

69
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

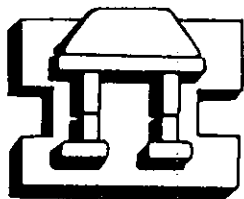
CAMPUS IZTACALA

Activación de la proteína oncogénica RET en Carcinomas
Papilares Tiroideos Humanos.

Biologo

T E S I S T A

IVAN MARTINEZ MONROY



IZTACALA

ASESOR DE TESIS: D. EN C. MAURICIO SALCEDO VARGAS.

MARZO DE 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

260565



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

-A MIS PADRES:

Jesús y Eva, a quienes les debo todo lo que soy y todo lo que espero ser. Sin su amor , confianza y apoyo incondicional en todo lo que he logrado hasta ahora, simplemente no estaría aquí.

-A MIS HERMANOS:

Jesús y Mauricio, gracias por ayudarme y aguantarme durante toda esta etapa de mi vida, y espero apoyarlos de la misma forma en que ustedes lo hicieron.

-A MAURICIO:

Por guiarme en la realización de este proyecto, y al mismo tiempo ayudarme en mi desarrollo como futuro investigador.

-A MIS AMIGOS DE LA CARRERA:

Por haberme aguantado durante todo ese tiempo tan importante en mi vida y por haber compartido alegrías, esperanzas y vivencias conmigo. Jamas los olvidaré, Gracias: Alfredo, Moni, Kena, Ale, Luisillo, Isra, Carlos, Rocio, Liz, Marcela, Ana, Charlotte y Malinali.

-A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO:

Por ayudarme en todo lo que ha sido mi formación, y por su valiosa amistad dentro y fuera del Laboratorio. Gracias: Alfredo (otra vez!), Carlos F., El Dr. Hector Mayani, Bety, Sonia, Ramón, Carlos P., Ricardo, Paty, y las hematopoyas (Dra. Laura, Ale, Kena y Margarita).

"Llegará una época en la que una investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas. La vida de una sola persona, aunque estuviera toda ella dedicada al ciclo, sería insuficiente para investigar una materia tan vasta.....Por lo tanto, este conocimiento sólo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades. Llegará una época en que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoráramos cosas que para ellos son tan claras.....Muchos son los descubrimientos reservados para las épocas futuras, cuando se haya borrado el recuerdo de nosotros. Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera a cada época algo que investigar.....La naturaleza no revela sus misterios de una vez y para siempre".

*Seneca, Cuestiones Naturales
Libro 7, Siglo primero después de Cristo.*

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	7
Aspectos generales de las enfermedades neoplásicas.....	7
Bases moleculares de la carcinogénesis.....	8
LA GLÁNDULA TIROIDES.....	9
Aspectos anatómicos y funcionales de la tiroides.....	9
EL CÁNCER DE TIROIDES.....	10
Clasificación histológica de las lesiones neoplásicas en tiroides.....	10
TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DEL CPT.....	14
Técnica Inmunohistoquímica y sus variantes.....	14
LA ONCOPROTEÍNA RET Y EL CPT.....	15
Características del proto-oncogén ret.....	16
Identificación y descripción de los diferentes rearrreglos RET/PTC.....	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
Tejidos y muestras.....	22
Detección de la oncoproteína RET mediante la técnica de Inmunohistoquímica.....	22
Detección de transcritos del oncogén ret mediante la técnica de Hibridación in situ.....	23
RESULTADOS.....	24

La proteína RET no se encontró expresada en los Adenomas Tiroideos y solo se observó su expresión en células parafoliculares de tejido sano y en el control positivo que fue el Carcinoma Medular Tiroideo.....	25
La proteína RET se expresa en un gran número de muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo.....	31
El análisis estadístico de los resultados entre los tumores positivos y negativos para la proteína RET junto con los subtipos histológicos y algunos datos clínicos, muestran ciertas diferencias entre ellos.....	37
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES.....	43
REFERENCIAS.....	44

INTRODUCCIÓN

El desarrollo del cáncer ya no es un misterio. Durante las últimas dos décadas, la investigación del cáncer ha progresado asombrosamente en la identificación de las bases más profundas en este proceso, llegando incluso hasta el nivel molecular. En realidad, el término "cáncer" se refiere a más de 100 formas diferentes de la enfermedad, ya que en cada tejido de nuestro cuerpo puede generarse esta malignidad, y es más, en un solo tejido pueden originarse diferentes tipos, por lo que cada cáncer tiene características muy particulares. Aun así, el proceso básico que produce esta diversidad de tumores parece ser muy similar en todos los cánceres (1).

En base a los últimos descubrimientos realizados en el campo de la biología y la genética molecular, se puede decir que el cáncer es una enfermedad genética la cual es provocada por los daños en el material genético (mutaciones) y específicamente en los genes involucrados en la regulación de los procesos normales de replicación y reparación del ADN, junto con los genes de proliferación y diferenciación celular. Estos cambios pueden ser provocados por agentes ambientales (radiación), exposición a agentes químicos (asbestos), agentes biológicos (virus), y algunas veces por la herencia de algún gen alterado, en donde se le llama cáncer familiar (2). Los genes que controlan estos procesos y que tienen el potencial de provocar una neoplasia maligna se les conoce como proto-oncogenes, mientras que los genes con el potencial de bloquearlo se les llama genes supresores de tumor ó anti-oncogenes. Los proto-oncogenes al sufrir cambios en el control de su expresión debido a diversas mutaciones (mutaciones puntuales, translocaciones, amplificaciones, inserciones, etc.), se comportan de forma anormal y es cuando se les nombra oncogenes, los cuales ya pueden cooperar para la formación de un tumor. Al mismo tiempo, los genes supresores de tumor, cuya función normalmente es la de gobernar la proliferación celular, al sufrir mutaciones (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones, etc.) que les provoquen la pérdida de esta función, hace que se pierda el control de freno de esta proliferación lo que también induce la formación de un tumor (3).

Cuando una célula se vuelve tumorigénica, le ocurren principalmente tres diferentes cambios:

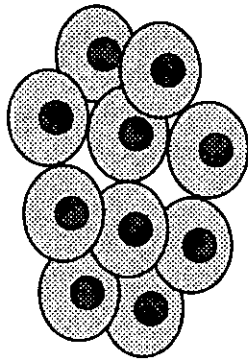
- Inmortalización: se describe como la capacidad de proliferar indefinidamente (sin que necesariamente existan otros cambios fenotípicos), esta característica involucra cambios en el control de la proliferación que todavía a nivel molecular no han sido bien comprendidos. Cuando se toman células de un vertebrado y las ponemos en cultivo *in vitro* (cultivo primario), éstas crecen durante un número determinado de divisiones (aproximadamente 50) y entonces entran en crisis y la mayoría de las células muere. Las sobrevivientes de esta crisis tienen la capacidad de dividirse indefinidamente (línea celular establecida), pero obviamente sus características genéticas han cambiado.

- Transformación: describe la incapacidad de la célula tumorigénica para comportarse bajo las limitaciones normales de la proliferación; por ejemplo, en un cultivo *in vitro* las células transformadas se vuelven independientes de los factores necesarios para su crecimiento, se anula la inhibición por contacto, por lo que las células cancerosas crecen hasta alcanzar altas densidades y se apilan unas sobre otras formando focos.

- Metástasis: describe la característica más dañina para el organismo, en la cual la célula cancerosa adquiere la capacidad de invadir tejido normal, pudiéndose mover de su tejido de origen y establecer una nueva colonia en cualquier otra parte del cuerpo. Este fenómeno se inicia cuando varias células cancerosas se desprenden del tumor original, llamado tumor primario y comienza el proceso denominado invasión, donde la célula cancerosa atraviesa la matriz extracelular con objeto de llegar a un vaso sanguíneo o linfático, y es ahí donde se lleva a cabo la fase de penetración o ingreso al vaso a través de su membrana. Una vez dentro del torrente circulatorio, ya sea como resultado de procesos mitóticos o por asociación con otras células metastásicas presentes en el torrente sanguíneo se produce el fenómeno de agregación. Por último, las células salen del torrente circulatorio (evasión), atravesando nuevamente la matriz celular y originando la formación de un tumor secundario (4) (Figura I).

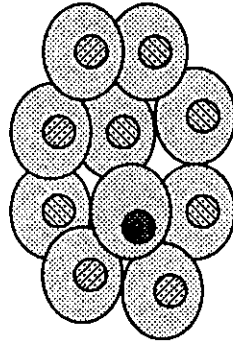
Por todo lo anterior, se puede resumir que el cáncer es un proceso complejo que se da en etapas múltiples con un origen multifactorial. Al parecer, en humanos es necesario que se alteren al menos de 3 a 4 proto-oncogenes y 2 genes supresores de tumor para que se

INMORTALIZACIÓN



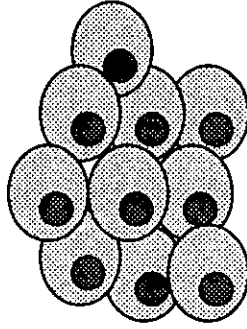
Células Primarias

El cultivo *in vitro* obtenido de un organismo se divide por varias veces



Crisis

La mayoría de las células mueren, pero algunas pocas sobreviven debido a cambios genéticos y no fenotípicos.

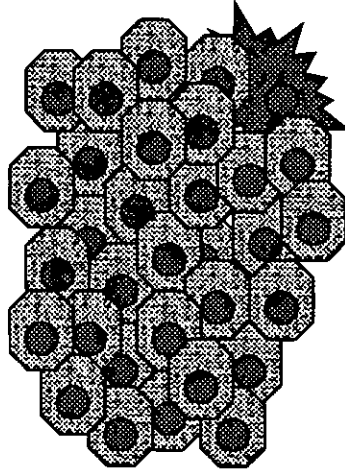


Establecimiento de la línea celular

Se dividen indefinidamente pero las células continúan adheriéndose al sustrato, requieren nutrientes y se inhibe su crecimiento al contacto



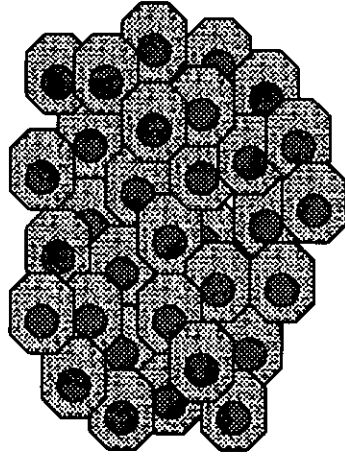
METÁSTASIS



Células tumorigénicas

Las células se vuelven móviles y pueden migrar para empezar nuevas colonias

TRANSFORMACIÓN



Células transformadas

se vuelven independientes de nutrientes, no existe inhibición por contacto y se apilan formando focos

FIGURA I Existen 3 diferentes cambios que distinguen a una célula cancerosa de una célula normal, algunos cambios secuenciales en cultivos celulares pueden ser correlacionados con los cambios en la tumorigénesis.

Commercial
Technical
Journal

de el desarrollo de un tumor maligno y otro par de genes durante el proceso de metástasis (1). Este tipo de cooperación entre oncogenes y la ausencia de los genes supresores, sugiere que para que se de el proceso de malignización es necesario que sucedan fenómenos que ocurren a nivel de membrana, citoplasma y dentro del núcleo celular (4) (Figura II).

LA GLÁNDULA TIROIDES

La glándula tiroides es uno de los primeros órganos en realizar su aparición, tanto en el desarrollo embrionario como en el desarrollo de la especie (5). La tiroides es una glándula endócrina de origen endodérmico desarrollada a partir de una evaginación de la base de la lengua (*Foramen cecum*), y se encuentra localizada por delante de la tráquea y del esófago, y en íntima relación con los cartílagos de la laringe. Esta glándula está constituida por dos lóbulos laterales y simétricos conectados entre sí por un istmo (6). El folículo tiroideo es la unidad anatómica y funcional de la tiroides; tiene forma esférica y esta compuesta por una capa de células epiteliales cuboides, conocidas como células foliculares, cuyo tamaño depende de la actividad glandular; estas células rodean el lumen folicular, que contiene un material llamado coloide, constituido en un 75 a 90% por tiroglobulina, proteína secretada por las células foliculares, y el 10 a 25% restante corresponde a otras proteínas. Los folículos son de diversos tamaños y se encuentran separados entre sí por pequeñas cantidades de tejido conectivo y por células "C" ó parafoliculares, productoras de tirocalcitonina y prostaglandinas, las cuales tienen un origen diferente al de las células foliculares ya que son de origen neuroendócrino (7) (Figura III). Las células foliculares tienen las siguientes funciones primordiales: captar y transportar iodo, sintetizar tiroglobulina (TG) y secretarla hacia el coloide, separar las hormonas tiroideas de la molécula de TG y secretar las hormonas tiroideas a la circulación.

La tiroides tiene un importante papel en la regulación del metabolismo celular a través de la síntesis y secreción de 2 hormonas: la tetraiodotironina (T4) y la triiodotironina (T3); ambas hormonas se sintetizan en el coloide por iodinización y condensación de moléculas de tirosina, difiriendo entre sí por un átomo de iodo. La T3 y T4 son enviadas a la circulación por exocitosis a través de microtúbulos y microfilamentos de la célula, éstas

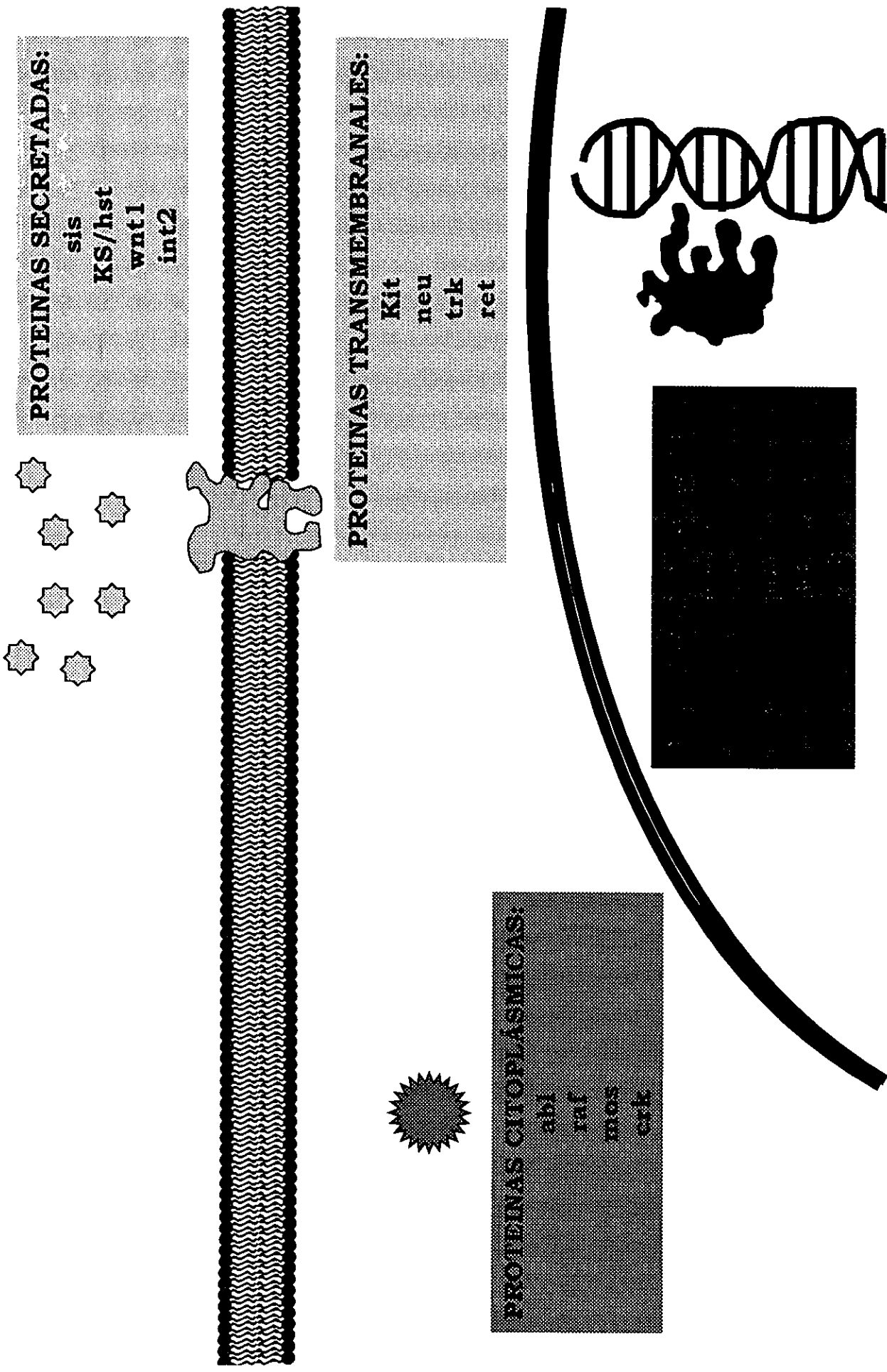


FIGURA II Los proto-oncogenes pueden codificar para proteínas secretoras, proteínas transmembranales, proteínas citoplásmicas o proteínas nucleares. Los genes supresores de tumor (anti-oncogenes), codifican mayormente proteínas nucleares.

penetran en el citoplasma celular de sus tejidos blanco, y se unen a varios sitios específicos intracelulares. En el núcleo se unen a una proteína ácida no histona, que actúa sobre el DNA aumentando la síntesis de RNA mensajero y ribosomal, esto induce la codificación de un gran número de proteínas como la hormona del crecimiento y la alfa-2-globulina. Las acciones de las hormonas tiroideas son varias ya que participan en la calorificación, el metabolismo, crecimiento, etc. y los aparatos y sistemas en donde influyen son diversos, como en la secreción gástrica, motilidad intestinal, reactividad muscular, maduración neuronal, síntesis de vitaminas y hemoglobina, etc (8).

