

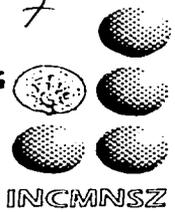
11262

7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

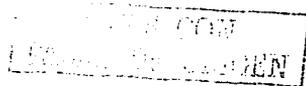
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE
TELOMERASA EN CARCINOMA PAPILAR
BIEN DIFERENCIADO DE TIROIDES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
M É D I C A S
P R E S E N T A :
LETICIA BORNSTEIN QUEVEDO

MÉXICO, D.F.



FEBRERO 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

**CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE TELOMERASA EN
CARCINOMA PAPILAR BIEN DIFERENCIADO DE TIROIDES**

Tesis que para obtener el grado de
maestro en ciencias médicas
presenta

LETICIA BORNSTEIN QUEVEDO

Tutor de maestría:
Armando Gamboa Domínguez.
Investigador Titular. Departamento de Patología, INCMNSZ.
Profesor Titular de Anatomía Patológica. Facultad de Medicina, UNAM.

Co-tutores:
Ofelia González Treviño.
Departamento de Medicina Nuclear.
Consultante Titular de la Clínica de Tiroides, INCMNSZ.

Ignacio Camacho Arroyo.
Investigador Titular. Facultad de Química, UNAM.

Miguel F. Herrera.
Investigador Titular.
Departamento de Cirugía, INCMNSZ.

Arturo Angeles Angeles.
Jefe del Departamento de Patología.
Investigador Titular. INCMNSZ

SEDES:
Departamentos de Patología, Cirugía y Clínica de Tiroides. Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

RESUMEN

La relevancia clínica y la correlación de actividad de telomerasa y estadio clínico en carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides no ha sido determinada. La actividad de la enzima informada en estudios previos puede deberse al análisis de neoplasias con infiltrado inflamatorio o al estudio de variantes agresivas de carcinoma papilar. El presente trabajo es un estudio prolectivo en el cual se analizó la actividad de telomerasa en carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides sin infiltrado inflamatorio.

Se analizó la actividad de telomerasa mediante el protocolo de amplificación de repetidos teloméricos (TRAP- *telomeric repeat amplification protocol*). Los resultados fueron correlacionados con estadio clínico y otras variables clinicopatológicas.

En 21 (42%) pacientes con carcinoma papilar bien diferenciado se identificó actividad de telomerasa. La actividad de la enzima fue detectada con mayor frecuencia en estadio III ($p = 0.01$) y en tumores con extensión extratiroidea ($p = 0.04$). Se observó mayor riesgo de presentar enfermedad avanzada (estadio III) y crecimiento extratiroideo en tumores telomerasa positivos ($p = 0.01$; OR 4.7 (IC95% 1.4-16.0)), y ($p = 0.04$; OR 3.6 (IC95% 1.1-11.7)), respectivamente. No se estableció correlación entre actividad de telomerasa y género, metástasis ganglionares, tamaño del tumor (≥ 4 cm) y variante histológica.

La actividad de telomerasa se identificó en 42% de carcinomas papilares bien diferenciados de tiroides y fue más frecuente en pacientes en estadio III. Este hallazgo sugiere que las alteraciones de telomerasa no están involucradas en la carcinogénesis de células foliculares, sino, en la progresión tumoral.

RECIBIDO
1980 JUN 10

SUMMARY

Clinical relevance and stage correlation of telomerase activity in well-differentiated papillary thyroid carcinoma (WD PTC) has not been well determined, since its reported activity could be due to the analysis of tumors with lymphocytic infiltrates or aggressive variants of papillary carcinomas. We conducted a prospective study of telomerase activity in WD PTC without inflammatory infiltrates and correlated it with clinical stage.

Fifty WD PTCs were analyzed for telomerase activity by PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-based TRAP assay. Results were correlated with stage and other clinicopathologic variables.

Twenty-one (42%) WD PTCs demonstrated telomerase activity. The enzyme was detected more frequently in stage III WD PTCs ($p = 0.01$) and in tumors with extrathyroidal extension ($p = 0.04$). The risk of presenting advanced disease (stage III) and extrathyroidal growth was significantly increased in telomerase-positive tumors ($p = 0.01$; OR 4.7 (IC95% 1.4-16.0), and ($p = 0.04$; OR 3.6 (IC95% 1.1-11.7)), respectively. There was no correlation of telomerase activity with gender, histologic variant, tumor size or cervical lymph node metastasis.

Telomerase activity was observed in 42% of WD PTC and was detected more frequently in AJCC/UICC TNM stage III cases. This finding suggests that telomerase dysregulation is not involved in follicular cell carcinogenesis but in tumor progression.



