, MAPK8IP1, CDC25B, MAP2K3, PRKCA</i> and <i>MAP3K8</i>	<i>PLA2G6, NF1, CASP2, DUSP14</i> and <i>CASP9</i>
Cell cycle	<i>MCM7, MAD2L1, CDK2, PKMYT1, HDAC2, ORC6L, CDKN2C, GSK3B, E2F2, MCM10, CCNA2, TGFB2, MCM6, CCNB2, BUB1, CCNE1, CDC25A, CDC6, CDC25B, MCM3, PRKDC</i> and <i>CDC2</i>	
Focal adhesion	<i>AKT2, TNK1, THBS1, SOS1, PARVG, GSK3B, LAMB1, ELK1, ZYX, ITGA5, RAC1, HRAS, CRKL, COL1A1, ACTN2, COL6A2, NRAS, ITGA11, COL6A3, PRKCA, SPP1, SHC1</i> and <i>PIK3CD</i>	<i>ARHGAP5, PPP1CA</i> and <i>PAK3</i>
Regulation of actin cytoskeleton	<i>ABI2, ARPC1B, MYH10, PFN1, SOS1, FGFR1, ARPC3, GNAI3, ITGA5, RAC1, HRAS, SSH1, CRKL, ACTN2, DIAPH3, NRAS, ITGA11, VIL1, F2R</i> and <i>PIK3CD</i>	<i>PPP1CA, AVIL</i> and <i>PAK3</i>
TGF- β signaling pathway	<i>GDF5, THBS1, MYC, FST, TGFB2, SMURF1, TGFB2, RBX1</i> and <i>IFNG</i>	<i>PPP2CB, ID1, SMAD7, ID2, BMPRIA, ZFYVE16</i> and <i>ID4</i>

Table 2 Main enriched gene families with over- and underexpressed genes (FDR-adjusted <0.15 and differences in absolute values >2-fold) in ATC/PDTC versus PTC and versus FTC. Gene family names are based on the Entrez Gene database and PubMed information

Gene family name	Gene symbol
<i>Gene families with overexpressed genes</i>	
Matrix metalloproteinase (MMP) family	<i>MMP1, MMP2, MMP10, MMP11, MMP19</i> and <i>MMP25</i>
Alpha, beta and gamma tubulin families	<i>TUBG2, TUBB5, TUBB, TUBA8, TUBA6, TUBA3</i> and <i>TUBA1</i>
E2 ubiquitin-conjugating enzyme family	<i>UBE2C, UBE2T, UBE2I, UBE2V2</i> and <i>UBE2V1</i>
Melanoma antigen family A	<i>MAGEA1, MAGEA2, MAGEA3, MAGEA4, MAGEA6, MAGEA8, MAGEA10</i> and <i>MAGEA11</i>
Transcription cyclin family	<i>CCNE1, CCNB2</i> and <i>CCNA2</i>
Centromere proteins	<i>CENPA, CENPB, CENPE</i> and <i>CENPF</i>
Laminin family of extracellular matrix glycoproteins	<i>LAMB1, LAMA3</i> and <i>LMNA</i> and the interaction mediator between laminin B and chromatin (<i>LBR</i>)
Collagen family	<i>COL12A1, COL6A3, COL6A2</i> and <i>COL1A1</i>
DEAD box protein family	<i>DDX11, DDX55, DDX39, DDX21</i> and <i>DDX10</i>
Chemokine family x	<i>CXCL10, CXCL11</i> and <i>CXCL3</i>
Actin-related proteins (ARPs)	<i>ACTRT1, ACTL7B, ARPC3</i> and <i>ARPC1B</i>
Transforming growth factor protein family	<i>TGFBR2, TGFB2, TBRG4</i> and <i>TGFB11</i>
Tumor necrosis factor receptor/ligand superfamily;	Receptors: <i>TNFRSF6B, TNFRSF19L</i> ; Ligand: <i>TNFSF7, TNFSF13B</i> and <i>TNFSF11</i>
NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase	<i>NEK2, NEK3</i> and <i>NEK6</i>
<i>Gene families with underexpressed genes</i>	
Protein phosphatase 2 family:	<i>PPP2R5C, PPP2R5A</i> and <i>PPP2CB</i>
Dominant-negative helix-loop-helix protein family:	<i>ID1, ID2</i> and <i>ID4</i>
Heat-shock protein family:	<i>DNAJC4, DNAJB5</i> and <i>DNAJB2</i> ,
Aldehyde dehydrogenases family of proteins:	<i>ALDH9A1, ALDH6A1, ALDH3A2</i> and <i>ALDH1A1</i>
Cadherin superfamily of integral membrane proteins that mediate calcium-dependent cell-cell adhesion:	<i>CDH1</i> and <i>CDH12</i>

patterns (significant over- or underexpression for ATC/PDTC) belonged to the same gene family (Table 2).

A predictor of clinical prognosis for WDTC

Using an SVM-learning algorithm and F-ratio gene selection method, the Prophet program defined a prediction classifier of only 30 transcripts (corresponding to 23 genes and 6 ESTs; Table 3) that generates the lowest unbiased cross-validation error (0.0455%) for this tumor series (Figure 1a).

A hierarchical unsupervised analysis (Figure 1b) using the set of genes selected by the predictor visually shows the discrimination among tumors with different clinical outcomes.

Validation of gene expression

Validation of microarray results was done in 2 ATC, 3 PDTC and 17 WDTC (3 FTC and 14 PTC), using predesigned TaqMan probes of four genes from the signature of the predictor: ubiquitin-conjugating enzyme E2C (*UBE2C*), effector cell peptidase receptor 1 (survivin, *BIRC5*), actin-binding protein (anilin, *ANLN*) and centromere protein A (*CENPA*). *BIRC5*, *CENPA*, *UBE2C* and *ANLN* showed a higher expression in ATC and PDTC cases. These results validated those obtained by using microarray technology.

Discussion

To date, only a few studies on ATC and PDTC have been published and, due to the difficulty to obtain tumor

samples, most of them use cell lines. In the present study, we have identified molecular processes significantly involved in the complex event of malignancy progression in thyroid cancer, using a large frozen tissue panel of human primary thyroid tumors in different dedifferentiation stages (7ATC, 6PDTC and 31WDTC). We were able to identify an original molecular prognosis signature of 30 transcripts by means of expression profiling and new high accuracy bioinformatics tools able to solve common limits of multiple testing analysis and a relatively small sample size.

Expression and functional profiling highlight the molecular basis of the dedifferentiation process

A significant upregulation of 'Cell cycle progression' was found by the functional profiling of ATC/PDTC comparisons, as expected for these aggressive tumors. In addition, the analysis related to the dedifferentiation process confirmed over- and underexpression of genes previously described to indicate poor prognosis for thyroid tumors (Rocha *et al.*, 2003; Onda *et al.*, 2004; Motti *et al.*, 2005; Pallante *et al.*, 2005; Sorrentino *et al.*, 2005; Zou *et al.*, 2005; Table 4).

Moreover, our transcriptional profile correlate with poor prognosis features previously described for different types of malignant tumors (Glinsky, 2006) such as the increased expression of members of the inhibitor of apoptosis protein family (*BIRC5*), activation of mitotic spindle checkpoint proteins (*BUB1, BUB3, KNTC2, MAD2 (MAD2L1), PLK4* and *AURORA A (STK6)*) and high levels of cell cycle control/marker proteins (*CCNB2, CCNA2* and *CDC2*).

Table 3 Twenty-three genes included in the signature that predict poor prognosis

Gene symbol	Gene description	Chr	Start (bp)	End (bp)	Strand	Fold change PPTC/NPPTC	FDR-adjusted
<i>ANLN</i>	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, <i>Drosophila</i>)	7	36202672	36266638	1	5.85	9.58E-05
<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	17	73721944	73732372	1	6.00	7.03E-05
<i>UBE2C</i>	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C	20	43874662	43879001	1	8.08	1.94E-06
<i>CENPA</i>	Centromere protein A, 17 kDa	2	26898803	26935583	1	5.98	7.25E-05
<i>CCNB2</i>	Cyclin B2	15	57184612	57204535	1	6.74	1.35E-05
<i>PRC1</i>	Protein regulator of cytokinesis 1	15	89310279	89338808	-1	6.75	1.35E-05
<i>NUSAP1</i>	Nucleolar and spindle-associated protein 1	15	39412380	39460535	1	5.78	1.09E-04
<i>ASPM</i>	Asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (<i>Drosophila</i>)	1	193785111	193847224	-1	7.54	3.89E-06
<i>D2S448</i>	Interleukin 1 receptor antagonist	2	1605957	1718575	-1	7.10	8.04E-06
<i>DIAPH3</i>	Diaphanous homolog 3 (<i>Drosophila</i>)	13	59246299	59636042	-1	6.18	4.88E-05
<i>RRM2</i>	Ribonucleotide reductase M2 polypeptide	2	10213331	10221218	1	5.73	1.15E-04
<i>C10orf3</i>	Chromosome 10 open reading frame 3. CEP55, centrosomal protein 55 kDa	10	95246386	95278837	1	5.80	1.06E-04
<i>SIAH1</i>	Seven in absentia homolog 1	16	46951950	46976717	-1	-6.64	1.76E-05
<i>SH3BGR12</i>	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	6	80397719	80470088	1	-6.15	5.15E-05
<i>C6orf209</i>	Chromosome 6 open reading frame 209	6	70442472	70563609	-1	-8.06	1.94E-06
<i>SDK2</i>	Sidekick homolog 2 (chicken)	17	68842119	68945808	-1	-6.98	8.50E-06
<i>APLP2</i>	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	11	129445011	129519910	1	-7.08	8.04E-06
<i>PTPRN2</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2	7	156831227	157879837	-1	-7.69	2.92E-06
<i>NCRM5</i>	Non-coding RNA in rhabdomyosarcoma (RMS)	12	96382930	96482924	1	-6.03	6.60E-05
<i>C7orf23</i>	Chromosome 7 open reading frame 23	7	86470131	86493682	-1	-7.42	4.67E-06
<i>PDK2</i>	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2. The reference sequence status is provisional	17	45527695	45543421	1	-6.38	3.13E-05
<i>ORMDL3</i>	ORM1-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	17	35330822	35337380	-1	-7.05	8.04E-06
<i>PPAP2B</i>	Phosphatidic acid phosphatase type 2B	1	56671960	56757154	-1	-6.77	1.35E-05

Abbreviations: Chr, chromosome; NPPTC, non-poor prognosis thyroid carcinoma; PPTC, poor prognosis thyroid carcinoma.

Finally, we found that our ATC/PDTC series had a deregulation of critical genes for thyroid hormone synthesis, such as the overexpression of *ARRB2* (β -arrestin 2; Voigt *et al.*, 2000), which is implicated in the desensitization of thyroid-stimulating hormone receptors (TSHR), the underexpression of *RAB5A*, which participates in the thyroglobulin production (TG; Croizet-Berger *et al.*, 2002), and a diminished expression of *TG* and *PAX8*, which has also been observed before in ATC/PDTC series (Onda *et al.*, 2004). Furthermore, the expression of *HHEX*, a gene related to thyroid morphogenesis and differentiation, was decreased in ATC/PDTC. All these data are consistent with the TSHR pathway alteration and loss of thyroid-specific function in the dedifferentiated thyroid neoplasias.

Functional profiling and gene family analysis reveal the deregulation of molecular pathways related to malignancy progression of thyroid cancer

We observed that the MAP-kinase signaling pathway, which includes the well-known molecular lesions involved in WDTC (Nikiforova *et al.*, 2003) was strongly affected through an overexpression of key pathway activators and an underexpression of negative regulators (Table 1). Deregulation of this pathway is critical for the evolution of thyroid neoplasia, and its restoration could constitute a promising therapeutic approach for the dedifferentiated carcinoma.

Other pathways showing important alterations were the interconnected TGF β signaling pathway, focal adhesion and regulation of the actin cytoskeleton. The

TGF β signaling pathway has been associated with the epithelial-to-mesenchymal (EMT) transition in later stages of cancer (Siegel and Massague, 2003) and more recently, with papillary thyroid tumor invasion (Vasko *et al.*, 2007). EMT is a multi-step process involving dissolution of tight and adherent junctions, cytoskeletal reorganization, loss of cell polarity, repression of epithelial markers and upregulation of mesenchymal proteins (Grunert *et al.*, 2003). In our ATC/PDTC series, we observed an overexpression of the E3 ubiquitin ligase *SMURF1* that targets RhoA, producing tight junction dissolution and actin cytoskeleton remodeling (Wang *et al.*, 2003). This last event may be reflected in our tumor profile by the overexpression of several genes involved in cytoskeleton remodeling (Table 1). Moreover, the transcriptional ATC/PDTC profile also showed overexpression of *TWIST1* and downregulation of *CDH1*, both important regulators of EMT in the metastatic and invasive process (Yang *et al.*, 2004; Zavadil and Bottinger, 2005). In addition, several mesenchymal protein coding genes (members of the collagen and laminin protein families; Table 2) were overexpressed as expected for tumor invasion and angiogenesis (Sherman-Baust *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2006). An overexpression of various genes of the metalloproteinase (MMP) family was also observed (Table 2) and they have been associated with degradation of the basal lamina components, TGF β pathway upregulation and tumor invasion (Chambers and Matrisian, 1997).