EL CÁNCER DE TIROIDES.

El cáncer de tiroides a nivel mundial, según datos provenientes del servicio de salud pública de los Institutos Nacionales de Salud (EUA), presenta una aparición de aproximadamente 45 nuevos casos al año por millón de habitantes, el cual ocupa el 1.2% de todos los cánceres (9). En nuestro país, según datos publicados por la Secretaría de Salud, ocupa el décimo lugar con el 2.1% del total de las neoplasias malignas (10).

En la tiroides existe un gran espectro de lesiones neoplásicas y de acuerdo al tipo histológico estas neoplasias se clasifican en: carcinomas papilares, medulares, foliculares, insulares y anaplásicos (11). Existen estudios que indican que lesiones benignas como el bocio y algunos adenomas como el adenoma trabecular hialinizante, podrían ser lesiones precursoras del cáncer de tiroides (12,13). De esta manera, junto con la gran variedad de subtipos morfológicos que presentan estas neoplasias, el cáncer de tiroides sugiere ser un excelente modelo para el estudio de la carcinogénesis en todas sus etapas, desde lesiones benignas hasta neoplasias altamente agresivas.

Hablando en particular del carcinoma papilar de tiroides (CPT), este representa el 70% de los cánceres de tiroides, seguido por el carcinoma medular con el 15% y correspondiendo el resto a los otros tipos histológicos (9) (Figura IV). En el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, según información proporcionada por el servicio de Cabeza y Cuello, se registran aproximadamente 30 nuevos casos de CPT al año. Se ha considerado a esta neoplasia como una lesión de baja malignidad, sin embargo, se ha

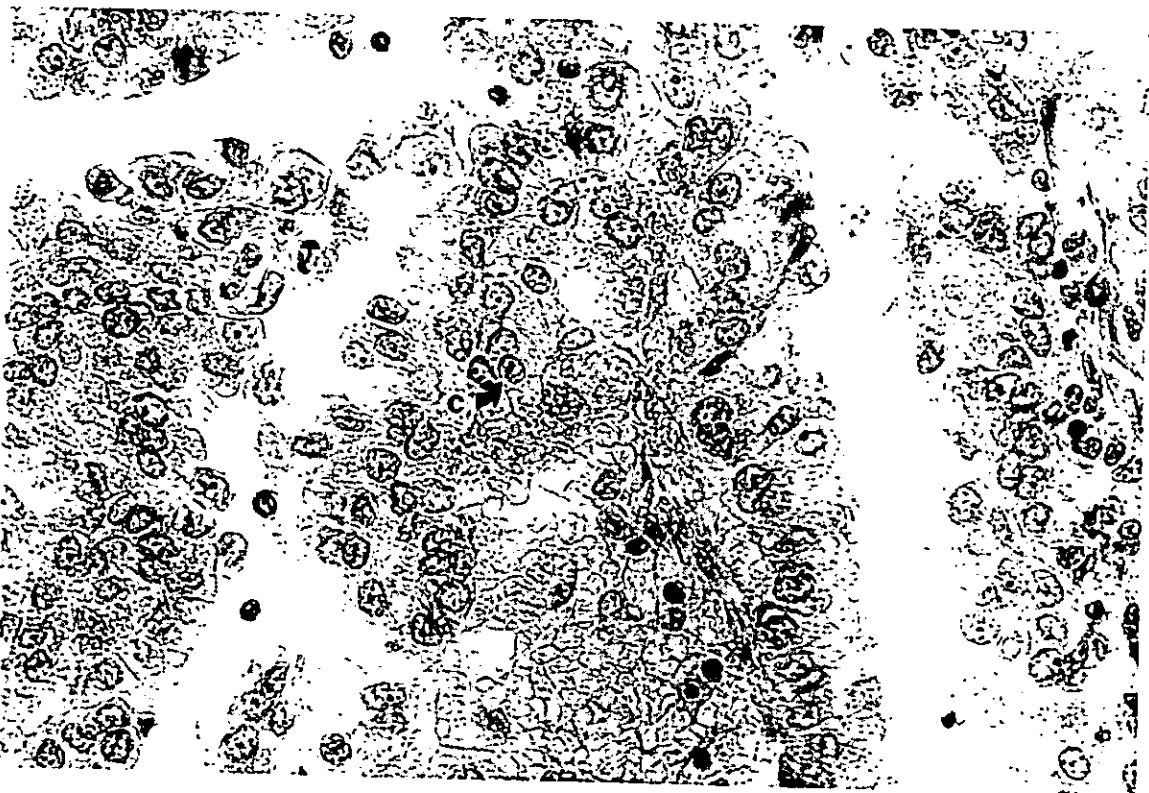
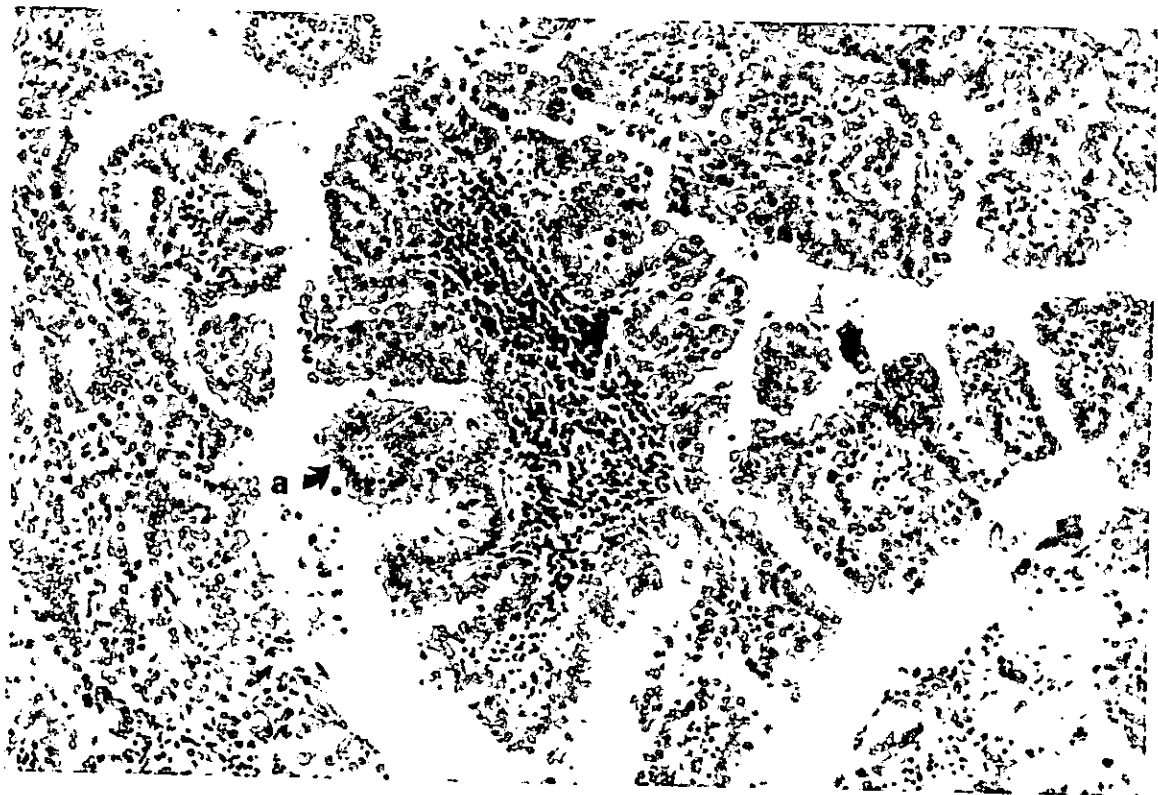


Figura IV.-Fotografías de un corte de tejido tumoral con características histológicas de un Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT), obtenido de una glándula tiroidea con tejido neoplásico. Tinción con Hematoxilina y Eosina. 200X y 400X. a) Células tumorales, b) Papilas características y c) inclusión o barra.

penetran en el citoplasma celular de sus tejidos blanco, y se unen a varios sitios específicos intracelulares. En el núcleo se unen a una proteína ácida no histona, que actúa sobre el DNA aumentando la síntesis de RNA mensajero y ribosomal, esto induce la codificación de un gran número de proteínas como la hormona del crecimiento y la alfa-2-globulina. Las acciones de las hormonas tiroideas son varias ya que participan en la calorificación, el metabolismo, crecimiento, etc. y los aparatos y sistemas en donde influyen son diversos, como en la secreción gástrica, motilidad intestinal, reactividad muscular, maduración neuronal, síntesis de vitaminas y hemoglobina, etc (8).

EL CÁNCER DE TIROIDES.

El cáncer de tiroides a nivel mundial, según datos provenientes del servicio de salud pública de los Institutos Nacionales de Salud (EUA), presenta una aparición de aproximadamente 45 nuevos casos al año por millón de habitantes, el cual ocupa el 1.2% de todos los cánceres (9). En nuestro país, según datos publicados por la Secretaría de Salud, ocupa el décimo lugar con el 2.1% del total de las neoplasias malignas (10).

En la tiroides existe un gran espectro de lesiones neoplásicas y de acuerdo al tipo histológico estas neoplasias se clasifican en: carcinomas papilares, medulares, foliculares, insulares y anaplásicos (11). Existen estudios que indican que lesiones benignas como el bocio y algunos adenomas como el adenoma trabecular hialinizante, podrían ser lesiones precursoras del cáncer de tiroides (12,13). De esta manera, junto con la gran variedad de subtipos morfológicos que presentan estas neoplasias, el cáncer de tiroides sugiere ser un excelente modelo para el estudio de la carcinogénesis en todas sus etapas, desde lesiones benignas hasta neoplasias altamente agresivas.

Hablando en particular del carcinoma papilar de tiroides (CPT), este representa el 70% de los cánceres de tiroides, seguido por el carcinoma medular con el 15% y correspondiendo el resto a los otros tipos histológicos (9) (Figura IV). En el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, según información proporcionada por el servicio de Cabeza y Cuello, se registran aproximadamente 30 nuevos casos de CPT al año. Se ha considerado a esta neoplasia como una lesión de baja malignidad, sin embargo, se ha

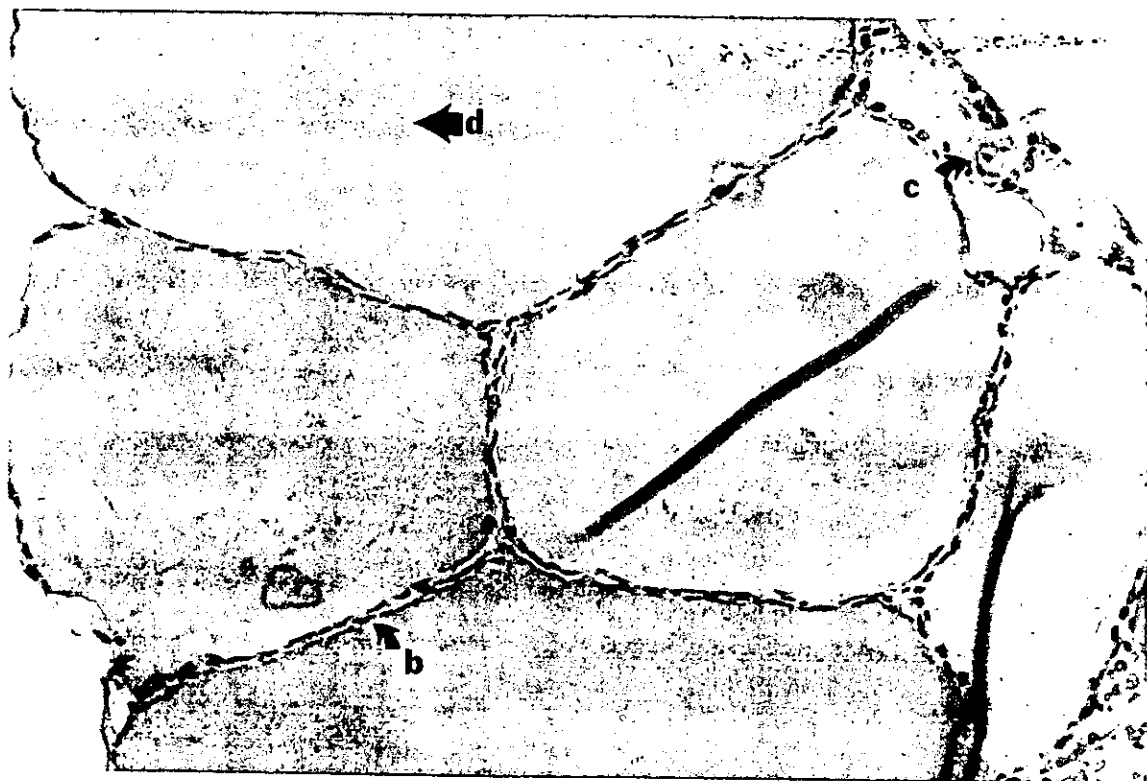
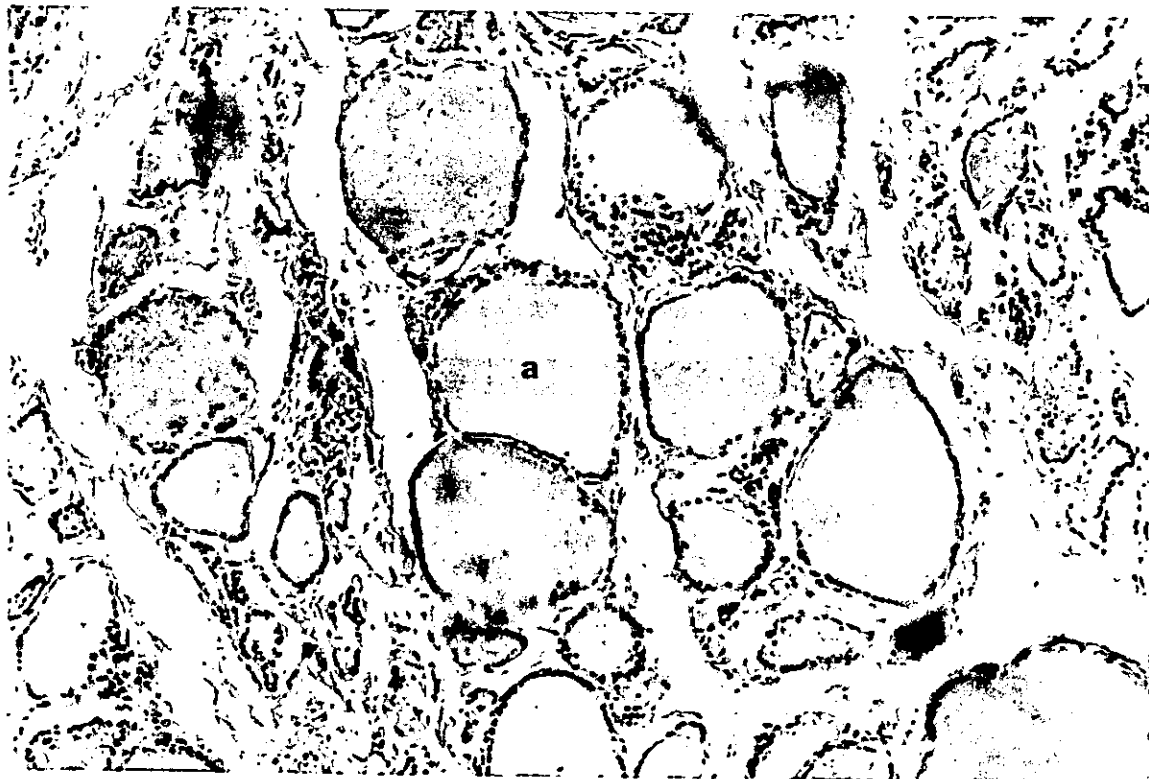


Figura III.- Fotografías de un corte de tejido obtenido de una glándula tiroides normal. Tinción con Hematoxilina y Eosina. 100X y 200X. a) Folículo Tiroideo, b) Célula Folicular, c) célula "C" o parafolicular y d) Lumen Folicular.

observado que más de la mitad de los pacientes con CPT muestran invasión ganglionar (12), y que algunos subtipos morfológicos como el CPT de células altas o los CPT's con focos de células desdiferenciadas (insulares o anaplásicas), presentan un curso clínico más agresivo y un peor pronóstico que el tipo usual de CPT (14), lo que indica que el estudio de este tipo de neoplasias debe profundizarse.

