

THE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) SIGNALING PATHWAY IN PAPILLARY THYROID CANCER. FROM THE MOLECULAR BASES TO CLINICAL PRACTICE

In recent years, significant progress has been made in elucidating the genetic bases promoting tumorigenesis in various human neoplasms. Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway is a major event in the carcinogenesis of papillary thyroid carcinoma (PTC), the most prevalent endocrine malignancy. Affected elements include RET/PTC rearrangements and point mutations of the Ras and BRAF genes. Mutations in these genes are found in over 70% of PTC. Chromosomal RET rearrangements, called RET/PTC, result in constitutive ligand-independent activation of RET kinase, which was the first genetic anomaly detected in PTC and is found in 5-70% of tumoral samples. Although less frequent, the activation of other tyrosine kinase receptors, such as NTRK1, c-Met or EGFR, has also been reported in PTC. The BRAF mutation represents the most common genetic alteration found in PTC. More than 90% of BRAF mutations lead to a change of a valine to a glutamic acid at position 600 (V600E). Finally, Ras is the least affected molecule in the pathway. A relationship between clinical behavior and these genetic alterations has been proposed. Thus, the BRAF mutation is associated with a more aggressive PTC phenotype and is correlated with poorer outcomes. However, no clear association has been found between RET/PTC and clinical features. The discovery of these alterations opens the way to new therapeutic strategies, especially to treat those patients in whom conventional therapy is not effective. Several new drugs are being tested, such as small molecule tyrosine kinase inhibitors. Some of these recently developed agents have begun to be used with promising results.

Key words: Papillary thyroid carcinoma. MAPK. RET/PTC. BRAF.

Vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica en el carcinoma papilar de tiroides. De las bases moleculares a la práctica clínica

CARLES ZAFON Y GABRIEL OBIOLS

Servicio de Endocrinología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

En los últimos años se ha empezado a descubrir las bases genéticas de la carcinogénesis en diferentes neoplasias humanas. La desregulación de la vía de señalización dependiente de la proteincinasa de activación mitogénica (MAPK) es un mecanismo fundamental en la oncogénesis del carcinoma papilar de tiroides (CPT), el tumor endocrino más frecuente. Concretamente, tres integrantes de la vía –el receptor tirosincinasa RET, Ras y BRAF– se encuentran implicados en más del 70% de los casos. El reordenamiento cromosómico de RET, denominado RET/PTC, ocasiona la activación enzimática de esta tirosincinasa. Fue la primera alteración genética específica del CPT y se encuentra en un 5-70% de las muestras tumorales. En menor proporción se han encontrado activaciones constitutivas de otros receptores tirosincinasa, como NTRK1, c-met o EGFR. La mutación de BRAF es la alteración genética más frecuente en el CPT. En la mayoría de los casos, la mutación ocasiona un cambio de valina por ácido glutámico en la posición 600 (V600E). Finalmente, Ras es la molécula menos afectada de la vía. La presencia de estas alteraciones se correlaciona, en algunos casos, con el comportamiento clínico de la enfermedad. Así, la mutación de BRAF condiciona una mayor agresividad y un peor pronóstico. No hay tanto consenso en el papel de RET/PTC. Por otro lado, el descubrimiento de estas alteraciones abre la puerta a nuevas estrategias terapéuticas, en especial para los pacientes en quienes el tratamiento convencional resulta inefectivo. Entre las nuevas opciones se encuentran los inhibidores de las tirosincinasas. Algunos fármacos de esta familia han empezado a ser utilizados con resultados esperanzadores.

Palabras clave: Carcinoma papilar de tiroides. MAPK. RET/PTC. BRAF.

INTRODUCCIÓN

El cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina más frecuente. En un 3% de los casos afecta a las células C o parafoliculares y da lugar al carcinoma medular. Otro 2% de los casos corresponde a la forma indiferenciada denominada carcinoma anaplásico. Sin embargo, la gran mayoría se engloba en el término carcinoma diferenciado de tiroides (CDT), con dos formas principales, el folicular

Correspondencia: Dr. C. Zafon.
Hospital Universitari Vall d'Hebron.
Pg. Vall d'Hebron, 119-129. 08035 Barcelona. España.
Correo electrónico: 26276czl@comb.es

Manuscrito recibido el 27-2-2009 y aceptado para su publicación el 18-3-2009.

(15%) y el papilar (CPT) (80%)¹. El CPT incluye un grupo heterogéneo de neoplasias tiroideas compuesto por diversas variantes con implicaciones para el pronóstico también diferentes. Actualmente, el esquema terapéutico comprende la tiroidectomía total, con exéresis simultánea de los ganglios del compartimento central, la ablación de restos con radioyodo (¹³¹INa) y el tratamiento con L-tiroxina a dosis supresoras de tirotrópina. Mediante este protocolo, se ha logrado una gran mejora del pronóstico de la enfermedad, con una mortalidad que no excede el 10% a los 10 años^{2,3}. Por esta razón, algunos investigadores clínicos han venido considerando que la modalidad terapéutica podría ser demasiado agresiva para la mayoría de los casos. Así, y a fin de seleccionar qué pacientes pudieran tener una evolución peor, se han propuesto varios factores pronósticos. Los más aceptados son la edad, el tipo histológico, la extensión inicial de la enfermedad y el tamaño del tumor primario. A pesar de ello, no se ha establecido la causa de que en algunos pacientes el CPT sufre un proceso de dediferenciación que hace que el tejido neoplásico pierda la capacidad de producir tiroglobulina y concentrar yodo, lo que convierte el tumor en resistente al tratamiento convencional.

El conocimiento cada vez más profundo de las bases moleculares que rigen la transformación neoplásica ha puesto de manifiesto que la manera de caracterizar correctamente el cáncer de tiroides debe residir en los factores genéticos involucrados en los mecanismos que determinan la extensión inicial de la enfermedad y el proceso de dediferenciación.

Hace poco más de 20 años Sturgill et al⁴ detectaron la presencia de actividad proteincinasa activada por insulina en extractos de adipocitos 3T3-L1 con capacidad para fosforilar un péptido identificado como MAP-2. Durante estas dos décadas se ha llegado a detallar, con elevada exactitud, la composición de los elementos que integran lo que hoy conocemos como vía de señalización dependiente de la proteincinasa, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Esta ruta, altamente conservada desde microorganismos hasta mamíferos, constituye una de las cascadas moleculares más importantes en la regulación de aspectos clave de la funcionalidad celular como la diferenciación, la proliferación y la migración⁵. Su activación transmite señales desde distintos tipos de receptores de membrana hasta activar factores de transcripción nuclear (fig. 1). Una pequeña proteína de unión a guanosintrifosfato (GTP), denominada ras, es la molécula que actúa como transductor inicial y común de la señal iniciada tras la activación de los receptores de membrana. Ras se comporta como un interruptor bimodal, con dos estados conformacionales, uno activo y otro inactivo. La conformación activa produce la activación de la MAP-cinasa-cinasa, conocida también como RAF. A su vez, RAF activa, mediante fosforilación, la MAP-cinasa-cinasa o MEK. Finalmente, MEK activa la MAP-cinasa o ERK. Por lo tanto, la estructura básica de MAPK está formada por un módulo de tres cinasas (RAF, MEK y ERK)

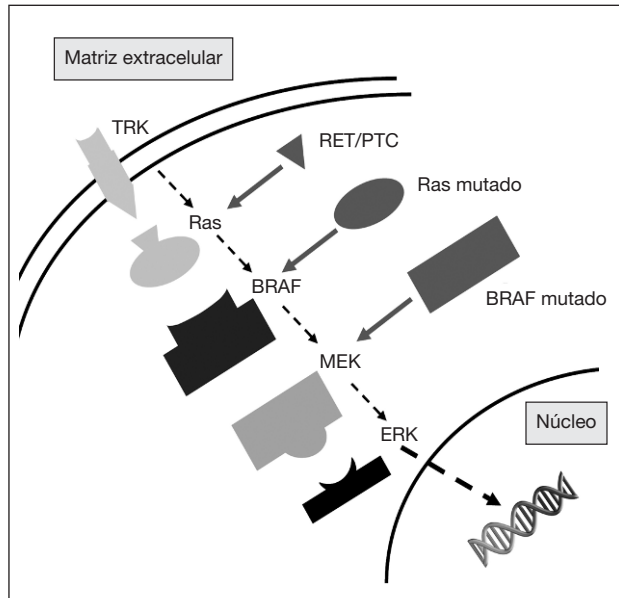


Fig. 1. Esquema de la vía de señalización de activación mitogénica (MAPK). A la derecha: lugar de activación constitutiva de la vía debido a las diferentes alteraciones genéticas detectadas en el carcinoma papilar de tiroides

dependiente de la proteincinasa que se activan de manera secuencial. Mientras que RAF y MEK son de localización citoplásmica, ERK tiene la capacidad de trasladarse al núcleo, y ahí puede fosforilar directamente un gran número de factores de transcripción como c-jun o c-Myc.

