



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA.

---

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

“Caracterización del Inmunofenotipo para el EGFR, TBXA2R Y SMAD3 En Arreglos de Tejido para el Diagnóstico Diferencial Entre Adenoma e Hiperplasia Paratiroidea en una Muestra de Pacientes Intervenidos Quirúrgicamente por HPTP no Familiar”

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA:

P R E S E N T A

**ALEXANDRA BARAJAS OLIVAS.**

Directores de Tesis:

DR. FRANCISCO FLORES MURRIETA  
DR. DAVID VELÁZQUEZ FERNÁNDEZ

MÉXICO D.F. 2010

**Aprender sin pensar es inútil. Pensar sin aprender es peligroso**

**Confucio**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 17 del mes de diciembre del 2010 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Caracterización del Inmunofenotipo para el EGFR, TBXA2R y SMAD3 en Arreglos de Tejido para el Diagnóstico Diferencial entre Adenoma e Hiperplasia Paratiroidea en una Muestra de Pacientes Intervenido Quirúrgicamente por HPTp No Familiar”

Presentada por la alumna:

Barajas Olivas Alexandra Guadalupe  
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro: 

B	0	7	1	4	9	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA  
Directores de tesis

Dr. Juan Rodríguez Silverio

Dr. David Velázquez Fernández

Dr. Francisco Javier Flores Murrieta

Dr. Juan Gerardo Reyes García

Dr. Miguel Francisco Herrera Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I.P.N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION  
CONTROL ESCOLAR



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México el día 17 del mes Diciembre del año 2010, el que suscribe Barajas Olivas Alexandra Guadalupe alumna del Programa de Maestría En Ciencias En Investigación Clínica con número de registro B071495 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Juan Rodríguez Silverio, Dr. David Velázquez Fernández y cede los derechos del trabajo intitulado “Caracterización del Inmunofenotipo para el EGFR, TBXA2R y SMAD3 en Arreglos de Tejido para el Diagnóstico Diferencial entre Adenoma e Hiperplasia Paratiroidea en una Muestra de Pacientes Intervenidos Quirúrgicamente por HPTp no Familiar”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [alegbo@hotmail.com](mailto:alegbo@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Alexandra Guadalupe Barajas Olivas

Nombre y firma

## CONTENIDO

	Página	
1	RESUMEN	1
2	AGRADECIMIENTOS	2
3	MARCO TEORICO	3
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5	JUSTIFICACIÓN	16
6	HIPÓTESIS DE TRABAJO	17
7	OBJETIVOS	18
8	PACIENTES Y MÉTODOS	19
	8.1 Estructura del Estudio	19
	8.2 Definiciones Operacionales	19
	8.3 Variables Analizadas	20
	8.4 Muestra	21
	8.5 Criterios de Selección	21
	8.6 Métodos Utilizados	22
	8.7 Análisis Estadístico	28
9	RESULTADOS	30
10	DISCUSIÓN	40
	10.1 EGFR	42
	10.2 TBXA2R	43
	10.3 SMAD3	44
11	CONCLUSIONES	45
12	BIBLIOGRAFÍA	46



## 1.- RESUMEN

**Antecedentes.-** El hiperparatiroidismo primario (HPTp) no familiar es una endocrinopatía relativamente común. Tiene una mayor incidencia en mujeres a partir de la sexta década de la vida. Se caracteriza por una secreción anormalmente alta de PTH que ocasiona hipercalcemia que puede o no ser clínicamente sintomática. En el 80% de los casos el HPTp es ocasionado por un adenoma mientras que entre el 10-15% por una afección de 2 o más glándulas paratiroides. El tratamiento estándar es el quirúrgico, con la resección de la(s) glándula(s) afectada(s). En un porcentaje considerable de estos pacientes el diagnóstico cambia durante la cirugía o durante el seguimiento clínico, lo que en algunas ocasiones lleva a la re-exploración quirúrgica. Esto indudablemente se acompaña de una mayor morbilidad con también mayores costos para el paciente. Por este motivo la identificación y confirmación diagnóstica de estas entidades tiene valor médico (tanto pronóstico como diagnóstico) al igual que un impacto económico para los pacientes con HPTp.

**Objetivo.-** Determinar si existen diferencias en el inmunofenotipo para los marcadores del EGFR, TBXA2R y SMAD3, que nos permitan discernir categóricamente entre adenoma e hiperplasia paratiroides en una muestra de pacientes mexicanos intervenidos quirúrgicamente en nuestro instituto por HPTp de origen no familiar.

**Pacientes y Métodos.-** Un total de 49 muestras fueron incluidas: 37 adenomas únicos y 12 hiperplasias paratiroides. Todos los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente por HPTp en el INCMNSZ entre 1991 y 2009. Se realizaron microarreglos de 7x8 de arreglos de 2 mm de diámetro de tejido de los bloques de parafina de dichos pacientes, previa firma de consentimiento informado. Se revisaron de manera retro y prospectiva todos los casos para evaluar su comportamiento clínico. Se realizó inmunohistoquímica previa desparafinización/rehidratación con recuperación antigénica por proteasa y reacción Ag-Ab con bloqueo de peroxidasa-DAB. Se utilizaron anticuerpos de conejo mono y policlonal para EGFR, TBXA2R y SMAD3 con reactividad para humano disponibles de manera comercial. Se siguieron las recomendaciones del proveedor, con sus respectivos controles positivos y negativos. Los inmunofenotipos fueron evaluados por un patólogo experto (AGD), el cual estaba cegado para los fenotipos definitivos. Las lecturas se expresaron de forma cualitativa. Se realizó un análisis descriptivo y bivariado de todas las variables incluidas y su relación con los diferentes inmunofenotipos mediante SPSS versión 13.0 y Excel Office. Se consideraron como significativos estadísticamente todos aquellos valores de  $p \leq 0.05$  para dos colas.

**Resultados.-** El 82% de los casos fueron mujeres, con una edad media de 52 (30-77 años). Los adenomas se localizaron preoperatoriamente en el 75.7% de los casos. El 100% de las hiperplasias fueron bilaterales. El calcio sérico preoperatorio era de  $11.5 \pm 1.2$  y de  $10.6 \pm 1.2$  mg/dL en los adenomas e hiperplasias respectivamente, mientras que la PTH preoperatoria fue de  $334.7 \pm 425.7$  vs  $326.9 \pm 209.8$  pg/mL respectivamente. La PTH postoperatoria fue ligeramente superior en los pacientes operados por hiperplasia, pero no fue estadísticamente significativa. El calcio urinario preoperatorio así como el tiempo quirúrgico fueron variables que difirieron estadísticamente entre los adenomas y las hiperplasias ( $p \leq 0.05$ ). El 32.4% de los adenomas marcaron positivos para EGFR y TBXA2R, mientras que las hiperplasias fueron positivas sólo en el 8.7% y 16.7% respectivamente para los mismos marcadores. En contraste, el 90% de los adenomas y de las hiperplasias resultaron negativas para SMAD3.

**Conclusiones.-** Demostramos que es posible una evaluación rápida y eficiente por arreglos de tejidos de hasta 56 pacientes de una manera simultánea. Además, nuestros resultados mostraron una tendencia a poder diferenciar estas entidades por inmunohistoquímica para los 3 marcadores evaluados. Sin embargo ninguna de las proporciones observadas resultó estadísticamente significativa, muy probablemente debido al tamaño muestral. Con esto concluimos que el uso individual de cualquiera de éstos marcadores es limitado e insuficiente, por lo que su uso conjugado en forma de "firma" sería más adecuado y mejoraría la eficiencia diagnóstica de la evaluación. Recomendamos evaluar prospectivamente un mayor número de estos marcadores en

un mayor tamaño muestral. Una evaluación de mayor precisión cuantitativa, como el qRT-PCR para mRNA de estos marcadores también podría ser una alternativa potencialmente útil.

## 1.- ABSTRACT

**Background:** Primary hyperparathyroidism (pHPT) is a relatively common endocrinopathy. Its real incidence resides among women and people older than 60 years of age. It occurs as a consequence of an excessive secretion of parathyroid hormone (PTH) by one or more of the parathyroid glands. It can either be asymptomatic, or be associated with a variety of symptoms. Around 80% of the patients with pHPT have unique glandular enlargement, also called adenoma; between 10-15% of the patients have multiglandular disease caused by sporadic (nonfamilial) parathyroid hyperplasia (SPH). The standard treatment is surgery, which consists in the removal of the affected gland (s). In a considerable percentage of these patients, the diagnosis changes during surgery or follow-up, which in some cases, the patient has to have a second surgery, thus increasing the morbidity and costs. For this reason to identify and confirm the diagnosis of these two entities has both medical value (prognostic and diagnostic), as well as economic impact for patients with pHPT.

**Objective.-** To determine if there are differences in the immunophenotype for the biomarkers EGFR, TBXA2R, and SMAD3, in order to allow us to differentiate categorically between an adenoma and parathyroid hyperplasia in a sample of Mexican subjects which had surgery secondary to sporadic pHPT at our institution.

**Methods.-** A total of 49 samples were included: 37 adenomas and 12 parathyroid hyperplasias. Consent form was signed by the subjects. All the patients had surgery due to pHPT at the INCMNSZ between 1991 and 2009. We carried out microarrays (7x8) consisting of tissue samples obtained of the paraffin block of the patients organized in arrays of 2 mm in diameter. The data was reviewed in a retrospective manner initially, and prospectively later on to evaluate clinical behavior. Immunohistochemistry was performed with antigenic retrieval by protease and antigen-antibody reaction using peroxidase-DAB blockade. We used specific polyclonal antibodies for EGFR, TBXA2R, and SMAD3. Immunophenotypes were evaluated by an expert pathologist, which was blinded to the final phenotypes. The readings were expressed in a qualitative way. A descriptive and bivariate analysis of all the variables and their association with the different immunophenotypes was carried out using SPSS versión 13.0 and Excell Office. A  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant.

**Results.-** 82% were female with a mean age of 52 (30-77 years). Adenomas were localized preoperatively in 75.7% of the cases. All the hyperplasias were bilateral. Preoperative serum calcium was  $11.5 \pm 1.2$  and  $10.6 \pm 1.2$  mg/dl in adenomas and hyperplasias respectively, while preoperative PTH was  $334.7 \pm 425.7$  vs  $326.9 \pm 209.8$  pg/ml respectively. PTH was slightly superior after surgery in patients with hyperplasia, but was not statistically significant. Preoperative urinary calcium and surgical time were variables that differed statistically between adenomas and hyperplasias ( $p \leq 0.05$ ). 32.4% of the adenomas were positive for EGFR and TBXA2R, while in the hyperplasias only 8.7% and 16.7% were positive to both markers respectively. Opposite to the previous markers, 90% of the adenomas and hyperplasias were negative for SMAD3.

**Conclusions.-** We demonstrated a fast and efficient way to evaluate tissue arrays in up to 56 patients simultaneously. Our results also showed a tendency towards a phenotypical differentiation between the two pathologies for our 3 studied biomarkers. Nevertheless, none of our results was statistically significant probably due to the size of the sample. With all these data we conclude that a single marker use is limited and insufficient. Therefore we recommend to identify a "signature" composed of a combination of different biomarkers. We need prospective evaluation in a bigger sample, as well as the use of quantitative evaluation such as qRT-PCR for mRNA.

## **2.- AGRADECIMIENTOS**

**Quisiera dedicar esta tesis en primer lugar a mis padres, quienes a lo largo del camino siempre han creído en mí, han sido mi apoyo en toda circunstancia y quienes sacrificaron todo por darme lo mejor. Sin su ejemplo e inspiración yo no estaría hoy aquí.**

**A mi hermana, Regina, mi cómplice, amiga, mi pequeña. Gracias por darme siempre tu amor, tu apoyo incondicional y tu sonrisa. Sabes que te adoro.**

**A mi tutor el Dr. David Velazquez, por darme el privilegio de ser tu alumna, de aprender de ti el amor a la investigación y sobretodo enseñarme a hacer las cosas como se debe. He aprendido infinidad de cosas de ti, valoro mucho las oportunidades que me has dado y sobretodo la guía que has sido en mi carrera.**

**Al Dr. Miguel A Mercado, por ser mi gran ejemplo en la vida y en la carrera, gracias por tu cariño, enseñanzas y amistad.**

**A mis grandes amigos, Ingrid, Gerardo, Fer y Paola, gracias por sus consejos, ejemplo y amistad. Su paciencia para escucharme y echarme porras sin duda ayudaron a que este proyecto se llevara a cabo.**

**A mi preciosa hija Ana Sofia, gracias simplemente por existir contigo y por ti soy mejor persona y vale la pena cada esfuerzo vivido.**

**Y finalmente a mi gran amor, Ricardo, gracias por estar a mi lado en cada momento, por impulsarme a seguir adelante, por apoyarme y siempre creer en mí. Por no dejarme desistir cuando la vida me ponía obstáculos, por acompañarme durante cada viaje y por darme tu amor. Como siempre hemos dicho, juntos y mirando a la misma dirección. Te amo.**

### 3.-MARCO TEORICO

El hiperparatiroidismo primario (HPTp) es un padecimiento endocrino relativamente común, con una incidencia de hasta 1 por cada 1000 individuos. Esta enfermedad puede aparecer en todos los grupos de edad, sin embargo, es más frecuente en la sexta década de la vida. El sexo femenino se encuentra con mayor frecuencia afectado, tres veces más que el masculino, de hecho la mitad de todos los pacientes son mujeres posmenopáusicas <sup>1</sup>.

El HPTp es causado por una secreción excesiva de la hormona paratiroidea (PTH) a partir de una de las 4 glándulas paratiroideas que normalmente posee un individuo. En el 80% de los casos el HPTp es debido a un adenoma único, también denominado HPTp monoglandular.<sup>1</sup> De forma menos frecuente el HPTp puede ser ocasionado por un proceso patológico que afecta las 4 glándulas, denominado hiperplasia o enfermedad poliglandular (del 15 al 20% de los casos de HPTp). A pesar de que la mayoría de los casos son esporádicos (90-95%), sólo en un 5% de los pacientes el hiperparatiroidismo se relacionan a síndromes familiares (como las neoplasias endocrinas múltiples tipo 1 y 2) y de éstos solamente un 1% presentará carcinoma paratiroideo<sup>2,3, 4</sup>. En los casos de origen familiar, la hiperplasia paratiroidea es la causa más frecuente de hiperparatiroidismo (80%) mientras que la enfermedad monoglandular es menos frecuente (menos del 15%).

A pesar de que no está bien definida la predisposición ambiental y genética de las neoplasias paratiroideas de origen esporádico, se sabe que las mujeres se afectan más frecuentemente que los hombres. Esto nos hace pensar que a nivel fisiopatológico el estado hormonal juega un papel importante en el desarrollo y progresión del HPTp, ya que la mayoría de las mujeres son diagnosticadas después de la menopausia. Por otro lado, se ha logrado un tratamiento exitoso en aquellas pacientes posmenopáusicas con esta enfermedad tratadas con reemplazo estrogénico <sup>1, 2</sup>.

En la actualidad la mayoría de los pacientes se presentan de manera asintomática (80% aproximadamente). Los valores séricos de calcio se encuentran 1 mg/dl por arriba del valor normal alto y en gran parte refieren sintomatología vaga sin hacer hincapié en algún órgano en específico. Los cuadros clínicos tradicionalmente característicos de osteítis fibrosa quística, tumores pardos, fracturas patológicas e insuficiencia renal secundaria a nefrolitiasis o nefrocalcinosis, se presentan actualmente en contadas ocasiones<sup>5</sup>.

Lo más frecuente es llegar al diagnóstico de manera incidental como un hallazgo de laboratorio en pacientes con otra patología principal o con sintomatología clínica inespecífica o vaga. Los dos marcadores bioquímicos característicos de esta entidad son la hipercalcemia y los niveles anormalmente elevados de PTH; aunque ocasionalmente los niveles de esta última pueden encontrarse dentro de rangos normales. La medición de la concentración de PTH circulante es la manera más eficiente de llegar al diagnóstico <sup>2,6</sup>.