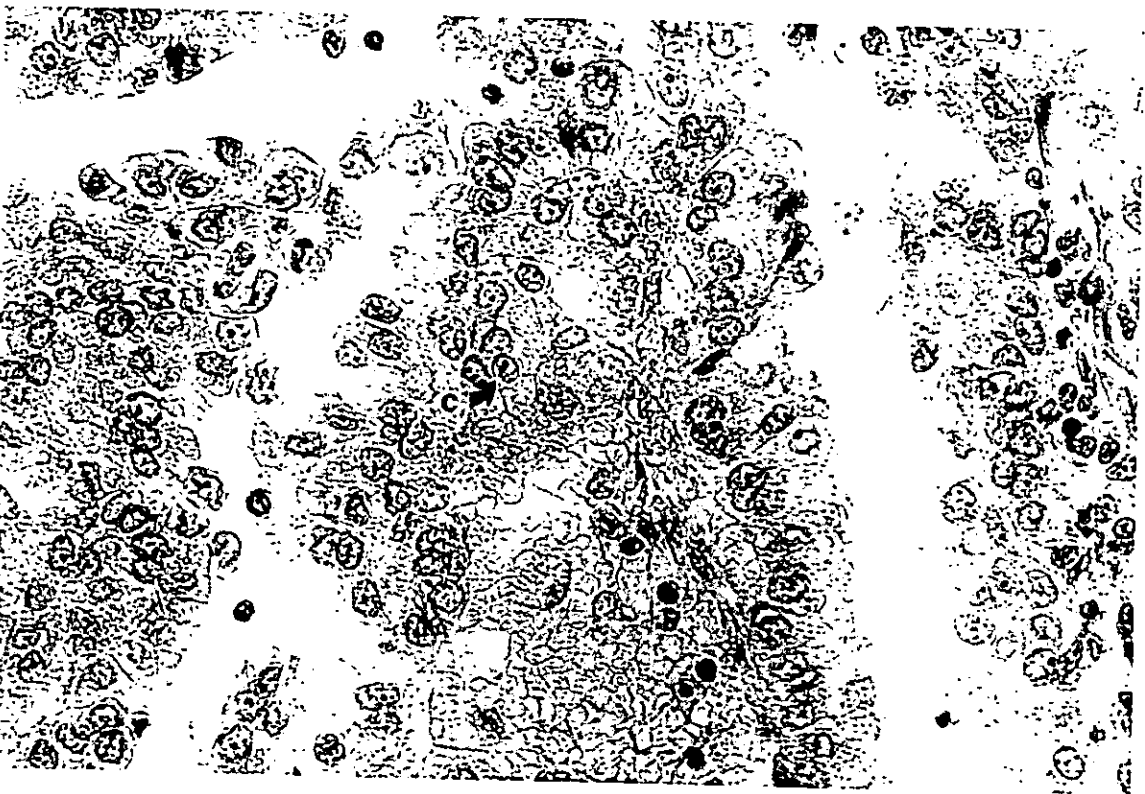
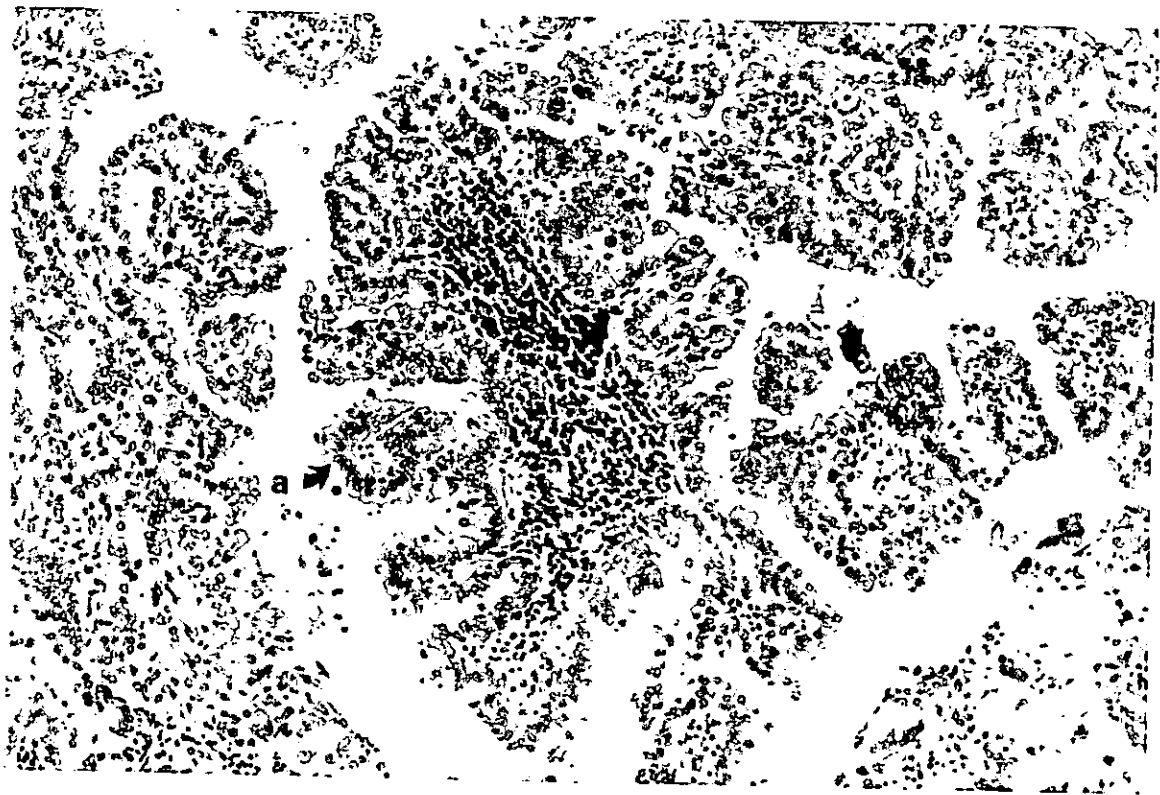


Figura IV.-Fotografías de un corte de tejido tumoral con características histológicas de un Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT), obtenido de una glándula tiroidea con tejido neoplásico. Tinción con Hematoxilina y Eosina. 200X y 400X. a) Células tumorales, b) Papilas características y c) inclusión o barra.

TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DEL CPT.

Mediante estudios citogenéticos y apoyado por técnicas de Biología y Genética Molecular, como la técnica de Inmunohistoquímica, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la Hibridación *in situ*, la Secuenciación de ADN, etc., se ha demostrado que existen diferentes alteraciones cromosómicas y genéticas involucradas en el CPT, dentro de las cuales se han detectado trisomías en los cromosomas 2, 7 y 12, monosomías en el cromosoma 9, pérdida del cromosoma Y, ganancias en el 2q y un punto de ruptura en el cromosoma 10 (15,16). Por otro lado, una de las técnicas para detectar cualitativamente la expresión, sobreexpresión ó ausencia de una proteína en un tejido (normal o tumoral), es la técnica de Inmunohistoquímica la cual se basa en el reconocimiento específico de una molécula llamada antígeno (en nuestro caso una proteína oncogénica), por otra conocida como anticuerpo. Esta técnica nos ayuda a reconocer la presencia de este antígeno específico dentro del tejido y esto se realiza sobre cortes histológicos del mismo (17).

Existen diferentes técnicas de Inmunohistoquímica y una de las más usadas es la tinción con inmunoperoxidasa, la cual tiene 4 métodos principales:

a) Método Directo: El anticuerpo es marcado con una enzima que es la peroxidasa de rábano fuerte (HRP) (18); la reacción de éste con un cromógeno, por ejemplo la diaminobencidina (DAB) la cuál se prepara en un amortiguador de sales (Tris) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), dan como resultado un producto final de color café en el sitio donde se encuentra el antígeno. En la tinción por inmunoperoxidasa, la enzima peroxidasa forma un complejo con el sustrato que en este caso es el peróxido de hidrógeno, donde este complejo reacciona con un donador de electrones que es la Diaminobencidina y produce como producto final H_2O más una molécula coloreada que es derivado benzidil que precipita en la zona de reacción dando el color café característico.

b) Método Indirecto: Se hace reaccionar el antígeno con el anticuerpo producido en conejo (IgG de conejo), luego es tratado con un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en otra especie y marcado con HRP; todo el complejo es tratado con DAB produciendo un color café en el sitio del antígeno.

c) Método de Puente Enzimático: El antígeno es marcado con IgG de conejo, este complejo se une indirectamente al anticuerpo anti-HRP usando como puente un anti-IgG de conejo. La región variable del anti-HRP se enlaza con la peroxidasa libre y todo el complejo es evidenciado con la reacción de DAB.

d) Método Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP): Combina los dos últimos pasos del anterior método, el anticuerpo anti-HRP y la peroxidasa libre se hacen reaccionar formando un complejo soluble PAP; Este complejo actúa como el último sistema antigénico el cual se enlaza al anticuerpo al anticuerpo anti-IgG de conejo por medio de una IgG de cerdo anti-IgG de conejo (19).

Recientemente, ha salido al mercado un sistema de Inmunohistoquímica conocido como Kit Envision System Peroxidase (DAKO), el cual está basado en el método de PAP, en donde se utiliza un sistema de amplificación de señal mediante un polímero marcado y conjugado con peroxidasa para inmunoglobulinas cabra anti-conejo y cabra anti-ratón (Figura V). Este sistema aumenta la sensibilidad de la técnica en comparación con los métodos anteriormente descritos, debido a que este polímero al unirse al primer anticuerpo posee mayores sitios de reacción enzimática con los cromógenos para dar un producto colorimétrico final (café) de mayor intensidad.

LA ONCOPROTEÍNA RET Y EL CPT.

La utilización de las técnicas antes descritas, ha permitido detectar en una gran diversidad de tipos de neoplasias, variaciones en la expresión de diferentes proteínas oncogénicas como los oncogenes ras, trk, myc, los genes supresores de tumor p53, Rb, y genes ligados a la progresión de potencial metastásico como nm23 y CD44 y algunas variantes (20). Por ejemplo, se ha observado un tipo de rearrreglo intracromosómico en el proto-oncogén ret, el cual se encuentra involucrado en el carcinoma de tiroides; específicamente, este rearrreglo provoca una sobreexpresión de la proteína RET exclusivamente en el histotipo papilar (21), de tal forma que es posible determinar de manera indirecta la alteración de este gen.

c) Método de Puente Enzimático: El antígeno es marcado con IgG de conejo, este complejo se une indirectamente al anticuerpo anti-HRP usando como puente un anti-IgG de conejo. La región variable del anti-HRP se enlaza con la peroxidasa libre y todo el complejo es evidenciado con la reacción de DAB.

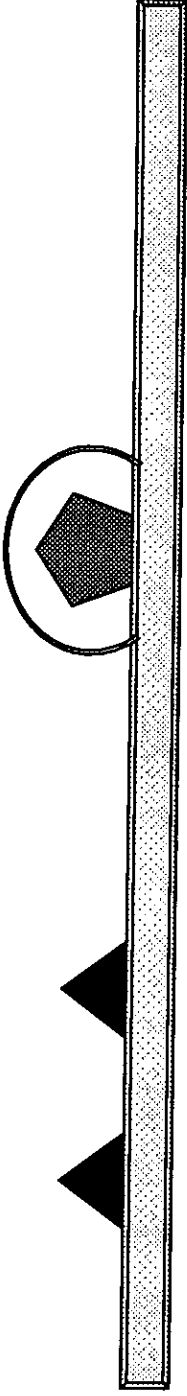
d) Método Peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP): Combina los dos últimos pasos del anterior método, el anticuerpo anti-HRP y la peroxidasa libre se hacen reaccionar formando un complejo soluble PAP; Este complejo actúa como el último sistema antigénico el cual se enlaza al anticuerpo al anticuerpo anti-IgG de conejo por medio de una IgG de cerdo anti-IgG de conejo (19).

Recientemente, ha salido al mercado un sistema de Inmunohistoquímica conocido como Kit Envision System Peroxidase (DAKO), el cual está basado en el método de PAP, en donde se utiliza un sistema de amplificación de señal mediante un polímero marcado y conjugado con peroxidasa para inmunoglobulinas cabra anti-conejo y cabra anti-ratón (Figura V). Este sistema aumenta la sensibilidad de la técnica en comparación con los métodos anteriormente descritos, debido a que este polímero al unirse al primer anticuerpo posee mayores sitios de reacción enzimática con los cromógenos para dar un producto colorimétrico final (café) de mayor intensidad.

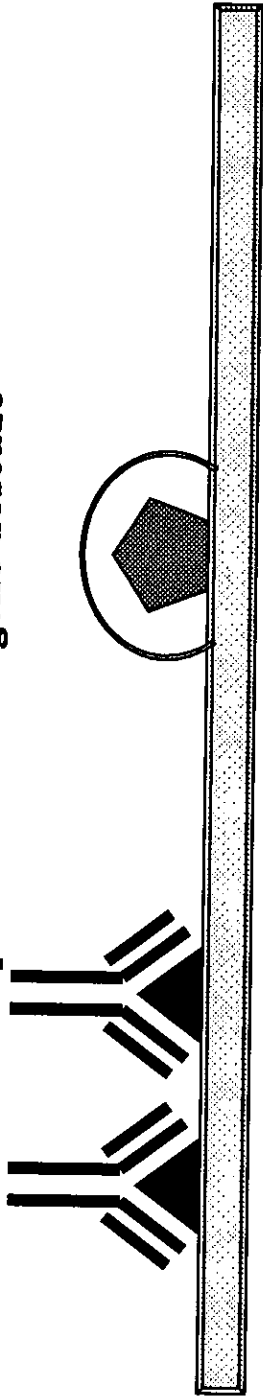
LA ONCOPROTEÍNA RET Y EL CPT.

La utilización de las técnicas antes descritas, ha permitido detectar en una gran diversidad de tipos de neoplasias, variaciones en la expresión de diferentes proteínas oncogénicas como los oncogenes ras, trk, myc, los genes supresores de tumor p53, Rb, y genes ligados a la progresión de potencial metastásico como nm23 y CD44 y algunas variantes (20). Por ejemplo, se ha observado un tipo de rearrreglo intracromosómico en el proto-oncogén ret, el cual se encuentra involucrado en el carcinoma de tiroides; específicamente, este rearrreglo provoca una sobreexpresión de la proteína RET exclusivamente en el histotipo papilar (21), de tal forma que es posible determinar de manera indirecta la alteración de este gen.

Bloqueador



1er Anticuerpo contra el antígeno deseado



Sistema de amplificado con un polímero marcado

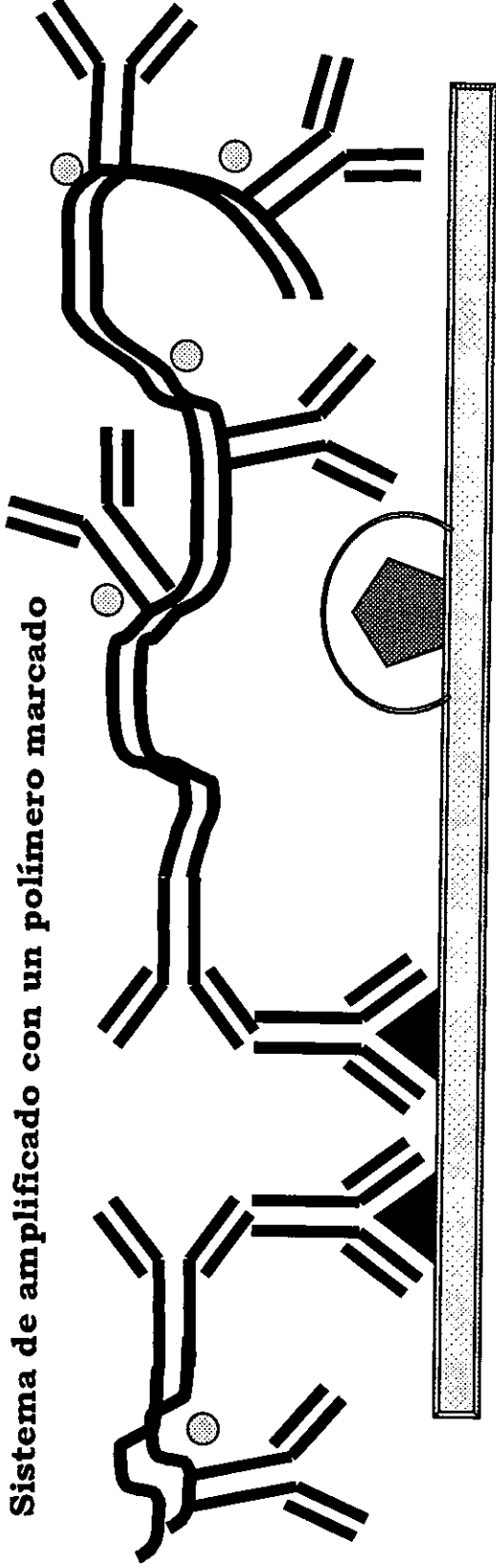


Figura V.- Esquema metodológico de la técnica de inmunohistoquímica utilizando el Kit Envision System Peroxidase (DAKO), como se describe en Materiales y Metodos.