Other proteins involved in invasion are the chemokines, which have been detected in a wide range of tumors and have been suggested to exhibit a cancer-specific

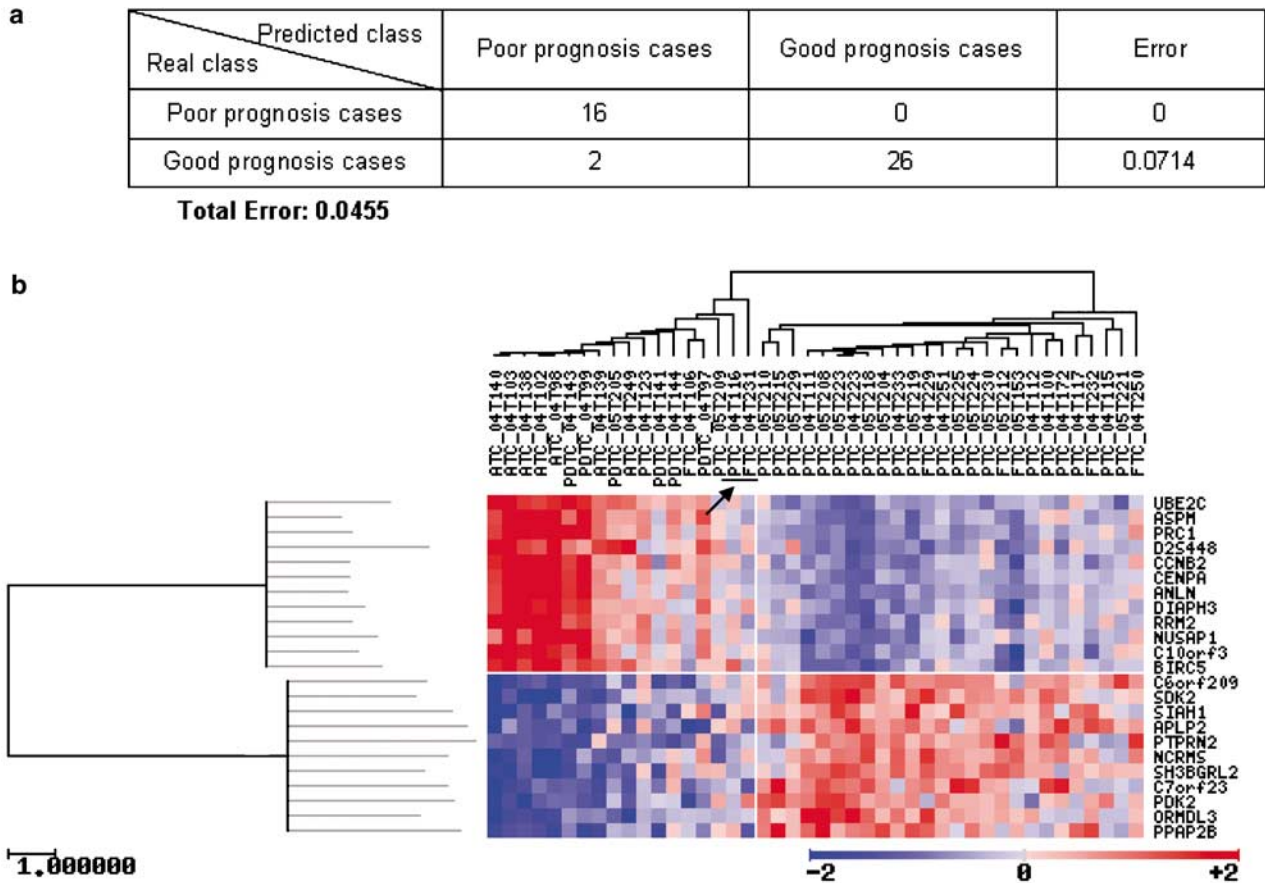


Figure 1 (a) Confusion matrix using Prophet. The two cases apparently misclassified were PTC_04T116 and FTC_04T231 (black arrow). (b) Unsupervised clustering: column represents sample and row represents gene. Left branch includes all poor prognosis tumors and right one includes only good prognosis cases. Color bar: Dark blue and red represent relative under- and overexpression of ≥ 2 -fold respectively.

Table 4 Genes showing significant differences in the comparisons of the ATC/PDTC series versus PTC and versus FTC (FDR-adjusted < 0.15 and differences in absolute values > 2 -fold) which have previously been related to poor prognosis thyroid tumors

Gene symbol	Gene description
<i>Overexpressed genes in ATC/PDTC</i>	
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2C
S100A4	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)
STK5	Aurora kinase B
<i>Underexpressed genes in ATC/PDTC</i>	
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
TG	Thyroglobulin
PAX8	Paired box gene 8

expression pattern (Slettenaar and Wilson, 2006). We found that *CXCL3*, *CXCL10* and *CXCL11* were significantly overexpressed in ATC/PDTC. The transcription of *CXCL10* and *11* is induced by interferon- γ , which was also upregulated in our ATC/PDTC series.

Interestingly, we observed an overexpression of the MAGEA subfamily of cancer testis antigens (*MAGEA1-4*, *MAGEA6*, *MAGEA8* and *MAGEA10-11*). These genes,

together with other subfamily members of MAGE antigens, are normally expressed only in placenta and male germ cells, but serve as unique tumor markers in several types of malignancies. It has been proposed that MAGE-derived antigen mRNA expression is correlated with *in vitro* acquisition of paclitaxel and doxorubicin resistance, and higher malignancy (Duan *et al.*, 2003). This also occurred in our thyroid carcinoma series, indicating that ATC/PDTC could be candidates for a MAGE-based therapy. In fact, recent clinical trials in non-thyroid tumors have shown promising results (Burgdorf *et al.*, 2006).

Identification of a molecular prognosis signature for thyroid follicular cell tumors

In recent years, numerous mathematical algorithms have been proposed to find the minimal number of transcripts able to discriminate clinical features from global expression profiles of different sets of tumors, allowing the improvement of the prognostic procedure (van de Vijver *et al.*, 2002). However, these tools often present errors related to gene selection bias (Ambroise and McLachlan, 2002) that can lead to severe underestimations of prediction errors. We used

the Prophet program (Medina *et al.*, 2007), a tool unique in its kind, which implements a cross-validation strategy that renders unbiased error estimations. By means of this tool, we obtained a molecular signature including only 23 genes (Table 3) and 6 ESTs that can properly distinguish ATC/PDTC and recurrent-WDTC from good prognosis WDTC. It was especially interesting that a PTC case diagnosed as Diffuse Sclerosing Variant (DSV) (04T117), with an initial TNM stage of T4N1M1, was classified as non-poor prognosis tumor by current molecular signature. DSV is a rare variant of papillary thyroid carcinoma, which is characterized by early tumor onset (mean age, 29 vs 46 years for classic PTC), large tumors and higher incidence of cervical node metastases than classic PTC (80 vs 43%). It should be noted that despite the aggressive clinicopathologic features of DSV, it has a prognosis similar to that of classic PTC (the overall disease-specific survival rate is 93%; Fujimoto *et al.*, 1990; Lam and Lo, 2006). In fact, this patient is free of disease after 5 years of follow-up.

On the other hand, only two WDTC cases (FTC_04T231 and PTC_04T116), free of disease at the moment they were included in the study, were classified as poor prognosis tumors. These patients had less than two years of follow-up, and a future relapse cannot be ruled out. Thus, although further series of thyroid tumors and prospective studies are needed to validate this signature, this finding is of great interest for diagnosis and therapy improvement through the classification of patients according to prognosis.

Potential clinical implications of the current findings

The findings of the present study represent a significant contribution toward understanding the complex molecular mechanisms involved in progression and dedifferentiation of thyroid follicular cell tumors. There is a lack of alternative treatments for thyroid follicular cell-derived tumors with a poor response to conventional therapy; thus, it is desirable to identify the molecular pathways involved in thyroid cancer pathogenesis since this may lead to improvement in disease management. In the present paper, we describe new molecular pathways and markers specifically altered in PDTC and ATC that may allow the identification of novel targets for therapies. Furthermore, the poor prognosis molecular profile identified in this study demonstrates a relationship between the transcriptional pattern and the clinical behavior and pathology stage. This should contribute to a better prediction of recurrence and mortality, with an obvious improvement in the stratification of treatment and clinical follow-up.

Material and methods

Tissue specimens and clinical data

Seven ATC, 6 PDTC and 31 WDTC (7 FTC and 24 PTC) were collected from unrelated patients from Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Hospital de Sabadell, Hospital Arnau de Vilanova and other Hospitals through the Spanish National Tumor Bank Network coordinated by CNIO. The tissues were

immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Five frozen normal thyroid tissues were obtained from laryngectomies of consenting patients without thyroid disease. Three independent pathologists evaluated each diagnosis and defined the percentage of tumor tissue by hematoxylin/eosin (H&E) staining of the sections. Only samples with more than 80% tumor cells were included in the study; when possible, samples were manually microdissected to remove areas with less than 80% tumor cells.

The clinicopathologic characteristics of the cases are detailed in Supplementary Table 1. The 31 patients with WDTC had a follow-up that ranged from 8 months to 19 years (mean 3.43 years). Twenty-eight of them were disease-free at the last medical control, whereas there was evidence of tumor recurrence in three patients. These three cases were designated as 'poor prognosis WDTC'.

The six PDTC cases were classified in this category according to the criteria proposed by the WHO, 2004 (DeLellis *et al.*, 2004), which include the presence of three different histologic patterns (insular, trabecular or solid). The six tumors exhibited an infiltrative pattern of growth, necrosis and obvious vascular invasion and none had a minor component of papillary or follicular carcinoma. However, nuclear features similar to papillary carcinomas were focally detected in two tumors (04T141 and 05T205), and a further two (04T143 and 04T144) showed focal of architectural configuration similar to follicular carcinomas.

RNA isolation

Total RNA was extracted using TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) and purified using an RNeasy kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA). Purity and integrity of the RNA was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), and degraded samples were discarded. Concentration was determined using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer.

cDNA synthesis, labeling, hybridization and detection

For each sample, 4 μg of total RNA were amplified by double-strand cDNA synthesis (Life Technologies, Inc.), followed by T7-based *in vitro* transcription (Ambion, Austin, TX, USA) as previously described (Alonso *et al.*, 2007). Amplified RNA (aRNA) was labeled with cyanine 5-conjugated dUTP (Cy5) whereas aRNA from Universal Human Reference RNA was labeled with cyanine 3-conjugated dUTP (Cy3). The CNIO Oncochip v2 was used to perform the co-hybridization. Slides were washed, dried and scanned in a Scanarray 5000XL scanner (GSI Lumonics, Kanata, Ontario, Canada).

The CNIO Oncochip v2 is a cDNA microarray which contains 11 675 human clones representing 9348 known genes and uncharacterized expressed sequence tags (ESTs). The probes were selected on the basis of their proven or putative involvement in cancer. Internal controls and at least one duplicate per clone are present in order to assess the reproducibility and specificity of the assay.

Data analysis

Normalization and preprocessing Two channel ratios (Cy5/Cy3) for each array spot were generated and quantified using GenePix Pro 5.1. (Axon Instruments, Inc., Union City, CA, USA). Data were normalized by the LOWESS method as implemented in the GEPAS package (Montaner *et al.*, 2006). Half of the median background was subtracted from each spot. Normalized data were log₂ transformed. Spots in defective areas of the microarray, or with halo morphology or with intensities (sum of medians of two channels) below the

sum of the mean backgrounds, were considered missing values. Inconsistent replicates of clones were discarded and consistent duplicates were averaged. Gene patterns containing missing values were discarded.

Differentially expressed genes associated to dedifferentiation and aggressiveness To identify specific transcripts related to dedifferentiation and aggressiveness, two distinct pairwise comparisons were made between ATC/PDTC and each class of WDTC (FTC and PTC). A *t*-test was carried out as implemented in GEPAS (Montaner *et al.*, 2006). *P*-values were corrected for multiple testing using the method proposed by Hochberg and Benjamini for controlling the false discovery rate (FDR; Benjamini and Yekutieli, 2005). Genes showing a FDR value < 0.15 and a more than two-fold difference in absolute values for both comparisons were considered differentially expressed.

Functional profiling of dedifferentiation and aggressiveness Gene set enrichment analysis (Mootha *et al.*, 2003) is the most powerful strategy to discover biological processes differentially regulated in ATC/PDTC and WDTC. It is based on the study of the distribution of gene sets sharing functional annotations across a list of genes ranked according to differential expression. We ranked the genes according to differential expression in ATC/PDTC and WDTC, correcting for gender and age effects using the Limma package from bioconductor (Gentleman *et al.*, 2004). Since this scenario is more complex than the simple case-control implemented in the original proposal of the method, we used a generalization of the gene set enrichment test, the FatiScan, which is independent of experimental design and only uses a list of ranked genes. This test is implemented in the Babelomics package (Al-Shahrour *et al.*, 2006; <http://www.babelomics.org>) and allows to test different biological terms (Gene Ontology, KEGG pathway, Biocarta pathways, functional motifs, Swissprot keywords, transcription factor binding sites and *cis*-regulatory elements).

Additional functional enrichment of the differentially expressed gene set was assessed using the FatiGOplus tool, also implemented in the Babelomics package (Al-Shahrour *et al.*, 2006), as well as manual exhaustive searches in PubMed and the Entrez Gene database.

References

- Ain KB. (1999). Anaplastic thyroid carcinoma: a therapeutic challenge. *Semin Surg Oncol* **16**: 64–69.
- Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M *et al.* (2007). A high-throughput study in melanoma identifies epithelial–mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* **67**: 3450–3460.
- Al-Shahrour F, Minguéz P, Tarraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM *et al.* (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Res* **34**: W472–W476.
- Ambrose C, McLachlan GJ. (2002). Selection bias in gene extraction on the basis of microarray gene-expression data. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6562–6566.
- Benjamini Y, Yekutieli D. (2005). Quantitative trait loci analysis using the false discovery rate. *Genetics* **171**: 783–790.
- Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS *et al.* (2000). Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 262–267.
- Burgdorf SK, Fischer A, Claesson MH, Kirkin AF, Dzhandzhugazyan KN, Rosenberg J. (2006). Vaccination with melanoma lysate-pulsed dendritic cells, of patients with advanced colorectal carcinoma: report from a phase I study. *J Exp Clin Cancer Res* **25**: 201–206.
- Chambers AF, Matrisian LM. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* **89**: 1260–1270.
- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ *et al.* (2006). Management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid* **16**: 109–142.
- Croizet-Berger K, Daumerie C, Couvreur M, Courtoy PJ, van den Hove MF. (2002). The endocytic catalysts, Rab5a and Rab7, are tandem regulators of thyroid hormone production. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8277–8282.
- DeLellis R, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C. (2004). *WHO, Tumors of Endocrine Organs*. IARC Press: Lyon.
- Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT *et al.* (2003). Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **9**: 2778–2785.
- Fujimoto Y, Obara T, Ito Y, Kodama T, Aiba M, Yamaguchi K. (1990). Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid. Clinical importance, surgical treatment, and follow-up study. *Cancer* **66**: 2306–2312.

- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S *et al.* (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80.
- Glinisky GV. (2006). Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated Polycomb Group (PcG) protein chromatin silencing pathway. *Cell Cycle* **5**: 1208–1216.
- Grunert S, Jechlinger M, Beug H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 657–665.
- Herrero J, Valencia A, Dopazo J. (2001). A hierarchical unsupervised growing neural network for clustering gene expression patterns. *Bioinformatics* **17**: 126–136.
- Huang E, Cheng SH, Dressman H, Pittman J, Tsou MH, Horng CF *et al.* (2003). Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* **361**: 1590–1596.
- Lam AK, Lo CY. (2006). Diffuse sclerosing variant of papillary carcinoma of the thyroid: a 35-year comparative study at a single institution. *Ann Surg Oncol* **13**: 176–181.
- Medina I, Montaner D, Tarraga J, Dopazo J. (2007). Prophet, a web-based tool for class prediction using microarray data. *Bioinformatics* **23**: 390–391.
- Montaner D, Tarraga J, Huerta-Cepas J, Burguet J, Vaquerizas JM, Conde L *et al.* (2006). Next station in microarray data analysis: GEPAS. *Nucleic Acids Res* **34**: W486–W491.
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J *et al.* (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* **34**: 267–273.
- Motti ML, Califano D, Baldassarre G, Celetti A, Merolla F, Forzati F *et al.* (2005). Reduced E-cadherin expression contributes to the loss of p27kip1-mediated mechanism of contact inhibition in thyroid anaplastic carcinomas. *Carcinogenesis* **26**: 1021–1034.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F *et al.* (2003). BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 5399–5404.
- Onda M, Emi M, Yoshida A, Miyamoto S, Akaishi J, Asaka S *et al.* (2004). Comprehensive gene expression profiling of anaplastic thyroid cancers with cDNA microarray of 25 344 genes. *Endocr Relat Cancer* **11**: 843–854.
- Pallante P, Berlingieri MT, Troncone G, Kruhoffer M, Orntoft TF, Viglietto G *et al.* (2005). UbcH10 overexpression may represent a marker of anaplastic thyroid carcinomas. *Br J Cancer* **93**: 464–471.
- Randolph GW, Daniels GH. (2002). Radioactive iodine lobe ablation as an alternative to completion thyroidectomy for follicular carcinoma of the thyroid. *Thyroid* **12**: 989–996.
- Rocha AS, Soares P, Fonseca E, Cameselle-Teijeiro J, Oliveira MC, Sobrinho-Simoes M. (2003). E-cadherin loss rather than beta-catenin alterations is a common feature of poorly differentiated thyroid carcinomas. *Histopathology* **42**: 580–587.
- Sakamoto A, Kasai N, Sugano H. (1983). Poorly differentiated carcinoma of the thyroid. A clinicopathologic entity for a high-risk group of papillary and follicular carcinomas. *Cancer* **52**: 1849–1855.
- Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR *et al.* (2003). Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* **3**: 377–386.
- Siegel PM, Massague J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 807–821.
- Slettenaar VI, Wilson JL. (2006). The chemokine network: a target in cancer biology? *Adv Drug Deliv Rev* **58**: 962–974.
- Sobrinho-Simoes M, Sambade C, Fonseca E, Soares P. (2002). Poorly differentiated carcinomas of the thyroid gland: a review of the clinicopathologic features of a series of 28 cases of a heterogeneous, clinically aggressive group of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* **10**: 123–131.
- Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, Troncone G, Palombini L, Bavetsias V *et al.* (2005). Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 928–935.
- Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y. (2006). Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers. *Clin Cancer Res* **12**: 3716–3722.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW *et al.* (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* **347**: 1999–2009.
- Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, He H, Auer H, Liyanarachchi S *et al.* (2007). Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 2803–2808.
- Vini L, Harmer C. (2002). Management of thyroid cancer. *Lancet Oncol* **3**: 407–414.
- Voigt C, Holzapfel H, Paschke R. (2000). Expression of beta-arrestins in toxic and cold thyroid nodules. *FEBS Lett* **486**: 208–212.
- Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomsen GH *et al.* (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**: 1775–1779.
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C *et al.* (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* **117**: 927–939.
- Zavadil J, Bottinger EP. (2005). TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **24**: 5764–5774.
- Zou M, Al-Baradie RS, Al-Hindi H, Farid NR, Shi Y. (2005). S100A4 (Mts1) gene overexpression is associated with invasion and metastasis of papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* **93**: 1277–1284.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>).

Overexpression of the S-phase kinase-associated protein 2 in thyroid cancer

Gennaro Chiappetta, Carmela De Marco¹, Alfina Quintiero², Daniela Califano, Simona Gherardi¹, Donatella Malanga³, Marianna Scrima³, Cristina Montero-Conde⁴, Letizia Cito¹, Mario Monaco, Maria Letizia Motti⁵, Rosa Pasquinelli, Valter Agosti², Mercedes Robledo⁴, Alfredo Fusco¹ and Giuseppe Viglietto^{2,3}

Laboratorio Oncologia Sperimentale III, Istituto Nazionale Tumori, via M. Semmola, 80131 Napoli, Italy

¹Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare 'L Califano', Università Federico II, via S. Pansini 5, 80131 Napoli, Italy

²Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica 'G Salvatore', Università Magna Graecia, Campus Universitario Germaneto, 88100 Catanzaro, Italy

³Laboratorio di Oncologia Molecolare, BioGem scarl, Via Camporeale Area PIP, 83031 Ariano Irpino (AV), Italy

⁴Hereditary Endocrine Cancer Group. Cancer Genetics Programme, Spanish National Cancer Centre (CNIO), Melchor Fernández Almagro 3, 28029 Madrid, Spain

⁵Dipartimento degli Studi e delle Istituzioni Territoriali, Università Parthenope, via Acton 38, 80131 Napoli, Italy

(Requests for offprints should be addressed to G Viglietto; Email: viglietto@unicz.it)

Abstract

Loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 through enhanced protein degradation frequently occurs in human cancer. Degradation of p27 requires ubiquitination by the S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2), a member of the F-box family of Skp1–Cullin–F-box protein ubiquitin ligases. In the present study, we have investigated the role of Skp2 in human thyroid tumours. Immunohistochemistry analysis showed that Skp2 was overexpressed significantly in thyroid carcinomas (26 out of 51) compared with goitres (0 out of 12, $P < 0.001$) or adenomas (1 out of 10, $P < 0.05$), and that high Skp2 expression was detected more often in anaplastic thyroid (ATC; 83%, $n = 12$) than follicular thyroid (FTC; 40%, $n = 20$) or papillary thyroid (PTC; 42%, $n = 19$) carcinomas ($P < 0.05$). Thyroid cancer cell lines and tissues with high levels of Skp2 protein presented high p27 degradation activity and there was an inverse correlation between Skp2 and p27 expression in thyroid cancer tissues ($n = 68$; $P < 0.05$). In most cases, the observed overexpression of Skp2 protein was paralleled by an increase in the levels of Skp2 mRNA, and we observed *Skp2* gene amplification at 5p13 in 2 out of 6 cell lines and in 9 out of 23 primary tumours (six out of eight ATCs, two out of nine PTCs and one out of six FTCs) using Q-PCR and/or fluorescence *in situ* hybridization analysis. Finally, *in vitro* experiments demonstrated that suppression of Skp2 expression drastically reduced proliferation of thyroid cancer cells and, conversely, forced expression of Skp2 circumvented serum dependency and contact inhibition in Skp2-negative cells by promoting p27 degradation. These findings indicate that Skp2 plays an important role for the development of thyroid cancer.

Endocrine-Related Cancer (2007) 14 405–420

Introduction

Alteration of cell cycle is a hallmark of cancer (Hanahan & Weinberg 2000). In particular, the importance of the G1/S transition in human tumour cells has been highlighted by the frequent observations of aberrant regulation of molecules involved in this process (Malumbres & Barbacid 2001). Thyroid tumours occur frequently in the general population and although the majority represents benign follicular adenomas (FAs), thyroid cancer constitutes 1% of all

malignancies worldwide (Sherman 2003). Among the differentiated cancers, two main types are recognized, including papillary thyroid carcinoma and follicular thyroid carcinoma forms (PTC and FTC) that originate from the thyrocytes. The undifferentiated form, anaplastic thyroid carcinoma (ATC), is highly aggressive cancer that often originates from pre-existing differentiated cancer (Hedinger *et al.* 1989). As is the case with other common human carcinomas, a series of multiple alterations in cell cycle control-related gene

products are involved in thyroid cancer pathogenesis (Kondo *et al.* 2006). It is therefore important to clarify the cell cycle control mechanisms involved in the development and progression of thyroid cancer.

Skp1–Cullin–F-box protein (SCF) complexes are a multicomponent RING-type evolutionarily conserved class of ubiquitin ligase enzymes (E3) that consists of four subunits: an adaptor protein (Skp1, S-phase kinase-associated protein), a scaffold protein (Cull1/Cullin), a RING-domain protein (Rbx1) and a substrate-binding protein (F-box-containing protein; Patton *et al.* 1998, Deshaies 1999). Cullin-1, Skp1 and ROC1 proteins are constant component of SCF, whereas F-box proteins represent variable subunits that dictate specificity (Patton *et al.* 1998, Deshaies 1999). Each F-box protein recognizes a specific subset of protein substrates and thus promotes their ubiquitination and subsequent degradation (Kipreos & Pagano 2000, Jin *et al.* 2004). The F-box protein Skp2, which was originally identified as a protein that interacts with cyclin A–cyclin-dependent kinase 2 (CDK2; Zhang *et al.* 1995) is one of the substrate recognition units of SCF. Skp2 has been shown to be required for G1/S transition in both diploid fibroblasts and transformed cells (Zhang *et al.* 1995, Sutterluty *et al.* 1999). The levels of Skp2 are low in G0–G1 phases and high in S-phase (Zhang *et al.* 1995), and forced expression of Skp2 induces quiescent fibroblasts to replicate their DNA in low serum (Zhang *et al.* 1995, Sutterluty *et al.* 1999).

Control of cell cycle progression by Skp2 has been linked to its ability to control the levels of the CDK inhibitor p27 (Slingerland & Pagano 2000, Philipp-Staheli *et al.* 2001), a CDK inhibitor that negatively regulates cell cycle (Carrano *et al.* 1999, Tsvetkov *et al.* 1999). Skp2 ubiquitinates and degrades p27, both *in vivo* and *in vitro* (Carrano *et al.* 1999, Tsvetkov *et al.* 1999, Slingerland & Pagano 2000, Philipp-Staheli *et al.* 2001). Degradation of p27 through the ubiquitin–proteasome pathway requires phosphorylation of p27 on Thr187 by cyclin E/CDK2 or cyclin A/CDK2 complexes (Pagano *et al.* 1995, Sheaff *et al.* 1997) and subsequent binding of Skp2 to T187-phosphorylated p27. Accordingly, suppression of Skp2 expression in cultured cells stabilizes p27 protein *in vivo* (Kudo *et al.* 2005), whereas Skp2-deficient mice show high levels of p27 (Nakayama *et al.* 2000).

The loss of p27 expression plays an important role in human cancer pathogenesis (Slingerland & Pagano 2000). The p27 expression is reduced in several tumours including thyroid carcinomas (Erickson *et al.* 1998, Baldassarre *et al.* 1999, Tallini *et al.* 1999); data from our laboratory suggest that

such decreased expression depends on enhanced p27 protein degradation (Motti *et al.* manuscript in preparation). Therefore, although there are different reports of overexpression of Skp2 protein in human haematological and solid cancers (Gstaiger *et al.* 2001, Hershko *et al.* 2001, Kudo *et al.* 2001, Latres *et al.* 2001, Chiarle *et al.* 2002, Masuda *et al.* 2002, Signoretti *et al.* 2002, Li *et al.* 2004), so far there are no studies regarding the clinical significance or the biological behaviour of Skp2 expression in human thyroid carcinomas. Most interestingly, genetic alterations that result in gain of part or of the entire short arm of chromosome 5, where the *Skp2* gene has been assigned at 5p13, frequently occur in PTC, Hurthle carcinomas and ATC (Hemmer *et al.* 1999, Wada *et al.* 2002, Foukakis *et al.* 2005), suggesting that Skp2 may be the target of gene amplification in a fraction of thyroid cancer.

The aim of the present study was to determine the potential role of Skp2 in thyroid cancer development and progression. The findings reported here might provide additional insight into the molecular pathogenesis and identify Skp2 as a novel potential therapeutic target for thyroid ATC.

Materials and methods

Clinical samples

Primary thyroid carcinomas and their paired adjacent normal glandular tissues were obtained from patients who underwent surgery from 1993 to 2000, at the Chirurgia B, INT Fondazione G Pascale, Napoli, Italy.

Cell culture

Cell lines have been established from PTC (NPA (Ohta *et al.* 1997), BHP2.7, BHP10.3 and BHP17.10 (Pang *et al.* 1989), TPC-1 (Tanaka *et al.* 1987), BC-PAP (Fabien *et al.* 1994); FTC (WRO ;Estour *et al.* 1989) and ATC (FB-1 (Fiore *et al.* 1997), FRO (Fagin *et al.* 1993) and ARO (Ohta *et al.* 1997)). Cells were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies Inc.) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 100 units/ml penicillin–streptomycin (Life Technologies Inc.), in a CO₂ incubator (5% CO₂ in air) at 37 °C. Control thyroid cells were provided by Dr F Curcio (University of Udine, Italy) and grown as described (Curcio *et al.* 1994).

RNA and DNA isolation and RT-PCR

Total RNA and high-molecular-weight genomic DNA were prepared as described (Chomczynski & Sacchi

1987, Sambrook *et al.* 1992). Semiquantitative RT-PCR amplification was performed by 24 cycles, using the following primers: Skp2 sense primer, GCTGCTAAA GGTCTCTGGTGT; Skp2 antisense primer AGGCT-TAGATTCTGCAACTTG; actin sense primer GTCAA CGGATTTGGTCTGTATT and actin antisense primer AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT.

Quantitative reverse transcription real-time PCR (Q-RT-PCR) and quantitative real-time PCR (Q-PCR)

Q-RT-PCR and Q-PCR were performed using the Power SYBR Green PCR Master Mix in an ABI Prism 7300 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in the presence of 0.4 μM primers, in a total volume of 25 μl. cDNAs were synthesized from 5 mg total RNA by Superscript. In all real-time PCR experiments, we run the final dissociation stage to generate a melting curve for the verification of amplification product specificity. All primers were designed and tested for their specificity using the Primer Express v. 1.5 (Applied Biosystems). For RNA analysis, primers were designed to span two adjacent exons in the *Skp2* gene (exons 4 and 5 respectively) to avoid amplification of contaminating genomic DNA sequences. The target amplicon was 120 bp.

Oligonucleotide sequences used as primers in the Q-RT-PCR experiments were the following: Skp2 forward (on exon 4), 5'-CGCTGCCACGATCATT-TAT-3'; Skp2 reverse (on exon 5), 5'-TGCAACTTG-GAACTGAGACA-3'; β-actin forward, 5'-TGCGT GACATTAAGGAGAAG-3' and β-actin reverse, 5'-GCTCGTAGCTCTTCTCC-3'.

The expression levels of Skp2 mRNA in each sample were normalized on the basis of the respective actin content and recorded as a relative expression level.

For *Skp2* gene dosage analysis, the target amplicon was 98 bp spanning exon 5 and intron 5 of *Skp2* gene. Oligonucleotide sequences used as primers in the Q-PCR genomic DNA quantification experiments were the following: Skp2 forward (exon 5), 5'-CTCCACGGCATACTGTCTCA-3'; Skp2 reverse (intron 5), 5'-ACTCT GCCTGCCACTCACTT-3'; β-actin forward, 5'-TGCG TGACATTAAGGA-GAAG-3' and β-actin reverse: 5'-GCTCGTAGCTCT-TCTCC-3'.