El único estudio de gabinete útil e indispensable para la evaluación de los pacientes con HPTp es la densitometría ósea. Esta permite evaluar cambios tempranos en la masa ósea y desmineralización de la misma, principalmente en pacientes con un diagnóstico retrasado de HPTp.

Se han empleado distintos métodos de imagen para localizar la glándula enferma. El ultrasonido en manos expertas localiza hasta el 80% de los casos de enfermedad monoglandular, tiene costo bajo y no es invasivo; dentro de sus desventajas están el depender de la habilidad del técnico que lo efectúa y no ser particularmente útil en la identificación de glándulas de localización ectópica<sup>7</sup>. El parte aguas en los métodos de imagen está representado por el gammagrama con <sup>99m</sup>Tc sestamibi, ya que el tejido paratiroideo lo capta con gran avidez, y en especial los adenomas, debido a su alto contenido de mitocondrias. Es capaz de localizar por arriba del 90% de los adenomas, y es el estudio de primera elección ante la sospecha de glándulas ectópicas o reoperación por HPTp persistente o recurrente. Tiene como desventaja principal la incapacidad para caracterizar la afección de múltiples glándulas o cuando un existe un crecimiento asimétrico de algunas de las mismas. Cuando el ultrasonido y el rastreo con <sup>99m</sup>Tc sestamibi concuerdan, la certeza diagnóstica sobrepasa el 95%. <sup>8</sup>

La determinación transoperatoria de PTH ha demostrado ser de utilidad para predecir curación en los casos de HPTp. Un descenso de los niveles de PTH por debajo del 50% de su valor basal, a los 10 minutos de haberse resecado la glándula enferma, predice con gran eficiencia la curación<sup>9</sup>.

No existe duda en el hecho de que la cirugía sea el tratamiento de primera elección para los pacientes con HPTp. Se sabe que el tratamiento quirúrgico es exitoso en más de 95% de los casos, con una frecuencia de complicaciones quirúrgicas que no excede el 5% en la mayor parte de las series publicadas. La cirugía está indicada en todos los pacientes sintomáticos e incluso en algunos con enfermedad asintomática. En el Consenso de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América tanto de 1990 como en su revisión en el 2005 <sup>10</sup> se sugirió

intervenir quirúrgicamente a los enfermos con HPTp asintomático que reunieran los siguientes criterios diagnósticos:

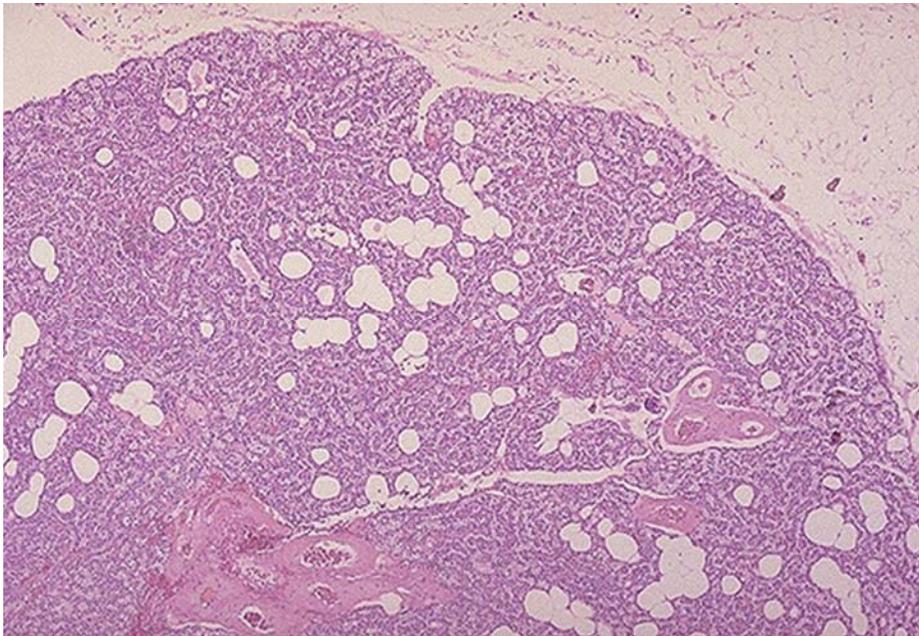
1. Hipercalcemia superior a 0.25 mol/L [ó 1.0 mg/dL] por arriba del valor máximo normal.
2. Hipercalciuria mayor de 10 mol [ó 400 mg/dL]) en recolección de 24 horas.
3. Reducción de la depuración de creatinina sérica 30% ó más, comparada con los valores normales de referencia para la edad del paciente.
4. Disminución de la densidad ósea medida en la columna vertebral, cadera o radio distal, 2.5 desviaciones estándar por debajo del pico de masa ósea.
5. Pacientes menores de 50 años de edad.
6. Pacientes con imposibilidad para ser seguidos clínicamente por tiempo prolongado (al menos 6 meses).
7. Historia de un episodio de hipercalcemia severa que haya puesto en peligro la vida
8. Nefrolitiasis, osteítis fibrosa quística, síntomas neuromusculares

Siguiendo estas guías, se calcula que la mitad de los pacientes asintomáticos serán intervenidos quirúrgicamente y la otra mitad podrá ser vigilada.

El abordaje quirúrgico tradicional del HPTp consiste en la exploración bilateral del cuello, visualización de las cuatro glándulas, y escisión de las glándulas anormales sin la necesidad de practicar estudios de localización. El mejoramiento de las técnicas de imagen y el ensayo rápido de PTH han dado lugar a que pueda reducirse la exploración quirúrgica a un lado del cuello en pacientes con adenoma. Se han desarrollado múltiples técnicas de invasión mínima que incluyen cirugía endoscópica, guiada mediante radioisótopos, video-asistida y con incisión pequeña bajo anestesia local, además de otras técnicas más sofisticadas como la transaxilar o transmamaria.<sup>11, 12, 13</sup> Esto ha tenido un impacto no sólo en el tiempo de estancia y morbilidad del paciente, sino en los costos generales del tratamiento. Por lo tanto la utilidad en diferenciar enfermedad monoglandular de la poliglandular no sólo incluye la decisión de la técnica quirúrgica a utilizar en el paciente, sino en la certeza en el pronóstico y en el seguimiento clínico del paciente que debería de ser mucho más corto en el paciente operado por adenoma simple. Actualmente el diagnóstico definitivo lo establece el cirujano con la visualización de las glándulas durante la cirugía y con la normalización de los niveles de PTH y calcio sérico en el seguimiento clínico a los 6 meses.

Así, en la actualidad se utilizan 2 métodos poco específicos como el “*estándar de oro*” para la diferenciación entre adenoma e hiperplasia paratiroidea: la apariencia macroscópica de las

glándulas durante la cirugía y el análisis histopatológico. Aunque para fines prácticos, el diagnóstico definitivo se obtiene con el mantenimiento de la normocalcemia y PTH dentro de rangos normales al término de los 6 meses después de la cirugía. Dentro de las características morfológicas, el adenoma es una masa ovoidea, encapsulada, blanda, de peso variable (normal 70 mg) constituida en la mayoría de los casos por células principales<sup>14</sup>. Como puede notarse en la Figura 1.

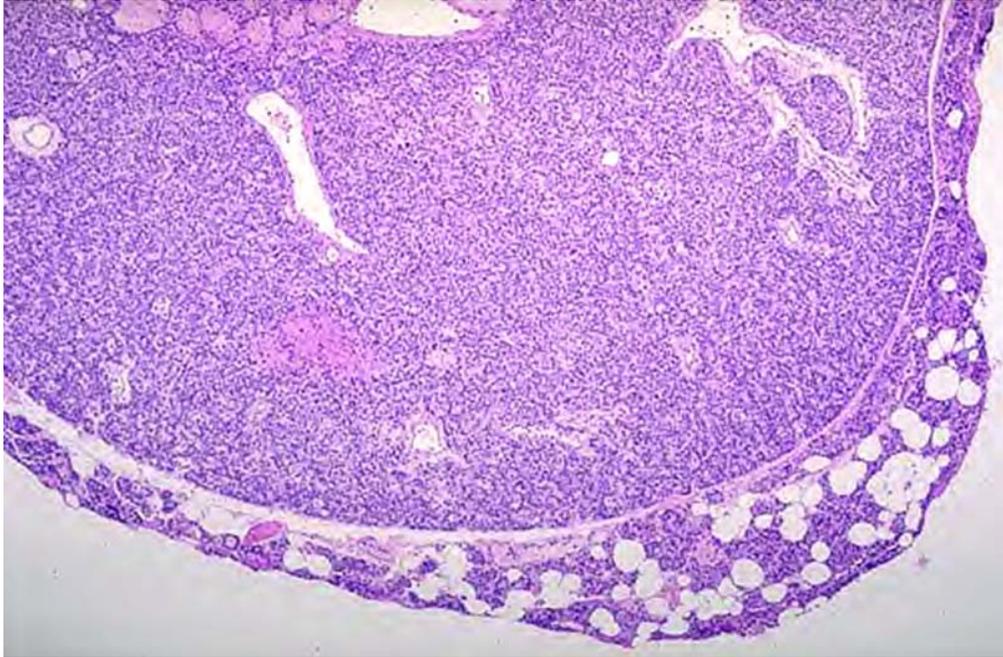


**Figura 1.** Aspecto microscópico de una glándula paratiroides normal.

Desde el punto de vista histopatológico la hiperplasia paratiroidea se define como el incremento absoluto de células principales, oncocíticas y oncocíticas transicionales, mezcladas con elementos estromales que afectan múltiples glándulas paratiroides en ausencia de un estímulo conocido para la hipersecreción de PTH. Morfológicamente la hiperplasia puede tener un patrón clásico, pseudoadenomatoso u oculto, sin embargo ninguna de éstas es suficiente para establecer el diagnóstico diferencial contra el adenoma.<sup>14</sup>

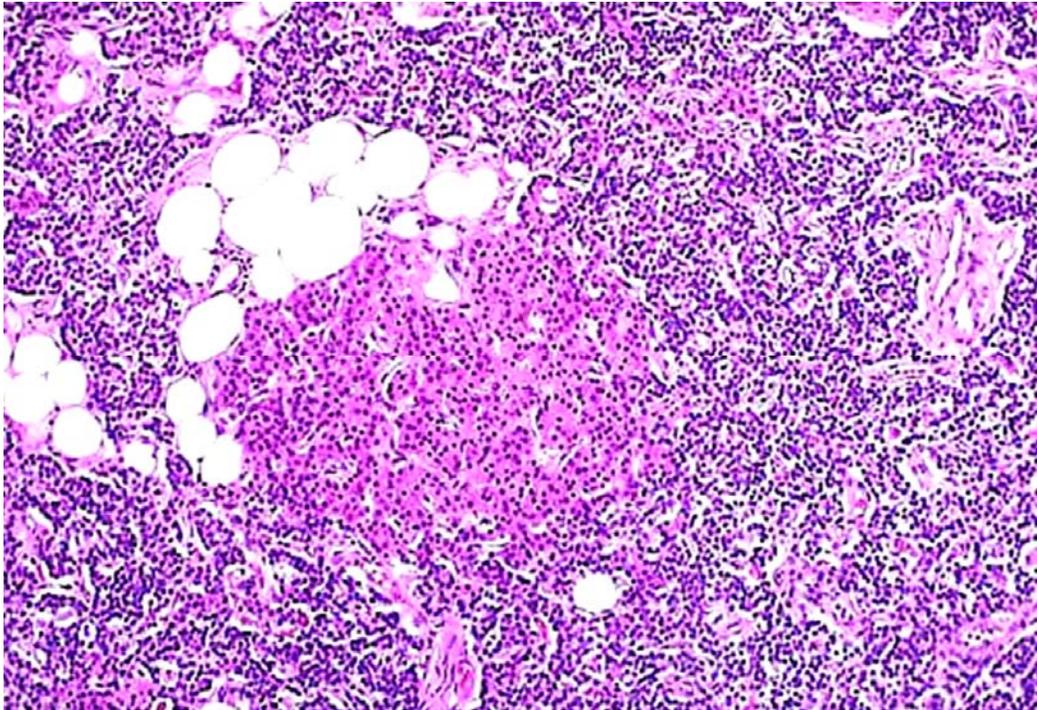
A diferencia del adenoma que tiene un patrón monoclonal, la hiperplasia es una expansión policlonal del número de células paratiroides y no exclusivamente de una sola célula. Desde el

punto de vista microscópico como se puede apreciar en la figura 2, el adenoma se encuentra rodeado de un anillo periférico en el cual se puede observar tejido paratiroideo normal o que recuerda a la proporción normal entre células oxifílicas y grasas (que se ven como espacios vacíos).



**Figura 2.** Aspecto microscópico de un adenoma paratiroideo, obsérvese el ribete de tejido tiroideo normal que a manera de “cápsula” rodea la expansión monoclonal y con mayor densidad de células oxifílicas en el centro.

En contraste, en la hiperplasia paratiroidea se observa un patrón muy homogéneo con algunos grupos de células grasas intercaladas pero que no guardan la proporción observada en la paratiroides normal ni en el adenoma simple. Como se puede apreciar en la figura 3, esta apariencia es de mayor densidad de células oxifílicas, aunque ésta propoción puede ser muy variable (tomado de <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg4/ENDO044.jpg>). Algunas de las diferencias observadas en la histopatología se describen en la tabla 1.



**Figura 3.** Aspecto microscópico de la hiperplasia paratiroidea, se puede observar una proporción alterada de células oxifílicas (con mayor densidad) y una menor proporción de células grasas.

Un estudio realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran (INCMNSZ) <sup>15</sup>, consideró los siguientes parámetros para el diagnóstico histopatológico de la causa del HPTp en los 40 pacientes que integraron la cohorte en estudio:

- 1) La presencia de células grasas,
- 2) la presencia de un anillo de tejido normal en la periferia y
- 3) el número de células diferentes

La concordancia entre tres patólogos diferentes para el diagnóstico histopatológico entre adenoma e hiperplasia fue relativamente bajo (menor al 0.56) en este estudio, confirmándose que el diagnóstico diferencial entre adenoma e hiperplasia paratiroideas sigue siendo un problema clínico vigente.

Debido a este problema en los últimos años han aparecido algunos estudios clínicos, histopatológicos y moleculares con el propósito de diferenciar al adenoma de la hiperplasia. Estos tienen el objetivo práctico de facilitar el diagnóstico diferencial además del manejo

clínico de estos pacientes. Sin embargo, hasta la fecha, ninguno de estos estudios ha logrado identificar algún marcador clínico, celular, histológico, genético, bioquímico o molecular que pueda diferenciar de una manera categórica y precisa a alguna de estas dos entidades<sup>16</sup>.

Desde el punto de vista molecular, se ha especulado que hasta el 75% de los adenomas paratiroides podrían tener un origen monoclonal, lo que quiere decir que es probable que haya ocurrido una mutación oncogénica en la célula original o progenitora de la clona.<sup>17, 18</sup>

Como se comentó previamente, la segunda causa del HPTp es la hiperplasia, por lo que se convierte en el primer diagnóstico diferencial a estudiar. La hiperplasia paratiroidea, es vista con un ejemplo de verdadera hiperplasia, es decir, de una expansión policlonal del número de células paratiroides y no exclusivamente de una sola célula original mutada como en el caso del adenoma. La expansión policlonal se ha asociado a la estimulación de factores tróficos o factores genéticos comunes en todo el tejido involucrado (muy probablemente en presencia de alguna forma de predisposición genética inicial); mientras que la expansión monoclonal se ha asociado principalmente a una mutación somática que le confiere ciertas ventajas a esa clona como una mayor supervivencia o proliferación. Algunas de las características morfológicas y moleculares tanto del adenoma como de la hiperplasia paratiroidea se resumen en la tabla número 1<sup>19</sup>.