El proto-oncogén *ret* (**RE**arreglo durante la **Tr**ansfección), fué inicialmente identificado hace 12 años, mediante un ensayo de transfección en la línea celular NIH 3T3 con ADN de alto peso molecular de un linfoma de células T humano. La caracterización de este gen transformante indicó que fué activado por un rearrreglo de ADN, donde al recombinarse dos segmentos no relacionados de ADN generaron una nueva unidad transcripcional (12). Después de estos ensayos se demostró que existían formas de rearrreglo del proto-oncogén *ret in vivo*, las cuales fueron detectadas en CPTs únicamente (22), en base a esto se le llamó oncogén RET/PTC (**P**apillary **T**hyroid **C**arcinoma) (23).

En 1988, se encontró que el proto-oncogén *ret* codifica para un receptor transmembranal con actividad tirosina-cinasa (24,25) en el que su ligando fue durante mucho tiempo un misterio; pero a finales de 1996 se descubrió que el ligando de *ret* es el GDNF (**F**actor **N**eurotrófico **D**erivado de una línea celular de la **G**lia), miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante (26), el cual funciona como un potente factor de sobrevivencia para neuronas centrales y entéricas, así como un factor esencial para el desarrollo del sistema nervioso entérico y del riñon (27,28). *ret* puede estar relacionado en la diferenciación neuronal, ya que este se expresa normalmente en la cresta neural de ratón durante la mitad de su gestación (29). También se ha encontrado su expresión tanto en tejido normal originario de la cresta neural en humano, como de tejido neoplásico del mismo origen (30).

Este proto-oncogén puede ser expresado en dos isoformas con un peso de 140 y 170 KDa (31,32,33) o sea de 1072 y 1114 aminoácidos respectivamente; esto es debido a un "corte y empalme" (splicing) alternativo en sus últimos dos exones, ya que cada isoforma difiere de la otra por tener 9 ó 51 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal (34). Otros dos mecanismos complejos de corte y empalme alternativo han sido descritos con el intrón 4 (35), y la región entre los exones 2 al 6 (36). Mediante el uso de la técnica de PCR y secuenciación, se ha demostrado que el proto-oncogén *ret* consiste de 20 exones (37,38), dentro de un fragmento de ADN de 55 Kb (39).

La identificación del oncogén RET/PTC como un nuevo ejemplo de activación de *ret* por rearrreglo de forma somática (ya que el rearrreglo no ha sido encontrado en los linfocitos de pacientes con el oncogén en el tumor) (23), ilustra el papel inesperado de este

gen en malignidades humanas y en particular en la glándula tiroides, ya que también se conoce que este proto-oncogén sufre mutaciones puntuales, tanto en su región que codifica para la parte extracelular como intracelular de la proteína transmembranal, en algunos carcinomas medulares tiroideos familiares y esporádicos, y en dos variedades de síndromes neoplásicos, que son la neoplasia endócrina múltiple tipo 2A (NEM2A), y la neoplasia endócrina múltiple tipo 2B (NEM2B) (40).

Cabe aclarar que en la glándula tiroides, normalmente el gen *ret* se expresa únicamente en las células parafoliculares (células C), debido a su origen neuroendócrino, mientras que en las células foliculares de origen epitelial, la expresión de este gen no existe.

El mapeo del proto-oncogén, indicó que se encontraba en el brazo largo del cromosoma 10 en la región q11.2 (41), así mismo, el oncogén RET/PTC se localizó en el cromosoma 10 en la misma banda q11.2, sugiriendo esto que ha ocurrido un rearrreglo intracromosómico de *ret* en los CPT's positivos para el oncogén (23).

Estudios posteriores realizados con técnicas de Inmunohistoquímica y de RT-PCR (Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa), confirmaron que la activación del rearrreglo RET/PTC está presente en alrededor del 35% de todos los casos de CPT (42), aunque existen variaciones significativas en diferentes países (Tabla I). Estas grandes variaciones pueden deberse a diversos factores: desde los diferentes tipos y niveles de exposición a eventos mutagénicos de cada población y su resistencia dependiendo del grupo racial, sexo y edad (40), hasta factores alimenticios donde se ha observado que un aumento en la dieta de yodo incrementa el número de casos de CPT (6). En la población latinoamericana y en particular en México, no existen estudios de este tipo que traten de conocer la frecuencia con que se presenta al gen *ret* rearrreglado.

Hasta el momento, se han descrito tres formas de rearrreglos que sufre *ret*: RET/PTC1 (23,43), RET/PTC2 (44), y RET/PTC3 (45,46) (Figura VI).

RET/PTC1 es una secuencia quimérica que es generada por una inversión paracéntrica cromosómica, *inv* (10)(q11.2q21), la cual ocurre con un gen no descrito anteriormente, al que originalmente se le designó H4 y ahora se le ha renombrado D10S170, donde se fusionan el extremo 5' de D10S170 y el dominio 3' tirosina-cinasa de *ret* (23). Este gen quimérico codifica para dos proteínas, una de 64 Kda (33) y otra de 59

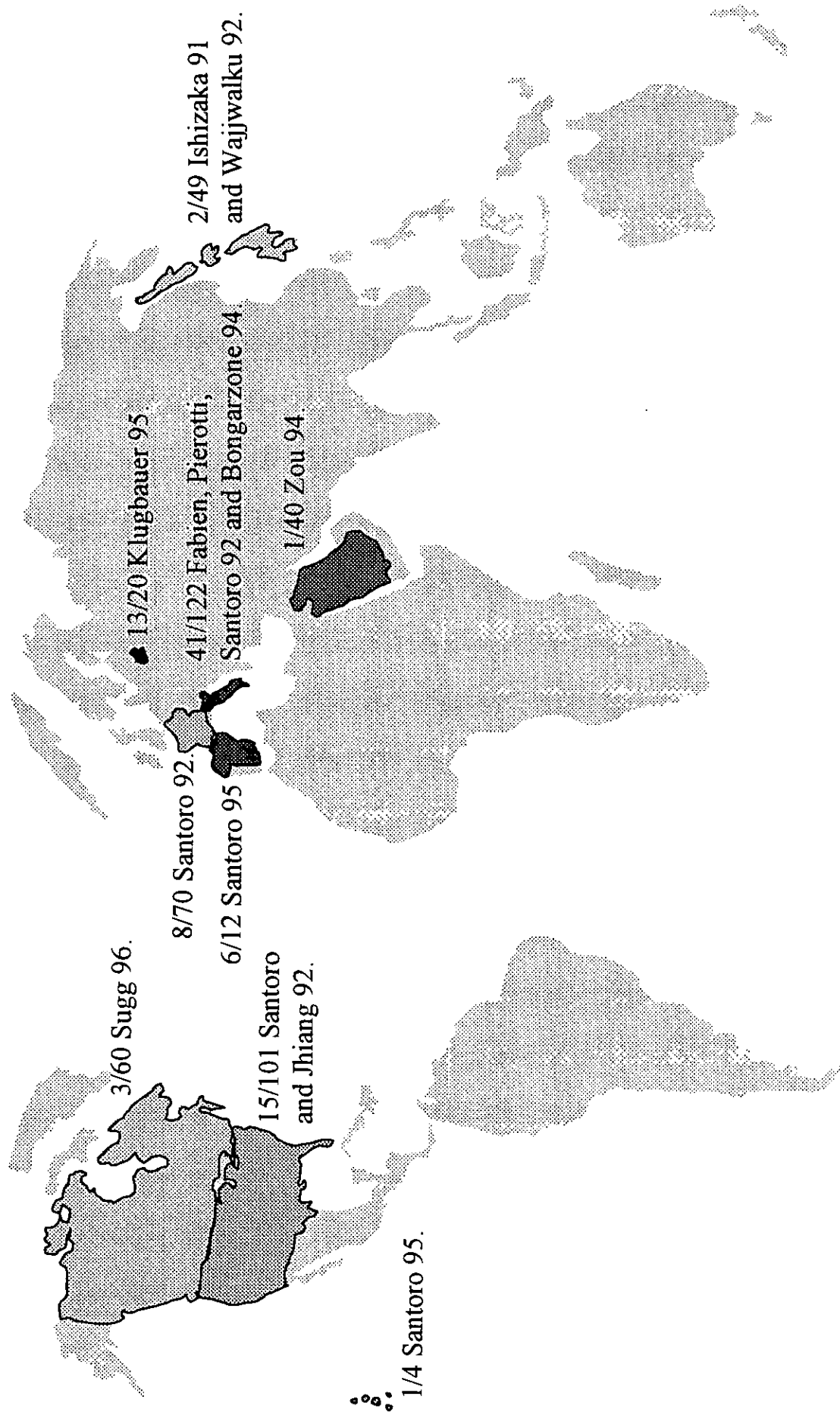



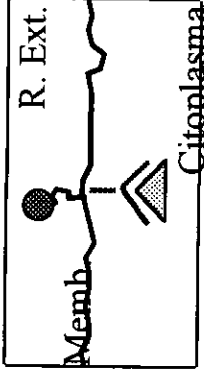
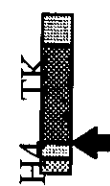
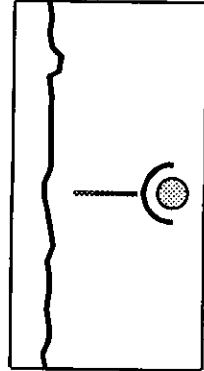
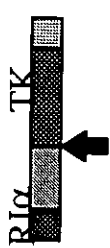
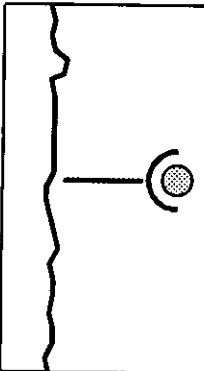
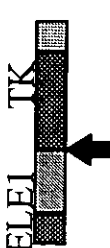
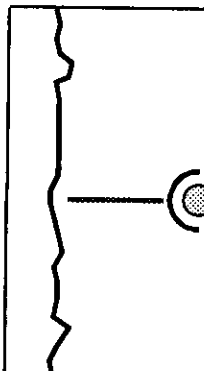
TABLA I.-FRECUENCIA DE LOS REARREGLOS RET/PTC A NIVEL MUNDIAL

Kda (44). La caracterización molecular de diversos carcinomas papilares, muestran que alrededor del 70% de los casos positivos para el rearrreglo, son debidos al rearrreglo RET/PTC1, y también se ha demostrado que los productos protéicos de este oncogén se localizan en la fracción soluble citoplásmica y están fosforilando constitutivamente; por otro lado, los productos del proto-oncogén ret se localizaron en las células C en la fracción de membrana y no estaban fosforilados (32,33).

RET/PTC2 es un segundo tipo de rearrreglo oncogénico de ret, donde la actividad transformante es creada por la fusión del dominio tirosina-cinasa de ret con la región de la subunidad regulatoria RI α de la proteína cinasa A (PKA: receptor intracelular de AMPcíclico), la cual esta localizada en el brazo largo del cromosoma 17 (q23). En esta translocación, los transcritos de RET/PTC2 codifican dos isoformas de la proteína quimérica con un peso de 76 y 81 Kda, que manifiestan fosforilaciones constitutivas de tirosina, como también la actividad enzimática tirosina-cinasa. Las proteínas de RET/PTC2 pueden presentar dimerización y pesar 175 y 190 Kda, en condiciones no reductoras, esto es debido a sus enlaces disulfuro (44). El punto de fusión de la secuencia transformante RI α está localizada en la misma posición de la porción de ret donde se encuentra para D10S170 (RET/PTC1), entre la región transmembranal y el dominio tirosina-cinasa del proto-oncogén ret.

Por último, RET/PTC3 es resultado de la fusión del dominio tirosina-cinasa de ret al extremo 5' de un nuevo gen de 790 nucleótidos al que se le llamó RFG (Gen Fusionado a Ret). Mediante clonaciones se ha demostrado que el gén RFG se expresa constitutivamente y no muestra homología a ningún gen conocido (46). Posteriormente se le llamó RFG2/ELE1, el cual es un rearrreglo por una inversión paracéntrica (igual que RET/PTC1), y éste se encuentra en el cromosoma 10 (q11.2) (47,48). Al igual que los anteriores rearrreglos, su punto de fusión se encuentra entre la secuencia transmembranal y el dominio tirosina-cinasa de ret (46), donde es importante observar que este punto de ruptura en ret es siempre el mismo (intrón 11), y que sus productos pueden encontrarse en el citoplasma fosforilando constitutivamente a proteínas no específicas, debido a una autofosforilación donde aparentemente son regulados por fosfotirosin-fosfatasas (33).

EL PROTO-ONCOGÉN RET Y SUS REARREGLOS.

	Proteína expresada	% de presencia del rearreglo	Detección de la proteína por el anticuerpo α -RET	Detección de los transcritos RET/PTC por RT-PCR
 <p>Proto-oncogén RET</p>		----	+	-
 <p>RET/PTC1 inv(10)(q11.2,q21)</p>		70 %	+	+
 <p>RET/PTC2 t(10q11.2;17q23)</p>		10 %	+	+
 <p>RET/PTC3 inv(10)(q11.2)</p>		20 %	+	+

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

Figura VI.-Representación esquemática del proto-oncogén ret y los diferentes rearreglos oncogénicos identificados.

Por todo lo anterior, es claro entender que existe una sobreexpresión del oncogén RET/PTC, debido a que al perder su promotor por el rearreglo y al estar bajo la influencia de otro promotor que expresa proteínas constitutivamente, el gén quimérico es expresado de forma anormal. Esto llamó la atención y actualmente una de las formas para demostrar de forma indirecta la presencia de cualesquiera de estos rearreglos, es mediante una prueba de inmunohistoquímica.

Recientemente se ha observado, que la activación RET/PTC, es un evento temprano en la carcinogénesis de tiroides, ya que estos rearreglos han sido encontrados en posibles lesiones precursoras del cáncer de tiroides tales como el bocio y los adenomas (49), así como en microcarcinomas ó carcinomas ocultos del histotipo papilar encontrados accidentalmente en autopsias de personas asintomáticas (50).

Se ha demostrado que el oncogén RET/PTC es parte fundamental del desarrollo del CPT, debido a que al crearse ratones transgénicos que expresan el oncogén RET/PTC1 bajo el promotor de tiroglobulina de rata (que solo se expresa específicamente en tiroides), se demostró que los ratones desarrollaron tumores tiroideos del histotipo papilar, mientras que otros desarrollaron áreas de hiperplasia tiroidea. Estos resultados demuestran el potencial oncogénico del rearreglo *in vivo* para el tejido tiroideo y su habilidad de inducir tumores tiroideos exclusivamente del histotipo papilar. Cabe aclarar, que no todos los ratones transgénicos desarrollaron tumores tiroideos, lo que comprueba que la expresión de la oncoproteína es necesaria pero no suficiente para inducir la neoplasia, lo que significa que la cooperación con otros oncogenes y anti-oncogenes puede ser fundamental para lograr una progresión maligna en células foliculares tiroideas (51).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

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

En varios estudios realizados con pacientes que presentaban CPT con un comportamiento metastásico, como en otros pacientes que no tuvieron metástasis, se ha encontrado que la activación y la presencia de la proteína oncogénica RET es más alta en pacientes con metástasis (50%), que en pacientes sin metástasis (12%), aunque en estos estudios el número de muestras estudiadas es escasa (52). En otro estudio, se observó que el transcrito quimérico RET/PTC1 fué expresado más frecuentemente en tumores con metástasis distantes (20%), que en tumores que no presentaban metástasis (4%) (53). De estos datos podemos sugerir, que la presencia de la proteína quimérica RET puede ser un importante marcador molecular de comportamiento en los CPT's, por lo que el estudiar la frecuencia con que se presenta esta proteína en cierta población de nuestro país, y su presencia en tumores metastásicos, podría darnos información importante que pueda aportar una ayuda al clínico para de manera más temprana indicarle el posible curso clínico del paciente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de la proteína oncogénica RET en tumores de carcinoma papilar tiroideo de pacientes que presentaron metástasis y/o invasión extratiroidea, así como en pacientes que no presentaron estas características , y buscar una posible relación con el histotipo histológico y los datos clínicos de cada uno.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar mediante la técnica de Inmunohistoquímica utilizando el Kit Envision System peroxidase (DAKO), la frecuencia con que se presenta la proteína RET en las muestras de carcinoma papilar tiroideo obtenidas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- 2.-Buscar una posible relación entre la presencia de la proteína RET y el subtipo histológico y datos clínicos de los pacientes con carcinoma papilar tiroideo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de la proteína oncogénica RET en tumores de carcinoma papilar tiroideo de pacientes que presentaron metástasis y/o invasión extratiroidea, así como en pacientes que no presentaron estas características , y buscar una posible relación con el histotipo histológico y los datos clínicos de cada uno.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar mediante la técnica de Inmunohistoquímica utilizando el Kit Envision System peroxidase (DAKO), la frecuencia con que se presenta la proteína RET en las muestras de carcinoma papilar tiroideo obtenidas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- 2.-Buscar una posible relación entre la presencia de la proteína RET y el subtipo histológico y datos clínicos de los pacientes con carcinoma papilar tiroideo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo representa un estudio descriptivo y retrospectivo de tumores clasificados como carcinomas papilares tiroideos.