Each sample was run thrice and each PCR experiment included two non-template control wells. The relative amounts of mRNA or DNA were calculated by the comparative cycle threshold method

by Livak & Schmittgen (2001) and subsequently normalized by β-actin expression.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH analysis was performed on ten formalin-fixed paraffin-embedded samples (five PTCs, two FTCs and three ATCs). The copy number status of the SKP2 locus was determined using two different probes: 1) three BAC clones covering the gene (RP11-36A10, RP11-262E5 and RP11-624K2) that were labelled with dUTP-SpectrumOrange (Vysis Inc., DownersGrove, IL, USA) and 2) three BAC clones as control probe (RP11-215J12, RP11-397H14 and RP11-620I22) covering the 5q31 region that were labelled with dUTP-SpectrumGreen (Vysis Inc.). The BAC clones used were designed according to the Ensembl database (www.ensembl.org). The slides were deparaffinized, boiled in a pressure cooker with 1 mM EDTA (pH 8.0) for 10 min and incubated with pepsin at 37 °C for 30 min. The slides were then dehydrated. The probes were denatured at 75 °C for 2 min after overnight hybridization at 37 °C in a humid chamber. Slides were washed with 0.4 × SSC and 0.3% NP-40. FISH evaluation was performed by two investigators with no previous knowledge of other genetic, clinical or IHC results. Scoring of fluorescence signals was carried out in each sample by counting the number of single copy gene and control probe signals in an average of 130 (60–210) well-defined nuclei. Gain or amplification status was counted as the ratio (in >5% of tumour cells) of red/green signals. The cut-off values for the copy number changes were obtained from the analysis of normal adjacent cells in each experiment.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies of Skp2 and p27 in thyroid carcinoma were performed using the avidin–biotin–peroxidase method (LSAB kit; DAKO, Glostrup, Denmark) on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues as described previously (Signoretti *et al.* 2002, Li *et al.* 2004). All sections were counterstained with haematoxylin. p27 was scored by observing 500 cancer cells in at least ten high-power fields and were classified as positive (staining in >40% of cells) or negative (staining in <40% of cells) as described previously. The expression of Skp2 was graded as high (>20% of tumour cells showed strong or diffuse immunopositivity) or low (<20% of the tumour cells showed weak focal immunopositivity or absence of staining).

Western blot and antibodies

Whole cell extracts were prepared from cultured cells by homogenizing cells in NP-40 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40) containing protease inhibitors. Western blot analysis was carried out by standard methods using whole cell extracts. Mouse monoclonal antibodies to Skp2, p27 and phospho-T187, p27 were purchased from Zymed Laboratory (San Francisco, CA, USA) and Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA) respectively.

Transfection assays

Human Skp2 cDNA was a gift of Dr Giulio Draetta (Milan, Italy). Onto a six-well multiwell plate, 1×10^5 cells were plated and allowed to attach for 24 h. Transfection was done with Fugene 6 reagent (Roche Applied Biosciences). After 48 h of transfection, cells were treated with 800 $\mu\text{g/ml}$ G418 (Invitrogen) for 2–3 weeks as a selective marker. Surviving cells were dispersed in a 24-well multiwell plate and several stably transfected cell clones were obtained after 2–3 more weeks. Each clone was screened for Skp2 expression by western blot analysis.

RNA interference

Antisense experiments targeting Skp2 were performed as described previously (Yokoi *et al.* 2004). Oligonucleotides containing phosphorothioate backbones were synthesized (Invitrogen): AS, 5'-CCTGGGGG ATGTTCTCA-3' (the antisense direction of human Skp2 cDNA nucleotides 180–196) and SC, 5'-GGCTT CCGGGCATTAG-3' (a scrambled control for AS). Oligonucleotides (AS or SC), were delivered into ATC cells at a final concentration of 200 nmol/l each, using oligofectamine reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. After 24 or 48 h of transfection, cells were harvested by trypsinization for growth and viability assays.

Virus generation and infection

The human p27 (NM_004064) MISSION shRNA set (five individual hairpins individually cloned into pLKO.1-puro; Sigma) was used to generate lentiviral particles in HEK293T packaging cells. Subconfluent HEK293T cells were cotransfected with 13 μg p27 MISSION shRNA set, 18 μg pCMV-deltaR8.91 and 12 μg pCMV-VSVG per 100 mm tissue culture plate by calcium phosphate precipitation (Zufferey *et al.* 1997). Starting 48 h after transfection, supernatants were collected at 8-h intervals, filtered and used for three rounds of transduction of WRO cells in the

presence of 8 $\mu\text{g/ml}$ polybrene (Sigma). Transduced cells were lysed after 72 h from infection, and were analysed by immunoblotting with anti-p27 antibodies. The p27 knockdown in transduced WRO cells was determined by immunoblotting and compared with untransduced WRO cells, to Mission non-target control transduction virus (Sigma SHC002V) and to Mission TurboGFP Control Vector encoding virus (Sigma SHC003V).

In vitro proliferation assay and flow cytometry assay

Mock- and Skp2-transfected cells were plated at a density of 1.0×10^5 cells/well in triplicate and were harvested and counted daily for 6 days. The medium was changed every 48 h. This experiment was repeated thrice.

Indirect immunofluorescence

Cells were grown to subconfluence on coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. 5'-Bromo-3'-deoxyuridine (BrdU) was added to the culture medium to a final concentration of 10 μM for 2 h. S-phase cells were identified using a BrdU Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science). Cell nuclei were identified by Hoechst staining. Fluorescence was viewed with a Zeiss 140 epifluorescent microscope equipped with filters that allowed discrimination between Texas red and FITC.

In vitro p27 protein degradation assay

Human histidine-tagged p27 was generated by RT-PCR and cloned into pET21a plasmid as described previously (Viglietto *et al.* 2001). The 6-histidine tag was at the C-terminus. The p27 degradation assay was performed as described by Pagano *et al.* (1995). Frozen tissue samples and cell pellets were resuspended in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.5) and 1 mM dithiothreitol (DTT), and subsequently frozen and thawed several times. Lysates were then centrifuged at 13 000 *g* and the supernatant was retrieved and stored at -80°C for the degradation assay. Purified histidine-tagged p27 was incubated at 37°C in a degradation mixture containing 100 μg cell extract, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5), 5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 2 mM ATP, 10 mM creatine phosphokinase (Sigma), 10 mM creatine phosphate (Sigma) and 5 μM ubiquitin (Sigma). The p27 degradation rate was analysed by immunoblotting with an anti-p27 antibody.

Results

Expression of Skp2 in thyroid cancer cell lines

To determine the role of Skp2 in thyroid carcinogenesis, we analysed the expression of Skp2 protein in ten cell lines derived from human thyroid tumours: six cell lines were derived from PTC (NPA, BHP2.7, BHP10.3, TPC-1, BHP17.10 and B-CPAP), one from FTC (WRO) and three from ATC (FB-1, ARO and FRO; Fig. 1A). The primary P5 cells were used as control of normal human thyroid cells (TN). Western blot analysis demonstrated that Skp2 expression was moderately increased in four out of nine PTC cell lines (NPA, BHP10.3, BHP17.10 and B-CPAP), and markedly overexpressed in two ATC cell lines (FRO

and ARO). Subsequently, we examined Skp2 mRNA expression by northern blot (not shown) and quantitative RT-PCR in a selected panel of thyroid cancer cell lines (NPA, B-CPAP, TPC-1, ARO, FRO and FB-1; Fig. 1B). We found a good correlation between Skp2 mRNA and protein expression in most cell lines analysed. In fact, the lines that showed low levels of Skp2 protein (FB-1 and TPC-1) also showed low amount of mRNA, whereas the cell lines with increased Skp2 protein levels showed enhanced amount of Skp2 mRNA (B-CPAP, FRO and ARO).

Previous work has shown that the *Skp2* gene mapping at 5p13 is frequently the target of amplification in lung cancer (Yokoi *et al.* 2002, 2004, Coe *et al.* 2005), in glioblastoma (Saigusa *et al.* 2004) and in carcinoma of the biliary tract (Sanada *et al.* 2004). Interestingly, an increase in the copy number of chromosome 5 involving the locus 5p13, where the *Skp2* gene has been assigned, was reported to occur in FTC, in Hurthle carcinomas (Hemmer *et al.* 1999, Wada *et al.* 2002) and in ATC cell lines including ARO (Foukakis *et al.* 2005). Thus, we examined the amplification status of *Skp2* gene in thyroid carcinoma cell lines (Fig. 1C). Genomic DNA extracted from six thyroid cancer cell lines and from control normal human lymphocytes (Fig. 1C, control) was analysed by Q-PCR as described in Materials and Methods. The DNA copy number of the *Skp2* gene was considered to be increased when the arbitrary values obtained by the quantitative PCR analysis (after normalization with actin levels) were greater than twofold the value obtained for normal diploid human lymphocytes. Using these parameters, our results indicated that at least three cell lines (NPA, FRO and ARO) presented increased copy number of the *Skp2* gene in comparison with genomic DNA from normal lymphocytes or from other cell lines examined. At least, two out of the three cell lines (ARO and FRO) that presented amplification of the *Skp2* gene expressed the highest levels of Skp2 mRNA and protein.

Subsequently, we investigated whether Skp2 was involved in p27 degradation in thyroid cancer cells. First, we found that in thyroid cancer cells the expression of Skp2 and p27 was inversely correlated. p27 was expressed heterogeneously in thyroid cancer cells, with marked accumulation in the TPC-1, BHP2.7 and WRO cells that presented low Skp2 expression. Conversely, the p27 expression was reduced (B-CPAP, NPA, FRO) or lost (ARO) in cells that presented relatively high Skp2 expression (Fig. 2A). The finding that in B-CPAP cells the p27 levels did not correlate with Skp2 levels, suggested that other (unknown) factors, in addition to Skp2, are involved in the regulation of p27 levels in cultured thyroid cancer cells. Since Skp2-dependent degradation of p27 depends on T187 phosphorylation

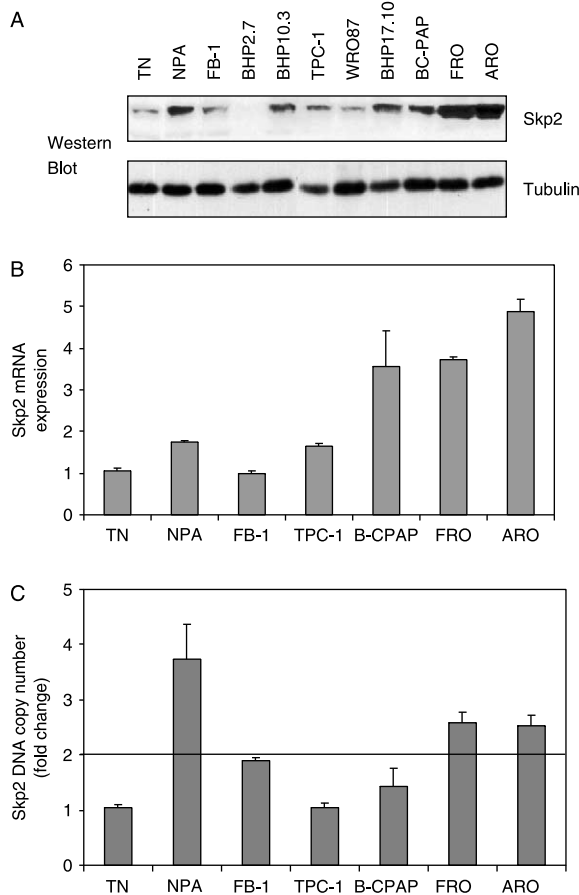


Figure 1 Skp2 expression in human thyroid cancer cell lines. (A) Immunoblot analysis of Skp2 in human thyroid cancer cell lines. TN, normal thyroid cell line (P5); NPA, BHP2.7, BHP10.3, TPC-1, BHP17.10 and B-CPAP cell lines were derived from papillary carcinomas (PTCs), WRO from follicular carcinoma (FTC), FB-1, ARO and FRO cells were derived from ATC. Antibodies to β -tubulin were used for normalization. (B) Skp2 relative mRNA expression by Q-RT-PCR. Control, RNA from P5 cells. (C) *Skp2* relative gene number by Q-PCR. Control, DNA from normal peripheral blood lymphocytes.

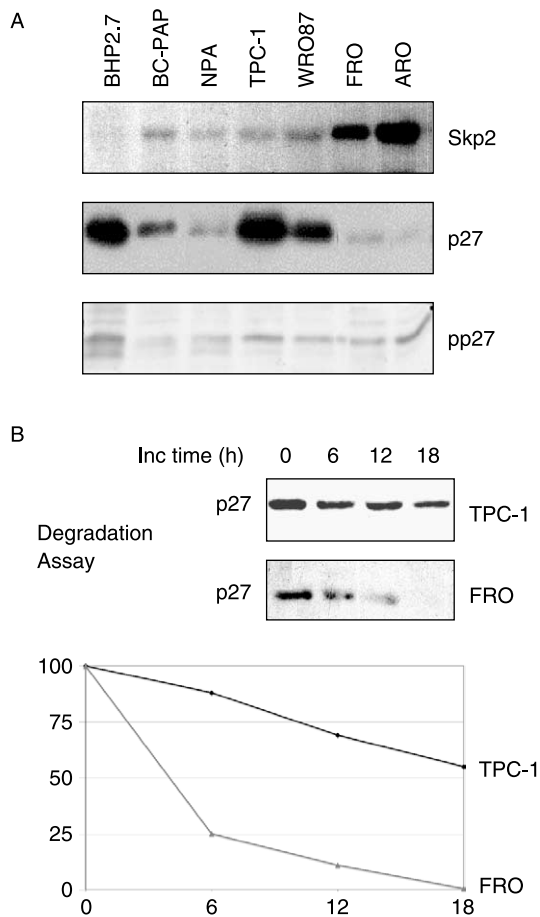


Figure 2 Correlation between Skp2 and p27 expression in thyroid cancer cell lines. (A) Immunoblot analysis of Skp2 in human thyroid cancer cell lines. (B) p27 degradation assay. Rate of p27 degradation in extracts from TPC-1 and FRO cells. One microgram of recombinant p27 was incubated at 37 °C with 100 µg proteasome extracts for 0, 6, 12 or 18 h respectively, and the subsequent immunoblot analysis revealed the amount of intact p27 protein in different conditions. Half-life of p27 protein was of ~4–5 h in FRO cells and > 18 h in TPC-1.

of p27, we also analysed T187 phosphorylation using phospho-specific antibodies. We found that p27 was apparently more abundantly phosphorylated at T187 in those cells which presented reduced or absent p27 expression (see the amount of T187 phosphorylation relative to the levels of p27 in NPA, ARO and FRO cells compared with other cells), suggesting that T187 phosphorylation was implicated in p27 degradation in thyroid cancer cells (Fig. 2A). Subsequently, we evaluated the ability of extracts from cells expressing high levels of Skp2 protein (ATC cells: FRO and ARO) to degrade recombinant p27 *in vitro* in comparison with cell lines that express low levels of Skp2 protein (TPC-1 and WRO). Proteasome extracts prepared from FRO, ARO, TPC-1 and WRO cells were incubated with

recombinant p27 and analysed by western blotting to determine the rate at which the thyroid cancer cells degraded p27. Proteasome extracts derived from TPC-1 (Fig. 2B) and WRO (not shown) cells slowly degraded p27 (half-life: > 18 and ~11.5 h respectively), whereas FRO (Fig. 2B) and ARO (not shown) cells degraded p27 with a shorter half-life (~4.5 and 5 h respectively).