Por otra parte, se ha documentado que los factores de crecimiento con limitada actividad sobre la célula paratiroidea como son: el factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like growth factor – I ó IGF-I), el factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor ó EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblastic Growth Factor ó FGF), podrían tener un efecto pro-mitogénico en el tejido paratiroideo. Muchos de estos factores de crecimiento no sólo promueven el inicio del ciclo celular sino que simultáneamente pueden inhibir la muerte celular programada o apoptosis, acentuando aún más el efecto de otros factores mitogénicos y de crecimiento e induciendo mayor proliferación celular.<sup>20</sup>

Aunque la evidencia actual sobre la progresión neoplásica en la glándula paratiroidea es muy limitada hoy en día, muy probablemente ésta involucre modificaciones tanto en ciclo celular (que induzcan a factores que intervienen normalmente en la replicación del DNA y división celular), así como en la muerte celular programada o apoptosis (inhibiendo a factores que normalmente estimulan o controlan ésta).<sup>21</sup>

ADENOMA	HIPERPLASIA
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Responsable del 80% de casos con HPTp</li> <li>• Es una neoplasia benigna</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Responsable del 15% de los casos con HPTp</li> <li>• Verdadera hiperplasia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Población pura de células principales oncocíticas y transicionales (apariencia monomórfica)</li> <li>• Células más grandes de lo normal, núcleos hipercromáticos, atipia y con aumento en el contenido de DNA</li> <li>• Muchos patrones histológicos</li> <li>• Pocas células grasas o ausentes</li> <li>• Ribete de tejido paratiroideo normal (en el 60% de los casos)</li> <li>• Áreas de hemorragia o espacios quísticos de manera ocasional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incremento de células principales, oncocíticas y transicionales (apariencia polimórfica) mezclada con elementos estromales</li> <li>• Arreglo nodular al principio</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta a 1 o 2 glándulas. Con mayor frecuencia a una sola glándula. La glándula se encuentra crecida al doble del tamaño normal y el resto es normal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta a múltiples glándulas, usualmente a las cuatro, aunque puede haber hiperplasia asimétrica.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expansión monoclonal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expansión policlonal</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutaciones somáticas</li> <li>• Mutaciones en proteínas del ciclo celular y proto-oncogenes</li> <li>• Alteración en la vía de la proteincinasa C (PKC) y del receptor sensible a calcio (CasR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estimulación de factores tróficos y hormonas</li> <li>• Asociada principalmente a NEM</li> </ul>

**Tabla 1.** Resumen de algunas características morfológicas y moleculares entre el adenoma y la hiperplasia de las glándulas paratiroides.<sup>19</sup>

Algunos trabajos publicados en la literatura internacional han sugerido que diversas alteraciones en el balance entre el ciclo celular y la apoptosis podrían inducir a la hipersecreción crónica de la PTH<sup>22</sup>. En estos trabajos se han investigado además algunos marcadores de apoptosis como lo son BAX y Bcl-2 (los dos participantes de la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis); encontrándose significativamente más expresados en el tejido paratiroideo normal<sup>21</sup>. Sin embargo, ninguno de estos estudios fue más allá en la diferenciación diagnóstica entre adenoma e hiperplasia, por lo que sus conclusiones no son definitivas. Otro estudio demostró que el péptido relacionado a la PTH (PTHrp) y la misma PTH pueden regular el ciclo celular y la apoptosis en osteoclastos y en algunos tipos de cáncer, como el mamario.<sup>23, 24</sup>

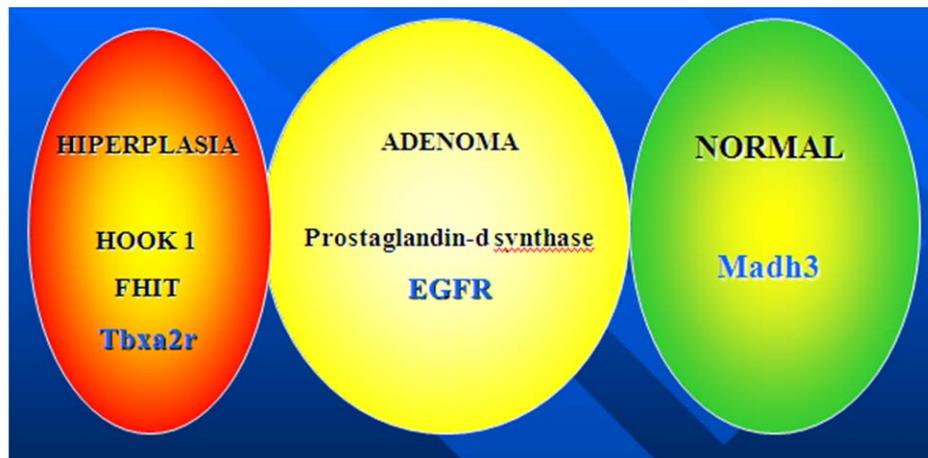
Con el advenimiento y rápida evolución de la tecnología genómica, se ha logrado la secuenciación sistemática y completa de algunos genomas vegetales y animales. En años recientes, la secuencia completa o casi completa del genoma humano fue publicada en diversas revistas, lo que abrió muchas posibilidades para el ulterior estudio de diversos genes y polimorfismos asociados a enfermedades comunes que no tenían un aparente origen genético. Además ésta tecnología ha permitido la exploración de miles de genes al mismo tiempo mediante el uso de tecnología de alto desempeño como los microarreglos. Con esta herramienta se ha podido explorar en un tiempo breve miles de genes interesantes relacionados al cáncer o a la proliferación neoplásica. Esto ha permitido el descubrimiento de múltiples genes y productos de éstos (como los mRNAs y microRNAs) que regulan la proliferación celular y la secreción y síntesis de algunas hormonas como la PTH.

En la última década también se han desarrollado múltiples plataformas que son capaces de secuenciar segmentos completos (secuenciación masiva) en un tiempo breve, lo que ha permitido la comparación entre diferentes especies así como la identificación de variaciones (puntuales por ejemplo) en la secuencia de algunos genes que tienen injerencia en el desarrollo del cáncer o de las neoplasias benignas como el adenoma paratiroideo. Con todas estas herramientas actualmente es posible obtener en un laboratorio el genoma completo de un organismo, aunque esto sigue teniendo un costo alto<sup>25, 26</sup>

En un estudio realizado por nuestro grupo en el INCMNSZ en el 2006, mediante el uso de microarreglos de cDNA pudimos explorar algunas de las diferencias entre adenoma e hiperplasia paratiroideas así como respecto al tejido normal y cáncer desde la perspectiva transcriptómica. El objetivo general de nuestro estudio fue el de diferenciar mediante los perfiles de expresión genómica diferencial (de mRNA) los fenotipos de adenoma e hiperplasia, tomando como control tejido normal paratiroideo. En este estudio se incluyeron a 12 pacientes con adenoma paratiroideo, 3 con hiperplasia y 2 glándulas normales. Mediante hibridación competitiva en un microarreglo que contenía alrededor de 19,968 sondas de cDNA humano con replicados contiguos exploramos los genes más importantes asociados a proliferación neoplásica, ciclo celular, muerte y apoptosis, entre muchos otros.

En nuestro estudio pudimos demostrar una diferencia estadísticamente significativa entre los perfiles de expresión genómicos (para mRNA de algunos genes) entre las dos patologías paratiroideas más frecuentes: adenoma e hiperplasia en pacientes con HPTp. Un total de 200 genes mostraron una expresión diferencial entre adenoma e hiperplasia: 61 se encontraban sobre-regulados y 139 infra-regulados. De igual manera cuando la hiperplasia se comparó con el

tejido normal pudimos demostrar que aproximadamente 50 genes se encontraban diferencialmente expresados: 42 estaban sobre-regulados mientras que sólo 8 infra-regulados. Por lo menos 17 genes podrían ser utilizados para discriminar entre hiperplasia y adenoma (respecto a tejido normal). Los genes sobre-regulados se encontraron relacionados a la inhibición de la apoptosis, proliferación celular, actividad transcripcional y adhesión celular entre muchas otras funciones. Los genes infra-regulados se encontraban principalmente relacionados a actividad de canales iónicos, lipo-polisacáridos, prostaglandina-d sintasa así como proteínas integrales de membrana celular.



**Figura 4.** Firma Molecular de los diversos fenotipos patológicos explorados de las glándulas paratiroides en el trabajo comentado arriba <sup>14</sup>

En base a los resultados de éste estudio pudimos identificar los genes con mayor expresión en cada una de las patologías (Figura 4), así como en tejido normal, para evaluar por técnicas más sencillas, efectivas y certeras el diagnóstico entre hiperplasia y adenoma paratiroideo. Con esta información pudimos concluir que tanto la hiperplasia como el adenoma poseen una “firma molecular” (basada en mRNA o expresión genómica diferencial) que al menos en teoría, podría ser utilizada para el diagnóstico diferencial de estas dos entidades tomando como basal el tejido paratiroideo normal que fue utilizado como control en nuestro trabajo. <sup>14</sup>

Cada uno de estos marcadores tiene mecanismos que favorecen la proliferación de las células anormales, tomemos por ejemplo el Receptor de Crecimiento epidérmico (EGFR). Este marcador es parte de una familia de receptores transmembranales del tipo tirosin-cinasa. En general, la unión al ligando de éstos receptores, induce a la formación de receptores homo y

heterodiméricos que activan de manera intrínseca los dominios ricos en tirosinas de la membrana, resultando en la fosforilación específica de éstos residuos en la porción intracitoplásmica. Estos residuos actúan como sitios de unión para proteínas específicas que a su vez activan una cascada de señalización intracelular que se traduce en estímulos nucleares específicos<sup>27, 28, 29</sup>.

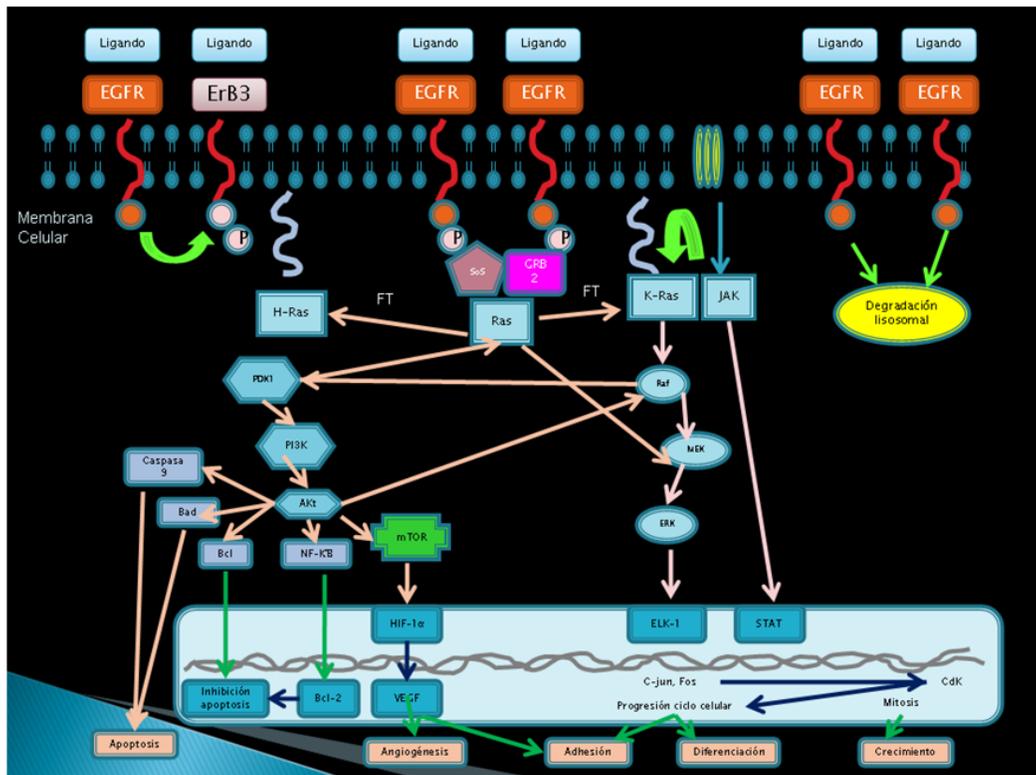


Figura 5. Diagrama del receptor EGF y su cascada de señalización intracelular

Esquemáticamente se pueden definir 3 pasos en la activación intracelular dependiente del receptor EGFR. Primero, la unión específica del ligando al receptor ocurre en la porción extracelular del éste, en segundo lugar hay una formación de un homodímero o heterodímero, dependiendo el caso, que causa una fosforilación ATP dependiente de residuos tirosin específicos en el dominio intracelular del receptor. En tercer lugar, esta fosforilación activa un complejo mecanismo intracelular de señales citoplasmáticas y nucleares. Las 2 vías intracelulares que se ven afectada por el EGFR son la vía RAS-RAF-MEK-MAPK, que controla la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S y la proliferación

celular. La segunda vía es la de PI3K-Akt que activa la cascada anti-apoptosis, angiogénesis y los mecanismos de supervivencia celular<sup>30, 31, 32</sup>. (Figura 5)

Se ha demostrado que el EGFR juega un papel pivote en el desarrollo tumoral y su expresión afecta el resultado clínico de los pacientes con cáncer. La sobre expresión de este receptor en pacientes con cáncer alcanza hasta un 100% en tumores de cabeza y cuello, seguido por el cáncer de páncreas, renal, colorrectal, mama, ovárico, próstata, vejiga, entre muchos otros<sup>28</sup>.

El receptor de tromboxano A2 (TBXA2R), es un miembro de la familia de los receptores asociados a proteína G. Es el producto de la expresión del gen con el mismo nombre localizado en 19p13.3. La proteína contiene 343 aminoácidos y pesa 37 431 daltons, con localización en membrana celular. Esta proteína interacciona con el tromboxano A2 lo que induce agregación plaquetaria y contracción del músculo liso vascular, por lo que se relaciona con hemostasis. Una mutación en este gen da por resultado alteraciones en la coagulación. La función de este receptor a nivel tumoral está relacionada a la angiogénesis (por tratarse de un receptor de prostanoides)<sup>38</sup>. En la literatura se ha encontrado asociación de este receptor con el incremento de la proliferación celular mediada por Nurr1 (un receptor nuclear huérfano) que a su vez induce la transcripción de la ciclina D1 que ha sido vinculada frecuentemente al desarrollo de adenomas paratiroideos. En un estudio realizado por Velazquez-Fernández<sup>14</sup>, se identificó como un posible gen que se ve sobre expresado en pacientes con hiperplasia por HPTp.

SMAD3 (*Mothers against decapentaplegic homolog 3*) pertenece a una familia de proteínas que actúan como mediadores claves en la señalización para la proliferación, diferenciación y desarrollo celular<sup>38</sup>. Es el producto de la expresión del gen homónimo localizado en 15q22.33 que contiene 9 exones. Su localización subcelular es ubicua, participando en múltiples vías de señalización celular. Su principal función es como modulador transcripcional activado por TGFb, por lo que se ha asociado en múltiples publicaciones a la regulación de la carcinogénesis. En relación a la función paratiroidea, se ha descrito que SMAD3 incrementa los niveles de beta-catenina en los osteoclastos, lo que interviene en la función anabólica en hueso que ejerce la PTH. Además menina (sobreexpresada en NEM1 principalmente) interacciona directamente con SMAD3. Se ha estudiado también como un potencial gen supresor de tumores en la patogénesis de los adenomas paratiroideos, encontrándose que en el 24% de éstos tenían pérdida de la heterocigocidad de alguno de los alelos de SMAD3.

#### **4.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad no existe una manera certera de diferenciar el adenoma y la hiperplasia paratiroidea en pacientes con HPTp de origen esporádico. Dado que en la mayoría de los casos se trata de una enfermedad monoglandular, la localización preoperatoria ha modificado el abordaje quirúrgico, haciendo de la cirugía una menos invasiva y con una menor estancia postoperatoria.