Se estudiaron 23 muestras de CPT proporcionadas del archivo de el Servicio de Patología, del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS en bloques de tejido incluidos en parafina, representando 3 años de este achivo (1995-1997). Además, se usaron como controles positivos y negativos tejidos de carcinomas medulares tiroideos y carcinomas foliculares tiroideos, respectivamente. También se utilizó como control, tejido tiroideo normal, el cual fué proporcionado por el Servicio de Patología del Hospital General de México (autopsias de individuo fallecido sin ninguna patología neoplásica, ni que comprometiera a tejido tiroideo).

Con las muestras obtenidas se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental: de cada uno de los bloques con tejido tumoral se obtuvo varios cortes seriados de 5 μm y uno de ellos se sometió a la tinción de Hematoxilina-Eosina, para ser verificado el diagnóstico por el médico patólogo. Para el resto de los cortes se llevó a cabo la técnica de Inmunohistoquímica utilizando el Kit Envision System Peroxidase (DAKO) como se describe:

- Los cortes de tejido tumoral de CPT se desparafinaron por 30 min a 60°C y en dos baños de xilol por 15 min. Los tejidos se hidrataron gradualmente en diferentes concentraciones de alcoholes por 5 min. (100%, 90%, 70% y 30%) y finalmente en PBS 1X durante 15 min. Se inhibió la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% por 1 hr. y posteriormente se lavó con PBS 1X. Enseguida se bloqueó con suero de burro no inmune al 10% por 45 min., se lavó rápidamente en PBS 1X y se agregó el primer anticuerpo contra el antígeno deseado que en nuestro caso es el anticuerpo policlonal IgG anti-RET desarrollado en conejo que reconoce a los aminoácidos 784-801 en la región carboxilo terminal del dominio con actividad tirosina-cinasa de la proteína RET, el cual fué donado por el Dr. Massimo Santoro de la Universidad de Nápoles, Italia (50). Éste se incubó a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se lavó con PBS 1X + Tritón al 0.25% y enseguida con PBS 1X y se agregó el polímero marcado con peroxidasa para

inmunoglobulinas cabra anti-conejo y cabra anti-ratón (Kit Envision DAKO) durante 1 hr. Después se lavó con PBS 1X + Tritón al 0.25% y enseguida con PBS 1X. En la reacción enzimática (colorimétrica) se utilizó la solución de Diaminobencidina (DAB) (6 mg de DAB + 100 µl de H₂O₂ al 3% en 10 ml de tris al 0.1 M). Se detuvo la reacción en agua destilada. Se contratiñeron los tejidos con Hematoxilina de Harris, se deshidrataron con alcoholes (30%, 70%, 90% y 100%) por 5 min. y xilol 10 min. Finalmente se montaron con resina para su observación al microscopio. Cada reacción se realizó tres veces.

En cuanto a la técnica de Hibridación *in situ* de RNA no radioactivo se utilizó una sonda plasmídica (pSV2) que contiene clonado el cDNA del proto-oncogen *ret*; Esta construcción fue donada por el Dr. Takahashi del Centro Nacional del Cáncer en Tokyo, Japón (24). El sistema utilizado para la detección del transcrito, fue uno no radioactivo biotinilado llamado Gen Point Dako, el cual se basa en la amplificación de la señal de hibridación, debido a que forma enlaces secundarios con grupos aromáticos lo que provoca un gran depósito de biotina en el sitio de hibridación. Esta biotina adicional es entonces usada para capturar más streptavidina-peroxidasa y revelada con diaminobencidina se obtiene una señal más intensa que una hibridación *in situ* común. Esta técnica se realizó como se describe:

- Los cortes de tejido tumoral de CPT se desparafinaron por 30 min a 60°C y en dos baños de xilol por 15 min. Los tejidos se hidrataron gradualmente en diferentes concentraciones de alcoholes por 5 min. Posteriormente se les administró un baño de digestión en Pepsina al 0.8% / 0.2N de HCl a 37°C durante un minuto. Se lavaron tres veces en agua bidestilada fresca y se quemó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante una hora. Después de lavar en agua bidestilada durante 10 min, se aplicó la sonda junto con el cocktail de hibridación en cada laminilla y se pusieron en un horno a 70°C durante 8 min para linealizar. Después se dejó hibridando durante 60 min a 37°C, y durante este tiempo se preparó la solución de lavado de astringencia del kit (1:50 en agua bidestilada) y se calentó en un baño maria a 55°C. Las muestras se sumergieron en TBST durante 10 min y a continuación se incubaron en la solución de astringencia durante 20 min a 55°C. Se volvieron a lavar en TBST por 5 min y posteriormente se aplicaron los ciclos de amplificación que son los siguientes: Ciclo de amplificación (se realizó dos veces).-

Streptavidina-HRP primario (1:1000) durante 15 min, lavado en TBST fresco durante 3 min, Solución Biotinil-Tiramida durante 15 min y un lavado en TBST fresco durante 3 min; A continuación, se realizó otro ciclo con Streptavidina-HRP secundario durante 15 min y un lavado en TBST fresco durante 3 min. Después de haber preparado el cromógeno de revelado que fue la Diaminobencidina, se agregó éste en las muestras y se monitoreó en el microscopio. La reacción del cromógeno se paró con agua bidestilada e inmediatamente se contratiñó con Hematoxilina y se deshidrató en el tren de alcoholes hasta xilol. Por último, la muestra se montó con resina para su observación al Microscopio.

Con respecto al estudio estadístico, se realizó mediante el análisis no paramétrico de χ^2 , gracias al apoyo de la Dra. Dulce María Hernández Hernández, Investigadora Asociada de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron 23 muestras de tejido tumoral incluido en parafina de pacientes con Carcinoma Papilar Tiroideo, que presentaban diferentes subtipos histológicos, los cuales están representados en la Tabla II y algunos datos clínicos como lo muestran la Tabla III. También fueron incluidos en este estudio las siguientes muestras de tejido incluido en parafina: un Adenoma Folicular y un Adenoma Oxifílico de Tiroides, como controles negativos; cinco muestras de tejido normal de tiroides obtenidos de autopsias de individuos fallecidos por causas no neoplásicas o que involucren a la glándula tiroides, también como controles negativos; y por último dos Carcinomas Medulares Tiroideos, como controles positivos (ya que anteriormente se ha descrito que los Carcinomas del histotipo Medular se originan de las células parafoliculares o células C, las cuales expresan normalmente el proto-oncogén *ret*). Tanto las muestras de control como las de estudio fueron analizadas histológicamente gracias al apoyo de la Dra. Alejandra Mantilla Morales del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Streptavidina-HRP primario (1:1000) durante 15 min, lavado en TBST fresco durante 3 min, Solución Biotinil-Tiramida durante 15 min y un lavado en TBST fresco durante 3 min; A continuación, se realizó otro ciclo con Streptavidina-HRP secundario durante 15 min y un lavado en TBST fresco durante 3 min. Después de haber preparado el cromógeno de revelado que fue la Diaminobencidina, se agregó éste en las muestras y se monitoreó en el microscopio. La reacción del cromógeno se paró con agua bidestilada e inmediatamente se contratiñó con Hematoxilina y se deshidrató en el tren de alcoholes hasta xilol. Por último, la muestra se montó con resina para su observación al Microscopio.

Con respecto al estudio estadístico, se realizó mediante el análisis no paramétrico de χ^2 , gracias al apoyo de la Dra. Dulce María Hernández Hernández, Investigadora Asociada de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI.

RESULTADOS

En el presente trabajo se estudiaron 23 muestras de tejido tumoral incluido en parafina de pacientes con Carcinoma Papilar Tiroideo, que presentaban diferentes subtipos histológicos, los cuales están representados en la Tabla II y algunos datos clínicos como lo muestran la Tabla III. También fueron incluidos en este estudio las siguientes muestras de tejido incluido en parafina: un Adenoma Folicular y un Adenoma Oxifilico de Tiroides, como controles negativos; cinco muestras de tejido normal de tiroides obtenidos de autopsias de individuos fallecidos por causas no neoplásicas o que involucren a la glándula tiroides, también como controles negativos; y por último dos Carcinomas Medulares Tiroideos, como controles positivos (ya que anteriormente se ha descrito que los Carcinomas del histotipo Medular se originan de las células parafoliculares o células C, las cuales expresan normalmente el proto-oncogén *ret*). Tanto las muestras de control como las de estudio fueron analizadas histológicamente gracias al apoyo de la Dra. Alejandra Mantilla Morales del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Subtipos Histológicos de Carcinomas Papilares Tiroideos	Número de Muestras estudiadas
Subtipos histológicos de Buen Pronóstico Clínico	
Ordinario o Común	10
Ordinario con Areas Foliculares	3
Subtipos histológicos de Mal Pronóstico Clínico	
Con Cambios Oxifílicos	3
Patrón Folicular	3
Con Células Altas	3
Con Células Oncocíticas	1
	Total: 23

Tabla II.- Subtipos Histológicos de las muestras estudiadas con Carcinoma Papilar Tiroideo.

-La proteína RET no se encontró expresada en los Adenomas Tiroideos y solo se observó su expresión en células parafoliculares de tejido tiroideo sano y en el control positivo que fue el Carcinoma Medular Tiroideo.

Al realizar la inmunoreacción de RET en tejido tiroideo sano, no se observó reacción en ninguna de las células foliculares que forman los folículos tiroideos, pero sí se observó una inmunoreacción de gran intensidad en las células parafoliculares o células C (Figura VII). Este resultado, coincide con lo anteriormente descrito en cuanto a que las

células de origen neuroendócrino (como las células C), sí expresan normalmente el proto-oncogen ret (21), y debido a que el anticuerpo fue diseñado para el reconocimiento de la región tirosina-cinasa de ret, puede detectarse tanto el proto-oncogen ret, como los diferentes rearrreglos oncogénicos, ya que todos conservan esta región. Al mismo tiempo, el resultado obtenido en Tejido tumoral de Carcinoma Medular Tiroideo fue satisfactorio, ya que al obtener una positividad en la inmunoreacción con RET en una mediana intensidad, nos indica que es un buen control positivo en este tipo en particular de detección (Figura VIII).

Algunos Datos Clínicos de Pacientes Con Carcinoma Papilar Tiroideo	Número de Muestras estudiadas
Con Metástasis	13
Sin Metástasis	10
Con Invasión Extratiroidea	16
Sin Invasión Extratiroidea	7
Tiempo de evolución	
Menos de 1 año	10
1 o más años	11
Edad al Diagnóstico	
Menor o igual a 50 años	10
De 51 años en adelante	13
Sexo	
Masculino	4
Femenino	19
Procedencia	
Distrito Federal y Estado de México	17
Interior de la República	6

Tabla III.- Algunos datos clínicos de los pacientes estudiados con Carcinoma Papilar Tiroideo.

En lo que respecta a los Adenomas tiroideos, en ninguno de los dos tipos histológicos se observó alguna inmunoreacción lo cual apoya a los antecedentes bibliográficos (42,52), en cuanto a que en los tumores tiroideos originados de células foliculares (Adenomas, Carcinomas Foliculares, Carcinomas Papilares, Carcinomas Insulares y Carcinomas Anaplásicos) “solo” en los Carcinomas Papilares Tiroideos se ha detectado la presencia de la proteína RET (figura IX).

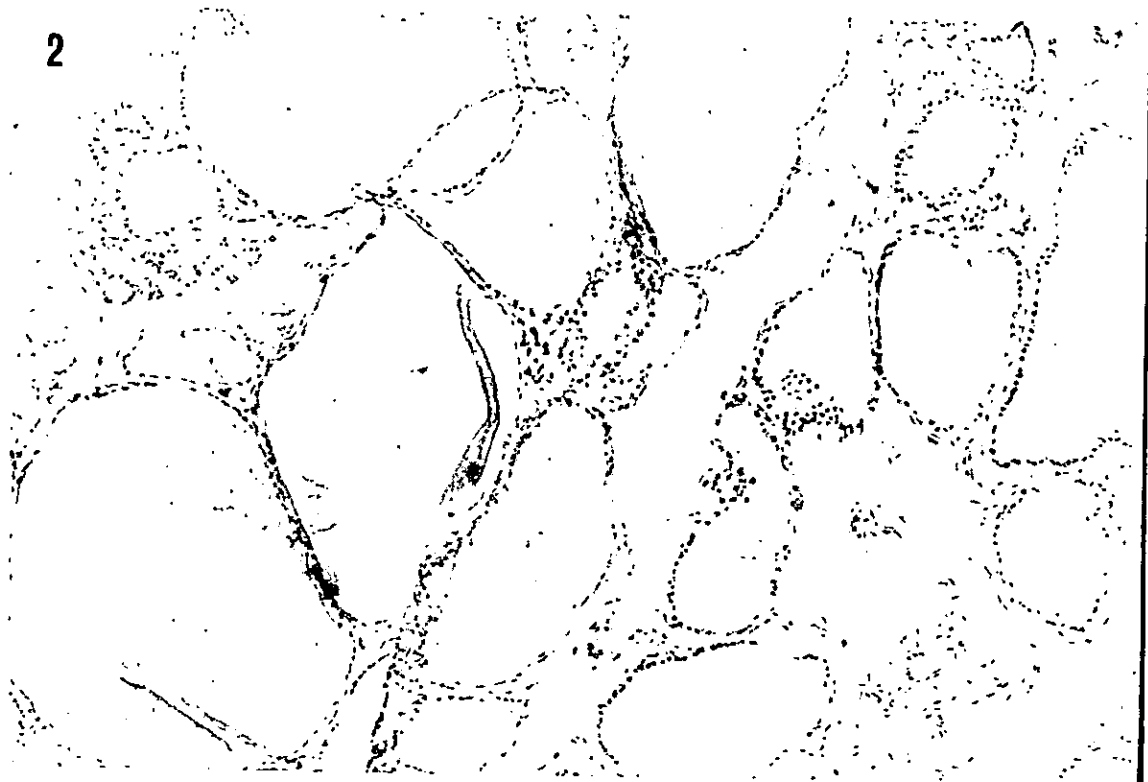
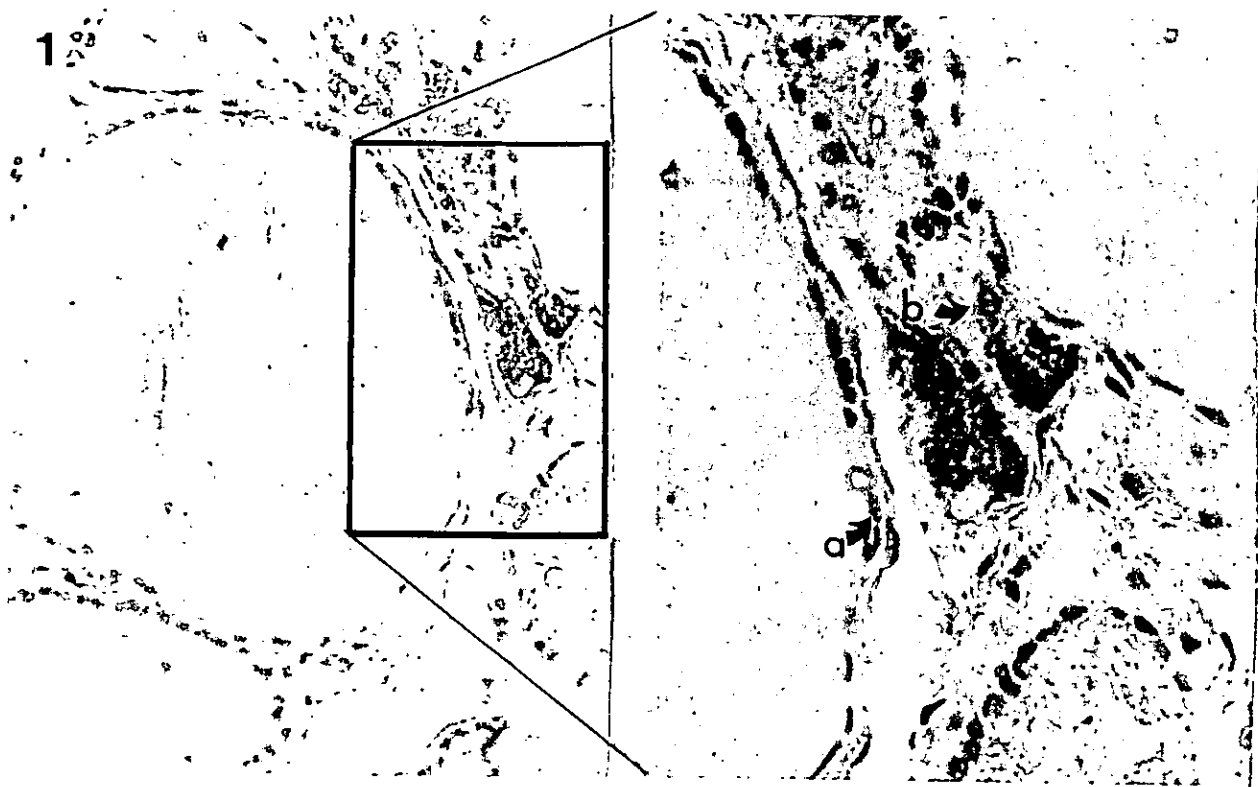


Figura VII.- Inmunodetección de la proteína RET en tejido tiroideo normal. 1.- Fotografía del corte que se le aplicó el anticuerpo α -RET: a) Células Foliculares negativas para la detección de RET, b) Célula parafolicular con gran positividad en la inmunodetección de la proteína RET. 400X. 2.- Fotografía del corte que se utilizó como control negativo, donde se aplicó toda la metodología de Inmunohistoquímica, pero sin el anticuerpo α -RET. 400X.