En los últimos años se ha visto que la desregulación de MAPK está implicada en la carcinogénesis de numerosos tumores humanos. De hecho, una gran cantidad de miembros de la vía fueron identificados inicialmente como protooncogenes. Así, la activación aberrante de la vía MAPK es un hallazgo frecuente en células malignizadas. En la última década, se ha podido demostrar que la alteración de la vía constituye un elemento precoz, y necesario, en el desarrollo del CPT⁶. Concretamente, tres elementos de la vía ya han sido implicados en más del 70% de los casos, y se acepta que la desregulación de MAPK es un evento inicial en la carcinogénesis específica de este tipo de tumor tiroideo⁷. Estos elementos son el receptor tirosincinasa RET, la proteína Ras y la cinasa RAF. Dichas alteraciones son mutuamente excluyentes⁸, lo que refuerza la idea de que la aberración de la vía de la cual forman parte es un elemento indispensable para el desarrollo del CPT⁹. Así, en un elegante conjunto de estudios, Melillo et al¹⁰ han demostrado que las tres moléculas están implicadas en la iniciación del CPT a través de la misma cascada de señalización.

RECEPTORES TIROSINCINASA

La vía MAPK puede ser activada a partir de diversas señales extracelulares, como citocinas, factores de cre-

cimiento y otros péptidos, a través de su acción sobre receptores de membrana. Entre las diferentes familias de receptores capaces de activar ras se encuentran los receptores con actividad tirosincinasa (RTK). Todos los integrantes de este grupo presentan una estructura común formada por tres regiones: un dominio extracelular que constituye el lugar de unión con el ligando, el dominio transmembrana y, en tercer lugar, el dominio intracelular o citoplásmico, que es el que posee la actividad enzimática tirosincinasa. En las mismas fechas que Sturgill y Ray sentaban las bases sobre el descubrimiento de la vía MAPK, Fusco et al¹¹ describían la presencia de una aberración cromosómica en el gen de un RTK, conocido como *RET*, en el CPT.

RET/PTC

El gen *RET* (*rearranged during transfection*)¹² codifica un RTK que se expresa primariamente en neuronas sensoriales del sistema simpático y del plexo entérico, así como en la yema del uréter durante la embriogénesis y en la diferenciación de los espermatozonios¹³. El ligando natural del receptor es el factor de crecimiento GDNF (*glial line-derived neurotrophic factor*). *RET* está implicado en diferentes afecciones humanas. Así, la mutación inactivadora germinal causa la agangliosis del tracto intestinal (enfermedad de Hirschprung), mientras que mutaciones activadoras son las causantes de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2A (MEN 2A)¹⁴.

Fusco et al¹¹ describieron en 1987 la presencia de una recombinación pericentromérica del cromosoma 10, por la cual se producía una fusión del dominio tirosincinasa de *RET* con el extremo 5' terminal de un gen conocido como *H4*. Este tipo de aberración estructural cromosómica es un mecanismo común en la oncogénesis de las neoplasias hematológicas, pero es un hallazgo muy poco frecuente en los carcinomas¹⁵. El gen quimérico resultante fue denominado *RET/PTC*. El efecto de dicha alteración es la activación enzimática constitutiva de *RET*. Posteriormente han sido descritas otras variantes de *RET/PTC*, en función del gen que se fusiona con el dominio tirosincinasa (TK) de *RET* y que actúa de promotor en su expresión. Hasta la fecha se conocen más de 17 isoformas, de las que *RET/PTC1* y *RET/PTC3* son las encontradas más frecuentemente^{16,17}.

En la actualidad no hay ninguna duda de que *RET/PTC* es un elemento clave en la carcinogénesis del CPT. Estudios experimentales han demostrado que induce la transformación neoplásica en cultivos de células foliculares¹⁸. Además, ratones transgénicos portadores de *RET/PTC* desarrollan el tumor con una elevada frecuencia¹⁹. También se acepta que su papel etiopatogénico queda restringido específicamente al tipo histológico papilar, ya que no ha sido detectado en otras clases de neoplasias tiroideas, como el carcinoma folicular o el carcinoma medular¹⁷. No obstante, algu-

nos autores han detectado *RET/PTC* en muestras de tiroides con tiroiditis crónica autoinmunitaria, aunque se desconoce el significado exacto de este hallazgo²⁰.

RET/PTC se encuentra frecuentemente en microcarcinomas papilares²¹. Por otro lado la presencia de *RET/PTC* es suficiente para ocasionar cambios morfológicos característicos de CPT en el núcleo de células foliculares²². Además, *RET/PTC* es más predominante en las formas de CPT bien diferenciadas, como la variante clásica²³, que en variantes histológicas más agresivas, como el carcinoma pobremente diferenciado y el carcinoma anaplásico²⁴. Todo ello lleva a considerar que *RET/PTC* actúa en los primeros pasos de la transformación tumoral, pero no participa en los eventos posteriores²⁵.

El factor etiológico que provoca *RET/PTC* es desconocido. Se ha publicado su elevada presencia en los casos de CPT aparecidos tras el accidente de la central nuclear de Chernobyl²⁶. Además, estudios experimentales han mostrado que la irradiación con rayos X induce la formación de *RET/PTC* en cultivos de células foliculares^{27,28}. Recientemente, Hamatani et al²⁹ han detectado una elevada incidencia de *RET/PTC* en casos de CPT de supervivientes de la bomba atómica. Todo ello parece indicar que las radiaciones ionizantes podrían ser la causa de la aberración cromosómica. Nikiforova et al³⁰ han señalado que la cromatina de las células tiroideas presenta una estructura tridimensional específica que la convertiría en altamente sensible a esta anomalía genética. Por otro lado, se ha visto que las células tiroideas son relativamente resistentes a la apoptosis ante la lesión de su material genético³¹. Así, la combinación de una configuración tridimensional característica y la disminuida respuesta a la apoptosis justifican la especial predisposición a la aberración cromosómica³².

Desde su descubrimiento, son numerosos los trabajos que han analizado la incidencia *RET/PTC* en el CPT, pero se observa gran disparidad de resultados. Así, la frecuencia oscila desde el 2,5 hasta más del 80% según las series estudiadas³³⁻³⁸. La heterogeneidad detectada ha sido atribuida a diferentes causas, como factores geográficos, características de los pacientes que configuran las distintas series, variantes histológicas o la metodología empleada^{34,39,40}. Por ejemplo, las series que incluyen a pacientes más jóvenes encuentran mayor incidencia⁴¹. El método utilizado para su determinación podría ser de lo más relevante⁴². Inicialmente, la detección de *RET/PTC* se efectuaba mediante técnica molecular y posteriormente se dispuso de inmunohistoquímica⁴³. Ésta permite la detección de cualquier variante de la alteración, mientras que la primera es específica para cada una de ellas³⁶. Por ello los trabajos que utilizan determinaciones inmunohistoquímicas hallan una mayor frecuencia de casos positivos que supera, en muchas ocasiones, el 60% de las muestras analizadas^{37,44}. Finalmente, algunos autores han descrito heterogeneidad en la distribución de *RET/PTC* en las células de un mismo tumor⁴⁵.