Expression analysis of Skp2 in thyroid tumours

Although the results described earlier suggest that Skp2 may play a key role in the process of thyroid carcinogenesis, it is necessary to note that the various thyroid cancer cell lines used in this study could not be the most relevant models of primary thyroid tumours. Therefore, we extended our study to the expression of Skp2 in primary carcinomas. To this aim, we performed immunostaining for Skp2 protein in 12 cases of TG, 10 FA and 51 cases of thyroid carcinomas (19 PTC, 20 FTC and 12 ATC). The incidence of Skp2 expression in thyroid disease is summarized in Fig. 3A. We found that Skp2 is not detectable in thyrocytes from normal glands (4 out of 4) and in hyperplastic disease such as goitres (12 out of 12), and is expressed only in one out of ten FA with few (~10%) focally distributed nuclear-positive tumour cells (Fig. 3B). In contrast, Skp2 is overtly overexpressed in 26 out of 51 (~51%) malignant thyroid carcinomas. Thyroid carcinomas were classified as positive for Skp2 expression when showing strong diffuse nuclear staining in several cells/high-power fields (cut-off set at >20% of tumour cells). Positive Skp2 expression was significantly higher in the carcinoma samples than in either goitres or adenomas (carcinoma versus goitre, $P < 0.001$; carcinoma versus adenoma, $P < 0.05$; Fisher's exact test). Among the different types of thyroid carcinomas, Skp2 expression was observed more frequently in ATC (83%, 10 out of 12) than PTC (42%, 8 out of 19) or FTC (40%, 8 out of 20; $P < 0.05$; Fisher's exact test).

The relationship between Skp2 and p27 protein expression was examined in 68 cases of thyroid tumours. The expression of p27 in thyroid tumour tissues was evaluated by immunohistochemistry with anti-p27 monoclonal antibody (Fig. 4A and B). Thyroid cancer cases showed three major patterns of Sp2/p27 expression. Eighteen tumours (26%) were characterized by low p27 and high Skp2 levels. Twenty-four tumours (35%) expressed high p27 and low Skp2 levels. In 20 tumours (29%), both Skp2 and p27 were observed in low levels. Only six tumours expressed both high levels of Skp2 and p27. Fisher's exact test indicated that the percentage of high Skp2 expressors was significantly greater in the low p27

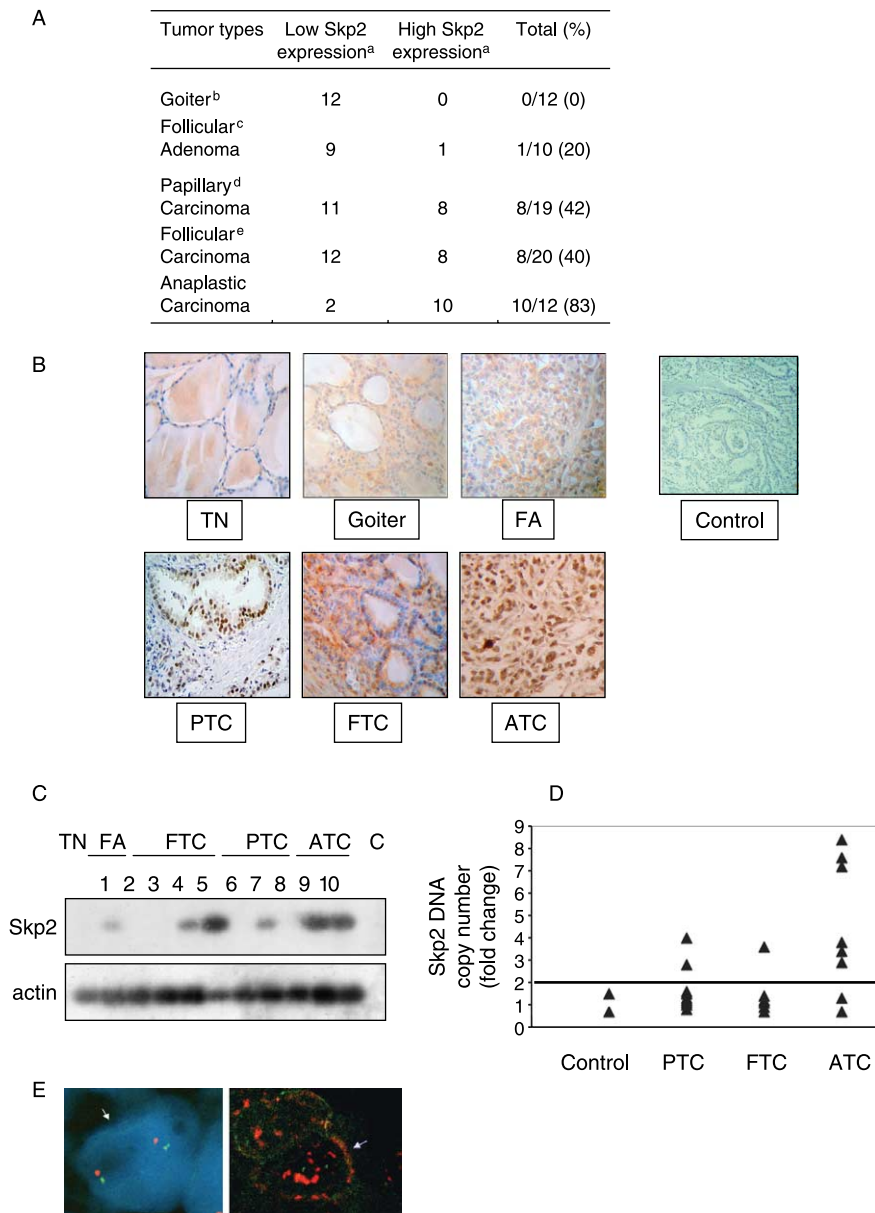


Figure 3 Skp2 expression in human primary thyroid cancer. (A) Expression of Skp2 in thyroid tumours. ^aThe expression of Skp2 was graded as high (>20% of tumour cells with strong or diffuse immunopositivity) or low (<20% of the tumour cells with weak focal immunopositivity or absence of staining). ^bSignificant; goitre versus carcinomas: $P=0.0008$ (Fisher's exact test). ^cSignificant; adenoma versus carcinomas: $P=0.032$ (Fisher's exact test). ^dSignificant; papillary versus ATCs: $P=0.031$ (Fisher's exact test). ^eSignificant; follicular versus ATCs: $P<0.027$ (Fisher's exact test). (B) Representative immunostaining of Skp2 in normal and pathological thyroid tissue. Serial formalin-fixed paraffin-embedded sections from normal thyroid tissue (TN), goitre, FA, PTC, FTC and ATC were analysed for Skp2 expression. Most follicular epithelial cells from normal glandular tissue, goitre and FA are negative for Skp2 expression; several cancer cells show intense nuclear Skp2 expression in PTC, FTC and ATC. Magnification, 100 \times . (C) Semiquantitative RT-PCR analysis of Skp2 mRNA expression in thyroid tumours. Twenty-four cycles RT-PCR products were separated onto agarose gel, transferred to nylon membrane and hybridized. Actin expression was used as a loading control. TN, normal thyroid; FTA, follicular adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; PTC, papillary thyroid carcinoma; ATC, anaplastic thyroid carcinoma and C, blank control without DNA for PCR. (D) Skp2 relative gene number by Q-PCR. Control, DNA from normal peripheral blood lymphocytes. E. FISH analysis of primary thyroid carcinomas. Left, the white arrow points to a cell showing the normal complement of *Skp2* gene (red); right, the white arrow points to a cell showing multiple signals of Skp2 (red).

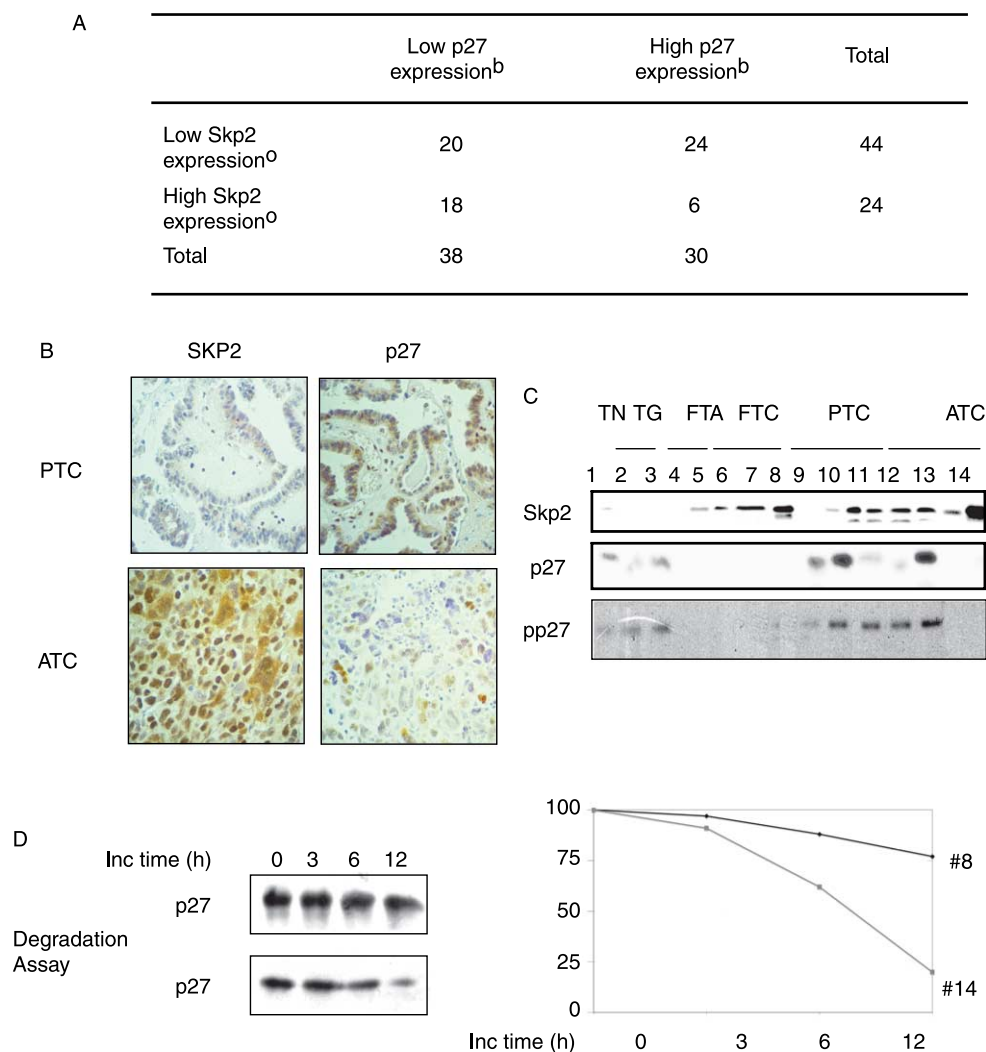


Figure 4 Correlation between Skp2 and p27 expression in thyroid primary tumours. (A) ^aCorrelation between the expression of Skp2 and p27 in thyroid tumours ($P=0.023$) with two-tailed Fisher's exact test. ^bCells were classified as p27-positive, if staining was observed in $>40\%$ of observed cells, or p27-negative, if staining was observed in $<40\%$ of observed cells. ^cCells were classified as Skp2-positive, if staining was observed in $>20\%$ of observed cells. (B) Immunostaining of Skp2 and p27 in a papillary tumour (PTC) that show low Skp2 and high p27 expression; immunostaining of Skp2 and p27 in an anaplastic tumour (ATC) with high Skp2 and low p27 expression. (C) Reciprocal expression of Skp2 and p27 in human primary thyroid carcinoma by western blot. TN, normal thyroid tissue; TG, goitre; FTA, follicular adenoma; FTC, follicular carcinoma; PTC, papillary carcinoma; TC, anaplastic carcinoma. D. Rate of p27 degradation in extracts from sample 8 or 14. One microgram of recombinant p27 was incubated at 37°C with $100\ \mu\text{g}$ proteasome extracts from tumours 8 and 14 for 0, 3, 6 or 12 h respectively, and the subsequent immunoblot analysis revealed the amount of intact p27 protein in different conditions. Half-life of p27 protein was of ~ 7 h in sample 14 and >12 h in sample 8.

expression group than in the high p27 expression group ($P<0.05$). Benign tumours that presented low expression of Skp2 (12 TG and 6 out of 8 FA) showed high nuclear expression of p27, whereas 18 out of 24 carcinomas with high Skp2 expression showed reduced levels of p27 protein. Figure 4B shows a representative immunostaining. Results were also confirmed by immunoblotting (Fig. 4C). To determine the contribution of T187 phosphorylation to p27 degradation, we

also determined p27 phosphorylation at T187 in the same samples of primary thyroid carcinomas (Fig. 4C). We found that most samples expressed high levels of Skp2 protein and thus lacked p27 and T187 phosphorylation, whereas a few samples (no. 10 and 13) showed low levels of Skp2 and high levels of p27. In these samples, the relative amount of T187-phosphorylated p27 was rather low. Conversely, in samples 11 and 12, which presented low levels of p27 protein,

the signal detected by the phospho-T187 antibody indicated that a great amount of p27 protein in those samples was phosphorylated. These studies indicated that Skp2 expression was inversely correlated with p27 levels and that both Skp2 levels and the different extent of T187 phosphorylation of p27 may contribute to determine p27 expression in thyroid cancer cells.

Since the reduction in p27 protein is brought about by ubiquitin–proteasome-mediated degradation, we also examined p27 degradation activity in these tissues. We compared the ability of proteasome extracts deriving from three different ATCs (that showed high levels of Skp2 protein) to degrade recombinant p27 in an *in vitro* degradation assay with that of two different PTCs with low Skp2 expression. Extracts from ATC showed higher p27 degradation activity in agreement with the very low level of p27 protein expression; conversely, extracts from PTC showed much lower p27 degrading activity (compare kinetics of p27 degradation rate in nos. 8 and 14 in Fig. 4D).

Subsequently, we investigated the molecular mechanisms whereby the expression of the Skp2 protein occurred in thyroid carcinomas. To this aim, we performed semiquantitative PCR analysis on RNA extracted from three normal thyroid tissues and 42 thyroid tumours (3 GT, 6 FA, 8 FTC, 16 PTC and 9 ATC). In a preliminary study, we determined the linearity of the PCR amplification and set the ideal conditions for Skp2 semiquantitative detection at 24 cycles. RT-PCR products were separated onto 1.2% agarose gels, transferred to nylon membranes and hybridized with a Skp2-specific probe. At this number of cycles, we found very low Skp2 mRNA expression in 3 out of 3 normal thyroid tissues and in 3 out of 3 GTs, in 4 out of 6 FAs; in contrast, 12 out of 16 PTCs, 5 out of 8 FTCs and 8 out of 9 ATCs showed consistent levels of Skp2 mRNA expression, confirming expression of Skp2 at the transcriptional level. Figure 3C shows an example of the semiquantitative PCR results, using actin primers as internal control of Skp2 expression. Similar results were obtained by Q-RT-PCR (not shown). As in cell lines, we found a significant relationship between Skp2 mRNA and protein levels also in primary tumours.