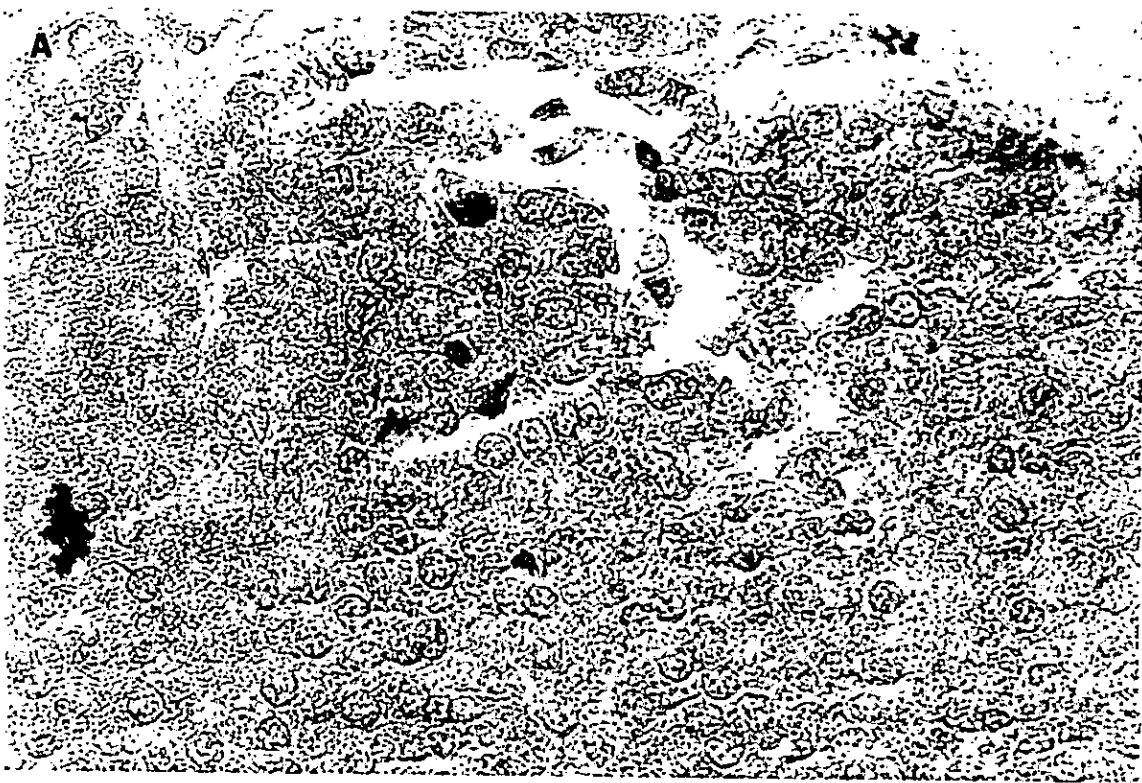


Figura VIII.- Inmunodetección de la proteína RET en Carcinoma Medular Tiroideo, utilizado como control positivo. A) Carcinoma Medular Tiroideo donde se le aplicó el anticuerpo α -RET. B) control negativo donde se aplicó toda la metodología de Inmunohistoquímica, pero sin el anticuerpo α -RET. 400X.

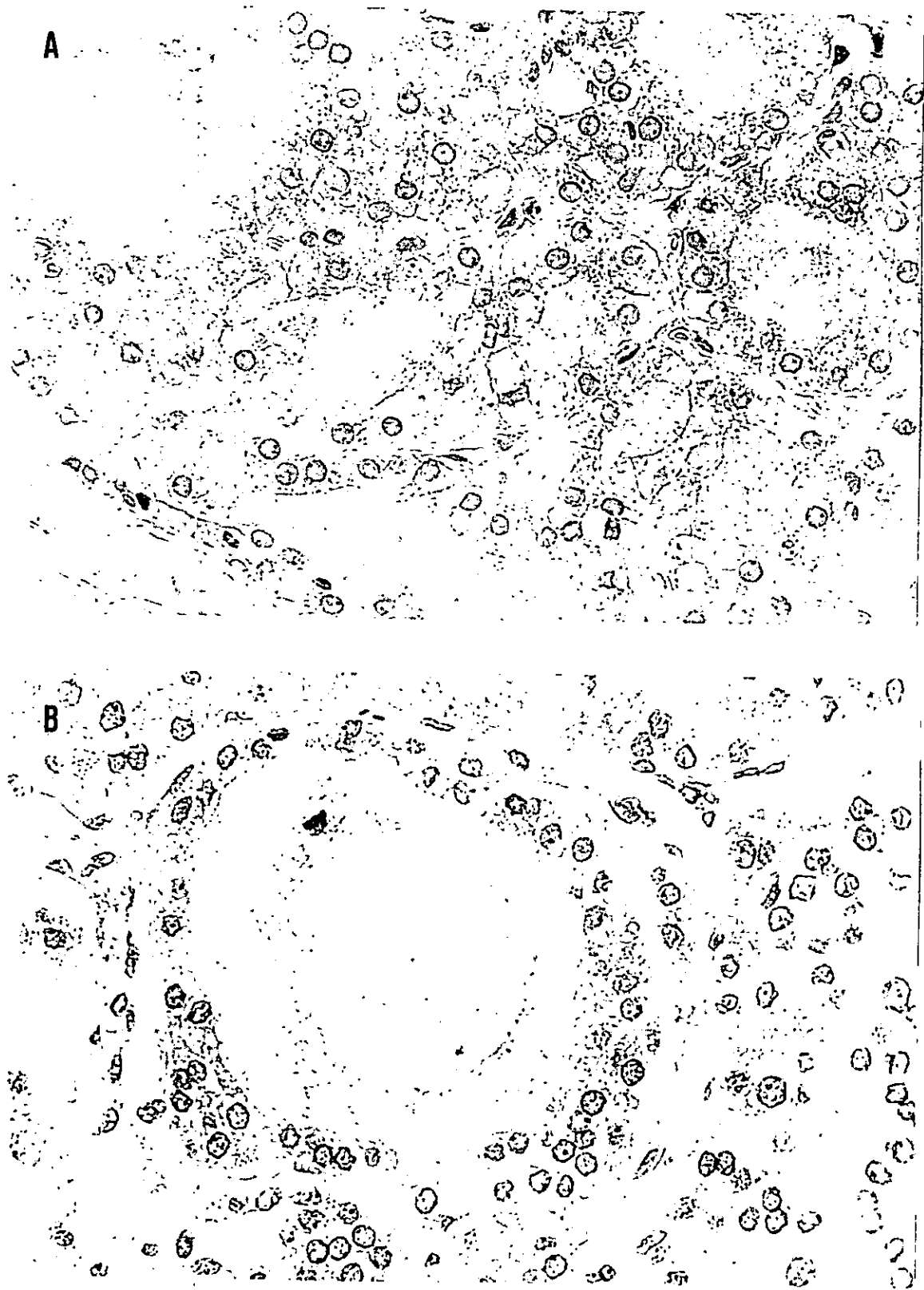


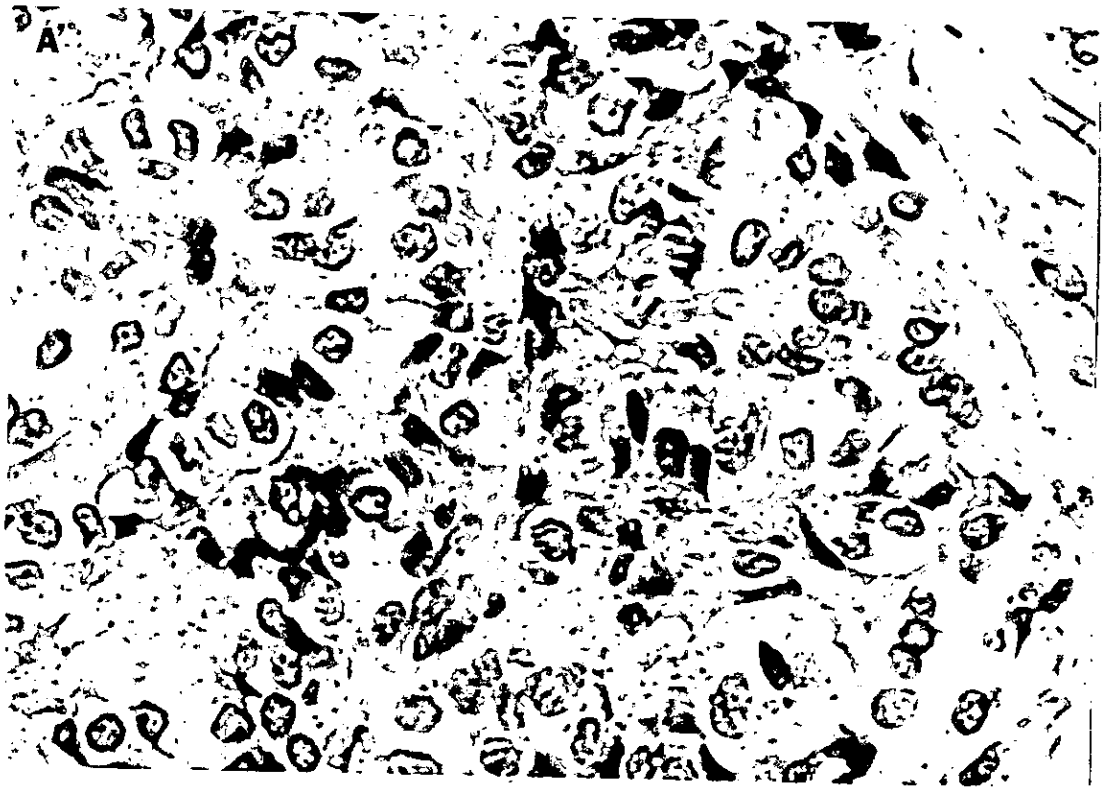
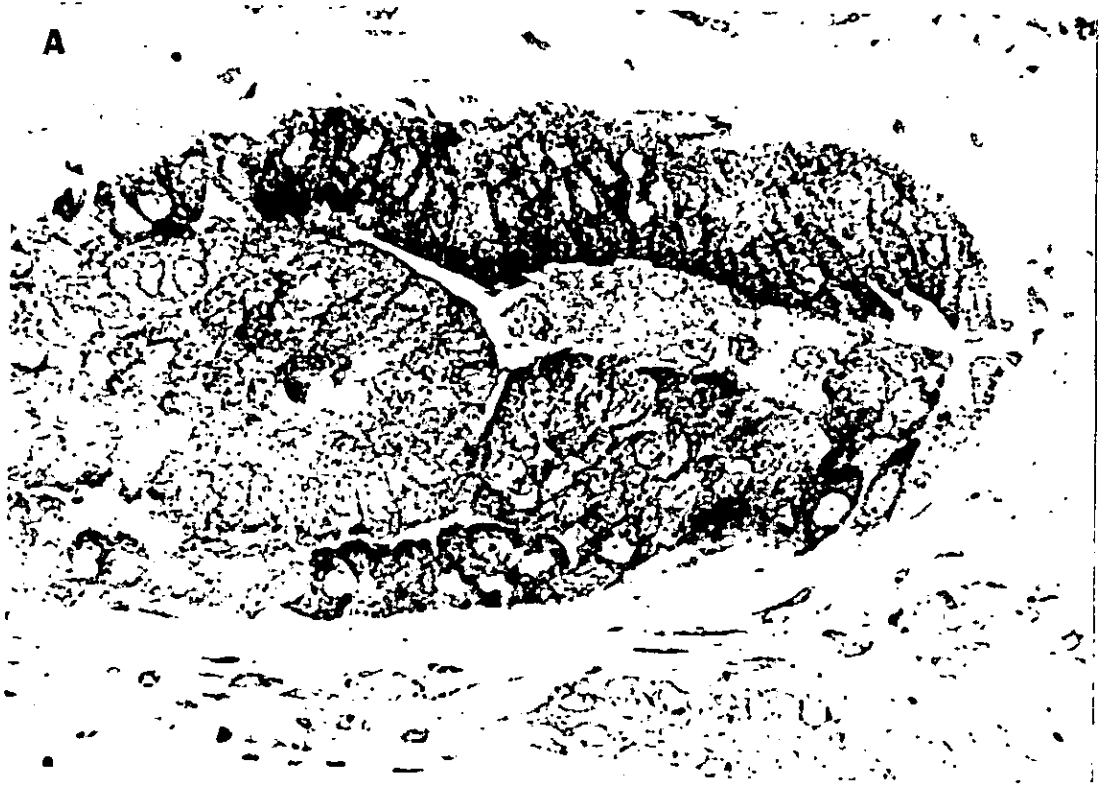
Figura IX.-Inmunodetección de la proteína RET en Adenomas tiroideos (Neoplasias Benignas). A) Adenoma Folicular de Tiroides negativo en la inmunodetección de la proteína RET, B) Adenoma oxifílico de Tiroides negativo en la inmunodetección de la proteína RET.

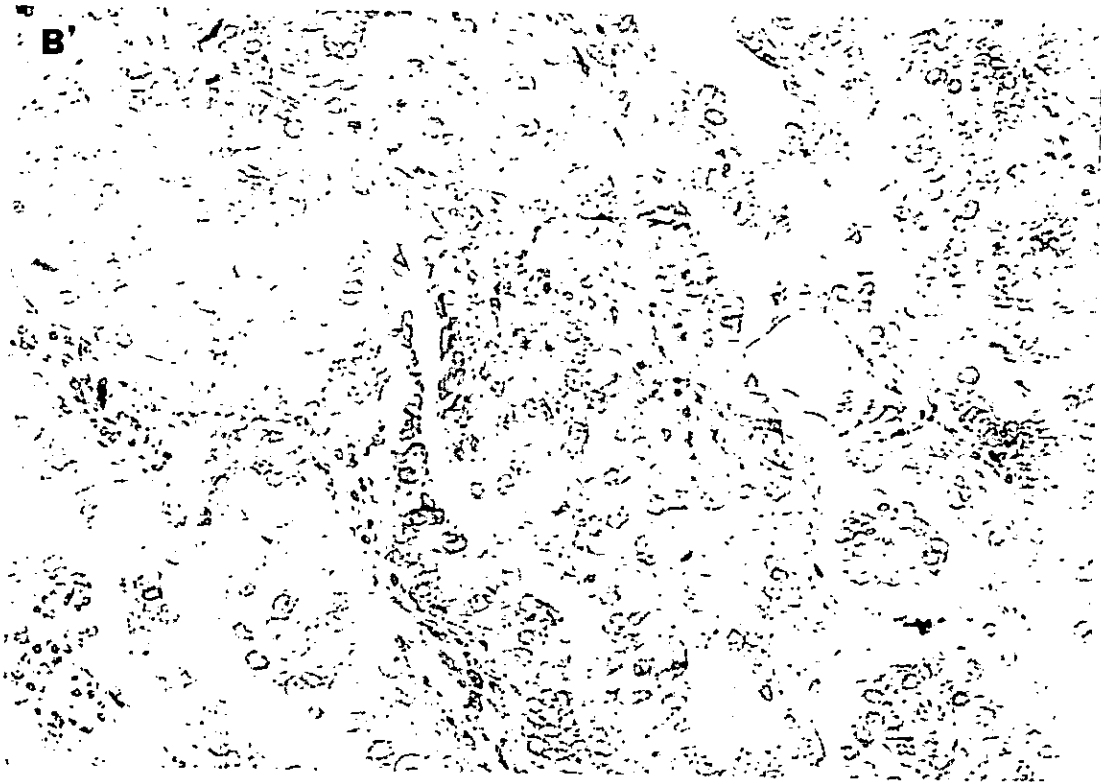
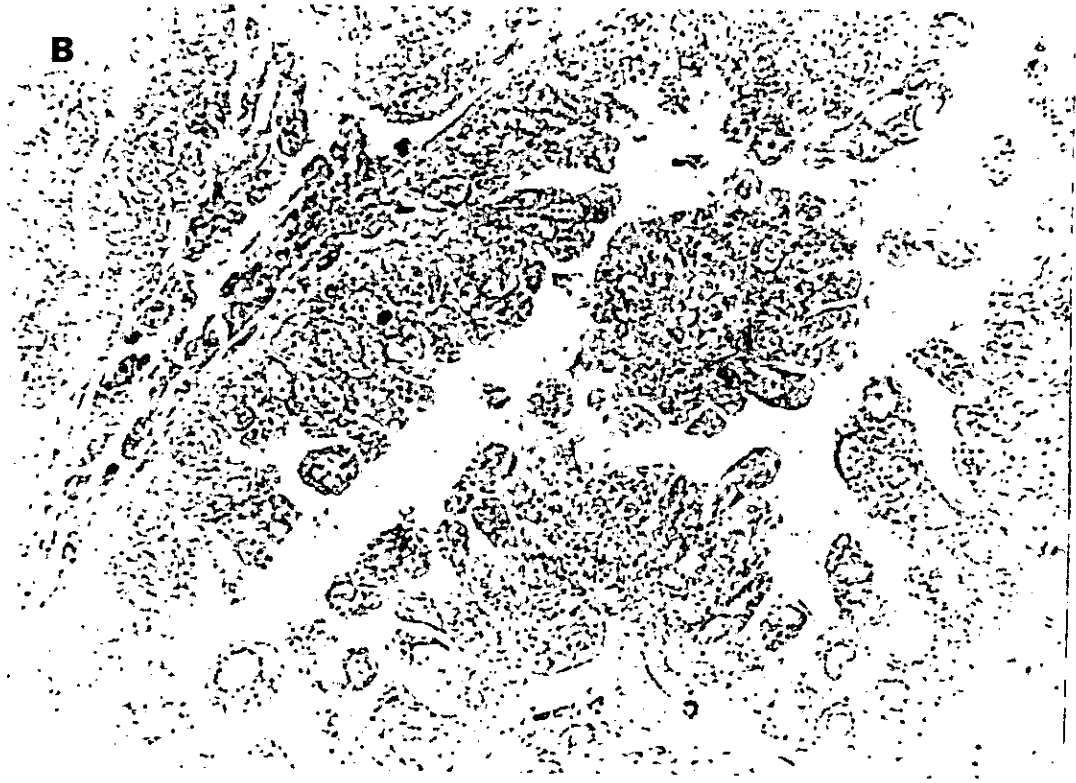
Figura IX.-Inmunodetección de la proteína RET en Adenomas tiroideos (Neoplasias Benignas). A) Adenoma Folicular de Tiroides negativo en la inmunodetección de la proteína RET, B) Adenoma oxifilico de Tiroides negativo en la inmunodetección de la proteína RET.