Sin embargo, la decisión acerca del tratamiento que se le dará al paciente con HPTp esporádico ya sea por hiperplasia u adenoma en la mayoría de las ocasiones se toma al momento de la cirugía, basándose en las observaciones del cirujano y la interpretación transoperatoria del patólogo.

No obstante el “estándar de oro” para el diagnóstico definitivo es el comportamiento de la PTH así como de la normocalcemia en el seguimiento clínico de estos pacientes en los primeros 6 meses después de la cirugía. Esto tiene un alto costo de tiempo y recursos tanto para el paciente como para la institución.

## **5.-JUSTIFICACIÓN**

La identificación de patrones de expresión diferencial para 3 marcadores (EGFR, TBXA2R y SMAD3) - previamente identificados como útiles por análisis de microarreglos de cDNA -, permitirá un diagnóstico diferencial entre adenoma e hiperplasia paratiroidea más eficiente en pacientes con HPTp de origen esporádico.

La caracterización del fenotipo entre estas dos patologías nos ayudará a establecer un diagnóstico diferencial y etiológico más preciso, así como a seleccionar un tratamiento quirúrgico y médico más adecuado, mejorando por consiguiente la eficiencia del tratamiento en estos pacientes.

La identificación de marcadores moleculares, bioquímicos o celulares que puedan diferenciar de una manera más precisa entre estos diagnósticos patológicos, producirá beneficios no sólo en la salud del paciente sino también de tipo económico tanto para él como para la institución tratante.

## 6.-HIPOTESIS DE TRABAJO

Existe un patrón diferencial entre las proporciones de la expresión (intensidad cualitativa medida en una escala porcentual) de 3 marcadores útiles por inmunohistoquímica (EGFR, TBXa2r y SMAD3) que diferenciará a los adenomas paratiroides (Fenotipo X) respecto a las glándulas paratiroides hiperplásicas (Fenotipo Y) en una muestra de pacientes mexicanos intervenidos quirúrgicamente en nuestro Instituto por HPTp No Familiar o Esporádico.

**FENOTIPO X** % EXPRESIÓN MARCADORES  $\neq$  **FENOTIPO Y** % EXPRESIÓN MARCADORES

## 7.-OBJETIVOS

### *A) General*

1. Determinar si existen diferencias en el inmunofenotipo para los marcadores del EGFR, TBXA2R y SMAD3, que nos permitan discernir categóricamente entre adenoma e hiperplasia paratiroides en una muestra de pacientes mexicanos intervenidos quirúrgicamente por HPTp de origen no familiar.

### *B) Específicos*

1. Determinar si la intensidad de la expresión cualitativamente medida por inmunohistoquímica para el **EGFR** resulta diferencial entre adenomas e hiperplasia paratiroides de pacientes con HPTp de origen no familiar.
2. Determinar si la intensidad de la expresión cualitativamente medida por inmunohistoquímica para el **TBXa2r** resulta diferencial entre adenomas e hiperplasia paratiroides de pacientes con HPTp de origen no familiar.
3. Determinar si la intensidad de la expresión cualitativamente medida por inmunohistoquímica para el **SMAD3** resulta diferencial entre patología paratiroidea respecto al control normal de pacientes con HPTp de origen no familiar.
4. Analizar si alguna otra variable clínica o demográfica incluida en el presente estudio es diferente entre los pacientes con adenomas e hiperplasias seguidos los primeros 6 meses después de la cirugía.

## 8.- PACIENTES Y MÉTODOS

### 8.1. Estructura del Estudio.-

De acuerdo a su estructura este estudio puede ser considerado de alcance descriptivo correlacional, con un seguimiento transversal, con una colección de datos de temporalidad mixta (tanto pro como retrospectivo).

### 8.2. Definiciones Operacionales.-

**Glándulas paratiroides.** Son habitualmente cuatro pequeñas glándulas de forma ovoidea o esférica que se encuentran por detrás de los ángulos tiroideos o vecinas a la glándula tiroidea en la parte anterior del cuello. La función de estas glándulas es meramente endocrina o de secreción interna, produciendo una hormona que regula el metabolismo y la concentración de calcio y fósforo séricos. Son de color pardo y cada glándula mide alrededor de 7mm de diámetro mayor y pesa entre 15 y 65 mg. Todas las glándulas deben de pesar en conjunto menos de 300mg.

**Adenoma paratiroideo.** Es una neoplasia benigna de la glándula paratiroides, compuesta por la proliferación de células principales, oncocíticas y transicionales o una mezcla de todas las anteriores. Se determina en cirugía porque la glándula (o glándulas) se encuentran crecidas al doble del tamaño del resto o normal. Es responsable del 80 a 90% de todos los casos con HPTp y usualmente afecta a una sola glándula.

**Hiperplasia paratiroidea por HPTP.** Es el incremento absoluto de células principales, oncocíticas y transicionales que se mezclan con elementos estromales en múltiples glándulas paratiroides en ausencia de un estímulo conocido para la hipersecreción de PTH. Las glándulas pueden ser de tamaño normal o anormal (si se trata de una hiperplasia asimétrica), sin que ninguna predomine. Es responsable del 15% de los casos con HPTP.

**Hiperparatiroidismo.** Condición patológica caracterizada por una hipersecreción de PTH de una o más glándulas paratiroides que puede o no ocasionar diversas manifestaciones clínicas que pueden variar dependiendo del

órgano o sistema afectados y de los niveles de calcio circulantes. Las causas pueden ser múltiples, y el hiperparatiroidismo puede ser primario, secundario o terciario.

**HPTp (HPTP).** Es la principal causa de hipercalcemia (en el 90% de los casos); aunque puede presentarse también como normocalcemia. Esta enfermedad es debida a la hiperfunción de las glándulas paratiroides que ocasiona hipercalcemia en grados variables. Sus manifestaciones clínicas varían desde el completo asintomático hasta fatiga, pancreatitis o coma. El diagnóstico se establece con la documentación de niveles elevados de PTH sérica en pacientes con hipercalcemia sin hipocalciuria.

### **8.3. Variables Analizadas.-**

- 1) Edad: Medida en años obtenida por interrogatorio directo o por el expediente
- 2) Género: obtenido del expediente
- 3) Peso: medido en gramos de la glándula, obtenido del reporte de histopatología.
- 4) Localización: superior, inferior, izquierda o derecha
- 5) Bilateralidad: evaluada como categórica
- 6) Talla del paciente: evaluada en una escala dimensional en metros
- 7) Peso del paciente, evaluada en una escala dimensional en kg
- 8) Calcio sérico, como variable dimensional expresada en mg/dL; evaluado también al mes, 3 y 6 meses después de la cirugía
- 9) PTH, variable dimensional expresada en ng/ul; evaluado también al mes, 3 y 6 meses después de la cirugía
- 10) Fósforo sérico, variable dimensional expresado en mEq/mL; evaluado también al mes, 3 y 6 meses después de la cirugía
- 11) Magnesio sérico, variable dimensional expresada en mEq/mL; evaluado también al mes, 3 y 6 meses después de la cirugía
- 12) Calcio urinario preoperatorio y postoperatorio, variable dimensional expresada en mg/dL; evaluado también al mes, 3 y 6 meses después de la cirugía
- 13) Tiempo quirúrgico, variable dimensional expresada en minutos
- 14) Diagnóstico definitivo por histopatología: Adenoma o Hiperplasia, otros diagnósticos no fueron incluidos.
- 15) Recurrencia, variable categórica expresada como si o no

16) Porcentaje de la expresión de diferentes marcadores (EGFR, TBXa2r y SMAD3) registrados y evaluados en escala percentilar por un solo patólogo (AGD).

#### **8.4. Muestra.-**

Se revisaron de manera retro- y prospectiva los expedientes clínicos de todos los pacientes operados por HPTp en el INCMNSZ a partir de 1991 y hasta el 2009 que desearon participar voluntariamente en el estudio, previa firma del consentimiento informado. Se obtuvieron muestras de los bloques de parafina de dichos pacientes se obtuvieron previa revisión individual de cada uno de los casos con el patólogo asociado a nuestro grupo (AGD) para la representatividad celular y la confirmación del diagnóstico histopatológico de todos los casos incluidos en el presente estudio.

Este proyecto fue sometido al comité de ética para la investigación en humanos del INCMNSZ con aprobación y registro número.....

#### **8.5. Criterios de Selección.-**

##### *a) Inclusión*

- Pacientes mayores de 30 años de edad
- Género indistinto.
- Pacientes que hayan sido intervenidos quirúrgicamente por HPTP en el INCMNSZ
- Pacientes que deseen participar voluntariamente en el estudio
- Se incluirán los tejidos criopreservados o congelados de pacientes operados previo consentimiento informado

##### *b) Exclusión*

- Pacientes con carcinoma paratiroideo o cualquier otro diagnóstico histopatológico que no corresponda al de interés
- Pacientes con cáncer de tiroides u otro de localización cervical que hayan invadido las paratiroides
- Pacientes con antecedentes o que padecieron patología paratiroidea de origen familiar
- Pacientes con HPT secundario o terciario
- Pacientes que no cumplan con alguno de los criterios de inclusión antes mencionados

*b) Eliminación*

- Muestras que tengan calidad inadecuada para el estudio
- Muestras insuficientes de tejido o RNA
- Muestras que durante alguna de las etapas del proceso tengan un deterioro importante en la calidad
- Muestras en las que no se pueda observar una calidad suficiente o representativa de la celularidad específica
- Pacientes que no completen al menos 6 meses de seguimiento después de la cirugía

## **8.6 Métodos Utilizados**

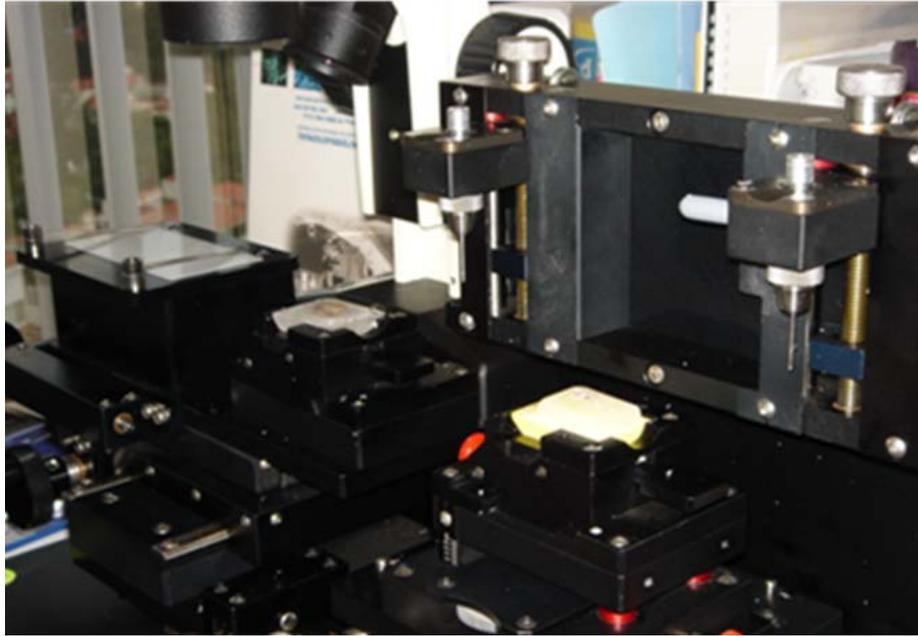
### **8.6.1 Extracción de tejido**

Una vez que se realizó la exéresis quirúrgica de la glándula paratiroidea (de adenoma, hiperplasia o de tejido normal), éste fue seccionado por el patólogo y montado en un bloque de parafina utilizando. Esta técnica se utilizó tanto para los nuevos casos encontrados como para los que se tenía registro de años anteriores.

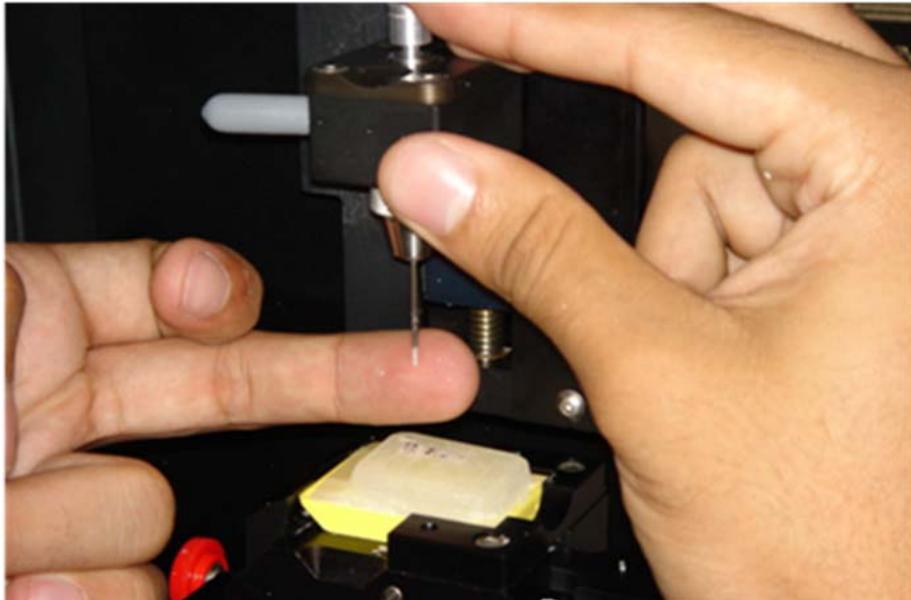
### **8.6.2 Microarreglo de tejido<sup>33,34,35</sup>**

Una vez que se verificaron con patología los casos recabados, se solicitaron los bloques de parafina de los mismos y se procedió a realizar el microarreglo de tejido. La porción de tejido que se toma, esta previamente marcada por el patólogo, en un único bloque se logran examinar hasta 60 muestras de diferentes tejidos. En el presente proyecto realizamos microarreglos de 56 muestras (7 columnas por 8 renglones) de muestras de diferentes pacientes de 2 mm de diámetro. Los pasos a seguir para realizar un microarreglo de tejido son:

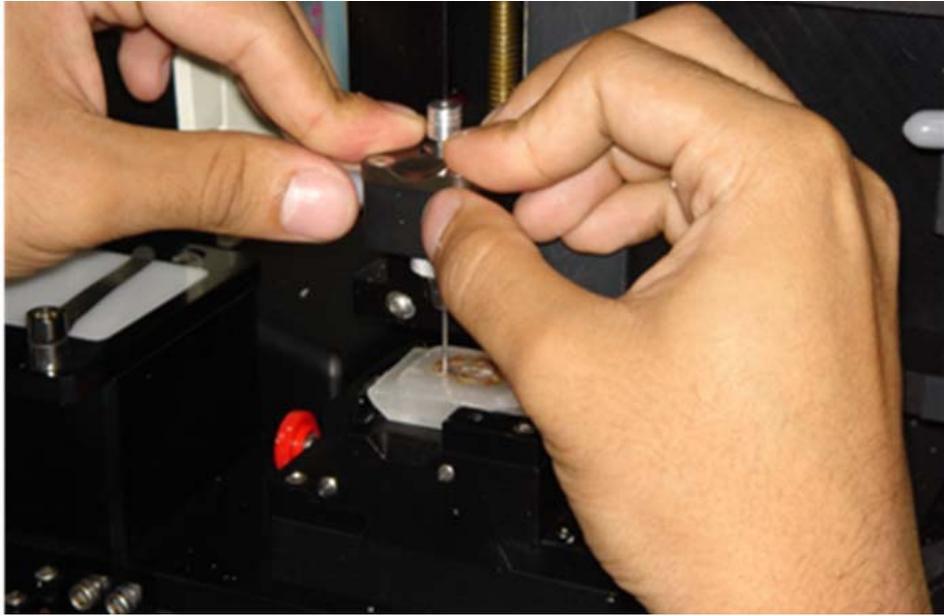
- A un bloque limpio de parafina o bloque receptor se le hace una perforación cilíndrica de 2 mm (Figura 6A y 6B). Aunque hay diversos tamaños y profundidades para los microarreglos de tejido, dependiendo del corte.