Otro aspecto controvertido es la utilidad clínica que puede ofrecer *RET/PTC*. No hay un claro consenso sobre el valor pronóstico de esta alteración. Algunos investigadores postulan que la presencia de *RET/PTC* se asocia a tumores con bajo potencial de crecimiento, a pacientes más jóvenes, a los que exhiben características histológicas de la variante clásica e incluso a neoplasias de menor tamaño, como es el caso del microcarcinoma^{24,35,36,46}. De esta manera, numerosos autores no han encontrado ninguna relación entre *RET/PTC* y los factores pronósticos clásicamente aceptados como la edad del paciente, el tamaño del tumor o la extensión^{36,47-49}. Tampoco se han observado diferencias significativas en la supervivencia entre los pacientes *RET/PTC* positivos y los negativos⁴⁷. Sin embargo, otros autores han demostrado que *RET/PTC* se asocia de manera significativa a una mayor incidencia de extensión extraglandular, pero limitada especialmente a la invasión de ganglios linfáticos regionales^{37,50,51}. A pesar de esta asociación, hay cierta unanimidad en que los portadores de *RET/PTC* tienen bajo potencial de malignidad, aunque se desconoce la causa de esta aparente paradoja⁴⁶.

En resumen, *RET/PTC* fue la primera alteración genética específica descrita en el CPT. Se lo considera un evento precoz en el proceso de carcinogénesis de este tipo de neoplasia y su presencia define un patrón histológico de bajo grado de malignidad, aunque puede asociarse a una mayor predisposición de afección ganglionar cervical.

NTRK1

El papel de la activación de enzimas con actividad TK como paso inicial en el proceso de transformación neoplásica en el CPT se vio reforzado en el momento en que se describió la implicación de un segundo RTK. NTRK1 (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1*) es el receptor del NGF (*nerve growth factor*), el cual regula el crecimiento y la diferenciación de neuronas tanto del sistema nervioso central como del sistema nervioso periférico⁵². La mutación con pérdida de función del gen ha sido implicada en la enfermedad genética conocida como insensibilidad congénita al dolor con anhidrosis⁵³. En el CPT, la alteración detectada es parecida a la de RET, es decir, un reordenamiento cromosómico con la fusión del dominio enzimático con otros genes, que actúan de promotores activando su función TK⁵⁴. Hasta la fecha se han descrito cuatro variantes en relación al gen fusionado⁵⁵. La implicación de NTRK1 en la génesis del CPT ha sido confirmada experimentalmente por Russell et al⁵⁶. Los autores desarrollaron ratones transgénicos que expresaban TRK-T1 (la variante más frecuente, fruto de la fusión del dominio enzimático de NTRK1 con el gen *TPR*) y observaron que todos los animales mayores de 7 meses de edad desarrollaban hiperplasia y/o carcinoma tiroideo. Por otro lado, Roccatto et al⁵⁷ han demostrado que

la estructura tridimensional del cromosoma 1, donde se localiza el gen, favorece la fusión de NTRK1 con *TPR*. No obstante, y a diferencia de lo que ocurre con RET, no parece que las radiaciones ionizantes tengan un papel etiológico en el reordenamiento de NTRK1⁵⁵. Así, la incidencia en casos de CPT tras Chernobyl es baja y no muestra diferencias de la encontrada en CPT esporádicos^{58,59}.

La incidencia de NTRK en el CPT es menor que la de RET/PTC, aunque presenta también una gran variación que oscila, según las series, entre 0 y el 50% de las muestras analizadas^{49,60,61}. Algunos autores han determinado conjuntamente la presencia de RET/PTC y NTRK1. En todos los casos la incidencia del primero es superior a la del segundo, y la suma de ambos alcanza alrededor del 30% de las muestras^{49,60}. Cabe destacar que no existe ningún caso publicado en que coexistieran ambas alteraciones en un mismo tumor^{60,62}.

El significado clínico de NTRK1 no está establecido. Algunos autores han encontrado que los portadores de esta alteración tienen peor pronóstico que los pacientes con RET/PTC⁴⁹, pero el hallazgo no ha sido verificado por otros estudios⁶⁰.

EGFR

Aparte de RET y NTRK1, otros RTK han sido implicados en la carcinogénesis del CPT, aunque en muchos casos los estudios han mostrado resultados contradictorios. Así, algunos trabajos han encontrado una sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)⁶³. Además, para ciertos autores la presencia de dicho receptor se asocia a tumores de comportamiento más agresivo^{64,65}. En otras series se ha observado una diferencia de localización celular de EGFR, siendo característica su ausencia en el núcleo de las células del CPT, contrariamente a lo que ocurre en el carcinoma folicular⁶⁶. Finalmente, trabajos más recientes apuntan que EGFR podría tener un papel más importante en los tumores anaplásicos o pobremente diferenciados^{67,68}. En este sentido, Liu et al⁶⁹ han resaltado la elevada implicación de diversos TRK en los carcinomas más indiferenciados.

C-MET

La participación de c-met, el receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF), ha sido ampliamente estudiada en el CPT. La mayoría de los trabajos coinciden en encontrar una sobreexpresión del gen que, en algunas series, llega a superar el 90% de las muestras analizadas^{70,71}. No obstante, no hay tanta unanimidad en cuanto a su posible significado. Para algunos autores la presencia de c-met se asocia a un mayor grado de extensión y con ello a un peor pronóstico^{70,72,73}. Una posible causa de esta asociación puede ser que la sobreexpresión de c-met es más fre-

cuenta en variedades histológicas más agresivas^{74,75}. A pesar de ello, en otros estudios c-met carece de significado clínico^{76,77}.

RAS

El protooncogén Ras codifica una proteína de 21 kDa que actúa como transductor de señales de receptores de factores de crecimiento. Las mutaciones del dominio del GTP (codón 12-13) o de la GTPasa (codón 61) producen un cambio en la secuencia de aminoácidos cuyo resultado es su activación constitutiva. Entre sus muchos efectos reguladores, cabe destacar la acción inhibidora sobre p27, proteína de la familia de las CIP/KIP que regula el ciclo celular. Así, el efecto neto de Ras es una estimulación en la progresión del ciclo de la célula⁷⁸.

La mutación de Ras es uno de los trastornos más prevalentes, ya que afecta a un 30% de los cánceres en la especie humana⁷⁹. Se han descrito mutaciones en los tres genes de Ras: *H-Ras*, *K-Ras* y *N-Ras*. Todas ellas fueron las primeras en ser asociadas a carcinomas tiroideos y han sido encontradas en las diversas variedades histológicas del cáncer de dicha glándula. De igual forma que los reordenamientos de *PAX8-PPAR γ* , son mucho más frecuentes en el carcinoma folicular (CFT) y en la variante folicular del CPT, así como en neoplasias tiroideas benignas⁸⁰⁻⁸³, mientras que son muy poco frecuentes en el CPT⁸⁴. No hay diferencias entre el tipo de mutación y el desarrollo de las distintas variantes o la evolución clínica. Como en el caso de *RET/PTC*, se considera que es una alteración propia de las etapas tempranas de la carcinogénesis^{85,86}. Los estudios realizados con líneas celulares de neoplasias epiteliales indican que es un potente inhibidor de la apoptosis^{87,88}. Se ha observado que en ausencia de tirotropina la expresión de *H-RASV12* acelera la proliferación celular, lo cual induce el crecimiento tumoral no dependiente de tirotropina y afecta, principalmente, a las células que, debido al proceso de desdiferenciación mencionado anteriormente, han perdido la capacidad de respuesta a la tirotropina⁸⁹. Este fenómeno ocurre en los casos con evolución desfavorable. De hecho, se ha visto que, cuando la expresión de Ras es muy elevada, se produce una inhibición de los genes específicos del tiroides como *TTF1* y *PAX8*, dos factores de transcripción necesarios para mantener la diferenciación de las células foliculares tiroideas⁹⁰. Este hecho ha sido corroborado en otros trabajos, en los que se ha hallado una decreciente expresión de factores que indican la diferenciación de los tirocitos, como la tiroperoxidasa⁹¹. También se han relacionado las mutaciones de Ras con lesiones del ADN, como alteraciones en el alineamiento de los cromosomas durante la mitosis, formación de micronúcleos y amplificación de los centrosomas⁹².