INTRODUCCIÓN

La frecuencia de neoplasias tiroideas es variable y los tipos histológicos de carcinomas que se diagnostican dependen de las concentraciones de yodo del agua y alimentos y de antecedentes de radiación en cuello.¹ La incidencia anual de cáncer de tiroides en el mundo es de 0.5 a 10 por 100,000 personas.² La neoplasia maligna más frecuente del tiroides es el carcinoma papilar (CP). La mortalidad anual atribuida al CP en mujeres y hombres norteamericanos es de 0.3 y 0.2 por 100,000 afectados respectivamente.²

En México las neoplasias malignas de la glándula tiroides ocupan el duodécimo lugar entre las enfermedades malignas de la población general, afectando con mayor frecuencia a mujeres.³ En centros de referencia de patología endocrina, la neoplasia maligna diagnosticada con mayor frecuencia en glándula tiroides es el carcinoma papilar.^{4, 5} Este tumor tiene una expresión fenotípica diversa que ha permitido identificar carcinomas papilares con muy bajo potencial de agresividad.⁶⁻⁹ En su forma clásica está constituido por papilas revestidas por células epiteliales con diferenciación folicular que citológicamente muestran núcleos de aspecto vacío, hendidas y pseudoinclusiones. Las células neoplásicas alternan con coloide denso, células gigantes y cuerpos de psamoma (Figura 1).¹⁰ La presencia de cambios estromales como abundante fibrosis, infiltrado inflamatorio linfocitario y células de Langerhans son comunes. El CP se clasifica en dos grupos: CP bien diferenciado y poco diferenciado. Las variedades morfológicas reconocidas de carcinoma papilar bien diferenciado son: a) clásico,

b) macrofolicular,¹¹ c) microcarcinoma,¹² d) encapsulado¹³ y, e) folicular.¹⁴ Todas ellas tienen como datos unificadores del diagnóstico morfológico la presencia de núcleos claros, hendiduras y pseudoinclusiones.¹⁰

Figura 1. Carcinoma papilar de tiroides. Papilas revestidas por células foliculares neoplásicas que alternan con cuerpos de psamoma.



Con frecuencia no es posible predecir la agresividad de los carcinomas papilares de tiroides atendiendo exclusivamente al patrón morfológico de la neoplasia.¹⁵ La etapificación clínica, sistema de estadificación TNM/AJCC¹⁶ (cuadro 1) y el tipo de cirugía inicial han mostrado buena correlación con la evolución de los pacientes. En algunos estudios el tipo histológico *per se* ha sido de gran valor para predecir el comportamiento junto con edad mayor de 45 años, tumor mayor de 4cm e invasión a tejidos peritiroideos.¹⁷ También, se han utilizado

PROG. GEN.
FALLA DE ORIGEN

diversos sistemas de gradificación pronóstica para tratar de predecir el comportamiento clínico¹⁸⁻²¹. Estos sistemas analizan características específicas del paciente y la neoplasia para identificar grupos de alto y bajo riesgo. Los que han mostrado una mejor correlación con el pronóstico de pacientes con cáncer de tiroides son: AMES²¹ (age, metastasis, extent, and size); AGES¹⁹ (age, grade, extent, and size); MACIS²⁰ (metastasis, age, completeness of resection, invasión, and size); EORTC²¹ (European Thyroid Cancer Cooperative Group) y TNM/AJCC^{16, 22}.

Cuadro 1. Sistema de estadificación TNM/AJCC para carcinoma papilar de tiroides.

T—Tumor primario				
T0 – sin evidencia de tumor primario; T1 – Tumor intratiroideo < 1 cm; T2 – Tumor intratiroideo > 1 cm y < 4 cm; T3 – Tumor intratiroideo > 4 cm; T4 – Tumor con extensión extratiroidea. T _N - cualquier tamaño.				
N – Ganglios linfáticos regionales.				
N0 – Sin metástasis a ganglios regionales; N1 – Metástasis a ganglios linfáticos regionales. N _N – metástasis regionales presentes/ausentes.				
M – Metástasis a distancia.				
M0 – Sin evidencia de metástasis a distancia; M1 – Metástasis a distancia.				
	< 45 años	> 45 años		
Estadio I	T _N , N _N , M0	T1	N0	M0
Estadio II	T _N , N _N , M1	T2 ó T3	N0	M0
Estadio III		T4 ó T _N	N0 ó N1	M0
Estadio IV		T _N	N0/N1	M1



En general, el riesgo de recidiva y muerte se asocia a invasión extratiroidea y metástasis a distancia, y las metástasis ganglionares aumentan el riesgo de recidiva pero no la mortalidad¹⁸⁻²¹. A pesar de que se apliquen estos parámetros, en ocasiones no es posible predecir el comportamiento biológico de la neoplasia en el momento del diagnóstico²².