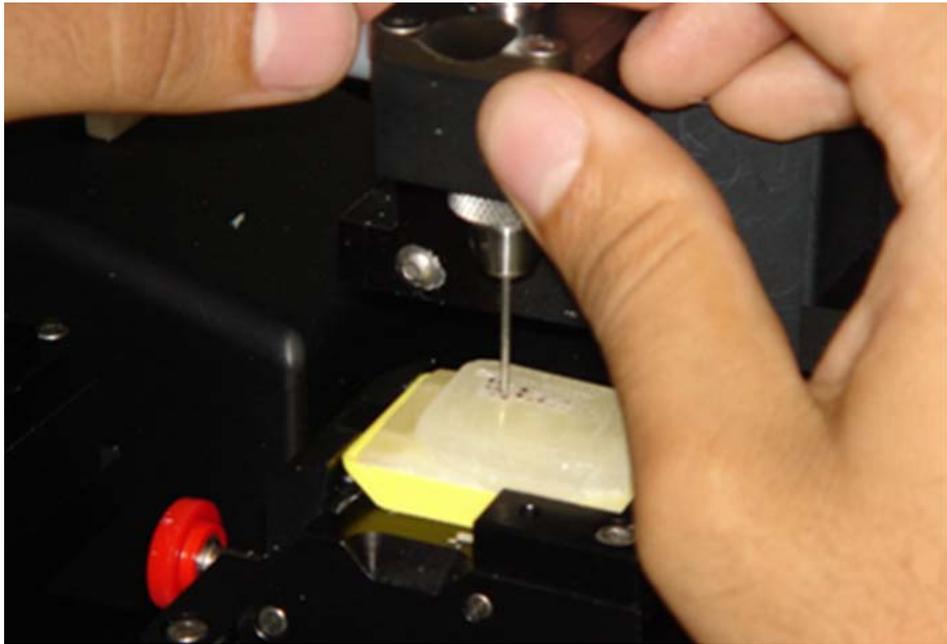
**Figura 6A.** Microarreglador para muestras de tejido parafinado.



**Figura 6B.** Extracción de un cilindro de 2 mm de ancho del sitio en donde se va a insertar el tejido a analizar. En la imagen se observa un bloque vacío de parafina.



**Figura 6C.** Extracción del cilindro obtenido del bloque original del paciente (donador).



**Figura 6D.** Colocación del cilindro extraído del bloque original en un bloque “receptor” en blanco de parafina, con un orden definido en la creación de lo que va a ser el microarreglo final a cortar.

- Se extrae de un bloque donador o el caso un cilindro del mismo tamaño. (Figura 6C)
- El cilindro de tejido obtenido se coloca en el agujero previamente hecho en el bloque receptor (Figura 6D).
- Se repite este proceso con todos los bloques donadores, hasta completar el bloque receptor, éste contendrá todos los casos de estudio los cuales tienen una separación de 5mm entre sí.
- Para este estudio, cada bloque receptor contiene 2 muestras del bloque receptor de cada paciente, el orden en que se organizaron fue aleatorio para así evitar sesgos al momento de la interpretación por el patólogo.

### **8.6.3 Inmunohistoquímica (Figura 7)<sup>36</sup>**

La inmunohistoquímica es una técnica de inmunotinción que permite demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados.

Una vez que se terminó el microarreglo, se hizo una evaluación de la literatura y los estudios previos realizados<sup>14</sup>, para elegir 3 de los marcadores que se consideran son los más representativos de cada patología, estos marcadores se obtuvieron a través de un proveedor autorizado con altos estándares de control de calidad y fueron verificados con el control positivo establecido antes de proceder a su aplicación en las muestras de estudio, estos marcadores son:

#### **1. Para Adenoma → Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)<sup>37</sup>**

- a. Fuente: conejo monoclonal
- b. Reactividad de la especie: humano y ratón
- c. Isotipo: Conejo IgG
- d. Localización celular: membrana celular y/o citoplasma.
- e. Control Positivo: carcinoma de células escamosas o cáncer de colon
- f. Tejido normal: piel

**2. Para hiperplasia → Receptor del anticuerpo de Tromboxano A2 (TBXa2r)<sup>38</sup>**

- a. Fuente: conejo policlonal
- b. Reactividad de la especie: humano
- c. Isotipo Conejo IgG
- d. Localización celular: membrana celular
- e. Control Positivo: músculo liso de vasos sanguíneos
- f. Tejido normal: endotelio

**3. Tejido Normal (control) → Anticuerpo Smad3<sup>38</sup>**

- a. Fuente: conejo policlonal
- b. Reactividad de la especie: humano, ratón y conejo
- c. Isotipo Conejo IgG
- d. Localización celular: en el citoplasma en ausencia de ligando; migración al núcleo cuando se conjuga con SMAD4
- e. Control Positivo: carcinoma de mama
- f. Tejido normal: tejido mamario normal

El proceso de inmunohistoquímica que se realizó en este estudio se detalla a continuación:

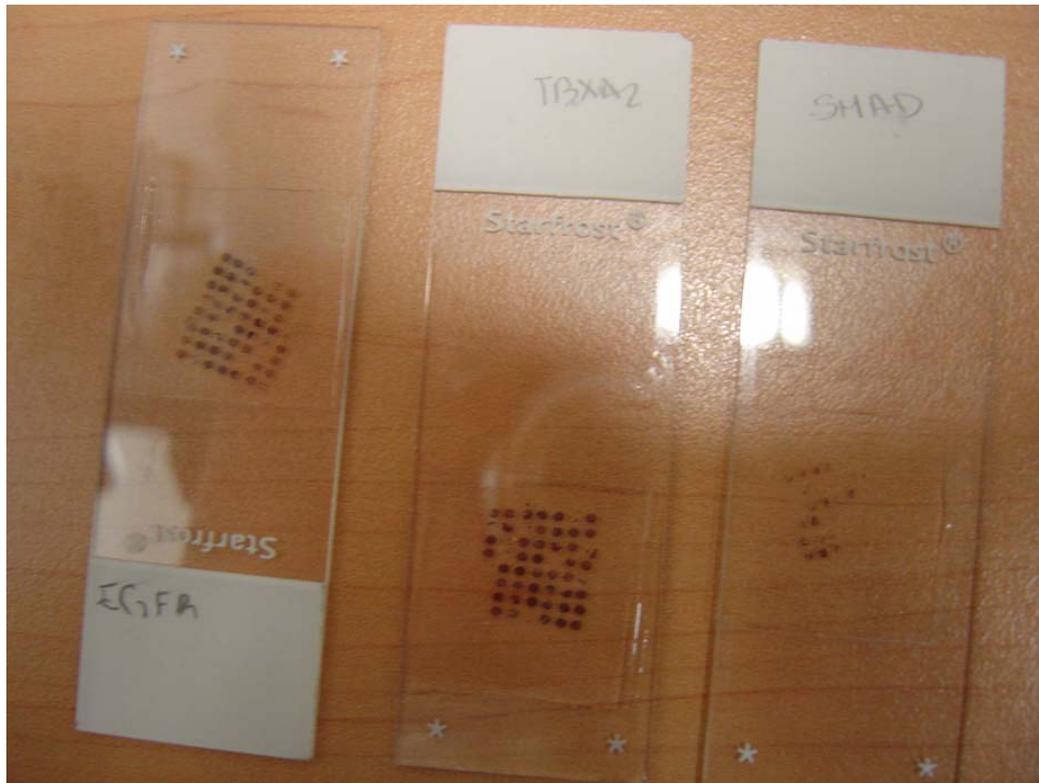
- I. Desparafinación de los tejidos por aproximadamente 60 min, utilizando una olla de presión.
- II. Lavado del tejido pasándolo por Xilol y alcohol a diferentes concentraciones, cada laminilla debe de permanecer 3 minutos en cada solución:
  - a. Xilol 1:1
  - b. Xilol 1:1
  - c. Alcohol absoluto + Xilol 1:1
  - d. Alcohol absoluto
  - e. Alcohol del 96
  - f. Alcohol del 96
  - g. Buffer
- III. Recuperación antigénica con proteasa:
  - a. Para EGFR se utilizó recuperación con proteasa
  - b. Para Smad3 y TbXa2r se realizó la recuperación con EDTA.
- IV. Se lavó la laminilla y se enmarcó con un plumón hidrofóbico.

- V. Bloqueo de la actividad de la peroxidada (100µL)
  - a. Peroxido de H<sub>2</sub> 0-01%
  - b. Se dejó por 10 minutos en movimiento continuo
  - c. Se enjuagó con Buffer
- VI. Se aplicó el anticuerpo primario por un periodo mínimo de 1 hora., posteriormente se enjuagó con buffer, la dilución fue específica para cada marcador utilizado:
  - a. Dilución para EGFR 1:100
  - b. Dilución para Smad3 1:500
  - c. Dilución para TbXa2r 1:75
- VII. Se agregó el anticuerpo secundario (1000 µL o 3 gotas) por 15 minutos para después enjuagar con buffer
- VIII. Se añadió estreptoquinasa aunado a peroxidada (100 µL) por 15 minutos y se enjuagó con buffer
- IX. Se bloqueó la actividad endógena de la Peroxidasa con diaminobezidina -DAB- (100 µL) por 34 minutos en movimiento
- X. Se tiñó la laminilla con hematoxilina (100 µL) por 4 minutos y tras este tiempo se enjuagó con buffer
- XI. Se lavó la laminilla en una solución de carbonato de litio al 1%
- XII. Una vez que apareció la coloración azul se pasó por agua corriente para lavar.
- XIII. Se terminó el proceso deshidratando el tejido pasándolo por las siguientes soluciones:
  - a. Buffer
  - b. Alcohol del 96
  - c. Alcohol del 96
  - d. Alcohol absoluto
  - e. Alcohol absoluto + Xilol 1:1
  - f. Xilol 1:1
  - g. Xilol 1:1
- XIV. Se monta la laminilla con un cubreobjetos utilizando una gota de resina

#### **8.6.4 Lectura e interpretación de la inmunohistoquímica (análisis histopatológico):**

Se realizó dentro del departamento de patología del INCMNSZ por un patólogo experto en paratiroides e inmunohistoquímica (AGD). Se evaluaron las características morfológicas de la muestra y

particularmente la positividad o negatividad del marcador. Se denominó como positivo aquel que había pintado al tejido en la localización celular indicada por la ficha técnica del mismo, mencionado anteriormente.



**Figura 7.** Inmunohistoquímica de microarreglos de tejido con los 3 marcadores elegidos para el estudio.

### **8.7 Análisis Estadístico.-**

Para las variables que tengan un escalamiento categórico como género o diagnóstico serán analizadas por tablas de 2 x 2 y la prueba de Chi cuadrada. Para variables de escalamiento dimensional como edad y la proporción de la intensidad en la expresión de ciertos marcadores se analizarán mediante la prueba t de Student o ANOVA. En el caso de ser necesario (heterocedasticidad de varianzas principalmente; con una prueba de Levene significativa para las variables con escalamiento dimensional) se realizará un análisis no paramétrico.

Se realizó un análisis descriptivo y bivariado de todas las variables incluidas en el presente estudio y su relación con los diferentes inmunofenotipos. Se consideraron como significativos estadísticamente aquellos valores de p o error alfa inferiores al 0.05 ó 5% respectivamente, para una prueba de hipótesis de dos colas.

La mayoría de las pruebas estadísticas así como los gráficos serán procesados por Excel de Microsoft Office y por el software estadístico SPSS versión 13.0.

## 9.- RESULTADOS

Un total de 50 muestras de tejido fueron identificadas para el estudio, de los cuales 37 fueron diagnosticados de manera definitiva tras 6 meses de seguimiento como adenomas y 12 como hiperplasias. Una muestra de adenoma fue eliminada al no cumplir con los criterios de calidad para ser analizadas. Aproximadamente el 81.6% de los pacientes fueron mujeres, mientras que sólo 9 (18.4%) fueron varones (Figura 8).

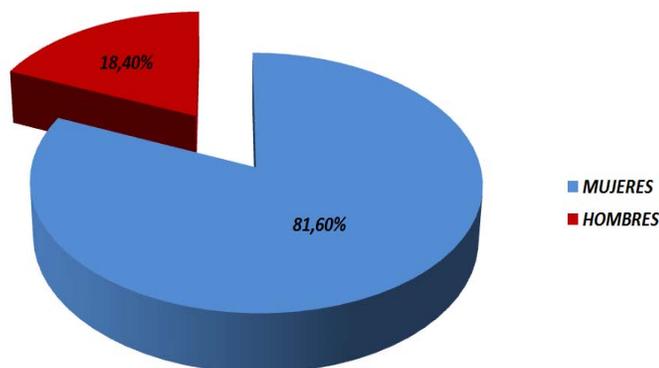


Figura 8. Distribución porcentual por género

En el caso de los 9 hombres incluidos en nuestro estudio, 6 (66.7%) presentaron adenomas mientras que sólo 3 hiperplasias (33.3%) de las glándulas paratiroides. En el caso de las mujeres 31 (77.5%) tenían adenoma y 9 (22.5%) hiperplasias (Figura 9). Estas proporciones no resultaron estadísticamente significativas cuando se analizaron por la prueba de Chi cuadrada.

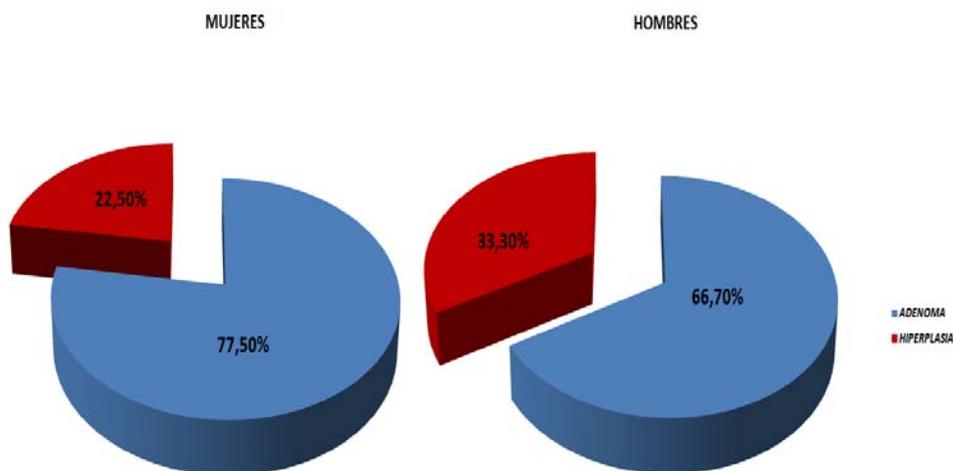
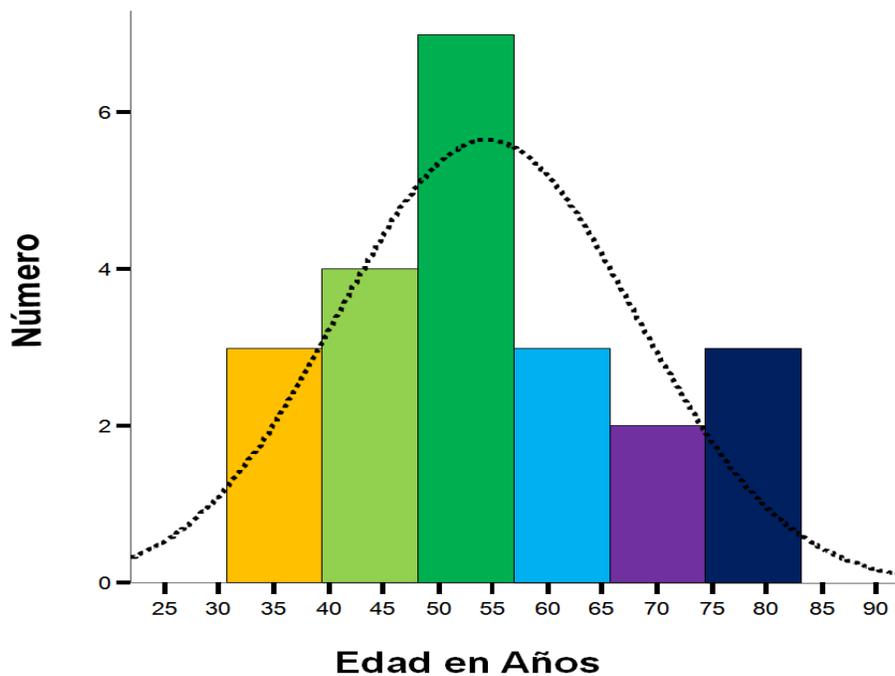


Figura 9. Porcentajes de acuerdo al género por diagnóstico.