La presencia de mutaciones de Ras en neoplasias benignas de tiroides y su mayor incidencia en el carcinoma folicular y en las variantes foliculares del CPT han

limitado su uso como factor pronóstico. Sin embargo, algunos autores han encontrado que la mutación del gen se asocia a estadios más avanzados del CPT^{93,94}. Otros trabajos han hallado una relación entre la mutación de Ras y la evolución a carcinomas poco diferenciados o anaplásicos y señalan que estos casos deberían ser controlados de una forma más estrecha⁹⁵. Así pues, se trata de una mutación muy poco frecuente en el CPT, y más característica de los carcinomas poco diferenciados. En estos casos podría constituir un factor de mal pronóstico^{96,97}.

BRAF

Los genes *RAF* fueron identificados inicialmente como oncogenes en tumores que afectaban a ratones y aves⁹⁸. Se han identificado tres genes, llamados *A-RAF*, *B-RAF* y *RAF-1* (o *C-RAF*). En las células foliculares del tiroides, la isoforma *B-RAF* es la predominante⁶. Como hemos visto, Ras se encuentra en la membrana y puede ser activado por factores de crecimiento, hormonas y citocinas⁹⁹. La activación de esta vía produce la fosforilación de *BRAF* que activa, constitutivamente, *ERK* e inicia así un gran número de mecanismos celulares implicados en la carcinogénesis¹⁰⁰. Se han detectado más de 40 mutaciones oncogénicas de estos genes en un gran número de cánceres humanos. Destacan, entre otros, el melanoma, el adenocarcinoma de colon, el carcinoma de ovario y el CPT¹⁰¹. En este tumor la mutación de *BRAF* más frecuente es la *V600E* (anteriormente llamada *V599E*) que, a causa de un cambio de timidina por adenosina en el nucleótido 1796, hace que la posición sea ocupada por ácido glutámico en lugar de valina¹⁰². Este cambio produce una alteración en la conformación de la molécula de *B-RAF* que la convierte en una estructura activada¹⁰³. Así, la forma mutada muestra una actividad enzimática unas 500 veces superior que la molécula no mutada¹⁰⁴.

La mutación *V600E* de *BRAF* es específica del CPT y su prevalencia oscila entre el 35 y el 40% en la mayoría de los estudios^{9,105-108}, aunque en algunas series supera el 60%¹⁰⁹. También se ha relacionado con carcinomas anaplásicos que se originan a partir de la desdiferenciación de un CPT¹¹⁰. No se ha observado en carcinomas foliculares, medulares o neoplasias benignas. La coexistencia de mutaciones dentro del CPT entre *RET/PTC*, *RAS* y *BRAF* es excepcional, aunque, como hemos visto anteriormente, en el 70% de los casos se encuentra por lo menos una de ellas^{8,9}. Por otra parte, se ha visto que hay asociación recíproca entre la edad y las mutaciones de *BRAF* y los reordenamientos de *RET/PTC* en el CPT, de forma que las primeras serían más frecuentes en individuos de mayor edad y éstas son más prevalentes en la edad pediátrica. Como se ha mencionado con anterioridad, la radiación ionizante es uno de los factores causales de *RET/PTC* y éste podría ser el motivo de que la población infantil sea mucho más proclive a presentar *RET/PTC*, como se ha visto

en los casos aparecidos tras Chernobyl¹¹¹, o en niños tratados con radioterapia externa¹¹². Por el contrario, en la población adulta las mutaciones de *BRAF* son mucho más frecuentes, y no se ha hallado ninguna relación con las radiaciones^{107,108,113}. Sin embargo, no se ha aclarado todavía por qué las mutaciones de *BRAF* ocurren en edades más adultas. Existen otras mutaciones de *BRAF* involucradas en la carcinogénesis, como la K601E o las que afectan al exón 11, pero que raramente se dan en el CPT¹⁰⁹. De manera excepcional, en algunos casos asociados a la exposición a radiaciones ionizantes, se ha observado una fusión del gen *BRAF* con el gen *AKAP9*, por una inversión paracentromérica del brazo largo del cromosoma 7, la cual resulta en un oncogén, ACAP9-*BRAF*, que también induce una activación constitutiva de la vía de la MAPK^{110,114,115}.

En los últimos 5 años se ha empezado a analizar la significación clínica de *BRAF*. El hecho de que se hayan observado mutaciones en las formas microscópicas de CPT¹⁰⁷ indica, como en el caso de los receptores TK y de Ras, que la molécula se encuentra involucrada en las primeras fases de la carcinogénesis del CPT. De igual modo, la mutación se asocia a algunas variantes histológicas más agresivas del CPT, como la de células altas, y en cambio se encuentra con menor frecuencia en la variante folicular^{107,109}. Asimismo, la mutación de *BRAF* es más frecuente en las formas del CPT que sufren una desdiferenciación y evolucionan a carcinomas poco diferenciados y anaplásicos, contrariamente a lo que sucede en las formas poco diferenciadas, que evolucionan a partir de carcinomas foliculares^{106,107}. Por otro lado, varios estudios han investigado la utilidad de determinar la mutación de *BRAF* como factor pronóstico^{106,107,116-118}. En la serie de Nikiforova et al¹⁰⁷ se describe una correlación entre la mutación y la extensión extratiroidea en el momento del diagnóstico. En la serie japonesa de 126 casos, la mutación se asocia a estados más avanzados y a metástasis a distancia¹⁰⁶. Sin embargo, no se ha visto ningún tipo de relación con los factores clínico-patológicos en dos series italianas y una americana^{108,116,117}, aunque el número de casos analizados es menor. Xing et al^{109,118}, en una serie amplia, demuestran una asociación significativa entre la mutación de *BRAF* y la extensión extratiroidea, afección de ganglios regionales, metástasis a distancia, recurrencia tumoral y una pérdida de la diferenciación del tumor caracterizada por una disminución en la capacidad de captar ¹³¹INa. Los mismos autores apuntan la falta de estratificación de las diferentes variantes histológicas del CPT en los diversos estudios que, al incluirlas conjuntamente, explicarían la disparidad de estos resultados.

Finalmente, la exclusividad de la mutación de *BRAF* T1799A en el CPT ha hecho que se haya estudiado su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad a partir de muestras de citología obtenidas por punción con aguja fina¹¹⁹⁻¹²². En todos los estudios, la especificidad y la sensibilidad para las muestras positivas para la mutación de *BRAF* han sido del 100%. Como la prevalencia de

dicha mutación en estas series era del 44%, se puede afirmar que casi la mitad de los casos de CPT podría diagnosticarse preoperatoriamente mediante su análisis.

Aplicación terapéutica

Alrededor del 5% de los CPT experimentan un proceso de desdiferenciación que da lugar a neoplasias de agresividad elevada y muy mal pronóstico. En estos casos, el tratamiento convencional se ha demostrado inefectivo y otras estrategias, como la quimioterapia y la radioterapia, tampoco ofrecen resultados satisfactorios. En los últimos años, el descubrimiento de las bases moleculares causantes del CPT ha generado la posibilidad de actuar sobre nuevas dianas terapéuticas. La vía de señalización MAPK constituye uno de los objetivos más esperanzadores¹²³. La mayoría de estas sustancias se encuentra todavía en fase experimental, pero muy probablemente pasarán a formar parte de los protocolos terapéuticos en un futuro no demasiado lejano⁸³.