- La proteína RET se expresa en un gran número de muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo.

En cuanto a la detección de la proteína RET en las muestras de pacientes con Carcinoma Papilar Tiroideo, se encontró una inmunodetección desde baja hasta alta en 15 de las 23 muestras estudiadas (Figura X). Para verificar que estos resultados de inmunoreacción con el anticuerpo anti-RET, son lo suficientemente sensibles para la proteína RET, en estos momentos nos encontramos realizando la detección del transcrito de la proteína RET en los mismos tejidos, mediante la técnica de Hibridación *in situ* de RNA utilizando el Sistema de detección no radioactivo biotilnado llamado Gen Point Dako, con el cual podemos obtener una señal más intensa que una hibridación *in situ* común (ver Material y Métodos) (Figura XI).

En cuanto a los diferentes subtipos morfológicos y a los datos clínicos de las muestras tanto positivas como negativas estos datos fueron resumidos en la Tabla IV y V.





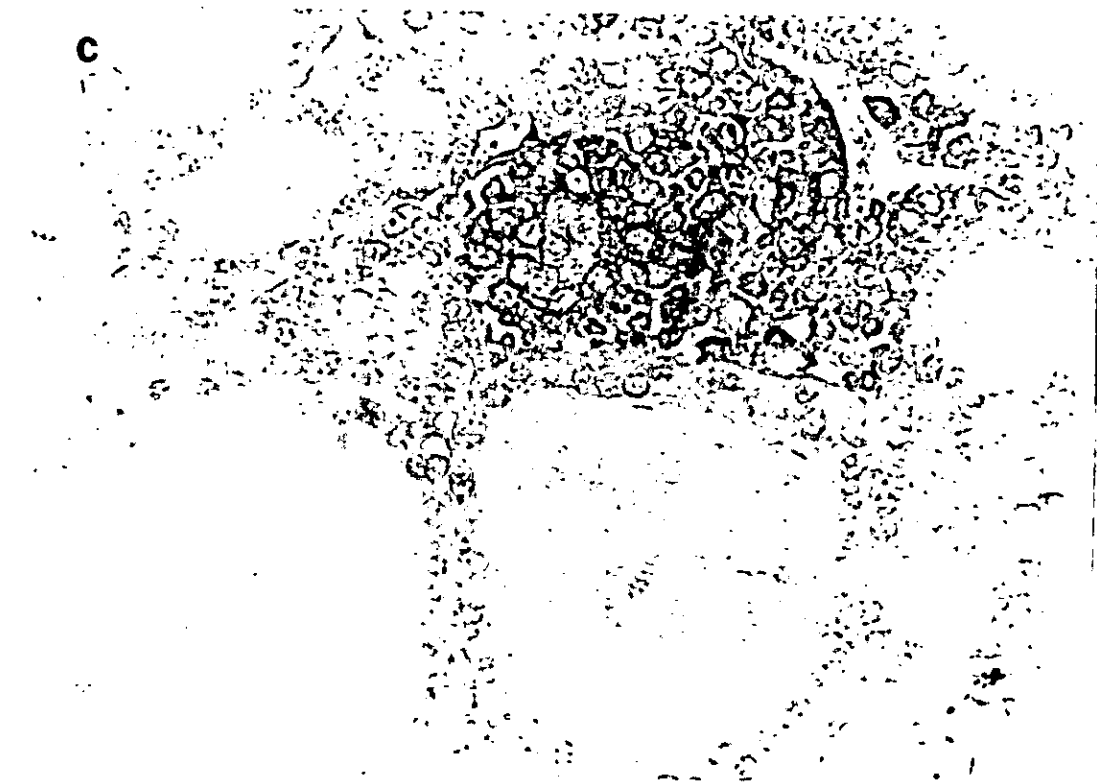




Figura X.- Inmunodetección de la proteína RET en diferentes muestras de Carcinoma Papilar de Tiroides (CPT), junto con sus controles negativos. A) CPT positivo en la inmunodetección de la proteína RET, donde se observan células tumorales con gran positividad, A') control negativo. B) CPT positivo en la inmunodetección de la proteína RET, donde se observan células tumorales con menor positividad, B') control negativo. C) CPT positivo en la inmunodetección de la proteína RET, donde se observan células tumorales con expresión diferencial en diferentes células, C') control negativo y D) CPT negativo en la inmunodetección de la proteína RET, donde se observan células tumorales sin el precipitado color café indicando indirectamente la falta de la proteína, D') control negativo. Todas las muestras están a un aumento de 400X.

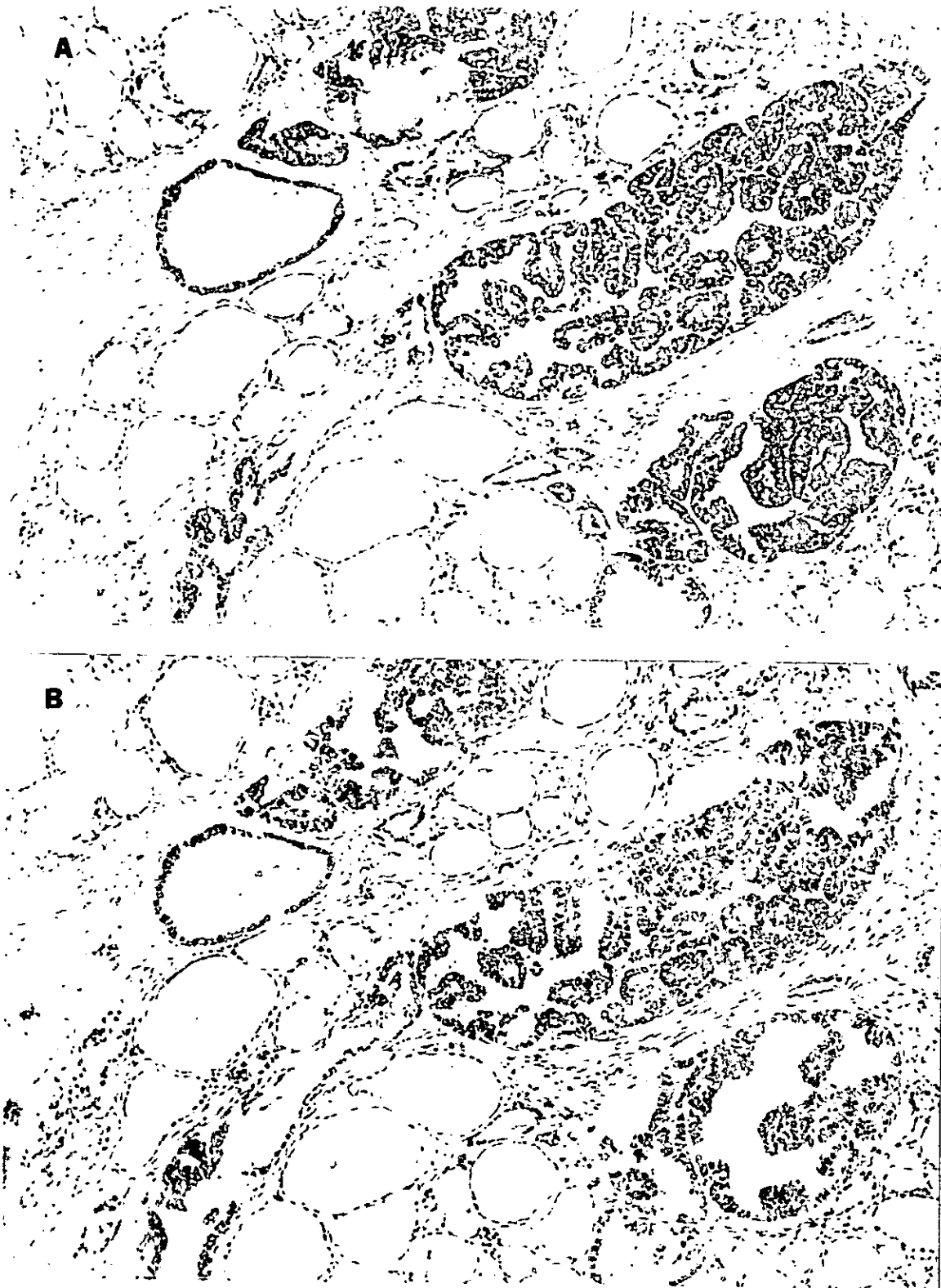


Figura XI.- Inmunodetección de la proteína RET en una muestra de Carcinoma Papilar de Tiroides de histoipo Multifocal, e Hibridación *in situ* de RNA del transcrito de *ret* en la misma muestra. A) CPT positivo en la inmunodetección de la proteína RET, donde se observan células tumorales con gran positividad y B) CPT positivo para la detección del transcrito del oncogén *ret* mediante la hibridación de RNA.

- El análisis estadístico de los resultados entre los tumores positivos y negativos para la proteína RET junto con los subtipos histológicos y algunos Datos clínicos, muestran ciertas diferencias entre ellos.

Al realizar los análisis estadísticos de los resultados que se encuentran en las Tablas IV y V, se obtuvieron datos en cuanto a la presencia o ausencia de la proteína RET y los diferentes subtipos histológicos que presentaban las muestras. Se observó que los subtipos de CPT que clínicamente se les considera de mal pronóstico debido a un comportamiento más agresivo, tienen un $OR=3.4$, o sea que es alrededor de 3 veces más frecuente la presencia de la proteína RET en subtipos de mal pronóstico que en los subtipos considerados de buen pronóstico. Otros resultados fueron obtenidos de los datos clínicos de los pacientes, donde se encontró que sí existen ciertas diferencias entre los pacientes que presentaron invasiones extratiroideas en comparación con los tumores bien encapsulados, ya que tienen un $OR=1.65$, o sea que es aproximadamente 2 veces más frecuente la presencia de la proteína RET en tumores que presentaban invasión fuera de la glándula.

Por último, el análisis de los datos clínicos de edad, sexo y lugar de residencia, presentaron también ciertas diferencias, debido a que los pacientes mayores de 50 años, de sexo femenino y que radicarán en el Distrito Federal o Estado de México, mostraron alrededor de dos veces más frecuente la presencia de la proteína RET que los pacientes que no presentaron estas características. Con lo que respecta a los datos de metástasis y tiempo de detección, no presentaron casi ninguna diferencia entre los pacientes con o sin metástasis, así como los pacientes que su tiempo de detección fue menor o mayor a un año. Desafortunadamente, debido al tamaño de la población de muestras estudiadas, las diferencias encontradas anteriormente no fueron estadísticamente significativas, ya que el valor de P fue mayor a 0.05 en todos los casos.

Subtipos Histológicos de Carcinomas Papilares Tiroideos	Número de Muestras estudiadas	
	RET+	RET-
Subtipos histológicos de Buen Pronóstico Clínico Ordinario o Común y Ordinario con Areas Foliculares	7/13	6/13
Subtipos histológicos de Mal Pronóstico Clínico Con Cambios Oxifílicos, Patrón Folicular, Con Células Altas y Con Células Oncocíticas	8/10	2/10

Tabla IV.-Diferentes subtipos histológicos de las muestras estudiadas con Carcinoma Papilar Tiroideo y la presencia o ausencia en cada uno de la proteína oncogénica RET.

Algunos Datos Clínicos de Pacientes Con Carcinoma Papilar Tiroideo	Número de Muestras estudiadas	
	RET+	RET-
Con Metástasis	8/13	5/13
Sin Metástasis	7/10	3/10
Con Invasión Extratiroidea	11/16	5/16
Sin Invasión Extratiroidea	4/7	3/7
Tiempo de evolución		
Menos de 1 año	5/10	5/10
1 o más años	8/11	3/11
Edad al Diagnóstico		
Menor o igual a 50 años	6/10	4/10
De 51 años en adelante	9/13	4/13
Sexo		
Masculino	2/4	2/4
Femenino	13/19	6/19
Procedencia		
Distrito Federal y Estado de México	12/17	5/17
Interior de la República	3/6	3/6

Tabla V.- Algunos datos clínicos de los pacientes estudiados con Carcinoma Papilar Tiroideo y la presencia o ausencia en cada uno de la proteína oncogénica RET.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la posible relación entre la activación o presencia de la proteína oncogénica RET y algunos datos clínicos y subtipos histológicos de los pacientes con Carcinoma Papilar Tiroideo. Aunque en este estudio se trabajó con una cantidad de muestras no lo suficientemente amplia como para ser estadísticamente significativo (ya que se calculó el número de muestras necesarias para un estudio así, y se necesitarían aproximadamente de 650 muestras), sí nos permite tener una idea parcial, así como un patrón diferencial sobre la posible participación de este gen en este particular tipo de neoplasia tanto en su morfología histológica como en su comportamiento.

Como se ha reportado anteriormente, existen técnicas más sensibles y sofisticadas que la inmunohistoquímica para la detección de la expresión de un gen en particular, como es la Hibridación *in situ* de RNA, Northern Blot, RT-PCR entre otras; pero a pesar de ello, este método posee ciertas ventajas ya que se puede utilizar material fijado en formol e incluido en parafina lo que permite que se puedan realizar estudios retrospectivos y también es una técnica lo suficientemente sensible y barata, la cual puede ser utilizada como un primer paso o filtro para posteriormente utilizar técnicas más sofisticadas y costosas. Debido a estas características se decidió la utilización de la técnica de inmunohistoquímica para el presente estudio.

En lo que respecta a nuestros resultados fue importante determinar la frecuencia con que se presenta la proteína RET en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo obtenidas del Hospital de Oncología, ya que en estudios anteriores se ha demostrado que existe una gran heterogeneidad de expresión y activación de los rearrreglos oncogénicos de ret a nivel mundial, así como también entre los diferentes grupos raciales, lo que indica que no

sabíamos con exactitud la frecuencia con que encontraríamos presente a RET en las muestras estudiadas, debido a que hasta el momento no se habían realizado ningún estudio de este tipo en una población mexicana y ni siquiera en una población latina, lo que es interesante debido a que es factible que entren en juego ciertos factores tanto ambientales como genéticos para que este proto-oncogen sufra estos rearrreglos y se encuentre activo.