La media para la edad del grupo del total de pacientes incluidos fue de 52 años (rango 30-77) (Figura 10). Los pacientes con adenoma paratiroideo tuvieron ligeramente una mayor edad que los pacientes con hiperplasia;  $54.1 \pm 10.3$  años vs  $49.7 \pm 20.3$  respectivamente. Esta diferencia no obtuvo significancia estadística al analizarla por una prueba t de Student ni U-Mann-Whitney, muy probablemente por poder estadístico.



**Figura 10.** Distribución de edad de todo el grupo (línea punteada representa la distribución normal)

De los adenomas, 11 (22%) estuvieron localizados en la glándula inferior derecha; 5 en la glándula inferior izquierda; en la glándula superior izquierda 3 y únicamente 1 en la superior derecha. El 75.7% de los adenomas ( $n=28$ ) fueron localizados de manera preoperatoria con la intención de realizar un abordaje quirúrgico mínimamente invasivo, el resto ( $n=9$ ) no se localizaron de manera prequirúrgica. Todas las hiperplasias fueron bilaterales.

Dentro de las características demográficas que se estudiaron para todo el grupo se encuentran la talla, peso, el calcio sérico, PTH, fósforo, magnesio y calcio urinario pre y posquirúrgico (a 1, 3 y 6 meses); el tiempo quirúrgico y la recurrencia del HPTp. Las medidas de tendencia central y dispersión para éstas variables en relación al diagnóstico definitivo en nuestra cohorte se encuentran resumidas en el Tabla 2.

Estadísticos de grupo

	DIAGNOSTICO	N	Media	Desviación típ.	Error tít. de la media
ANOS	ADENOMA	31	54.10	10.310	1.852
	HIPERPLASIA	11	49.73	20.303	6.122
KG	ADENOMA	30	64.4433	15.53744	2.83674
	HIPERPLASIA	10	61.5000	10.22252	3.23265
MTS	ADENOMA	30	1.5607	.08944	.01633
	HIPERPLASIA	9	1.5522	.07014	.02338
CALCIO_ PREOPERATORIO	ADENOMA	31	11.5126	1.21608	.21841
	HIPERPLASIA	10	10.6440	1.21279	.38352
PTH_PREOP	ADENOMA	27	334.7000	425.65680	81.91769
	HIPERPLASIA	7	326.9000	209.84574	79.31424
FOSFORO_PREOP	ADENOMA	30	2.6153	.65551	.11968
	HIPERPLASIA	10	3.7200	1.86690	.59037
MG_PREOP	ADENOMA	18	2.0967	.36416	.08583
	HIPERPLASIA	5	2.5040	.49591	.22178
VITD_PREOP	ADENOMA	12	28.13	11.003	3.176
	HIPERPLASIA	2	36.95	12.940	9.150
CREATININA_PREOP	ADENOMA	29	1.1383	.59690	.11084
	HIPERPLASIA	10	4.5300	6.02666	1.90580
CALCIO_URINARIO_ PREOP	ADENOMA	20	296.4600	156.29103	34.94774
	HIPERPLASIA	5	96.2000	55.71086	24.91465
GRAMOS	ADENOMA	23	2.92	2.642	.551
	HIPERPLASIA	2	5.15	2.616	1.850
MINUTOS	ADENOMA	27	90.1111	36.78454	7.07919
	HIPERPLASIA	8	144.5000	54.49508	19.26692
CALCIO_POP1MES	ADENOMA	22	9.0682	.60975	.13000
	HIPERPLASIA	11	10.0473	3.64881	1.10016
CALCIO_POP3MESES	ADENOMA	23	9.2417	1.05556	.22010
	HIPERPLASIA	10	9.2240	2.07220	.65529
CALCIO_POP6MESES	ADENOMA	28	9.2721	.41297	.07804
	HIPERPLASIA	11	9.1409	1.31241	.39571
PTHPOP1MES	ADENOMA	4	91.45	35.582	17.791
	HIPERPLASIA	1	129.23	157.919	78.959
PTHPOP3MESES	ADENOMA	15	108.68	57.449	14.833
	HIPERPLASIA	6	257.02	168.932	68.966
PTHPOP6MESES	ADENOMA	25	78.1280	53.75881	10.75176
	HIPERPLASIA	8	126.9875	93.88265	33.19253
FOSFORO_POP1MES	ADENOMA	18	3.3178	.64708	.15273
	HIPERPLASIA	9	3.4567	1.09563	.36521
FOSFORO_POP3MESES	ADENOMA	21	3.3152	.63732	.13907
	HIPERPLASIA	10	3.2690	1.17136	.37042
FOSFORO_POP6MESES	ADENOMA	27	3.2052	.68571	.13196
	HIPERPLASIA	10	3.7330	.99229	.31379
MGPOP1MES	ADENOMA	6	2.14	.272	.111
	HIPERPLASIA	5	3.00	.673	.301
MGPOP3MESES	ADENOMA	5	2.11	.197	.088
	HIPERPLASIA	4	2.43	.387	.194
MGPOP6MESES	ADENOMA	5	2.19	.244	.109
	HIPERPLASIA	4	2.27	.322	.161
VITDPOP	ADENOMA	10	29.32	13.193	3.298
	HIPERPLASIA	2	29.05	14.496	10.250

**Tabla 2.** Datos Demográficos según el diagnóstico (Adenoma vs. Hiperplasia)

El peso promedio ( $\pm$ DE) de los adenomas paratiroides fue de  $2.92 \pm 2.6$  gramos, mientras que las glándulas hiperplásicas pesaron en promedio ( $\pm$ DE)  $5.15 \pm 2.62$  gramos. El calcio

preoperatorio fue discretamente mayor en los adenomas que en las hiperplasias (11.51±1.2 vs 10.64±1.2 mg/dL respectivamente).

La PTH fue documentada en los pacientes con adenoma en un promedio de 334.7±425.6 pg/mL mientras que en los pacientes con hiperplasia ésta fue de 326.9±209.8 pg/mL.

El fósforo preoperatorio se encontró dentro de rangos normales tanto para los pacientes con adenomas como para los pacientes con hiperplasia (2.61±0.65 vs 3.7±1.87 mg/dL respectivamente) mientras que el magnesio se encontraba ligeramente incrementado en los pacientes con hiperplasia respecto a los pacientes con adenoma (2.5±0.49 vs 2.09±0.36 mg/dL respectivamente).

Respecto a las concentraciones de la vitamina D en plasma, los pacientes con adenoma paratiroideo mostraron un discreto menor nivel de ésta cuando fueron comparados con los pacientes con hiperplasia (28.13±11.0 vs 36.95±12.94 nmol/L).

El calcio urinario preoperatorio fue notablemente mucho mayor en los pacientes con adenoma paratiroideo que en los pacientes con hiperplasia (296.46±156.3 vs 96.2±55.7 mg/24 horas respectivamente). Esta diferencia resultó estadísticamente significativa por la prueba t de Student ( $p \leq 0.0001$ ).

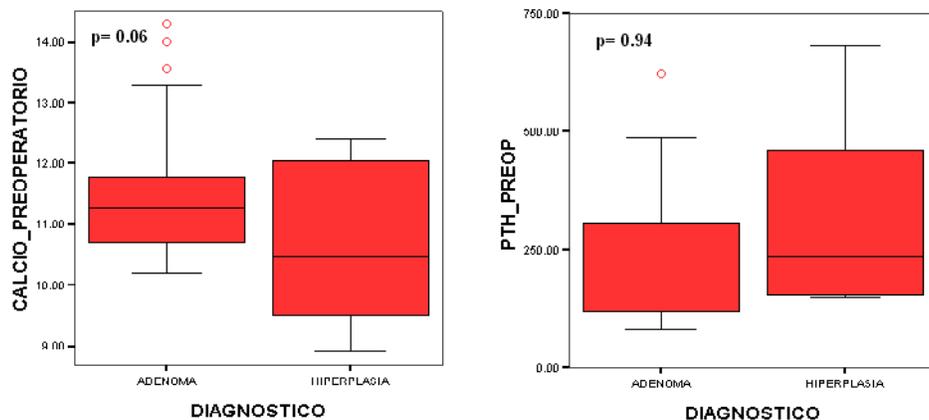
El tiempo quirúrgico también difirió entre los dos grupos en estudio: en los pacientes con adenoma este tiempo fue de 90.11±36.8 minutos, mientras que en los pacientes con hiperplasia este tiempo fue mucho mayor (144.5±54.49 mins). Esto muy probablemente se encuentre relacionado con el hecho de que los pacientes con hiperplasia son sometidos a una exploración bilateral de cuello, mientras que para la mayoría de los pacientes con adenoma paratiroideo, sólo se someten a un abordaje mínimamente invasivo, la mayoría de las ocasiones explorando un solo lado del cuello.

Los promedios y DE para los niveles de calcio postoperatorio al mes, 3 y 6 meses para cada uno de los grupos de pacientes se muestran también en la tabla 2. Como puede observarse todos los pacientes tuvieron niveles dentro de límites normales para este ion. Respecto a la PTH medida en los mismos intervalos de tiempo en el postoperatorio, pudimos observar un mayor incremento en los pacientes con hiperplasia paratiroidea.

A manera de resumen, solamente 3 variables mostraron significancia estadística asumiendo varianzas no homogéneas (dado el tamaño muestral): el Calcio urinario preoperatorio, el cual

fue más elevado en los pacientes con adenoma (Media 296.46) que en los pacientes con hiperplasia (Media 96.20) mostró una diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.0001$ ) calculado por T de student. El tiempo quirúrgico también mostró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) utilizando T de student para varianzas no homogéneas de acuerdo a la prueba de Levene que se comprobó que la paratireodectomía dura más en pacientes con hiperplasia. La tercer variable con significancia ( $p \leq 0.05$ ) fue la del Magnesio postquirúrgico al mes el cual resultó menor en pacientes con adenoma. Las diferencias para el tiempo quirúrgico y el calcio urinario fueron matemáticas y estocásticas, mientras que para el magnesio sérico únicamente fue matemática.

Dentro de los parámetros importantes para el diagnóstico y seguimiento del paciente como son el calcio sérico y la PTH, no encontramos diferencia significativa entre las 2 entidades patológicas estudiadas en el presente estudio (Figura 11).



**Figura 11.** Análisis estadístico por T de Student para varianzas no homogéneas por prueba de Levene del calcio y PTH prequirúrgicos.

Una vez obtenidos los datos que fueron válidos desde el punto de vista matemático y tras revisar en los microarreglos de tejido aquellos spots en los que el tejido fue insuficiente o la muestra no tiño de manera adecuada, se obtuvo la información total por marcador analizado. Para que el tejido fuera marcado como positivo, se verificaron cada uno de los marcadores con el control, si el control marcaba positivo, se aplicaba la misma técnica y dilución a la muestra de estudio. Cada laminilla contenía 2 muestras de tejido de cada caso de estudio, por lo que de cada paciente se tienen 2 lecturas por marcador, los resultados de la lectura por el patólogo se ven reflejados en la Tabla 3.

Fecha	Registro	Diagnóstico	Bloque	EGFR 1'	EGFR 2'	TBXa2r 1'	TBXa2r 2'	SMAD3 1'	SMAD3 2'
22/10/1992	137482	Hiperplasia	Q923553	0	0	0	0	1	0
12/03/1993	146947	Hiperplasia	Q930802	0	0	0	0	0	0
26/01/1995	134200	Hiperplasia	Q95382	0	0	0	0	0	0
19/06/2001	187423	Hiperplasia	Q012738	1	0	0	0	0	0
12/02/2003	136630	Hiperplasia	Q030761	0	0	0	1	0	0
15/02/2005	199858	Hiperplasia	Q050783	0	0	1	0	0	0
23/12/2003	211143	Hiperplasia	Q036516	0	0	0	0	0	0
05/12/2005	198316	Hiperplasia	Q056663	0	0	0	0	0	0
10/03/2006	194383	Hiperplasia	Q061361	0	0	0	0	0	0
02/06/2006	191536	Hiperplasia	Q062988	0	0	0	0	0	0
04/12/2007	225422	Hiperplasia	q077080	0	0	0	0	0	0
30/03/2008	169085	Hiperplasia	Q081910	0	NA	0	0	0	0
01/03/1996	163907	Adenoma	Q9609652	0	0	0	0	0	0
13/06/1997	32189	Adenoma	Q972745	NA	0	NA	1	NA	0
17/06/1997	173926	Adenoma	Q972794	NA	0	NA	1	NA	0
10/07/1997	148246	Adenoma	Q973256	0	0	0	NA	0	0
18/11/1997	174476	Adenoma	Q975512	1	0	0	1	1	0
13/01/1998	139861	Adenoma	Q980164	1	1	0	0	0	0
15/01/1998	176244	Adenoma	Q980196	0	0	0	1	0	1
24/02/1998	178562	Adenoma	Q980794	0	0	0	0	0	0
24/02/1998	175575	Adenoma	Q980818	1	NA	1	NA	0	0
10/09/1998	182313	Adenoma	Q984259	0	0	0	1	0	0
23/10/1998	183082	Adenoma	Q985082	0	0	0	0	NA	0
02/02/1999	185040	Adenoma	Q990508	1	0	0	0	0	0
23/02/1999	178243	Adenoma	Q990865	0	0	0	1	0	0
06/06/2000	185225	Adenoma	Q002678	0	0	0	1	0	0
28/07/2000	193901	Adenoma	Q003651	0	0	0	1	1	0
10/11/2000	192965	Adenoma	Q005554	1	0	1	1	0	0
01/03/2001	176256	Adenoma	Q010974	0	0	0	1	NA	NA
27/07/2001	200729	Adenoma	Q013477	1	0	0	0	0	0
11/01/2002	199619	Adenoma	Q02147	NA	NA	0	NA	NA	NA
15/04/2003	179202	Adenoma	Q031905	1	0	1	2	1	0
25/02/2005	166239	Adenoma	Q051019	0	0	0	2	0	0
13/01/2006	224284	Adenoma	q060196	0	0	0	0	0	0
28/03/2006	224574	Adenoma	q061643	0	0	0	0	0	0
26/05/2006	219532	Adenoma	q062822	0	0	0	0	0	0
14/07/2006	226854	Adenoma	q063968	0	0	0	0	0	0
18/08/2006	224723	Adenoma	q064777	0	0	0	0	0	0
03/10/2006	204613	Adenoma	q065689	0	0	0	0	0	0
15/12/2006	230995	Adenoma	q067008	1	1	0	0	0	0
25/04/2007	213670	Adenoma	q072902	0	0	0	0	0	0
29/04/2007	226760	Adenoma	q072982	0	NA	0	0	0	0
29/04/2007	231012	Adenoma	q072983	0	0	0	0	0	0
13/07/2007	233881	Adenoma	q073972	1	0	0	0	0	0
07/08/2007	221578	Adenoma	q074521	0	0	0	0	0	0
18/09/2007	234489	Adenoma	q075439	1	0	0	0	0	0
18/12/2007	229583	Adenoma	q077385	1	0	0	0	0	0
	234219	Adenoma	q081693	0	0	0	0	0	0
18/03/2004	237685	Adenoma	q081722	1	0	0	0	0	0
21/11/2008	241483	Adenoma	q087188	0	0	0	0	0	0

**Tabla 3.** Resultados de la inmunohistoquímica (con al menos 2 lecturas por marcador): 0= sin marcaje; 1= con marcaje, NA= muestra insuficiente

La primera evaluación que se realizó fue una T de student para comparar medias de 2 muestras independientes entre las variables demográficas, en particular aquellas que en el análisis demográfico fueron significativas y las de importancia para el diagnóstico (calcio urinario, tiempo quirúrgico, magnesio, PTH y calcio), y la positividad de cada uno de los marcadores, esto claro, asumiendo que las varianzas no son homogéneas con la finalidad práctica de asumir distribuciones no normales debido al tamaño muestral limitado.