Inhibidores de las tirosincinasas

Existen diferentes mecanismos para bloquear farmacológicamente el efecto de las TK. Entre ellos, el uso de moléculas de bajo peso molecular que actúan principalmente compitiendo con el lugar de unión de ATP¹²⁴. Con el bloqueo de la actividad de fosforilación de las TK se consigue la inhibición de sus efectos enzimáticos en las vías de señalización intracelulares¹²⁵. Como hemos visto, la destacada participación de distintos receptores con actividad TK, junto con el hecho de que su alteración sea un evento inicial en la oncogénesis del tumor, hace muy atractivo el uso de este grupo de fármacos en el CPT, especialmente en casos resistentes al tratamiento habitual⁶. La mayoría de estos fármacos no muestran especificidad de sustrato, sino que son potencialmente eficaces para inhibir diferentes RTK, especialmente los relacionados con la angiogénesis tumoral¹²⁶. El dominio cinasa de RET/PTC presenta una homología del 50% con Kit, PDGFR (*platelet-derived growth factor*) y VEGFR (*vascular endothelial growth receptor*). Las moléculas que han mostrado una mayor especificidad para bloquear RET son las que, *a priori*, han despertado mayores expectativas¹²⁷.

Vandetanib. Esta anilinoquinazolona es un potente inhibidor de VEGF, la TK considerada como principal regulador de la angiogénesis en el cáncer, y de EGFR, frecuentemente mutado en diferentes tipos de neoplasias¹²⁸. A su vez, Carlomagno et al¹²⁹ han demostrado que también es capaz de bloquear la actividad enzimática de RET, por lo que podría ser útil en el tratamiento del CPT.

Sorafenib. Recientemente, Henderson et al¹³⁰ han demostrado en un modelo experimental de CPT que

sorafenib es más eficaz en la reducción del crecimiento tumoral en casos portadores de RET/PTC que en los portadores de mutaciones de *BRAF* (a pesar de que la molécula fue diseñada originalmente como inhibidor de *BRAF*). En la actualidad hay en marcha diferentes estudios clínicos en fase II para valorar el efecto del fármaco en el cáncer de tiroides avanzado. Así, por ejemplo, Gupta-Abramson et al¹³¹ han tratado a 30 pacientes con cáncer de tiroides metastático y resistente al tratamiento con ¹³¹INa (de los que 18 eran CPT). Tras una media de 27 semanas de seguimiento, han observado una respuesta parcial en el 23,3% y una estabilización de la enfermedad en el 53,3% de los pacientes.

Sunitinib. Se ha demostrado su elevada eficacia para inhibir VEGF, PDGF y KIT. Además, Kim et al¹³² han publicado que es un potente inhibidor de RET/PTC en cultivos celulares de CPT. Desde un punto de vista clínico, Dawson et al¹³³ han comunicado una respuesta favorable a la molécula tras 4 años de seguimiento en 2 pacientes con cáncer avanzado.

Los inhibidores de TK son una opción de futuro en el tratamiento del CPT avanzado o resistente a la terapia habitual. Para que ello sea posible es necesario definir su efectividad y diseñar moléculas que actúen de manera más específica para las distintas TK implicadas. En este sentido, empezamos a tener candidatos con mayor especificidad para RET/PTC¹³⁴ o c-met¹³⁵.

Bloqueadores de *BRAF* y *MEK*

Los inhibidores de RET pueden ser efectivos en tumores portadores de RET/PTC, pero no cuando la mutación genética se encuentra por debajo de la cascada de señalización de la que constituye un elemento inicial. Mitsutake et al¹³⁶ han demostrado experimentalmente que *BRAF* es necesario para la activación de MAPK inducida por RET/PTC. Así, el bloqueo de *BRAF*, por su posición en la vía, resulta más efectivo, sea cual sea el gen mutado¹⁰. La primera generación de moléculas inhibidoras de *BRAF*, como sorafenib, se caracterizaba por su bajo nivel tanto de especificidad como de potencia. El paso siguiente de los investigadores fue encontrar compuestos más específicos. Ello se consiguió con los bloqueadores de MEK, el elemento activado por BRAF. Actuar sobre moléculas más distales en la vía MAPK ofrece mayor selectividad de acción, lo cual reduce la toxicidad del fármaco. El primer inhibidor de MEK fue CI-1040¹¹⁸. Estudios posteriores demostraron que la molécula ofrecía una potencia insuficiente como antineoplásico en los diferentes tipos de tumores humanos en los que se testó. Posteriormente, Ouyang et al¹³⁷ publicaron el efecto de dos nuevos inhibidores, AAL-881 y LBT-613, en líneas celulares de cáncer de tiroides portadoras de RET/PTC o con *BRAF* mutado. Ambas moléculas eran capaces de inhibir la fosforilación de MEK y ERK dependiente de Ras, BRAF y RET/PTC, reduciendo el crecimiento ce-

lular e induciendo apoptosis en las células malignas. A pesar de que los dos compuestos presentan una toxicidad que desaconseja su uso clínico, estos estudios demuestran que *BRAF* puede ser el talón de Aquiles del cáncer de tiroides¹³⁸. Así, Mitsiades et al¹³⁹ han demostrado que tanto el uso de AAL881 como la depleción de *BRAF* mediante la inhibición de su ARN resultan efectivos para frenar el crecimiento celular en cultivos de diferentes líneas de cáncer de tiroides. Además, el efecto es superior en las líneas portadoras de la mutación V600E que en aquellas con *BRAF* no mutado. A diferencia de los inhibidores de múltiples cinasas iniciales, este nuevo grupo de compuestos bloqueadores de MEK no compiten en la región de unión a ATP, con lo que aumenta su especificidad. Recientemente, se empezó a analizar una nueva generación de inhibidores de MEK. Entre las distintas moléculas sintetizadas, cabe destacar AZD6244. Su efectividad está siendo comprobada en líneas celulares de cáncer de tiroides¹⁴⁰, pero están en marcha distintos ensayos clínicos en fase II en pacientes portadores de neoplasias de otras localizaciones, con resultados esperanzadores y un bajo potencial tóxico¹⁴¹.

En resumen, la vía de señalización de las MAPK constituye un elemento clave en la transformación neoplásica de las células foliculares tiroideas en el CPT. Específicamente, la alteración genética en tres componentes de la vía, los RTK, especialmente RET, Ras y BRAF se hallan en más del 70% de estos tumores. Dichas anomalías se consideran un paso inicial en la carcinogénesis y confieren algunas peculiaridades clínicas que pueden resultar útiles, sobre todo en el momento de clasificar a los pacientes según el pronóstico de la enfermedad a medio y largo plazo. Además, el conocimiento de las bases que rigen la oncogénesis del CPT nos da la posibilidad de actuar en ellas y aporta nuevas dianas terapéuticas en casos en que el tratamiento convencional resulta inefectivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. A National Center Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995. *Cancer*. 1998;83:2638-48.
2. Ain KB. Papillary thyroid carcinoma. Etiology, assessment, and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1995;24:711-60.
3. Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med*. 1994;97:418-28.
4. Sturgill TW, Ray LB. Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulable kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;134:565-71.
5. Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:1150-60.
6. Fagin JA. How thyroid tumors start and why it matters: kinase mutants as targets for solid cancer pharmacotherapy. *J Endocrinol*. 2004;183:249-56.
7. Ciampi R, Nikiforov YE. Minireview: RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*. 2007;148:936-41.

8. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003; 22:4578-80.
9. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. 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*. 2003;63:1454-7.
10. Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, et al. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*. 2005;115:1068-81.
11. Fusco A, Grieco M, Santoro M, Berlingieri MT, Pilotti S, Pierotti MA, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*. 1987;328:170-2.
12. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by DNA rearrangement. *Cell*. 1985; 42:581-8.
13. Santoro M, Carlomagno F, Melillo RM, Fusco A. Dysfunction of the RET receptor in human cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:2954-64.
14. Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:441-67.
15. Teixeira MR. Recurrent fusion oncogenes in carcinomas. *Crit Rev Oncog*. 2006;12:257-71.
16. De Groot JWB, Links TP, Plukker JTM, Lips CJM, Hofstra RMW. RET as a diagnostic and therapeutic target in sporadic and hereditary endocrine tumors. *Endocr Rev*. 2006;27:535-60.
17. Santoro M, Melillo RM, Fusco A. RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology prize lecture. *Eur J Endocrinol*. 2006;155:645-53.
18. Santoro M, Melillo RM, Grieco M, Berlingieri MT, Vecchio G, Fusco A. The TRK and RET tyrosine kinase oncogenes cooperate with *ras* in the neoplastic transformation of a rat thyroid epithelial cell line. *Cell Growth Differ*. 1993;4:77-84.
19. Jhiang SM, Cho JY, Furminger TL, Sagartz JE, Tong Q, Capen CC, et al. Thyroid carcinomas in RET/PTC transgenic mice. *Recent Results Cancer Res*. 1998;154:265-70.
20. Rhoden KJ, Unger K, Salvatore G, Yilmaz Y, Vovk V, Chiappetta G, et al. 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*. 2006;91:2414-23.
21. Corvi R, Martinez-Alfaro M, Harach HR, Zini M, Papotti M, Romeo G. Frequent RET rearrangements in thyroid papillary microcarcinoma detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Lab Invest*. 2001;81:1639-45.
22. Fischer AH, Bond JA, Taysavang P, Battles OE, Wyndord-Thomas D. Papillary thyroid carcinoma oncogene (RET/PTC) alters the nuclear envelope and chromatin structure. *Am J Pathol*. 1998;153:1443-50.
23. Cheung CC, Ezzat S, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL. Immunohistochemical diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol*. 2001;14:338-42.
24. Santoro M, Papotti M, Chiappetta G, Garcia-Rostan G, Volante M, Johnsos C, et al. RET activation and clinicopathologic features in poorly differentiated thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:370-9.
25. Viglietto G, Chiappetta G, Martinez-Tello FJ, Fukunaga FH, Tallini G, Rigopoulou D, et al. RET/PTC oncogene activation is an early event in thyroid carcinogenesis. *Oncogene*. 1995;11:1207-10.
26. Smida J, Salassidis K, Hieber L, Zitzelsberger H, Kellerer AM, Demichik EP, et al. Distinct frequency of *ret* rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer*. 1999;80:32-8.
27. Ito T, Seyama T, Iwamoto KS, Hayashi T, Mizuno T, Tsuyama N, et al. In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement. *Cancer Res*. 1993;53:2940-3.
28. Mizuno T, Iwamoto KS, Kyoizumi S, Nagamura H, Shinohara T, Koyana K, et al. Preferential induction of RET/PTC1 rearrangement by X-ray irradiation. *Oncogene*. 2000;19:438-43.
29. Hamatani K, Eguchi H, Mukai M, Takahashi K, Taga M, Imai K, et al. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res*. 2008;68:7176-82.
30. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, Medvedovic M, Fagin JA, Nikiforov YE. Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science*. 2000;290:138-41.
31. Yang T, Namba H, Hara T, Takamura N, Nagayama Y, Fukata S, et al. p53 induced by ionizing radiation mediates DNA end-joining activity, but not apoptosis of thyroid cells. *Oncogene*. 1997;14:1511-9.
32. Pierotti MA. Chromosomal rearrangements in thyroid carcinomas: a recombination or death dilemma. *Cancer Lett*. 2001; 166:1-7.
33. Puxeddu E, Moretti S, Giannico A, Martinelli M, Marino C, Avenia N, et al. Ret/PTC activation does not influence clinical and pathological features of adult papillary thyroid carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2003;148:505-13.
34. Santoro M, Grieco M, Melillo RM, Fusco A, Vecchio G. Molecular defects in thyroid carcinomas: role of the RET oncogene in thyroid neoplastic transformation. *Eur J Endocrinol*. 1995;133:513-22.
35. Sugg SL, Ezzat S, Rosen IB, Freeman JL, Asa SL. Distinct multiple RET/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:4116-22.
36. Tallini G, Santoro M, Helie M, Carlomagno F, Salvatore G, Chiappetta G, et al. 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*. 1998;4:287-94.
37. Zafon C, Obiols G, Castellvi J, Tallada N, Baena JA, Simó R, et al. Clinical significance of RET/PTC and p53 protein expression in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Histopathology*. 2007;50:225-31.
38. Zou M, Shi Y, Farid NR. Low rate of *ret* proto-oncogene activation (PTC/*ret*TPC) in papillary thyroid carcinomas from Saudi Arabia. *Cancer*. 1994;73:176-80.
39. Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, et al. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81:2006-9.
40. Chiappetta G, Toti P, Cetta F, Giuliano A, Pentimalli F, Amendola I, et al. The RET/PTC oncogene is frequently activated in oncocytic thyroid tumors (Hurthle cell adenomas and carcinomas), but not in oncocytic hyperplastic lesions. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:364-9.
41. Fenton CL, Lukes Y, Nicholson D, Dinauer CA, Francis GL, Tuttle RM. The *ret*/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:1170-5.
42. Jhiang SM, Mazzaferri EL. The *ret*/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J Lab Clin Med*. 1994;123:331-7.
43. Rebelo S, Domingues R, Catarino AL, Mendonça E, Santos JR, Sobrinho L, et al. Immunostaining and RT-PCR: different approaches to search for RET rearrangements in patients with papillary thyroid carcinoma. *Int J Oncol*. 2003;23:1025-32.
44. Shin E, Hong SW, Kim SH, Yang WI. Expression of down stream molecules of RET (p-ERK, p-p38 MAPK, p-JNK and