Al observar que la proteína oncogénica RET esta presente en 15 de 23 muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo hasta el momento estudiadas (o sea el 65%), nos podría indicar indirectamente que en la población mexicana, esta mutación en este gen en particular es más frecuente que en otras poblaciones anteriormente analizadas. Esto sería de gran interés a futuro, porque el primer cuestionamiento que surge es ¿Qué factor genético-ambiental es el responsable de una mutación tan selectiva en un cierto oncogén y en una población en particular? Y otra cuestión es ¿Qué tan útil sería este oncogen ret como un posible marcador molecular utilizado en la clínica a nivel pronóstico? Hasta el momento, solo se ha visto involucrado directamente el rearrreglo de ret con un factor ambiental que es la exposición a ciertas cantidades de radioactividad de Yodo 131, ya que experimentos *in vitro* lo han relacionado (54), así como varios estudios en niños con CPT que estuvieron expuestos a cantidades altas de Yodo radioactivo debido a la explosión de Chernobyl (55). En nuestro país y en particular en los pacientes estudiados, la exposición a elementos radioactivos es un factor que no estuvo presente en ninguno de ellos, pero sí es interesante el observar que la frecuencia de aparición de la proteína RET fue casi dos veces mayor en los pacientes que están expuestos a altas concentraciones de contaminantes atmosféricos, ya que radican en la Ciudad de México y área conurbada, en comparación a los pacientes que radican en el interior de la república. Este resultado no es concluyente debido al número de muestras analizadas, y ha que no es un estudio epidemiológico, pero sí es importante enfatizarlo y observar a futuro que posible relación tendría éste, debido a que en la actualidad no se conoce a profundidad qué elementos contaminantes pueden ser ciertos grupos raciales, junto con la edad, sexo y tiempo de exposición. Con respecto a lo anterior, también se encontraron datos interesantes en esta población estudiada, en cuanto a que es un factor de riesgo de aparición de la proteína de alrededor del doble si el paciente es mayor de 50 años y es de sexo femenino, lo que nos indicaría que también podrían estar

involucrados ciertos factores tanto de recambio celular ya que a cierta edad el acúmulo de mutaciones es mayor y la maquinaria de reparación genética es menos eficiente, así como también nos estaría diciendo que al ser una glándula endócrina la tiroides, debe existir cierta interacción tanto de hormonas que la glándula produce, como de otras que ejercen cierto control en ella y su concentración diferencial tanto en hombres como en mujeres.

Otra característica importante obtenida de los resultados fue observar que los subtipos histológicos de CPT que los clínicos consideran agresivos debido a su curso clínico más metastásico o con mayores invasiones a tejido extratiroideo, la proteína RET se encontró alrededor de 3 veces más que los subtipos morfológicos de buen pronóstico. Esto podría ser un dato fundamental para apoyar en primer lugar, que existen diferentes vías para el desarrollo de un tumor como es el CPT, donde en algunos estaría mayormente involucrado el oncogen *ret*, y en otros subtipos otros oncogenes muy parecidos a nivel funcional con *ret* como es el proto-oncogen *trk* (que también codifica para una proteína transmembranal transductora de señales); así como también nos podría decir que *ret* esta involucrado junto con otros oncogenes y anti-oncogenes en el desarrollo, la morfología y el comportamiento de estos tumores. En segundo lugar, también podríamos obtener el beneficio en cuanto a que la presencia de RET nos ayudara como un posible marcador genético a nivel pronóstico en donde el clínico pudiera saber con mayor exactitud el posible comportamiento del tumor y por consiguiente un mejor tratamiento, al saber que esta proteína pueda estar involucrada en un comportamiento más agresivo del tumor.

Aun con todo lo anterior, es necesario el realizar un estudio más completo en cuanto a qué papel juega la proteína oncogénica RET en estos tumores tiroideos, en lo que respecta a su interacción en su cascada de traducción y su posible relación con el comportamiento del tumor y su morfología; con qué otros oncogenes y anti-oncogenes interactúa *ret* dentro de la célula para llevar a cabo la transformación cancerosa y que factores ambientales y genéticos podrían ser necesarios para que este proto-oncogen sufra este tipo de rearrreglo oncogénico.

CONCLUSIONES

1.- Existe una expresión alta en comparación con otras poblaciones, de la proteína RET en muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo obtenidas del Hospital de Oncología, del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

2.- La aparición de la proteína RET fue casi tres veces mayor en las muestras de Carcinoma Papilar Tiroideo con un subtipo histológico de mal pronóstico, que en los subtipos de buen pronóstico.

3.-La aparición de la proteína RET fue casi dos veces mayor en los pacientes con Carcinoma Papilar Tiroideo que radican en la Ciudad de México y área conurbada, que tengan más de 50 años y sean del sexo femenino, en comparación a los pacientes que radican en el interior de la República, son menores de 50 años y son del sexo masculino.

4.-La aparición de la proteína RET fue semejante tanto en pacientes con o sin metástasis.

REFERENCIAS

- 1.-Weinberg A.R.(1996) How cancer arises. Scientific American; 275: 32-40.
- 2.-Trichopoulos D., Li P.F. and J.D. Hunter (1996) What causes cancer. Scientific American; 275: 50-57.
- 3.-Bishop M.J. (1987) The molecular genetics of cancer. Science; 235: 305-311.
- 4.-Lewin B. (1997) Genes VI. Oxford University Press, USA. Chapter 37, 1260pp.
- 5.-Felix J.(1976) Bocio y cáncer de tiroides. Federación Panamericana de Asociaciones de Facultades de Medicina, Colombia. 222pp.
- 6.-Pardo M.J. (1992) Anatomía patológica especial. Doyma, Barcelona España. 1055pp.
- 7.-Robbins S.L., Contran R.S. and V. Kumar (1994) Pathologic Basis of disease. W.B. Saunders Co., USA. 1400pp.
- 8.-Flores F. y A. Cabeza de Flores (1990) Endocrinología. Méndez Cervantes, México. 639pp.
- 9.-Ries L., Hankey B.F., Miller B.A., Hartman A.M. and B.K. Edwards (1991) Cancer statistics review 1973-88. Bethesda (MD); National Cancer Institute; NIH publicaton: 91-2789.
- 10.-Kuri P., Mendez R., Macías C.G., De la Garza J.G., Mohar A., Meneses A., Ángeles A., Chávez L. y R.L. Fernández (1997) Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Dirección General de Epidemiología, México. 157pp.

- 11.-Santacruz D.J. (1985) Thyroid tumor pathology. Proceedings of an international workshop. San Miniato Italy, October 1984. Seminars in diagnostic pathology; 2: 87-146.
- 12.-Takahashi M., Ritz J. and G.M. Cooper (1985) Activation of a novel human transforming gene ret by DNA rearrangement. Cell; 42: 581-588.
- 13.-Carney J.A., Ryan J. and J.R. Goellner (1987) Hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland. Am J Surg Pathol; 11: 583-591.
- 14.-Johnson T.L., Lloyd R.V., Thompson N.W., Beierwaltes W. H. and J.C. Sisson (1988) Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. Am J Surg Pathol; 12: 22-27.
- 15.-Taruscio D., Carcangiu M.L., Ried T. and D.C. Ward (1994) Numerical chromosomal aberrations in thyroid tumors detected by double fluorescence in situ hybridization. Genes Chrom Cancer; 9: 180-185.
- 16.-Roque L., Clode A.L., Gomes P., Rosa-Santos J., Soares J. and S. Castedo (1995) Cytogenetic findings in 31 papillary thyroid carcinomas. Genes Chrom Cancer; 13: 157-162.
- 17.-Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and J.D. Watson (1983) Molecular biology of the cell. Garland Publishers Inc. New York & London.
- 18.-Nakane P.K. and A. Kawaoi (1974) Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. J Histochem Cytochem; 22: 1084-1091.
- 19.-Sepúlveda A. (1984) Técnicas inmunohistoquímicas en patología. preparación del complejo peroxidasa-anti-peroxidasa. Tesis, Facultad de Química, UNAM.

- 20.-Farid N.R., Shi Y. and M. Zou (1994) Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev*; 15: 202-232.
- 21.-Grieco M., Santoro M., Berlingieri M.T., Donghi R., Pierotti M.A., Della Porta G., Fusco A. and G. Vecchio (1988) Molecular cloning of PTC, a new oncogene found activated in human thyroid papillary carcinomas and their lymph node metastases. *Ann NY Acad Sci*; 551: 380-381.
- 22.-Santoro M., Sabino N., Ishizaka Y., Ushijima T., Carlomagno F., Cerrato A., Grieco M., Battaglia C., Martelli M.L., Paulin C., Fabien N., Sugimura T., Fusco A. and M. Nagao (1993) Involvement of ret oncogene in human tumours: specificity of ret activation to thyroid tumours. *Br J Cancer*; 68: 460-464.
- 23.-Grieco M., Santoro M., Berlingieri M.T., Melillo R.M., Donghi R., Bongarzone Y., Pierotti M.A., Della Porta G., Fusco A. and G. Vecchio (1990) PTC is a novel rearranged form of the ret proto-oncogene and is frequently detected in vivo in human thyroid papillary carcinomas. *Cell*; 60: 557-563.
- 24.-Takahashi M., Burma Y., Iwamoto T., Inaguma Y., Ikeda H. and H. Hiai (1988) Cloning and expression of the ret proto-oncogene encoding a tyrosine Kinase with two potential transmembrane domains. *Oncogene*; 3: 571-578.
- 25.-Takahashi M., Buma Y. and H. Hiai (1989) Isolation of ret proto-oncogene cDNA with an aminoterminal signal sequence. *Oncogene*; 4: 805-806.
- 26.-Worby C.A., Vega Q.C., Zhao Y., Chao H.J., Seas Holtz A.F. and J.E. Dixon (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor signals through the ret receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chemistry*; 271: 23619-23622.

- 27.-Durbec P., Marcos-Gutierrez C.V., Kilkenny C., Grigoriou M., Wartiovaara K., Suvanto P., Smith D. and B. Ponder (1996) GDNF signalling through the RET receptor tyrosine kinase. *Nature*; 381: 789-793.
- 28.-Trupp M., Arenas E., Fainzilber M., Nilsson A., Sieber B. and M. Grigoriou (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature*; 381: 785-789.
- 29.-Pachnis V., Mankoo B. and F. Costantini (1993) Expression of the c-ret proto-oncogene during mouse embryogenesis. *Development*; 119:1055-1017.
- 30.-Nakamura T., Ishizaka Y., Nagao M., Hara M. and T. Ishikawa (1994) Expression of the ret proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. *J Pathol*; 172: 255-260.
- 31.-Takahashi M., Buma Y. and M. Taniguchi (1991) Identification of the ret proto-oncogene products in neuroblastoma and leukemia cells. *Oncogene*; 6: 297-301.
- 32.-Ishizaka Y., Shima H., Sugimura T. and M. Nagao (1992) Detection of phosphorylated ret oncogene product in cytoplasm. *Oncogene*; 7: 1441-1444.
- 33.-Lanzi C., Borrello M.G., Bongarzone Y., Migliazza A., Fusco A., Grieco M., Santoro M., Gambetta R.A., Zunino F., Della Porta G. and M.A. Pierotti (1992) Identification of the product of two oncogenic rearranged forms of the ret proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*; 7: 2189-2194.
- 34.-Tahira T., Ishizaka Y., Itoh F., Sugimura T. and M. Nagao (1990) Characterization of the ret proto-oncogene mRNA encoding two isoforms of the protein product in a human neuroblastoma cell line *oncogene*; 5: 97-102.

- 35.-Xing S., Tong Q., Suzuki T. and S.M. Jhiang (1994) Alternative splicing of the ret proto- oncogene at intron 4. *Biochem Biophys Res Comm*; 205: 1526-1532.
- 36.-Lorenzo M.J., Eng C., Mulligan L.M., Stonehouse T.J., Healey C.S., Ponder B.A.J. and D.P. Smith (1995) Multiple mRNA isoforms of the human ret proto-oncogene generated by alternate splicing. *Oncogene*; 10: 1377-1383.
- 37.-Ceccherini I., Bocciardi R., Yin L., Pasini B., Hofstra R.M.W., Takahashi M. and G. Romeo (1993) Exon structure and flanking intronic sequences of the human ret proto-oncogene. *Biochem Biophys Res Comm*; 196: 1288-1295.
- 38.-Ceccherini I., Hofstra R.M.W., Yin L., Stulp R.p., Barone V., Stelwagen T., Bocciardi R., Nijveen H., Bolino A., Seri M., Ronchetto P., Pasini B., Bozzano M., Buys CH.C.M. and G. Romeo (1994) DNA polymorphisms and conditions for SSCP analysis of the 20 exons of the ret proto-oncogene. *Oncogene*; 9: 3025-3029.
- 39.-Pasini B., Hofstra R.M.W., Yin L., Bocciardi R., Santamaria G., Grootsholten P.M., Ceccherini I., Patrone G., Priolo M., Buys CH.C.M. and G. Romeo (1995) The physical map of the human ret proto-oncogene. *Oncogene*; 11: 1737-1743.
- 40.-Goodfellow P.J. and S.A. Well (1995) Ret gene and its implications for cancer. *J Natl Cancer Ins*; 87: 1515-1523.
- 41.-Ishizaka Y., Itoh F., Tahira T., Ikeda I., Sugimura T. and J. Tucker (1989) Human ret proto-oncogene mapped to chromosome 10q11.2. *Oncogene*; 4: 1519-1521.
- 42.-Santoro M., Carlomagno F., Hay I.D., Herrmann M.A., Grieco M., Melillo R., Pierotti M.A., Bongarzone I., Della Porta G., Berger N., Peix J.L., Paulin C., Fabien N., Vecchio G., Jenkins R.B. and A. Fusco (1992) Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest*; 89: 1517-1522.

- 43.-Ishizaka Y., Ushijima T., Sugimura T. and M. Nagao (1990) cDNA cloning and characterization of ret activated in a human papillary thyroid carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun*; 168: 402-408.
- 44.-Bongarzone I., Monzini N., Borrello M.G., Carcano C., Ferraresi G., Arighi E., Mondellini P., Della Porta G. and M.A. Pierotti (1993) Molecular characterization of a thyroid tumor-specific transforming sequence formed by the fusion of the ret tyrosine kinase and the regulatory subunit R1 α of cyclic AMP-dependent protein kinase A. *Mol Cell Biol*; 13: 358-366.
- 45.-Bongarzone I., Butti M.G., Coronelli S., Borrello M.G., Santoro M., Mondellini P., Pilotti S., Fusco A., Della Porta G. and M.A. Pierotti (1994) Frequent activation of ret proto-oncogene by fusion with a new activating gene in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res*; 54: 2979-2985.
- 46.-Santoro M., Dathan N.A., Berlingieri M.T., Bongarzone I., Paulin C., Grieco M., Pierotti M.A., Vecchio G. and A. Fusco (1994) Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the ret proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma. *Oncogene*; 9: 509-516.
- 47.-Pierotti M.A., Santoro M., Jenkin R.B., Sozzi G., Bongarzone I., Grieco M., Monzini N., Miozzo M., Herrmann M.A., Fusco A., Hay I.D., DellaPorta G. and G. Vecchio (1992) Characterization of an inversion on the long arm of chromosome 10 juxtaposing D10S170 and ret and creating the oncogenic sequence RET/PTC. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 1616-1620.
- 48.-Minoletti F., Butti M.G., Coronelli S., Miozzo M., Sozzi G., Pilotti S., Tunnacliffe H., Pierotti M.A. and I. Bongarzone (1994) The two genes generating RET/PTC3 are localized in chromosomal band 10q11.2. *Genes Chrom Cancer*; 11: 51-57.

- 49.-Ishizaka Y., Kobayashi S., Ushijima T., Sugimura T. and M. Nagao (1991) Detection of RET/PTC transcripts in thyroid adenomas and adenomatous goiter by an RT-PCR method. *Oncogene*; 6: 1667-1672.
- 50.-Viglietto G., Chiappetta G., Martínez-Tello F.J., Fukunaga F.H., Tallini G., Rigopoulou D., Visconti R., Mastro A., Santoro M. and A. Fusco (1995) RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene*; 11: 1207-1210.
- 51.-Santoro M., Chiappetta G., Cerrato A., Salvatore D., Zhang L., Manzo G., Picone A., Portella G., Santelli G., Vecchio G. and A. Fusco (1996) Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene*; 12: 1821-1826.
- 52.-Jhiang S.M., Caruso D.R., Gilmore E., Ishizaka Y., Tahira T., Nagao M., Chiu I.M. and E.L. Mazzaferri (1992) Detection of the PTC/ret^{TPC} oncogene in human thyroid carcinomas. *Oncogene*; 7: 1331-1337.
- 53.-Jhiang S.M. and E.L. Mazzaferri (1994) The RET/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J Lab Clin Med*; 123: 331-337.
- 54.-Ito T., Seyama T., Iwamoto K.S., Hayashi T., Mizuno T., Tsuyama N., Dohi K., Nakamura N. And M. Akiyama (1993) In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res*; 53: 2940-2943.
- 55.-Klugbauer S., Lengfelder E., Demidchik E.P. and H.M. Rabes (1995) High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene*; 11: 2459-2467.