Subsequently, to determine whether the observed increased expression of Skp2 could be ascribed to gene amplification at 5p13, we examined the amplification status of the *Skp2* gene in the same samples analysed for protein and mRNA expression. Therefore, we performed Q-PCR on genomic DNA extracted from 23 thyroid tumours (nine PTCs, six FTCs and eight ATCs) using normal human lymphocytes as control. As with cell lines, the DNA copy number of the *Skp2* gene was

considered to be increased when the values obtained by Q-PCR analysis with the Skp2 primers, were greater than twofold the value obtained for normal diploid human lymphocytes. We found that, compared with normal lymphocytes, six out of eight ATCs, one out of nine PTCs and one out of six FTCs showed *Skp2* gene increased copy number (Fig. 3D). DNA amplification at 5p13 was also evaluated by performing FISH analysis on ten cases as described in Materials and Methods. FISH analysis demonstrated that the copy number of the *Skp2* gene was increased in all three ATCs analysed. Conversely, gain of chromosome 5p13 was observed only in one out of five PTCs and in one out of two FTCs (see Fig. 3E for a representative case). Therefore, our data suggest that gene amplification of the Skp2 locus at 5p13 represents a common event in ATC and may account for the observed increased expression of Skp2 mRNA and protein frequently observed in these tumours.

Skp2 is necessary for p27 degradation and cell proliferation in ATC cells

To determine the effects exerted by the block of Skp2 expression on p27 expression and cell proliferation in ATC cells, we made use of antisense technology. FRO and ARO cells were transfected with Skp2 antisense or control oligonucleotides (200 nM). After 48 h, cells were incubated with 10 μ M BrdU for 2 h and processed for western blot and indirect immunofluorescence. As shown in Fig. 5A, we were able to reduce Skp2 expression by >70% in ARO cells and almost 90% in FRO cells, whereas the same dose of control sequence-scrambled oligonucleotides (Fig. 5A and C) had no effect on the cellular levels of Skp2. In parallel with the decrease in Skp2 expression, the treatment of ATC cells with anti-Skp2 antisense oligonucleotides induced a marked induction of p27 protein levels. Such increase in p27 levels in AS-treated WRO cells results in increased binding of p27 to CDK2 and decreased activity of the kinase using the histone H1 as substrate (not shown).

Finally, we found that the capacity to incorporate BrdU of ARO and FRO cells was markedly reduced in cells that were administered antisense oligonucleotides (Fig. 5B, AS) compared with untransfected (Fig. 5B, C1), mock-transfected ATC cells (Fig. 5B, C2) or cells transfected with control oligonucleotides (Fig. 5B, C3). Similar results were observed when cells were analysed after 24 and 48 h of treatment. Figure 6C shows a representative BrdU incorporation experiment. The results derived from antisense experiments pointed to a prominent role of Skp2 in the proliferative potential of ATC cells.

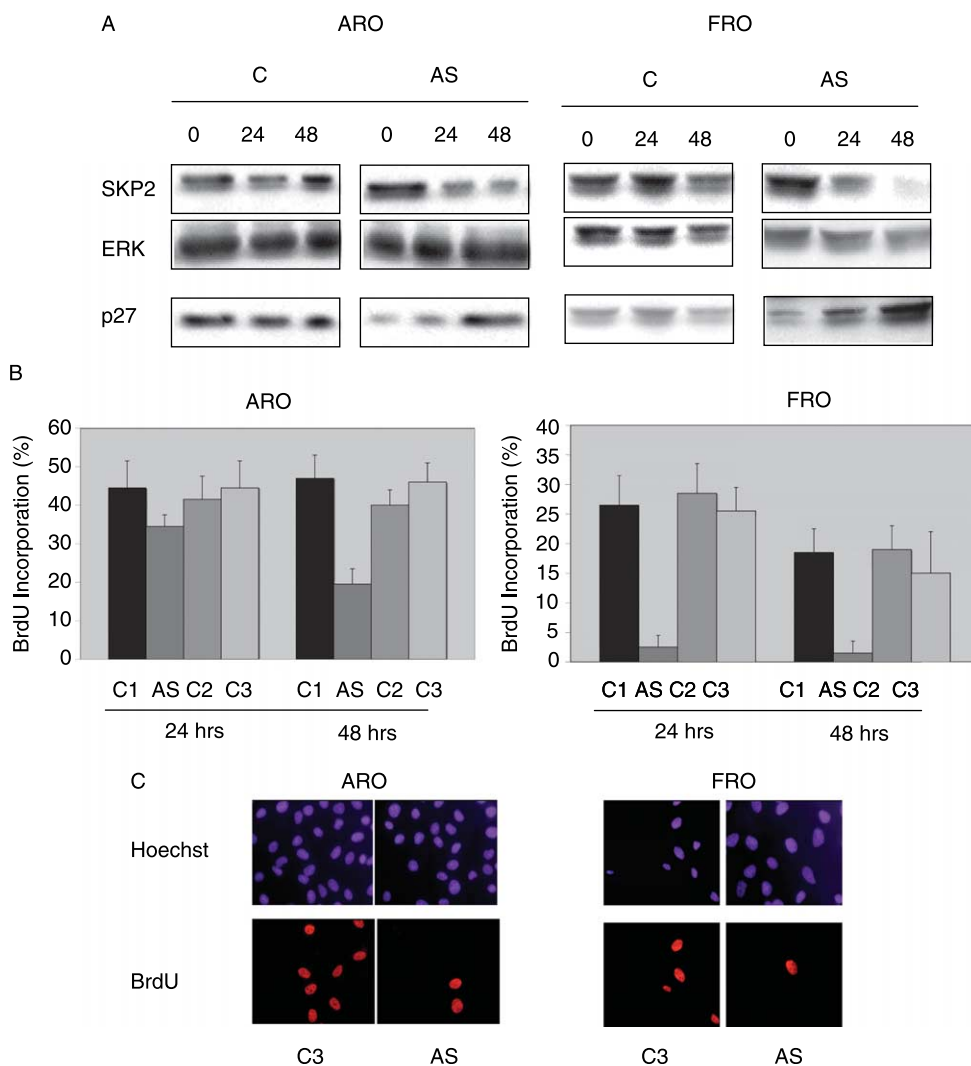


Figure 5 Suppression of Skp2 protein expression inhibits proliferation of human ATC cells. To suppress the expression of SKP2 in ATC cells, ARO and FRO cells were plated onto glass coverslips in DMEM containing 10% FBS and then transfected with SKP2 antisense or scrambled control oligonucleotides with oligofectamine. After 24 and 48 h, cells were incubated with 10 μ M BrdU and processed for western blot (A) or indirect immunofluorescence (B and C). A. Western blot analysis of cyclin SKP2 expression in the presence of control or anti-SKP2 antisense oligonucleotides. C1, untransfected cells; AS, anti-Skp2 oligonucleotide-transfected cells; C2, mock-transfected cells; C3, cells transfected with an oligonucleotide of scrambled sequence. B. Graphs indicate the percentage of BrdU-positive cells. BrdU-positive cells were evidenced using FITC-conjugated secondary antibodies. C. A representative BrdU incorporation experiment. Magnification, 63 \times .

Skp2 promotes cell in proliferating thyroid carcinoma cells

To further investigate the role played by Skp2 in the control of thyroid cell cycle progression, we transfected WRO cells with a plasmid that carry the cDNA encoding human Skp2 cDNA. Transfected cells were selected in G418-containing medium and several WRO-neo and WRO-Skp2 clones were isolated and expanded. The presence of the exogenous Skp2 protein in transfected cells was detected by western blot analysis (Fig. 6A). Two different WRO-neo (c1.2 and c1.9) and three

different WRO-Skp2 (c1.3, c1.5 and c1.17) clones were selected for biological studies. Since the same data were obtained with the three clones in all our experiments, we will refer to them as 'WRO or WRO-Skp2 cells'. As expected, forced expression of Skp2 protein in WRO cells promoted increased binding to T187-phosphorylated p27 (not shown) and reduced p27 levels (Fig. 6A).

We investigated whether the constitutive expression of Skp2 modified specific proliferative parameters of thyroid cells, including proliferation rate, serum requirement and contact inhibition of WRO cells.

To this aim, WRO or WRO-Skp2 cells were plated onto glass coverslips and, after allowing cells to attach for 24 h in complete medium, the medium was changed and the cells were grown in DMEM containing 10, 5, 1 and 0.1% FBS for further 24 h, incubated with 10 μ M BrdU and processed for indirect immunofluorescence. As shown in the graphs of Fig. 6B that indicate the percentage of BrdU-positive cells, BrdU incorporation of WRO-Skp2 cells was higher than that of parental WRO and WRO-neo cells. This effect was more evident for cells grown in serum as low as 1 and 0.1%. Figure 6B reports a representative experiment.

Although BrdU incorporation is a good measure of the rate of DNA synthesis, it does not measure cell division. To further characterize the effect of Skp2 overexpression on the proliferative potential of thyroid cancer cells, we measured the growth rates of parental and Skp2-transfected WRO cells in low or high serum content. WRO and WRO-Skp2 cells were plated in DMEM supplemented with 1% (low serum) or 10% (high serum) serum and counted daily for 6 days. A representative experiment of three is reported in Fig. 6C. As shown in the figure, the growth rate of WRO-Skp2 cells was higher compared with parental WRO cells, especially when grown in low serum-containing medium. Moreover, when grown at confluence, WRO-Skp2 cells incorporated more BrdU compared with WRO cells, which suggested that Skp2 relieved the growth arrest induced by high-density culturing in WRO cells (Fig. 6D).

Skp2 interacts with several cell cycle regulatory proteins (Zhang *et al.* 1995, Patton *et al.* 1998, Sutterluty *et al.* 1999, Philipp-Staheli *et al.* 2001). To determine whether the stimulation of proliferation induced by overexpression of Skp2 in WRO cells was entirely mediated by the reduction of p27 levels, we silenced p27 expression using lentiviral-transduced shRNA to p27 both in confluent and proliferating WRO cells. Although interference with p27 expression was complete in both confluent and proliferating WRO cells (not shown), we observed a partial but reproducible increase in the BrdU uptake of transduced confluent WRO cells compared with untransduced WRO cells or transduced with Mission non-target control transduction virus (Sigma SHC002V; Fig. 6D). This proliferative effects induced by interfering with p27 expression were observed only in confluent but not in proliferating WRO cells (Fig. 6D). These findings suggest that the effect on the proliferation of WRO cells exerted by Skp2 was mediated only in part by the control of p27 expression and that the regulation of other cell cycle regulatory proteins by Skp2 must

contribute to thyroid cancer cell proliferation, especially in proliferating cells.

In summary, these data indicate that Skp2 can act as a rate-limiting factor for G1/S transition in cultured thyroid cancer cells and its unrestrained expression removes the serum dependency constraint and impairs contact inhibition-induced G1 arrest.

Discussion

Here, we demonstrate that Skp2 protein is overexpressed in \sim 37% of surgically resected specimens from thyroid cancer patients. Interestingly, we found that Skp2 is significantly overexpressed in carcinomas but not in goitres or adenomas. Among malignant cancers, poorly differentiated carcinomas exhibit significantly higher levels of Skp2 protein compared with well-differentiated carcinomas of both follicular and papillary histotypes. These results are in agreement with previous studies that have shown Skp2 overexpression in different cancerous tissues (23–30), with a striking correlation between Skp2 overexpression and grade of malignancy, lymph node metastasis and poor prognoses (Gstaiger *et al.* 2001, Hershko *et al.* 2001, Kudo *et al.* 2001, Latres *et al.* 2001, Chiarle *et al.* 2002, Masuda *et al.* 2002, Signoretti *et al.* 2002, Li *et al.* 2004), and shed light on the molecular alterations that occur during thyroid carcinogenesis.

Skp2 is the substrate-recognizing subunit of an ubiquitin ligase named SCF complex (Deshaies 1999), and p27 is the target for ubiquitination and subsequent proteolysis by SCFSkp2 (Sutterluty *et al.* 1999, Slingerland & Pagano 2000, Philipp-Staheli *et al.* 2001). It is well known that reduced expression of p27 is frequently found in various cancers and correlated with poor survival of cancer patients (Slingerland & Pagano 2000, Philipp-Staheli *et al.* 2001). Cancer cells express low levels of p27 because of its decreased stability (Slingerland & Pagano 2000, Philipp-Staheli *et al.* 2001). Although some studies have proposed that the reduced stability of p27 protein observed in human cancer could be due to increased levels of Skp2, the detailed mechanism of abnormal degradation of p27 protein in cancer cells is still unclear.

Different groups including ours have previously reported that a substantial fraction of thyroid cancer presented reduced p27 expression (Erickson *et al.* 1998, Baldassarre *et al.* 1999, Tallini *et al.* 1999, Motti *et al.* 2005) and, most importantly, this was correlated with lymph node involvement and the presence of distant metastasis (Erickson *et al.* 1998, Kondo *et al.* 2006). In a recent study, we found that in more than two-third of the thyroid cancer samples analysed, the

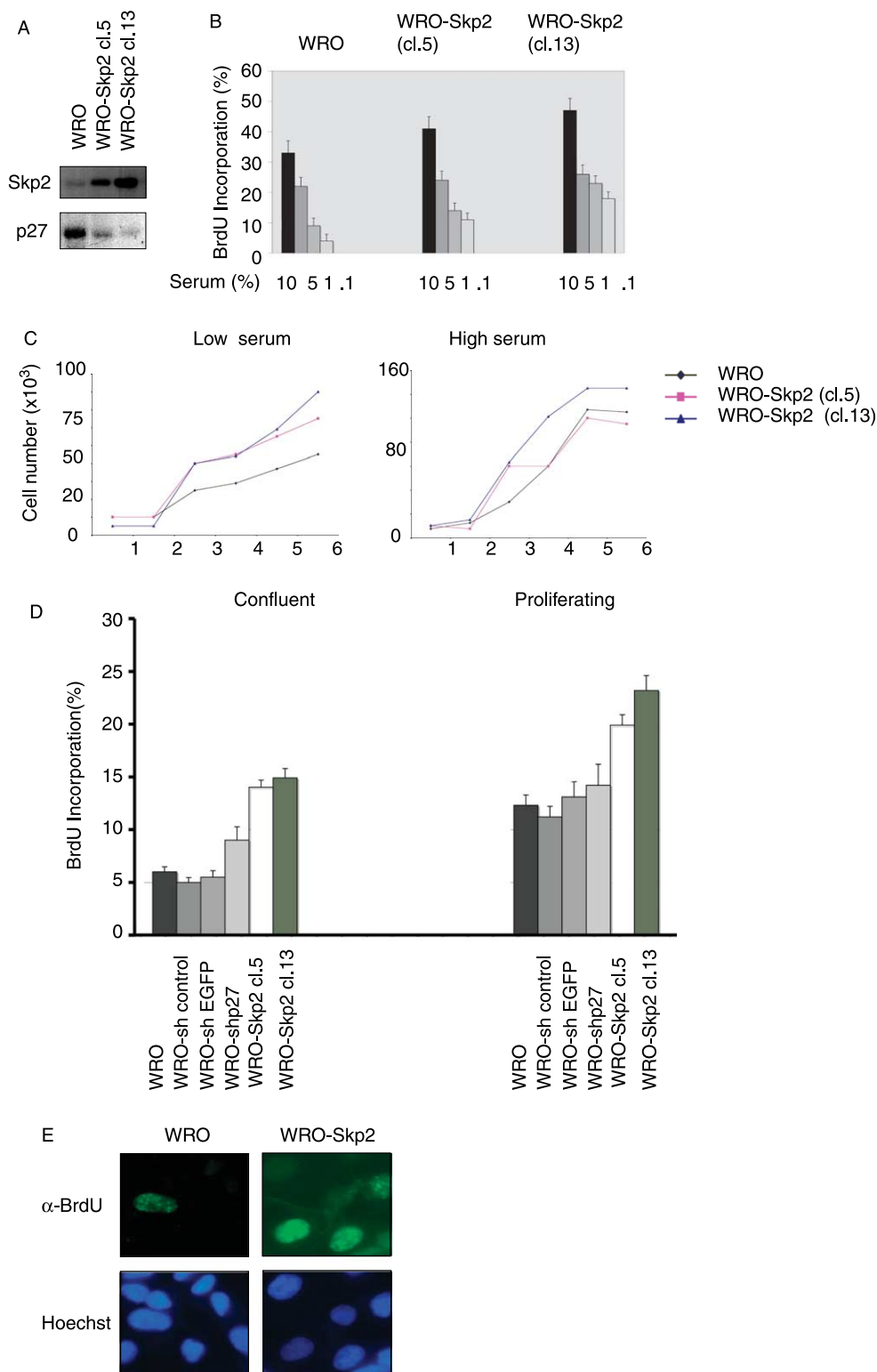


Figure 6 Skp2 promotes proliferation of thyroid cancer cells. (A) Effects of adoptive Skp2 expression on the growth rate of thyroid cancer cells. A. Skp2 and p27 expression in WRO and WRO-Skp2 (Cl.5 and Cl.13) cells. (B) WRO and WRO-Skp2 (Cl.5 and Cl.13) cells were plated onto glass coverslips in complete DMEM and, after 24 h, the medium was replaced with DMEM containing 10, 5, 1 and 0.1% FBS for further 24 h. Subsequently, cells were incubated with 10 μM BrdU and processed for indirect immunofluorescence.