- p-AKT) in papillary thyroid carcinomas. *Yonsei Med J.* 2004;45:306-13.
45. Zhu Z, Ciampi R, Nikiforova MN, Gandhi M, Nikiforov YE. Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:3603-10.
 46. Soares P, Fonseca E, Wyndord-Thomas D, Sobrinho-Simões M. Sporadic ret-rearranged papillary carcinoma of the thyroid: a subset of slow growing, less aggressive thyroid neoplasms? *J Pathol.* 1998;185:71-8.
 47. Basolo F, Molinaro E, Agate L, Pinchera A, Pollina L, Chiappetta G, et al. RET protein expression has no prognostic impact on the long-term outcome of papillary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2001;145:599-604.
 48. Erdogan M, Berdeli A, Karadeniz M, Ertan Y, Cetinkalp S, Saygili F, et al. The prevalence of RET/PTC mutations in papillary thyroid cancers in Turkish population and its relation between tumor histopathology and prognostic factors. *Exp Clin Endocrinol Diab.* 2008;116:225-30.
 49. Musholt TJ, Musholt PB, Khaladj N, Schulz D, Scheumann GFW, Klempnauer J. Prognostic significance of RET and NTRK1 rearrangements in sporadic papillary thyroid carcinoma. *Surgery.* 2000;128:984-93.
 50. Mai KT, Vaccani JP, Thomas J, Odell PF. Immunostaining for ret oncogene proteins in papillary thyroid carcinoma: a correlation of ret immunoreactivity and potential of lymph node metastasis. *Thyroid.* 2001;11:859-63.
 51. Miki H, Kitaichi M, Masuda E, Komaki K, Yamamoto Y, Monden Y. ret/PTC expression may be associated with local invasion of thyroid papillary carcinoma. *J Surg Oncol.* 1999;71:76-81.
 52. Alberti L, Carniti C, Miranda C, Roccatto E, Pierotti MA. RET and NTRK1 proto-oncogenes in human diseases. *J Cell Physiol.* 2003;195:168-86.
 53. Pierotti MA, Greco A. Oncogenic rearrangements of the NTRK1/NGF receptor. *Cancer Lett.* 2006;28:90-8.
 54. Greco A, Pierotti MA, Bongarzone I, Pagliardini S, Lanzi C, Della Porta G. TRK-T1 is a novel oncogene formed by the fusion of TPR and TRK genes in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene.* 1992;7:237-42.
 55. Brzezianska E, Pastuszak-Lewandoska D, Lewinski A. Rearrangements of NTRK1 oncogene in papillary thyroid carcinoma. *Neuro Endocrinol Lett.* 2007;28:221-9.
 56. Russell JP, Powell DJ, Cunnane M, Greco A, Portella G, Santoro M, et al. The TRK-T1 fusion protein induces neoplastic transformation of thyroid epithelium. *Oncogene.* 2000;19:5729-35.
 57. Roccatto E, Bressan P, Sabatella G, Rumio C, Vizzotto L, Pierotti MA, et al. Proximity of TPR and NTRK1 rearranging loci in human thyrocytes. *Cancer Res.* 2005;65:2572-76.
 58. Bounacer A, Schlumberger M, Wicker R, Du-Villard JA, Cailhou B, Sarasin A, et al. Search for NTRK1 proto-oncogene rearrangements in human thyroid tumours originated after therapeutic radiation. *Br J Cancer.* 2000;82:308-14.
 59. Rabes HM, Demichik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1093-103.
 60. Brzezianska E, Karbownik M, Migdalska-Sek M, Pastuszak-Lewandoska D, Wloch J, Lewinski A. Molecular analysis of the RET and NTRK1 gene rearrangements in papillary thyroid carcinoma in the Polish population. *Mutat Res.* 2006;599:26-35.
 61. Kuo CS, Lin CY, Hsu CW, Lee CH, Lin HD. Low frequency of rearrangement of TRK protooncogenes in Chinese thyroid tumors. *Endocrine.* 2000;13:341-4.
 62. Delvincourt C, Patey M, Flament JB, Suárez HG, Larbre H, Jardillier JC, et al. Ret and trk proto-oncogene activation in thyroid papillary carcinomas in French patients from the Champagne-Ardenne region. *Clin Biochem.* 1996;29:267-71.
 63. Ness GO, Haugen DR, Varhaug JE, Akslen LA, Lillehaug JR. Cytoplasmic localization of EGF receptor in papillary thyroid carcinomas: association with the 150-kDa receptor form. *Int J Cancer.* 1996;17:161-7.
 64. Chen BK, Ohtsuki Y, Furiata M, Takeuchi T, Iwata J, Liang SB, et al. Co-overexpression of p53 protein and epidermal growth factor receptor in human papillary thyroid carcinomas correlated with lymph node metastasis, tumor size and clinicopathologic stage. *Int J Oncol.* 1999;15:893-8.
 65. Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, et al. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors. *In Vivo.* 1992;6:291-6.
 66. Marti U, Rucht C, Kämpf J, Thomas GA, Williams ED, Peter HJ, et al. Nuclear localization of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptors in human thyroid tissues. *Thyroid.* 2001;11:137-45.
 67. Ensinger C, Spizzo G, Moser P, Tschoerner I, Prommegger R, Gabriel M, et al. Epidermal growth factor receptor as a novel therapeutic target in anaplastic thyroid carcinomas. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1030:69-77.
 68. Schiff BA, McMurphy AB, Jasser SA, Younes MN, Doan D, Yigitbasi OG, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8594-602.
 69. Liu Z, Hou P, Ji M, Guan H, Studeman K, Jensen K, et al. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:3106-16.
 70. Chen BK, Ohtsuki Y, Furiata M, Takeuchi T, Iwata J, Liang SB, et al. Overexpression of c-Met protein in human thyroid tumors correlated with lymph node metastasis and clinicopathologic stage. *Pathol Res Pract.* 1999;195:427-33.
 71. Zanetti A, Stoppaciario A, Marzullo A, Ciabatta M, Fazioli F, Prat M, et al. Expression of Met protein and urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR-R) in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol.* 1998;186:287-91.
 72. Ramirez R, Hsu D, Patel A, Fenton C, Dinauer C, Tuttle RM, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and the HGF/SF receptor (cMET) are associated with a high risk of metastasis and recurrence for children and young adults with papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol.* 2000;53:635-44.
 73. Siraj AK, Bavi P, Abubaker J, Jehan Z, Sultana M, Al-Dayel F, et al. Genome-wide expression analysis of Middle Eastern papillary thyroid cancer reveals c-MET as a novel target for cancer therapy. *J Pathol.* 2007;213:190-9.
 74. Di Renzo MF, Olivero M, Serini G, Orlandi F, Pilotti S, Belfiore A, et al. Overexpression of the c-MET/HGF receptor in human thyroid carcinomas derived from the follicular epithelium. *J Endocrinol Invest.* 1995;18:134-9.
 75. Nardone HC, Ziober AF, Livolsi VA, Mandel SJ, Baloch ZW, Weber RS, et al. c-MET expression in tall cell variant papillary carcinoma of the thyroid. *Cancer.* 2003;98:1386-93.
 76. Fluge O, Haugen DR, Lillehaug JR, Varhaug JE. Difference in patterns of Met expression in papillary thyroid carcinomas and nonneoplastic thyroid tissue. *World J Surg.* 2001;25:623-31.
 77. Oyama T, Ichimura E, Sano T, Kashiwaba K, Fukuda T, Nakajima T. c-Met expression of thyroid tissue with special reference to papillary carcinoma. *Pathol Int.* 1998;48:763-8.
 78. Motti ML, De Marco C, Califano D, De Gisi S, Malanga D, Troncone G, et al. Loss of p27 expression through RAS → BRAF → MAP kinase-dependent pathway in human thyroid carcinomas. *Cell Cycle.* 2007;6:2817-25.
 79. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 1989;49:4682-9.