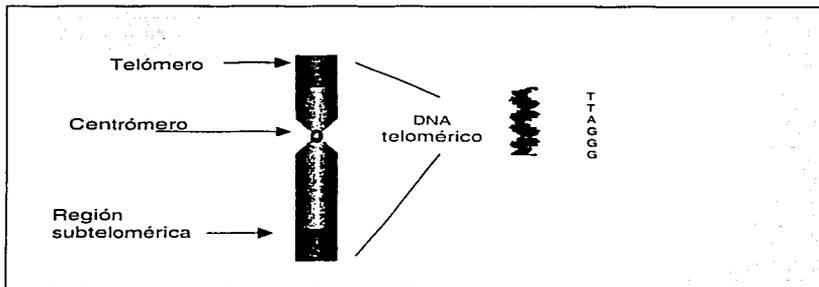
Con el objetivo de conocer la biología de neoplasias tiroideas e identificar grupos de alto riesgo, se han estudiado numerosos marcadores potenciales de progresión tumoral. El proceso de carcinogénesis tiroidea se ha correlacionado a mutaciones de RET, TRK²³, RAS y al receptor de TSH²⁴. Los CP en estadios avanzados muestran pobre respuesta de adenilato ciclasa a TSH, así como, expresión de RAS, p21 y p53²⁵. Estos marcadores han proporcionado información valiosa con respecto a la biología del tumor, sin embargo, hasta la fecha, no se les ha identificado una clara utilidad para predecir estadios avanzados de la enfermedad o progresión tumoral.

La integridad y estabilidad de los cromosomas son esenciales para asegurar la viabilidad de las células y el control del ciclo celular. Numerosos eventos genéticos, incluyendo la activación de proto-oncogenes y la pérdida de genes supresores de tumores, pueden llevar a la estimulación del ciclo celular, desencadenando la división anormal de la célula. Sin embargo, éstas poseen una serie de mecanismos para controlar y balancear dicho ciclo evitando el desarrollo de neoplasias. Uno de los mecanismos más conocidos es la apoptosis o muerte celular programada. Otro mecanismo importante lo constituye el acortamiento

progresivo de los extremos de los cromosomas (telómeros), que ocurre en cada división celular y contribuye al envejecimiento celular.

Los telómeros son estructuras especializadas en las porciones terminales de los cromosomas de las células eucariotes cuyas funciones son proteger el material genético y prevenir errores durante la recombinación del ácido desoxiribonucleico (ADN) cromosómico. En vertebrados los telómeros consisten en cientos o miles de repeticiones en tandem de la secuencia TTAGGG y proteínas asociadas (Figura 2).^{26,27}

Figura 2. Esquema de la localización de los telómeros en los extremos de los cromosomas.



Los análisis de los fragmentos terminales de restricción (FTR) de los cromosomas proporcionan la longitud compuesta de todos los telómeros en una

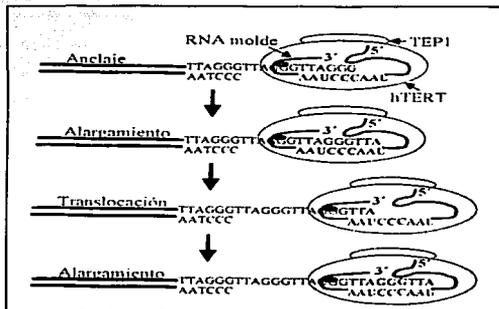
población celular.^{27, 28} En las células somáticas normales, el análisis de los FTR ha mostrado que los cromosomas pierden entre 50 a 200 nucleótidos de las secuencias teloméricas en cada división celular. Este fenómeno se conoce como problema de replicación terminal y está asociado a la incapacidad del ADN polimerasa de replicar los extremos del ADN lineal. El acortamiento progresivo de los telómeros se ha propuesto como un reloj mitótico que limita el potencial proliferativo de las células desencadenando una cascada de señalización que induce envejecimiento celular y coopera para la apoptosis.²⁹⁻³⁰ Un telómero corto puede ser la señal inhibitoria del ciclo celular normal.^{26, 29}

Existen dos teorías que se complementan para explicar la inhibición de la proliferación celular ocasionada por el acortamiento gradual de los telómeros. La primera propone que el acortamiento extremo de los telómeros es interpretado por la célula como un daño grave al ADN, señal que induce la expresión de p53 y la detención del ciclo celular. La segunda postula cambios en la expresión de genes reguladores localizados en áreas subtelo­méricas que participan en cascadas de señalización involucradas en el control del ciclo celular³¹. Estos procesos no son excluyentes, más bien, ambos pueden contribuir a la iniciación del proceso de envejecimiento. Este proceso se lleva a cabo en células somáticas normales; sin embargo, las células inmortales no muestran disminución neta de la longitud telomérica después de múltiples divisiones, sugiriendo que el mantenimiento de los telómeros se requiere para que la célula escape del envejecimiento replicativo y prolifere indefinidamente.^{27, 28}