reduction in the levels of p27 protein was not accompanied by a parallel reduction in the levels of the corresponding mRNA; conversely, tumours with low levels of p27 protein presented high rate of p27 degradative activity (Motti *et al.* manuscript in preparation). In the present study, we further extend these data and report that the enhanced degradation of p27 protein observed in thyroid cancer can be attributed to Skp2 overexpression. In fact, immunohistochemistry and immunoblot analysis demonstrated an inverse correlation between Skp2 and p27 expression ($n=68$; $P<0.05$). Thyroid tissue specimens presented three major patterns of Sp2/p27 expression: low p27 and high Skp2 levels in 26% of tumours, high p27 and low Skp2 levels in 35% of tumours and low Skp2 and p27 levels in 20% of tumours. Of note, only few cases expressed both high levels of Skp2 and p27. Accordingly, thyroid cancer cell lines and tissues that showed high levels of Skp2 protein presented high p27 degradation activity. The role of Skp2 in the regulation of p27 in thyroid cancer cells was further demonstrated by *in vitro* experiments with cultured model systems. Forced expression of Skp2 in WRO cells drastically reduced p27 expression and, in contrast, antisense oligonucleotide mediated suppression of Skp2 expression in two ATC cell lines (ARO and FRO) resulted in enhanced levels of p27 protein. These results suggest that the reduction in p27 protein at least in some thyroid cancer cases may be brought about by high Skp2-mediated degradation.

Moreover, the existence of some thyroid cancer cases that showed low expression of Skp2 and p27 implied that other systems might also regulate p27 protein expression. Recent studies showed that CDK subunit 1 (Cks1) was required for the ubiquitination of p27 by bridging Skp2 and its substrate, p27, *in vivo* and *in vitro* (Ganoth *et al.* 2001, Spruck *et al.* 2001). On the other hand, p27 degradation may be accomplished through Skp2-independent mechanisms (Hara *et al.* 2001, Kamura *et al.* 2004).

The mechanism for the overexpression of Skp2 in most cancer is still unknown, though amplification of the Skp2 locus was found in some tumours (lung, bladder and glioblastoma; Yokoi *et al.* 2002, 2004, Sanada *et al.* 2004, Saigusa *et al.* 2004, Coe *et al.* 2005,

Ohno *et al.*, 2005). In the work reported here, we showed that Skp2 was amplified in at least three out of six thyroid cancer-derived cell lines and in a significant fraction (35%) of primary thyroid carcinomas analysed, in particular ATC, providing evidence that amplification of the Skp2 locus at 5p13 represents one of the mechanisms capable of enhancing Skp2 expression in thyroid cancer. It is of note that our results confirm cytogenetic data indicating that gain of part or of the entire short arm of chromosome 5, where the *Skp2* gene maps, frequently occur in PTC, Hurthle carcinomas and ATC (Hemmer *et al.* 1999, Wada *et al.* 2002, Foukakis *et al.* 2005). However, other mechanisms must be involved in the dysregulation of Skp2 expression in thyroid cancer, since our results indicate that a fraction of thyroid carcinomas over-expresses Skp2 mRNA and protein in the absence of gene amplification of the Skp2 locus. Accordingly, it has been suggested that the expression of Skp2 protein may be regulated at post-transcriptional level (Bashir & Pagano 2004, Wei *et al.* 2004).

To investigate the effect of Skp2 in the proliferative activity of ATC cells, we made use of an antisense strategy. Transfection of an antisense oligonucleotide (AS) into cultured FRO and ARO cells decreased Skp2 protein levels and suppressed the growth of ATC cells *in vitro* by inhibiting the degradation of p27 via the ubiquitin–proteasome pathway. Conversely, AS treatment had no significant effect on cell viability during 24–70 h after transfection (not shown). In contrast, Skp2 transfection resulted in the promotion of proliferation in thyroid cancer cells that expressed low levels of Skp2. Forced expression of Skp2 in WRO cells circumvented serum dependency and contact inhibition, allowing WRO cells to cycle also in the presence of 1% of serum and in conditions of high density. Taking into account, our results of the inverse correlation between Skp2 and p27 in primary thyroid cancer tissues and cell lines and the observation that Skp2-overexpressors presented increased p27 degrading activity, the promotion of proliferation activity by Skp2 transfection into thyroid cancer cells may be attributable to p27 degradation following Skp2 overexpression. However, it is likely that different cell cycle regulatory proteins which are targeted by Skp2

Graphs indicate the percentage of BrdU-positive cells. (C) Growth rates of parental and Skp2-transfected WRO cells in low or high serum content. WRO and WRO-Skp2 (Cl.5 and Cl.13) cells were plated in DMEM supplemented with 1% (low serum) or 10% (high serum) FBS and counted daily for 6 days. A representative experiment of three is reported. (D) WRO and WRO-Skp2 (Cl.5 and Cl.13) cells were plated onto glass coverslips in complete DMEM, at <25% (low density) or >80% (high density) and allowed to grow as described in the text. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.2% Triton X-100. BrdU-positive cells were evidenced using FITC-conjugated secondary antibodies. Cell nuclei were identified by Hoechst staining. Fluorescence was visualized with a Zeiss 140 epifluorescent microscope. (E) A representative BrdU incorporation experiment. Magnification, 100 \times .

may contribute to thyroid cancer cell proliferation, since depletion of p27 in WRO cells only partially mimick the effects exerted by Skp2 cell proliferation.

Taken together, our findings are consistent with the current opinion indicating that Skp2 is an oncogene (Nakayama *et al.* 2000), regulating proliferation rate, resistance to apoptosis and higher potential for invasiveness, and motility in different carcinoma cells. In conclusion, these findings indicate that Skp2 may play an important role for the development of thyroid cancer, and that Skp2 overexpression could modulate the malignant phenotype of thyroid carcinoma, possibly by regulating the p27 protein level. However, it must be noted that in a certain fraction of thyroid carcinomas, p27 expression is not reduced (Erickson *et al.* 1998, Baldassarre *et al.* 1999, Tallini *et al.* 1999, Motti *et al.* 2005). Therefore, in these case mechanisms other than Skp2-dependent degradation of p27, such as sequestration into cyclin D/CDK complexes (Baldassarre *et al.* 1999) or phosphorylation-dependent cytoplasmic relocalization of p27 (Baldassarre *et al.* 1999, Vasko *et al.* 2004, Motti *et al.* 2005) have been proposed to contribute to inactivate p27 function.

Acknowledgements

We thank Dr Giulio Draetta (Milan, Italy) for providing the Skp2 plasmid. We would also like to thank Dr Elena Amendola and Dr Rosario Amato (Catanzaro, Italy) for helping in preliminary expression experiments. This work was supported by grants from the Associazione Italiana Ricerca sul Cancro (AIRC) to G V and D C by Progetto Finalizzato FSN2005 from Italian Minister of Health, PRIN2006 to G V and from Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), PI052509 and PI041313. Donatella Malanga is supported by Federazione Italiana Ricerca sul Cancro (FIRC). The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work. We would like to dedicate this work to the memory of Prof Salvatore Veruta, Chancellor of University 'Magna Graecia'.

References

- Baldassarre G, Belletti B, Bruni P, Boccia A, Trapasso F, Pentimalli F, Barone MV, Chiappetta G, Vento MT, Spiezia S *et al.* 1999 Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *Journal of Clinical Investigation* **104** 865–874.
- Bashir T & Pagano M 2004 Don't skip the G1 phase: how APC/CCdh1 keeps SCF/SKP2 in check. *Cell Cycle* **3** 850–852.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A & Pagano M 1999 SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology* **1** 193–199.
- Chiarle R, Fan Y, Piva R, Boggino H, Skolnik J, Novero D, Palestro G, De Wolf- Peeters C, Chilosi M, Pagano M *et al.* 2002 S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *American Journal of Pathology* **160** 1457–1466.
- Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162** 156–159.
- Coe BP, Henderson LJ, Garnis C, Tsao MS, Gazdar AF, Minna J, Lam S, Macaulay C & Lam WL 2005 High-resolution chromosome arm 5p array CGH analysis of small cell lung carcinoma cell lines. *Genes, Chromosomes and Cancer* **42** 308–313.
- Curcio F, Ambesi-Impiombato FS, Perrella G & Coon HG 1994 Long-term culture and functional characterization of follicular cells from adult normal human thyroids. *PNAS* **91** 9004–9008.
- Deshaies RJ 1999 SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15** 435–467.
- Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J & Lloyd RV 1998 Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Modern Pathology* **11** 169–174.
- Estour B, Van Herle AJ, Juillard GJ, Totanes TL, Sparkes RS, Giuliano AE & Klandorf H 1989 Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1). *Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* **57** 167–174.
- Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM & Paulin C 1994 Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoural markers. *Cancer* **73** 2206–2212.
- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH & Koeffler HP 1993 High prevalence of mutations of p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Investigation* **91** 179–184.
- Fiore L, Pollina LE, Fontanini G, Casalone R, Berlingieri MT, Giannini R, Pacini F, Miccoli P, Toniolo A, Fusco A *et al.* 1997 Cytokine production by a new undifferentiated human thyroid carcinoma cell line, FB-1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 4094–4100.
- Foukakis T, Thoppe SR, Lagercrantz S, Dwight T, Weng WH, Svensson A, Hoog A, Zedenius J, Wallin G, Lui WO *et al.* 2005 Molecular cytogenetic characterization of primary cultures and established cell lines from non-medullary thyroid tumors. *International Journal of Oncology* **26** 141–149.

- Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M & Hershko A 2001 The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nature Cell Biology* **3** 321–324.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J & Krek W 2001 Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *PNAS* **98** 5043–5048.
- Hanahan D & Weinberg RA 2000 The hallmarks of cancer. *Cell* **100** 57–70.
- Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S & Nakayama K 2001 Degradation of p27(Kip1) at the G(0)–G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *Journal of Biological Chemistry* **276** 48937–48943.
- Hedinger C, Williams ED. & Sobin LH. 1989 *Histological Typing of Thyroid Tumor*, pp 908–911. Heidelberg: Verlag.
- Hemmer S, Wasenius VM, Knuutila S, Franssila K & Joensuu H 1999 DNA copy number changes in thyroid carcinoma. *American Journal of Pathology* **154** 1539–1547.
- Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM & Hershko A 2001 Inverse relation between levels of p27Kip1 and of its ubiquitin ligase subunit SKp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* **91** 1745–1751.
- Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M & Harper JW 2004 Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes and Development* **18** 2573–2580.
- Kamura T, Hara T, Matsumoto M, Ishida N, Okumura F, Hatakeyama S, Yoshida M, Nakayama K & Nakayama KI 2004 Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nature Cell Biology* **6** 1229–1235.
- Kipreos ET & Pagano M 2000 The F-box protein family. *Genome Biology* **1** 3002.1–3002.7.
- Kondo T, Ezzat S & Asa SL 2006 Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nature Reviews. Cancer* **6** 292–306.
- Kudo Y, Kitajima S, Sato S, Miyauchi M, Ogawa I & Takata T 2001 High expression of S-phase kinase-interacting protein 2, human F-box protein, correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Research* **61** 7044–7047.
- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Kitagawa M, Miyauchi M & Takata T 2005 Small interfering RNA targeting of S phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell growth of oral cancer cells by inhibiting p27 degradation. *Molecular Cancer Therapeutics* **4** 471–476.
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami G & Pagano M 2001 Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *PNAS* **98** 2515–2520.
- Li Q, Murphy M, Ross J, Sheehan C & Carlson JA 2004 Skp2 and p27kip1 expression in melanocytic nevi and melanoma: an inverse relationship. *Journal of Cutaneous Pathology* **31** 633–642.
- Livak KJ & Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(–ΔΔ C(T)) method. *Methods* **25** 402–408.
- Malumbres M & Barbacid M 2001 To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews. Cancer* **1** 222–231.
- Masuda TA, Inoue H, Sonoda H, Mine S, Yoshikawa Y, Nakayama K, Nakayama K & Mori M 2002 Clinical and biological significance of S-phase kinase-associated protein (Skp2) gene expression in gastric carcinoma: modulation of malignant phenotype by Skp2 overexpression, possibly via p27 proteolysis. *Cancer Research* **62** 3819–3825.
- Motti ML, Califano D, Troncone G, De Marco C, Migliaccio I, Palmieri E, Pezzullo L, Palombini L, Fusco A & Viglietto G 2005 Complex regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 in thyroid cancer cells by the PI3K/AKT pathway: regulation of p27kip1 expression and localization. *American Journal of Pathology* **166** 737–749.
- Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T & Ishida N 2000 Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27Kip1, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO Journal* **19** 2069–2081.
- Ohno K, Imoto I & Inazawa J 2005 Overexpressed Skp2 within 5p amplification detected by array-based comparative genomic hybridization is associated with poor prognosis of glioblastomas. *Cancer Science* **96** 676–683.
- Ohta K, Pang XP, Berg L & Hershman JM 1997 Growth inhibition of new human thyroid carcinoma cell lines by activation of adenylate cyclase through the b-adrenergic receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 2633–2638.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF & Rolfe M 1995 Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269** 682–685.
- Pang XP, Hershman JM, Chung M & Pekary AE 1989 Characterization of tumour necrosis factor-alpha receptors in human and rat thyroid cells and regulation of the receptors by thyrotropin. *Endocrinology* **125** 245–249.
- Patton EE, Willems AR & Tyers M 1998 Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends in Genetics* **14** 236–243.
- Philipp-Staheli J, Payne SR & Kemp CJ 2001 p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Experimental Cell Research* **264** 148–168.
- Saigusa K, Hashimoto N, Tsuda H, Yokoi S, Maruno M, Yoshimine T, Aoyagi M, Sanada T, Yokoi S, Arii S *et al.* 2004 Skp2 overexpression is a p27Kip1-independent predictor of poor prognosis in patients with biliary tract cancers. *Cancer Science* **95** 969–976.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1992 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanada T, Yokoi S, Arai S, Yasui K, Imoto I & Inazawa J 2004 Skp2 overexpression is a p27Kip1-independent predictor of poor prognosis in patients with biliary tract cancers. *Cancer Science* **95** 969–976.
- Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM & Clurman BE 1997 Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes and Development* **11** 1464–1478.
- Sherman SI 2003 Thyroid carcinoma. *Lancet* **361** 501–511.
- Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M, Monti F, Loda M & Pagano M 2002 Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *Journal of Clinical Investigation* **110** 633–641.
- Slingerland J & Pagano M 2000 Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *Journal of Cellular Physiology* **183** 10–17.
- Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith AP, Ryan A, Krek TW & Reed SI 2001 A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Molecular Cell* **7** 639–650.
- Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U & Krek W 1999 p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nature Cell Biology* **1** 207–214.
- Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, Zelteman D, Viale G, Bosari S & Carcangiu ML 1999 Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *American Journal of Surgical Pathology* **23** 678–685.
- Tanaka J, Ogura T, Sato H & Datano M 1987 Establishment and biological characterization of an *in vitro* human cytomegalovirus latency model. *Virology* **161** 62–72.
- Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee S, Sun H & Zhang H 1999 p27Kip1 ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Current Biology* **2** 661–664.
- Vasko V, Saji M, Hardy E, Kruhlak M, Larin A, Savchenko V, Miyakawa M, Isozaki O, Murakami H, Tsushima T et al. 2004 Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *Journal of Medical Genetics* **41** 161–170.
- Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschlis P, Bellacosa A et al. 2001 Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nature Medicine* **8** 1136–1144.
- Wada N, Duh QY, Miura D, Brunaud L, Wong MG & Clark OH 2002 Chromosomal aberrations by comparative genomic hybridization in hurthle cell thyroid carcinomas are associated with tumor recurrence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 4595–4601.
- Wei W, Ayad NG, Wan Y, Zhang GJ, Kirschner MW & Kaelin WG 2004 Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428** 194–198.
- Yokoi S, Yasui K, Saito-Onara F, Koshikawa K, Lizasa T, Fujisawa T, Terasaki T, Horii A, Takahashi T, Hirohashi S et al. 2002 A novel target gene, SKP2, within the 5p13 amplicon that is frequently detected in small cell lung cancers. *American Journal of Pathology* **161** 207–216.
- Yokoi S, Yasui K, Mori M, Iizasa T, Fujisawa T & Inazawa J 2004 Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. *American Journal of Pathology* **165** 175–180.
- Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K & Beach D 1995 p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* **82** 915–925.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L & Trono D 1997 Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nature Biotechnology* **15** 871–875.