Al analizar el calcio entre las muestras que fueron consideradas en la inmunohistoquímica como positivas y negativas para el marcador EGFR, pudimos observar que los tejidos positivos tuvieron un calcio preoperatorio ligeramente más alto con un valor de  $p \leq 0.05$ . De igual manera se observó esta tendencia entre los tejidos que mostraron positividad para el TBXa2r. Cabe destacar que aquellos tejidos en los que tanto el EGFR como el TBXa2r fueron positivos esta diferencia que ya era significativa, fue aún mayor. El resto de las variables mencionadas no mostraron diferencia estadística.

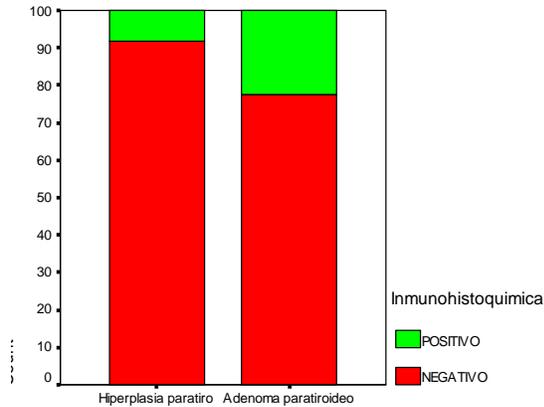
Un hallazgo de importancia en los tejidos que marcaron positivo y negativo para SMAD3, es que los positivos tuvieron una PTH menor, calcio urinario menor y un tiempo quirúrgico mucho menor que aquellos que fueron negativos, esto sugiere su valor como marcador de tejido normal. (Tabla 4) como habíamos observado en los microarreglos de cDNA en nuestro proyecto previo.

VARIABLES	SMAD3	N	Media	DE	p
Calcio Sérico	<i>Negativo</i>	37	11.15	1.24	<i>NS</i>
	<i>Positivo</i>	5	12.09	1.20	
PTH	<i>Negativo</i>	32	343.23	395.31	$\leq 0.05$
	<i>Positivo</i>	3	130.9	23.75	
Calcio Urinario	<i>Negativo</i>	23	267.79	155.57	$\leq 0.05$
	<i>Positivo</i>	3	157.33	30.73	
Magnesio Sérico	<i>Negativo</i>	20	2.15	0.422	<i>NS</i>
	<i>Positivo</i>	3	2.31	0.471	
Tiempo Quirúrgico	<i>Negativo</i>	31	105.5	48.07	$\leq 0.05$
	<i>Positivo</i>	4	71.75	14.22	

**Tabla 4.** Estadístico de SMAD3 para tejido positivo y negativo

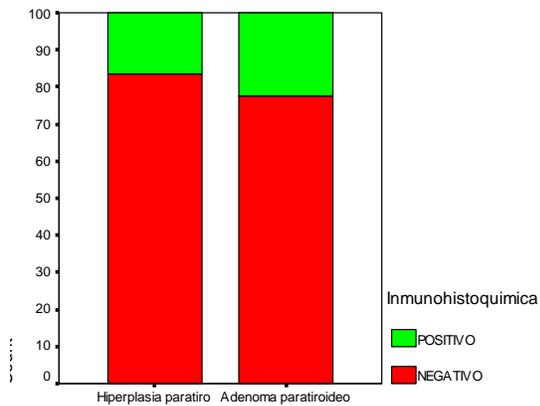
Se tomaron como positivas cualquier muestra de las 2 tomadas al paciente que tuviera marcaje para el receptor estudiado. Para el marcador EGFR (Figura 12), tuvimos 12 muestras positivas y 25 negativas; en el caso de la hiperplasia únicamente 1 fue positiva y el

resto (n=11) fueron negativas. Esto al realizar una prueba exacta de Fisher nos da un resultado de  $p=0.432$ . La sensibilidad para este marcador es del 32% y su especificidad es del 91% con un valor predictivo positivo (Vpp) de 92% y uno negativo (Vpn) de 30%.



**Figura 12.** EGFR en adenoma vs. Hiperplasias

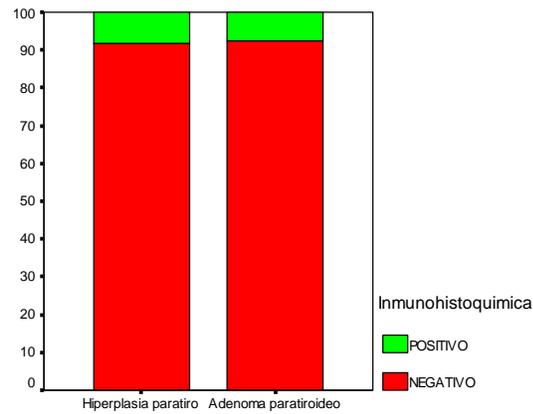
En el caso del TBXa2r, 2 hiperplasias marcaron positivas y otras 10 negativas, mientras que 12 adenomas marcaron positivos y 25 resultaron negativos. Para este marcador, la sensibilidad diagnóstica fue del 16%, la especificidad del 67.5%, el Vpp de 14% y el Vpn de 71%. (Figura 13). La prueba exacta de Fisher dio por resultado para este caso una  $p=1.000$ .



**Figura 13.** TBXa2r en adenomas vs. Hiperplasias

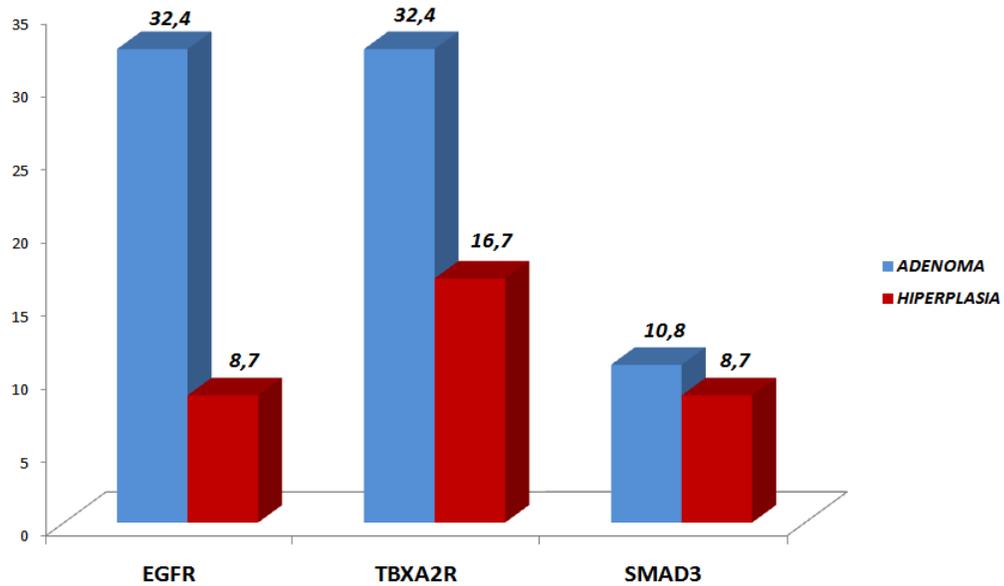
Para SMAD3, 33 adenomas resultaron negativos para este marcador mientras que 4 fueron positivos, mientras que sólo 1 hiperplasia fue positiva y las 11 restantes negativas. Esto representa una sensibilidad del 10% con una especificidad del 91%. El Vpp es del 80% y el Vpn del 25%. La comparación por Chi cuadrada entre hiperplasia y adenoma nos da una  $p=1$  lo que no es significativamente estadístico, lo cual refuerza que SMAD3 debe de ser

considerado definitivamente un marcador de tejido normal, ya que no hay diferencia estadística (más bien alto grado de similitud) entre adenoma e hiperplasia. (Figura 14).



**Figura 14.** SMAD3 entre adenomas e hiperplasias

Resumiendo: aproximadamente el 32.4% de los adenomas marcaron positivos para EGFR y TBXA2R, mientras que las hiperplasias fueron positivas para estos mismos marcadores en sólo el 8.7% y 16.7% respectivamente. Por el contrario, cerca del 90% de tanto los adenomas como las hiperplasias resultaron negativas para SMAD3. La figura 15 muestra las diferentes proporciones observadas para la positividad de los diferentes marcadores para cada uno de los fenotipos evaluados.



**Figura 15.** Resumen de las proporciones de POSITIVIDAD observadas para EGFR, TBXA2R y SMAD3 entre adenomas e hiperplasias

Ya que en varios de los casos, se identificó que un mismo tejido marcaba para más de un marcador, se evaluaron también las combinaciones de 1 o más receptores positivos, los resultados de éstos se muestran en la Tabla 5.

MARCADOR	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VPP	VPN
EGFR (+) TBXa2r (-) SMAD3 (-)	<b>88%</b>	<b>27%</b>	<b>21%</b>	<b>91%</b>
EGFR (+) TBXa2r (+) SMAD3 (-)	<b>100%</b>	<b>26%</b>	<b>8%</b>	<b>100%</b>
EGFR (-) TBXa2r (-) SMAD3 (+)	<b>0%</b>	<b>22%</b>	<b>0%</b>	<b>91%</b>
EGFR (+) TBXa2r (-) SMAD3 (+)	<b>0%</b>	<b>24%</b>	<b>0%</b>	<b>100%</b>
EGFR (-) TBXa2r (+) SMAD3 (+)	<b>100%</b>	<b>26%</b>	<b>8%</b>	<b>100%</b>
EGFR (-) TBXa2r (+) SMAD3 (-)	<b>77%</b>	<b>25%</b>	<b>18%</b>	<b>83%</b>
EGFR (-) TBXa2r (-) SMAD3 (-)	<b>68%</b>	<b>16%</b>	<b>45%</b>	<b>33%</b>
EGFR (+) TBXa2r (+) SMAD3 (+)	<b>100%</b>	<b>25%</b>	<b>5%</b>	<b>100%</b>

**Tabla 5.** Sensibilidad, Especificidad, Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) de los tejidos que fueron positivos para más de un marcador (%)

## 10.-DISCUSIÓN

En la actualidad, el diagnóstico definitivo entre adenoma e hiperplasia paratiroidea asociado a HPTp se establece una vez que el paciente ha sido sometido a una paratiroidectomía, ya sea de una, dos o de 3 y media de las 4 glándulas. A pesar de que el cirujano entra a la cirugía con el conocimiento previo de la posible glándula (s) afectada, es su experiencia y lo que visualiza al momento de la cirugía lo que define el tratamiento ulterior del paciente. Esto aunado a un calcio postoperatorio y PTH dentro de límites normales, nos da la pauta para definir mejor al paciente como curado o no.

Con la llegada de novedosas técnicas bioquímicas como el ensayo rápido intraoperatorio de la PTH, este diagnóstico clínico diferencial se ha visto facilitado, ya que una disminución superior al 50% de los niveles de PTH en plasma en los primeros 10 minutos posteriores a la remoción quirúrgica de la glándula anormal puede establecer el diagnóstico definitivo de adenoma. Sin embargo debido a su costo y al entrenamiento especial que se requiere para este estudio, no es la práctica habitual en la mayoría de los hospitales. De igual manera la cirugía de paratiroides ha tenido grandes innovaciones con el paso de los años, como es la cirugía mínimamente invasiva, en la cual la cicatriz es mucho menor en comparación con la exploración de cuello bilateral, y por lo tanto la recuperación del paciente es más rápida, menos dolorosa y más estética.

Sin embargo, en un porcentaje de pacientes estos estudios pueden no ser lo suficientemente sensibles o específicos para el diagnóstico, llevando a que la recurrencia de la hipercalcemia con la consecuencia de que el paciente tendrá que ser sometido a una reexploración de cuello. Es por ello que todo paciente que se somete a una paratiroidectomía por HPTp esporádico, independientemente de si es por enfermedad mono- o poliglandular (es decir adenoma o hiperplasia respectivamente), se le dé un seguimiento clínico de al menos 6 meses. En ausencia de algún parámetro bioquímico, radiológico, histopatológico o morfológico confiable para el diagnóstico diferencial entre adenoma e hiperplasia paratiroides, la búsqueda de marcadores moleculares para diferenciar estas entidades patológicas parece no sólo interesante sino hasta necesario en algunos casos. La capacidad para diferenciar estas dos entidades conllevaría a ventajas no sólo clínicas sino económicas en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de estos pacientes.

Los microarreglos de tejido fueron desarrollados por Kononen et al hace aproximadamente 10 años y son ampliamente utilizados a nivel mundial debido a que son una herramienta rápida, costo-efectiva y prácticamente útil para cualquier análisis de un tejido. Es un método validado de alta efectividad para analizar e investigar una gran variedad de biomarcadores<sup>33, 34,35</sup>. Es por

ello que para nuestro estudio, se decidió utilizarlos, dándonos así la oportunidad de evaluar todas nuestras muestras de tejido en una sola laminilla, lo cual permite que el análisis sea más rápido, más económico y por otro lado ayuda a que la interpretación del patólogo sea más consistente.

La inmunohistoquímica, es la localización de antígenos en ciertas secciones de un tejido por medio de un anticuerpo marcado que actúa como un agente específico que a través de una reacción antígeno – anticuerpo permite visualizar dicho marcador ya sea como una tinción fluorescente, una enzima un elemento radioactivo o un coloide. Los primeros marcajes de éste tipo se llevaron a cabo por Albert H. Coons y sus colaboradores. Ya que la inmunohistoquímica involucra una reacción antígeno – anticuerpo específica, es evidente la ventaja que tiene sobre otro tipo de tinciones tradicionales que únicamente identifican un número limitado de proteínas, enzimas y estructuras celulares. Es por ello, que la inmunohistoquímica es una técnica crucial y muy popular en el campo de la investigación y el diagnóstico clínico. La importancia de haber realizado éste proceso para nuestro estudio no solo radica en su posibilidad para identificar a ambas patologías sino además en el hecho de que es un método relativamente sencillo y más accesible.

De acuerdo a lo que observamos en nuestra cohorte pudimos constatar que el HPTp se presenta con mayor frecuencia en nuestros pacientes en la quinta década de la vida y en pacientes del género femenino. Esto muy probablemente se encuentre relacionado al estado hormonal de las mujeres a esta edad. Se ha descrito ya en la literatura la asociación entre menopausia y el HPTp, lo que podría ser un punto de interés para futuras terapias de sustitución hormonal.

Las características demográficas de nuestra población son en general homogéneas, aunque el tamaño muestral es limitado. Esto se debe a que la incidencia de la enfermedad no es tan alta, a pesar de que nuestro instituto es un centro de referencia.