80. Giordano TJ, Quick R, Thomas DG, Misek DE, Vinco M, Sanders D, et al. Molecular classification of papillary thyroid carcinoma: distinct BRAF, RAS, and RET/PTC mutation specific gene expression profiles discovered by DNA microarray analysis. *Oncogene*. 2005;24:6646-56.
81. Namba H, Gutman RA, Matsuo K, Alvarez A, Fagin JA. H-ras protooncogene mutations in human thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990;71:223-9.
82. Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*. 2008;21 Suppl 2:S37-43.
83. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P. New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14:957-77.
84. Cyniak-Magierska A, Brzezińska E, Januszkiewicz-Caulier J, Jarzab B, Lewinski A. Prevalence of RAS point mutations in papillary thyroid carcinoma; a novel mutation at codon 31 of K-RAS. *Exp Clin Endocrinol Diab*. 2007;115:594-9.
85. Lemoine NR, Mayall ES, Wyllie FS, Farr CJ, Hughes D, Padua RA, et al. Activated ras oncogenes in human thyroid cancers. *Cancer Res*. 1988;48:4459-63.
86. Namba H, Rubin SA, Fagin JA. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*. 1990;4:1474-9.
87. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO*. 1997;16:2783-93.
88. Rak J, Mitsuhashi Y, Erdos V, Huang SN, Filmus J, Kerbel RS. Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *J Cell Biol*. 1995;131:1587-98.
89. Shirokawa JM, Elisei R, Knauf JA, Hara T, Wang J, Saavedra HI, et al. Conditional apoptosis induced by oncogenic ras in thyroid cells. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1725-38.
90. De Vita G, Bauer L, Da Costa VM, De Felice M, Baratta MG, De Menna M, et al. Dose-dependent inhibition of thyroid differentiation by RAS oncogenes. *Mol Endocrinol*. 2005;19:76-89.
91. Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, Marcy M, Carayon P, De Micco C. Expression of TPO mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, braf, ras and pax8 genes. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:485-95.
92. Saavedra HI, Knauf JA, Shirokawa JM, Wang J, Ouyang B, Elisei R, et al. The RAS oncogene induces genomic instability in thyroid PCCL3 cells via the MAPK pathway. *Oncogene*. 2000;19:3948-54.
93. Basolo F, Pinchera A, Fugazzola L, Fontanini G, Elisei R, Romei C, et al. Expression of p21 ras protein as a prognostic factor in papillary thyroid cancer. *Eur J Cancer*. 1994;30A:171-4.
94. Nikiforov YE. Genetic alterations involved in the transition from well-differentiated to poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. *Endocr Pathol*. 2004;15:319-27.
95. Wang HM, Huang YW, Huang JS, Wang CH, Kok VC, Hung CM, et al. Anaplastic carcinoma of the thyroid arising more often from follicular carcinoma than papillary carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2007;14:3011-8.
96. Basolo F, Pisaturo F, Pollina LE, Fontanini G, Elisei R, Molinaro E, et al. N-ras mutation in poorly differentiated thyroid carcinomas: correlation with bone metastases and inverse correlation to thyroglobulin expression. *Thyroid*. 2000;10:19-23.
97. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:3226-35.
98. Mercer KE, Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653:25-40.
99. Robinson MJ. Mitogen-activated protein pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;17:5588-97.
100. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
101. Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell*. 2004;6:313-9.
102. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations in the braf gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949-54.
103. Dhillon AS, Kolch W. Oncogenic b-raf mutations: crystal clear at last. *Cancer Cell*. 2004;5:303-4.
104. Pratilas CA, Solit DB. Therapeutic strategies for targeting BRAF in human cancer. *Rev Recent Clin Trials*. 2007;2:121-34.
105. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, et al. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene*. 2003;22:6455-7.
106. Namba H, Nakashima M, Hayashi T, Hayashida N, Maeda S, Rogounovitch TI, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E in papillary thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4393-7.
107. Nikiforova MN, Kimura ET, Ghandi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, et al. BRAF mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic and poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5399-404.
108. Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinoma and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res*. 2003;63:4561-7.
109. Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12:245-62.
110. Ciampi R, Nikiforov YE. Alterations of BRAF gene in thyroid tumors. *Endocr Pathol*. 2005;16:163-72.
111. Unger K, Zitzelsberger H, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Braselmann H, et al. Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:4272-9.
112. Bounacer A, Wicker R, Caillou B, Cailleux AF, Sarasin A, Schlumberger M, et al. High prevalence of activating ret proto-oncogene rearrangements in thyroid tumors from patients who had received external radiation. *Oncogene*. 1997;15:1263-73.
113. Xing M, Vasko V, Tallini G, Larin A, Wu G, Udelsman R, et al. BRAF T1796A transversion mutation in various thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:1365-8.
114. Ciampi R, Knauf JA, Kerler R, Ghandi M, Zhu Z, Nikiforova MN, et al. Oncogenic AKAP9-BRAF fusion is a novel mechanism of MAPK pathway activation in thyroid cancer. *J Clin Invest*. 2005;115:94-101.
115. Fusco A, Vigiuetto G, Santoro M. A new mechanism of BRAF activation in human thyroid papillary carcinomas. *J Clin Invest*. 2005;115:20-3.
116. Fugazzola L, Puxeddu E, Avenia N, Romei C, Cirello V, Cavaliere A, et al. Correlation between B-RAF V600E mutation and clinicopathological parameters in papillary thyroid carcinoma: data from a multicentric Italian study and review of the literature. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:455-64.
117. Puxeddu E, Moretti S, Elisei R, Romei C, Pacucci R, Martignelli M, et al. BRAF (V599E) mutation is the leading genetic event in adult sporadic papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:2414-20.
118. Xing M. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev*. 2007;28:742-62.

119. Cohen Y, Rosenbaum E, Clark DP, Zeiger MA, Umbricht CB, Tufano RP, et al. Mutational analysis of BRAF in the fine needle aspiration biopsies of the thyroid: a potential application for the preoperative assessment of thyroid nodules. *Clin Cancer Res.* 2004;10:2761-5.
120. Hayashida N, Namba H, Kumagai A, Hayashi T, Ohtsuru A, Ito K, et al. A rapid and simple detection method for the BRAF (T1796A) mutation in fine-needle aspirated thyroid carcinoma cells. *Thyroid.* 2004;14:910-5.
121. Salvatore G, Giannini R, Faviana P, Caleo A, Migliaccio I, Fagin JA, et al. Analysis of BRAF point mutation and RET/PTC rearrangement refines the fine-needle aspiration diagnosis of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5175-80.
122. Xing M, Tufano RP, Tufano AP, Basaria S, Ewertz M, Rosenbaum E, et al. Detection of BRAF mutation on fine needle aspiration biopsy specimens: a new diagnostic tool for papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2867-72.
123. Chang F, Steelman LS, Lee JT, Shelton JG, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2003;17:1263-93.
124. Manash KP, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase-role and significance in cancer. *Int J Med Sci.* 2004;1:101-15.
125. Pinto Couto J, Prazeres H, Castro P, Lima J, Maximo V, Soares P, et al. How molecular pathology is changing and will change the therapeutics of patients with follicular cell-derived thyroid cancer? *J Clin Pathol.* 2009 Jan 15 [Epub ahead of print].
126. Lanzi C, Cassinelli G, Zunino F. Targeting RET for thyroid cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:297-309.
127. Knowles PP, Murray-Rust J, Kjaer S, Scott RP, Hanrahan S, Santoro M, et al. Structure and chemical inhibition of RET tyrosine kinase domain. *J Biol Chem.* 2006;281:33577-87.
128. Sathornsumetee S, Rich JN. Vandetanib, a novel multitargeted kinase inhibitor, in cancer therapy. *Drugs Today (Barc).* 2006;42:657-70.
129. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, et al. ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res.* 2002;62:7284-90.
130. Henderson YC, Ahn SH, Kang Y, Clayman GL. Sorafenib potently inhibits papillary thyroid carcinomas harboring RET/PTC1 rearrangement. *Clin Cancer Res.* 2008;14:4908-14.
131. Gupta-Abramson V, Troxel AB, Nellore A, Puttaswamy K, Redlinger M, Ransone K, et al. Phase II trial of sorafenib in advanced thyroid cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26:4714-9.
132. Kim DW, Jo YS, Jung HS, Chung HK, Song JH, Park KC, et al. An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/Papillary thyroid cancer kinases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:4070-6.
133. Dawson SJ, Conus NM, Toner GC, Raleigh JM, Hicks RJ, McArthur G, et al. Sustained clinical responses to tyrosine kinase inhibitor sunitinib in thyroid carcinoma. *Anticancer Drugs.* 2008;19:547-52.
134. Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Basolo F, Castellone MD, Melillo RM, et al. Efficient inhibitor of RET/Papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2). *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:1897-902.
135. Chattopadhyay C, El-Naggar AK, Williams MD, Clayman GL. Small molecule c-MET inhibitor PHA665752: effect on cell growth and motility in papillary thyroid carcinoma. *Head Neck.* 2008;30:991-1000.
136. Mitsutake N, Miyagishi M, Mitsutake S, Akeno N, Mesa C, Knauf JA, et al. BRAF mediates RET/PTC-induced mitogen-activated protein kinase activation in thyroid cells: functional support for requirement of the RET/PTC-RAS-BRAF pathway in papillary thyroid carcinogenesis. *Endocrinology.* 2006;147:1014-9.
137. Ouyang B, Knauf JA, Smith EP, Zhang L, Ramsey T, Yusuff N, et al. Inhibitors of Raf kinase activity block growth of thyroid cancer cells with RET/PTC or BRAF mutations in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1785-93.
138. Chiloeches A, Marais R. Is BRAF the Achilles' heel of thyroid cancer? *Clin Cancer Res.* 2006;12:1661-4.
139. Mitsiades CS, Negri J, McMullan C, McMillin D, Sozopoulos E, Fanourakis G, et al. Targeting BRAFV600E in thyroid carcinoma: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:1070-8.
140. Ball DW, Jin N, Rosen DM, Dackiw A, Sidransky D, Xing M, et al. Selective growth inhibitor in BRAF mutant thyroid cancer by the mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4712-8.
141. Adjei AA, Cohen RB, Franklin W, Morris C, Wilson D, Molina JR, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral, small-molecule mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol.* 2008;26:2139-46.