9 OTRAS PUBLICACIONES

1: J Med Genet. 2008 Apr;45(4):233-8. Epub 2007 Dec 5.

Molecular characterisation of a common SDHB deletion in paraganglioma patients.

Cascón A, Landa I, López-Jiménez E, Díez-Hernández A, Buchta M, Montero-Conde C, Leskelä S, Leandro-García LJ, Letón R, Rodríguez-Antona C, Eng C, Neumann HP, Robledo M.

BACKGROUND: Hereditary susceptibility to familial paraganglioma syndromes is mainly due to mutations in one of six genes, including three of the four genes encoding the subunits of the mitochondrial succinate dehydrogenase complex II. Although prevalence, penetrance and clinical characteristics of patients carrying point mutations affecting the genes encoding succinate dehydrogenase have been well studied, little is known regarding these clinical features in patients with gross deletions. Recently, we found two unrelated Spanish families carrying the previously reported SDHB exon 1 deletion, and suggested that this chromosomal region could be a hotspot deletion area. **METHODS:** We present the molecular characterisation of this apparently prevalent mutation in three new families, and discuss whether this recurrent mutation is due either to the presence of a founder effect or to a hotspot. **RESULTS:** The breakpoint analysis showed that all Iberian Peninsular families described harbour the same exon 1 deletion, and that a different breakpoint junction segregates in an affected French pedigree. **CONCLUSIONS:** After haplotyping the SDHB region, we concluded that the deletion detected in Iberian Peninsular people is probably due to a founder effect. Regarding the clinical characteristics of patients with this alteration, it seems that the presence of gross deletions rather than point mutations is more likely related to abdominal presentations and younger age at onset. Moreover, we found for the first time a patient with neuroblastoma and a germline SDHB deletion, but it seems that this paediatric neoplasia in a pheochromocytoma family is not a key component of this disease.

2: Endocr Relat Cancer. 2007 Sep;14(3):645-54.

Cytochrome P450 3A5 is highly expressed in normal prostate cells but absent in prostate cancer.

Leskelä S, Honrado E, Montero-Conde C, Landa I, Cascón A, Letón R, Talavera P, Cózar JM, Concha A, Robledo M, Rodríguez-Antona C.

Testosterone is essential for the growth and function of the luminal prostate cells, but it is also critical for the development of prostate cancer, which in the majority of the cases derives from luminal cells. Cytochrome P450 3A (CYP3A) enzymes hydroxylate testosterone and dehydroepiandrosterone to less active metabolites, which might be the basis for the association between CYP3A polymorphisms and prostate cancer. However, it is unknown whether the CYP3A enzymes are expressed at relevant levels in the prostate and which polymorphisms could affect this tissue-specific CYP3A activity. Thus, we measured CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, and CYP3A43 mRNA in 14 benign prostatic hyperplasias and ten matched non-tumoral/tumoral prostate samples. We found that CYP3A5 mRNA in non-tumoral prostate tissue was 10% of the average amount of liver samples, whereas the expression of the other CYP3A genes was much lower. Similarly to liver, CYP3A5*3 polymorphism decreased CYP3A5 mRNA content 13-fold. CYP3A5 protein was detected in non-tumoral prostate microsomes by western blot, and immunohistochemistry (IHC) localized CYP3A5 exclusively in the basolateral prostate cells. In contrast to the normal tissue, IHC and RT-PCR showed that tumoral tissue lacked CYP3A5 expression. In conclusion, prostate basolateral cells express high levels of CYP3A5 which dramatically decrease in tumoral tissue. This finding supports an endogenous function of CYP3A5 related to the metabolism of intra-prostatic androgens and cell growth, and that polymorphisms affecting CYP3A5 activity may result in altered prostate cancer risk and aggressiveness.

3: Cancer Res. 2007 Oct 1;67(19):9561-7.

Association study of 69 genes in the ret pathway identifies low-penetrance loci in sporadic medullary thyroid carcinoma.

Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Milne RL, Moya CM, Cebrián A, Letón R, Cascón A, Mercadillo F, Landa I, Borrego S, Pérez de Nanclares G, Alvarez-Escolá C, Díaz-Pérez JA, Carracedo A, Urioste M, González-Neira A, Benítez J, Santisteban P, Dopazo J, Ponder BA, Robledo M; Medullary Thyroid Carcinoma Clinical Group.

To date, few association studies have been done to better understand the genetic basis for the development of sporadic medullary thyroid carcinoma (sMTC). To identify additional low-penetrance genes, we have done a two-stage case-control study in two European populations using high-throughput genotyping. We selected 417 single nucleotide polymorphisms (SNP) belonging to 69 genes either related to RET signaling pathway/functions or involved in key processes for cancer development. TagSNPs and functional variants were included where possible. These SNPs were initially studied in the largest known series of sMTC cases (n = 266) and controls (n = 422), all of Spanish origin. In stage II, an independent British series of 155 sMTC patients and 531 controls was included to validate the previous results. Associations were assessed by an exhaustive analysis of individual SNPs but also considering gene- and linkage disequilibrium-based haplotypes. This strategy allowed us to identify seven low-penetrance genes, six of them (STAT1, AURKA, BCL2, CDKN2B, CDK6, and COMT) consistently associated with sMTC risk in the two case-control series and a seventh (HRAS) with individual SNPs and haplotypes associated with sMTC in the Spanish data set. The potential role of CDKN2B was confirmed by a functional assay showing a role of a SNP (rs7044859) in the promoter region in altering the binding of the transcription factor HNF1. These results highlight the utility of association studies using homogeneous series of cases for better understanding complex diseases.

4: Hum Mutat. 2007 Jun;28(6):613-21.

Loss of the actin regulator HSPC300 results in clear cell renal cell carcinoma protection in Von Hippel-Lindau patients.

Cascón A, Escobar B, Montero-Conde C, Rodríguez-Antona C, Ruiz-Llorente S, Osorio A, Mercadillo F, Letón R, Campos JM, García-Sagredo JM, Benítez J, Malumbres M, Robledo M.

Clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) is the most common malignant neoplasm of the kidney. The majority of hereditary and sporadic ccRCC cases are associated with germline and somatic mutations in the Von Hippel-Lindau gene (VHL), respectively. Gross deletions at the VHL locus can result either in ccRCC or in a mild clinical phenotype, with the absence of ccRCC development. Our goal in this study was to identify the molecular basis responsible for these differences in the clinical behavior in order to predict patients' phenotype. Using multiplex ligation-dependent amplification (MLPA), we identified and characterized gross VHL deletions in Spanish VHL families. A candidate gene related to this clinical association, HSPC300, was identified and depleted by RNA interference. It was possible to narrow the susceptibility region related to the mild clinical phenotype down to approximately 14 kb that included HSPC300 (C3orf10), a regulator of actin dynamics and cytoskeleton organization. Whereas 9 out of 10 families with ccRCC retained HSPC300 in the germline, loss of the HSPC300 locus was associated with mild clinical presentation of the disease in 6 out of 8 families. In fact, genetic depletion of HSPC300 resulted in cytoskeleton abnormalities and cytokinesis arrest in several tumor cell lines including ccRCC cells, suggesting that tumor cell proliferation was compromised in the absence of HSPC300. These clinical and functional data indicate a relevant function of HSPC300 in tumor cell progression, and suggest future therapeutic strategies based upon the inhibition of HSPC300 in renal cell carcinoma and possibly on other cancers.

5: Genes Chromosomes Cancer. 2006 Mar;45(3):213-9.

Gross SDHB deletions in patients with paraganglioma detected by multiplex PCR: a possible hot spot?

Cascón A, Montero-Conde C, Ruiz-Llorente S, Mercadillo F, Letón R, Rodríguez-Antona C, Martínez-Delgado B, Delgado M, Díez A, Rovira A, Díaz JA, Robledo M.

Pheochromocytoma and paraganglioma are rare neuroendocrine tumors that arise in the adrenal medulla and the extra-adrenal paraganglia, respectively. Inheritance of these tumors is mainly a result of mutations affecting the VHL, RET, NF1, and SDH genes. Germ-line mutations of the SDH genes have been found to account for nearly 10% of apparently sporadic cases. Nevertheless, alterations other than point mutations have not yet been well characterized. In this study, we investigated the frequency of gross SDH deletions in 24 patients who tested negative for point mutations and had at least one of the recommended features for genetic testing. For this purpose, we used a technique that is easy to implement in the lab to specifically detect gross deletions affecting SDHB, SDHC, and SDHD. We identified 3 heterozygous SDHB deletions (3/24) in 3 independent cases with paraganglioma: 1 whole SDHB deletion and 2 deletions exclusively affecting exon 1. These latter mutations match the unique gross deletion previously reported, indicating this region could be a hot spot for gross SDHB deletions. It seems likely that these alterations can account for a considerable number of both familial and apparently sporadic paraganglioma cases. Although this is the first report describing the presence of gross deletions in patients with apparently sporadic paragangliomas, the extra-adrenal location of the tumor seems to constitute a determining factor for whether to include these patients in genetic testing for gross deletions in the SDHB gene.

6: J Clin Endocrinol Metab. 2005 Apr;90(4):2127-30. Epub 2004 Dec 28.

Succinate dehydrogenase D variants do not constitute a risk factor for developing C cell hyperplasia or sporadic medullary thyroid carcinoma.

Cascon A, Cebrian A, Pollan M, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Leton R, Gutierrez R, Lesueur F, Milne RL, Gonzalez-Albarran O, Lucas-Morante T, Benitez J, Ponder BA, Robledo M.

Medullary thyroid carcinoma (MTC) is a tumor that arises from parafollicular cells of the thyroid gland. MTC can occur sporadically (75%) or as part of inherited cancer syndromes (25%). In most cases, hereditary MTC evolves from preneoplastic C cell hyperplasia (CCH), so early detection of this pathology would evidently be critical. A recent study reports that alterations in succinate dehydrogenase (SDH) D are responsible for familial non-RET CCH. First, we studied SDHD in two families with hereditary non-RET CCH and found no alterations related to the inheritance of this disease. Then, we investigated whether the H50R variant could be a risk factor in the sporadic development of MTC in both Spanish and English patients. We found no evidence that the presence of the H50R is strongly associated with the risk of sporadic MTC, although we did observe an association with age at diagnosis of MTC in Spanish H50R carriers that we did not find in English patients. Finally, we looked for evidence of CCH or any other thyroid disease in a panel of germ-line SDH (B or D) mutation carriers and found none. We conclude that SDHD variants do not constitute a risk factor for developing CCH or sporadic MTC.

7: Genes Chromosomes Cancer. 2005 Mar;42(3):260-8.

A novel candidate region linked to development of both pheochromocytoma and head/neck paraganglioma.

Cascón A, Ruiz-Llorente S, Rodríguez-Perales S, Honrado E, Martínez-Ramírez A, Letón R, Montero-Conde C, Benítez J, Dopazo J, Cigudosa JC, Robledo M.

Although the histologic distinction between pheochromocytomas and head and neck paragangliomas is clear, little is known about the genetic differences between them. To date, various sets of genes have been found to be involved in inherited susceptibility to developing both tumor types, but the genes involved in sporadic pathogenesis are still unknown. To define new candidate regions, we performed CGH analysis on 29 pheochromocytomas and on 24 paragangliomas mainly of head and neck origin (20 of 24), which allowed us to differentiate between the two tumor types. Loss of 3q was significantly more frequent in pheochromocytomas, and loss of 1q appeared only in paragangliomas. We also found gain of 11q13 to be a significantly frequent alteration in malignant cases of both types. In addition, recurrent loss of 8p22-23 was found in 62% of pheochromocytomas (including all malignant cases) versus in 33% of paragangliomas, suggesting that this region contains candidate genes involved in the pathogenesis of this abnormality. Using FISH analysis on tissue microarrays, we confirmed genomic deletion of this region in 55% of pheochromocytomas compared to 12% of paragangliomas. Loss of 8p22-23 appears to be an important event in the sporadic development of these tumors, and additional molecular studies are necessary to identify candidate genes in this chromosomal region.