En un porcentaje muy alto de nuestros pacientes se realizaron estudios de localización preoperatorios, lo que confirma la alta sospecha de enfermedad monoglandular en el HPTp en nuestra cohorte. Este abordaje es costo-beneficioso para los pacientes, pues permite que sean abordados de una manera mucho menos invasiva con una menor estancia hospitalaria, menor morbilidad asociada, menor dolor y una recuperación mucho más rápida. En la mayor parte de los casos el diagnóstico se estableció por niveles anormalmente altos de PTH pero ninguno con crisis hipercalcémicas, lo que sugiere que en la mayoría de las ocasiones el diagnóstico fue relativamente oportuno sin llevar a las consecuencias catastróficas a veces de la enfermedad crónica con un diagnóstico muy retrasado.

Como se menciona en la sección de resultados únicamente 3 de las variables estudiadas arrojan datos de significancia estadística, el tiempo quirúrgico prolongado en los casos de las hiperplasias se explica por el hecho de que si los estudios de gabinete y al momento de la cirugía, no se ve una clara evidencia de cuáles son las glándulas afectadas, la exploración del cuello bilateral debe de ser exhaustiva, así como es necesario la espera del transoperatorio para una confirmación. Por el contrario, en los pacientes con el diagnóstico preoperatorio de adenoma, sólo el estudio de localización basta para realizar una exploración mínimamente invasiva y habitualmente del mismo lado afectado. En pocas ocasiones se requiere de una mayor invasión (extensión de la herida quirúrgica) o de una exploración de mayor alcance.

En relación al calcio urinario pre quirúrgico y el magnesio postquirúrgico, se ve una mayor asociación en los pacientes con adenoma que en los pacientes con hiperplasia, ambos son datos que a nivel de la clínica, según nuestros resultados pudieran tener una influencia predictiva para el paciente tanto a nivel pre- como postquirúrgico.

Para el caso del calcio sérico y la PTH no hubo una franca diferencia entre ambas entidades, lo cual nos ayuda a sustentar nuestro trabajo, ya que si bien éstos dos estudios son el estándar de oro para realizar el diagnóstico de HPTp, no nos ayudan a discriminar la etiología de mismo.

A continuación analizaremos los resultados de la inmunohistoquímica para el arreglo de tejido de esta cohorte, encontrados para cada uno de los marcadores evaluados.

### **10.1. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)**

El receptor para el EGF (EGFR) fue el primero en ser identificado dentro de la familia de receptores conocida como los receptores de tirosin-cinasa tipo I. La función de éstos receptores en la activación de mecanismos que favorecen el crecimiento tumoral ha sido ampliamente estudiada para diferentes patologías pero no para el HPTp esporádico.

Nuestros resultados si bien no arrojan una diferencia significativa que nos haga pensar como el marcador único para hacer el diagnóstico diferencial entre hiperplasia y adenoma, si nos expresan una franca tendencia a que éste marcador se encuentra en los casos con adenoma y no en aquellos con hiperplasia.

Sadler<sup>39</sup> y sus colaboradores, realizaron un estudio a través de la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* para tratar de diferenciar entre estas 2 patologías. La conclusión de estos autores fue que faltaba un número adecuado de receptores a nivel de la membrana celular que realmente nos diera la pauta para identificar al EGFR como un marcador absoluto entre estas patologías.

En el presente estudio, si logramos observar una expresión aumentada del marcador para EGFR en los pacientes con adenoma paratiroideo al compararlos con las hiperplasias. Si bien, los resultados para éste marcador no son lo que esperábamos, creemos que con una muestra más importante esta diferencia podría llegar a ser estadísticamente significativa, partiendo de los antecedentes que se tienen de éste marcador como un buen indicador tumoral para otras patologías en la que se ha comprobado esto <sup>40, 41, 42</sup>.

A pesar de que la sensibilidad para EGFR en nuestro estudio fue de sólo el 88%, la especificidad fue muy baja (apenas un 27%). Lo esperado para éste marcador es específico que como mencionamos con anterioridad es un marcador ya bien establecido para el diagnóstico e incluso tratamiento de otros tumores sólidos, nos hace pensar que la inmunohistoquímica para éste marcador es cuestionable. Por otro lado, cuando decidimos incrementar el tamaño muestral de manera artificial (replicando los mismos resultados con las mismas proporciones pero con un mayor número de individuos por supuesto) pudimos observar una tendencia hacia la significancia estadística, lo que demuestra una vez más que estas observaciones fueron dependientes del poder estadístico de nuestra cohorte.

## **10.2. Receptor del Tromboxano A2 (TBXA2R)**

El receptor para el tromboxano A2, es un miembro de la familia de los receptores ligados a proteína G. Su principal papel se encuentra en el proceso de hemostasis ya que éste induce la agregación plaquetaria. A nivel tumoral su principal función es en angiogénesis (por tratarse de un receptor de prostanoides) <sup>38</sup>. En un estudio realizado por nuestro grupo<sup>14</sup>, el TBXA2R fue identificado en microarreglos de cDNA como un posible gen que se ve sobre expresado en pacientes con hiperplasia asociada a HPTp de origen esporádico. Contrario a los hallazgos que obtuvimos con esta plataforma, en el presente análisis por inmunohistoquímica del arreglo de tejido pudimos observar que no

había una diferencia significativa para éste marcador en pacientes con hiperplasia en relación a los pacientes que presentaban adenoma. Esto nos hace pensar que este marcador pudiera ser un falso positivo para hiperplasia o que el tamaño muestral una vez más limitaría las conclusiones por poder estadístico.

Ahora bien, es importante destacar, que al estudiar aquellas muestras de tejido paratiroideo que dieron positivo tanto para EGFR como para TBxA2r, nos dimos cuenta que en su mayoría eran adenomas, lo cual nos está hablando de que el receptor para el tromboxano A2, más que un marcador para hiperplasia, podría serlo para adenoma. Este supuesto debe de ser evaluado con mayor profundidad utilizando técnicas más específicas como son la reacción en cadena de la polimeras a en tiempo real (qRT-PCR) y en un mayor número de pacientes con HPTp.

La relevancia de la positividad con ambos marcadores radica en el hecho de que estamos viendo una tendencia que nos indica que para el diagnóstico de adenoma contamos con una firma molecular no específica ni limitada a un sólo gen o marcador, sino más bien a la combinación de algunos o hasta varios de ellos. Esto nos da la pauta para seguir estudiando la potencial combinación de éstos marcadores para el discernimiento categórico entre hiperplasia y adenoma paratiroideos como una herramienta de diagnóstico y pronóstico.

### **10.3. Mothers against decapentaplegic homolog 3 (SMAD3)**

Pertenece a una familia de proteínas que actúan como mediadores claves en la señalización celular que participa en la proliferación, diferenciación y desarrollo celular<sup>38</sup>. De manera interesante éste gen se vio expresado en un porcentaje extremadamente bajo tanto en hiperplasia como en adenoma, con una alta especificidad y una baja sensibilidad. Este hallazgo confirma de alguna manera lo observado por nuestro grupo para estas mismas entidades con la plataforma de microarreglos de cDNA al igual que en otros estudios<sup>14</sup>. Al parecer SMAD es un marcador que únicamente se expresa en tejido normal, lo cual podría conferir una utilidad clínica para diferenciar las entidades patológicas más frecuentes de las glándulas paratiroideas: adenoma e hiperplasia (cerca del 95% del total de los casos de HPTp) en relación al tejido paratiroideo normal.

## 11.- CONCLUSIONES

En el presente trabajo pudimos demostrar que es posible una evaluación por inmunohistoquímica rápida y eficiente mediante el uso de arreglos de tejido que pueden incluir hasta 56 pacientes. Con esta plataforma es posible evaluar diversos marcadores de una manera simultánea en un buen número de estos pacientes. Además nuestros resultados mostraron una tendencia a poder diferenciar estas entidades por inmunohistoquímica para los 3 marcadores evaluados inicialmente. Sin embargo ninguna de las proporciones observadas resultó estadísticamente significativa por sí sola, muy probablemente debido al tamaño muestral. Concluimos que el uso individual de cualquiera de éstos marcadores es limitado e insuficiente, por lo que su uso conjugado en forma de “firma” sería más adecuado y mejoraría la eficiencia diagnóstica de la evaluación. De esta manera, recomendamos evaluar prospectivamente un mayor número de estos marcadores y sus combinaciones en un mayor tamaño muestral.

Una evaluación con un método de mayor precisión cuantitativa, como lo es la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (qRT-PCR) para cuantificar mRNA de estos marcadores, también podría ser potencialmente útil. La qRT-PCR, podría complementar este estudio para analizar el detalle o cuantificar el número de transcritos de ciertos genes específicos o candidatos encontrados en nuestro estudio previamente descrito realizado en microarreglos de cDNA. También creemos que sería importante aumentar la muestra de tejidos a los cuales se les realice inmunohistoquímica, sin dejar de lado el hecho de que sólo los genes que tienen diferencias importantes en los niveles de expresión pueden ser probados, puesto que al tratarse de procesos de tinción, diferencias mínimas no pueden ser discriminadas fácilmente por el ojo humano. Este punto puede ser uno de los motivos por los cuales EGFR quien era el marcador que esperábamos nos daría un diagnóstico más categórico no fuera tan concluyente.

Finalmente, podríamos decir que nuestros resultados nos brindaron un mejor entendimiento del comportamiento molecular de estas patologías. Esperamos que los resultados mostrados en éste trabajo impulsen nuevas líneas de investigación sobre la búsqueda de marcadores que puedan diferenciar estas entidades, o sobre la firma molecular que pueda tener una aplicación clínica útil para el cirujano endocrino y mejorar la atención del paciente con HPTp.

## 12.- BIBLIOGRAFIA

1. Silverberg S, Bielezikian J. Asymptomatic primary hyperparathyroidism: a medical perspective. *Surgical Clinics of North America*. 2004; 84(3):787-801.
2. Bilezikian JP, Brandi ML, Rubin M. Primary Hyperparathyroidism: new concepts in clinical densitometric and biochemical features. *Journal of Internal Medicine*. 2005; 257: 6-17.
3. Dwight T, Twigg S, Delbridge L, et al. Loss of heterozygosity in sporadic parathyroid tumours: involvement of chromosome 1 and the MEN 1 gene locus in 11q13. *Clinical Endocrinology*. 2000; 53: 85-92.
4. Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia syndromes of the 20<sup>th</sup> century. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(3): 2617-20.
5. Lundgren E, Ljunghall S, Akerstrom G, et al. Case-control study on symptoms and signs of asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Surgery*. 1998; 124: 980-5.
6. Miedlich S, Krohn K, Pascke R. Update on Genetic and Clinical Aspects of Primary Hyperthyroidism. *Clin Endocrinol*, 2003; 59(5): 539-54.
7. Nicholson DA, Dawson P, Lavander JP et al. Imaging of the parathyroids. In: Lynn J, Bloom SR editors. *Surgical endocrinology Oxford*. 1993. 351-61.
8. Coakley AJ, Kettle AG, Wells CP et al. <sup>99m</sup>Tc sestamibi: a new agent for parathyroid imaging. *Nucl Med Commun*. 1989; 19(11): 791-4.
9. Mozes G, Curlee K, Rowland C. The predictive value of laboratory findings in patients with primary hyperparathyroidism. *Journal of the American College of Surgeons*. 2002; 194(2): 126-30.
10. Eigelberger MS, Cheah WK, Ituarte PHG, et al. The NIH Criteria for Parathyroidectomy in Asymptomatic Primary Hyperparathyroidism. Are they too limited? *Annals of Surgery*; 2004; 239(4): 528-35.
11. Silverberg S, Shane E, Jacobs T. A 10 year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. *The New England Journal of Medicine* 1999; 341 (17): 1249- 1255.
12. Sanford C, Leight G. Initial experience with intraoperative PTH determinations in the surgical management of 130 consecutive cases of primary hyperparathyroidism. *Surgery*. 1999; 126: 1132-8.
13. Chen H, Sokoll L, Udelsman R. Outpatient minimally invasive parathyroidectomy: A combination of sestamibi-SPECT localization, cervical block anesthesia, and intraoperative parathyroid hormone assay. *Surgery*. 1999; 126: 1016-22.
14. Velazquez-Fernández D, Laurell C, Saqui-Salces M. Differential RNA Expression Profile by cDNA microarray in sporadic primary hyperparathyroidism (pHPT): Primary Parathyroid Hyperplasia versus Adenoma. *World Journal of Surgery* 2006; 30: 705-713.
15. Bornstein-Quevedo L, Gamboa-Dominguez A, Angeles-Angeles A, Reyes Gutierrez E, Herrera MF. Histologic diagnosis of primary hyperparathyroidism: a concordance analysis between three pathologist. *Endocrine Pathology*. 2001; 12(1): 49-54.
16. Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, et al. Molecular Pathogenesis of Primary Hyperparathyroidism. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002; 17(2): N30-36.
17. Pasternak JJ. Chapter 4: The molecular Biology of the Gene del Libro: An introduction to human molecular genetics. Pag 85-90. 2a Edición. 2005.
18. Knudson Jr, Mutation and cancer in man. *Cancer*; 1977: 39 (suppl 4): 1882-6.
19. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Capítulo 26: Sistema Endocrino, del libro *Patología estructural y funcional*, pp 1204-10. 3ª edición. Editorial Interamericana. 1998.
20. Rodgers SE, Perrier ND. Parathyroid carcinoma. *Current Opinion in Oncology*. 2006; 18(1): 16-22.
21. Zhang P, Duchambon P, Gogusev J et al. Apoptosis in parathyroid hyperplasia of patients with primary or secondary uremic hyperparathyroidism. *Kidney International*. 2000; 57(2): 437-445.

22. Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, et al. Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107(9): 1093-1102.
23. Sepulveda T, Shen X, Falzon M. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 2002; 43(2): 596-606.
24. Chen HL, Demiralp B, Schneider A et al. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein exert both pro- and anti-apoptotic effects in mesenchymal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(2): 19374-19381.
25. Tefferi A, Bolander ME, Anseli SM et al. Primer on medical genomics: microarray experiments and data analysis. *Mayo Clinical Proceedings*. 2002; 77: 927-940.
26. King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays. *Journal of the American Medical Association* 2001; 286 (18): 2280-2288.
27. Sibilia M, Kroismayr R, Beate M et al. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 2007; 75: 770-787.
28. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 (Suppl 4):S3-S8.
29. Salomon DS, Brandt, R, Ciardello, F. et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232.
30. Ciardello F, Tortona G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine* 2008; 358 (11): 1160-1171
31. Zandi R, Larsen AB, Andersen P et al. Mechanisms for oncogenic activation of epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 2001; 19: 2012-2023.
32. Perez-Torres M, Guix M, Gonzalez A, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody down-regulates mutant receptors and inhibits tumor expressing EGFR mutations. *J Biol Chem* 2006; 281: 40183-40192.
33. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-7.
34. Packeisen J, Korsching E, Herbst H et al. Demystified...Tissue microarray technology. *J Clin Pathol: Mol Patol* 2003; 56: 198-204.
35. Parsons M, Grabsch H. How to make tissue microarrays. *Diagnostic Histopathology* 2009; 15 (3): 142-150.
36. IHC WORLD. Life Science Information Network.
37. [www.biocare.net](http://www.biocare.net)
38. [www.abcam.com](http://www.abcam.com)
39. Sadler GP, Morgan JM, JAsani B et al. Epidermal Growth Factor Receptor Status in Hyperparathyroidism Immunocytochemical and In situ hybridization study. *World J Surg* 1996; 20: 736-743.
40. Bednarz N, Blaut K, Sworzczak K et al. The profile of ErbB/Her family genes copy number assessed by real-time PCR in parathyroid adenoma and hyperplasia associated with sporadic primary hyperparathyroidism. *Acta Ciochimica Polonia* 2009; 56 (1): 83-88.
41. Mendelson j, Baselga J. Status of epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003; 21(14): 2787-2799
42. Rocha-Lima C, Soares H, Raez L et al. EGFR Targeting of Solid Tumors. 2007; 14(3): 295-304.