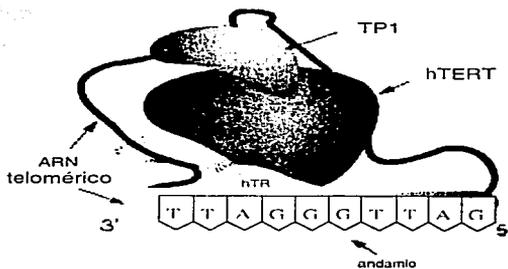
La telomerasa es una ribonucleoproteína que sintetiza ADN telomérico en las porciones terminales de los cromosomas usando un segmento de ácido ribonucleico (ARN) como andamio (Figura 3).^{32, 34} En células de humanos se ha identificado actividad de telomerasa en células germinales y en una gran variedad de neoplasias. En contraste, su actividad esta normalmente reprimida en células somáticas o en tejidos normales, excepto en algunos tejidos con alto potencial regenerativo como células precursoras en médula ósea, tejido linfoide, criptas colónicas y epidermis³⁴.

Figura 3. Representación esquemática de alargamiento de los telómeros por la telomerasa. Durante el alargamiento una molécula de ARN molde que forma parte del complejo ribonucleoprotéico es requerida para la adición de las secuencias repetidas al extremo del telómero.



Las tres subunidades principales que componen al complejo de la telomerasa en humanos son: el componente ARN, llamado hTR (ARN de la telomerasa humana), una proteína asociada llamada TEP1 (proteína asociada a la telomerasa) y la subunidad catalítica, denominada hTERT (transcriptasa reversa de la telomerasa humana) (Figura 4). Estudios de expresión en tejido normal y tumoral han mostrado que hTR y TEP1 se expresan de manera constitutiva indistintamente del tejido, a diferencia de hTERT que se identifica predominantemente en células neoplásicas y por lo tanto, esta involucrada en la activación de la enzima.³⁵

Figura 4. Estructura de la telomerasa humana.



En un gran número de estudios se ha establecido que la actividad de telomerasa esta presente en diversas neoplasias. Se ha propuesto que la actividad de la enzima puede ser de utilidad como marcador diagnóstico y/o pronóstico de cáncer³⁶.

En la glándula tiroides, la expresión de telomerasa se ha identificado en lesiones benignas y malignas.³⁷⁻⁴⁷ Se ha observado con mayor frecuencia en lesiones malignas y rara vez en adenomas.³⁹ La expresión de telomerasa en lesiones benignas es poco frecuente y generalmente se asocia a inflamación crónica del tejido tiroideo como en tiroiditis de Hashimoto o tiroiditis linfocítica⁴¹. Estudios previos han informado intervalos muy amplios de detección de actividad de telomerasa en CP, los cuales van desde 20 hasta 100%. (Cuadro 2).

Esta variabilidad puede deberse a que se han analizado series pequeñas, o bien a la inclusión de carcinomas papilares ricos en estroma linfoide o de variantes agresivas. En pocos estudios se ha correlacionado la actividad de telomerasa con variables clínicas^{37, 38, 39}. Aunque algunos autores han mostrado alta prevalencia de actividad de telomerasa en estadios avanzados³⁹ o con invasión extratiroidea³⁷, no se cuenta con información suficiente para considerar a la telomerasa como marcador de mayor estadio clínico o agresividad morfológica.



Cuadro 2. Resumen de series publicadas de actividad de telomerasa en carcinoma papilar de tiroides.

Autor	No. de casos	%
Haugen et al ³⁷	10/14	71
Yashima et al ³⁸	4/11	36
Cheng et al ³⁹	12/23	52
Saji et al ⁴⁰	20/30	66
Brousset et al ⁴¹	3/15	20
Ahn et al ⁴²	7/7	100
Aogi et al ⁴³	5/5	100
Okayasu et al ⁴⁴	16/26	61
Onoda et al ⁴⁵	9/16	56
Lo et al ⁴⁶	15/52	29
Matthews et al ⁴⁷	8/37	22
Total	109/236	46



JUSTIFICACIÓN

El carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado es una neoplasia que en general, muestra bajo potencial de agresividad. Sin embargo, existe un grupo de pacientes con cursos clínicos desfavorables en los que los factores pronósticos utilizados en la actualidad (tamaño, extensión extratiroidea y subtipo histológico), no son suficientes para predecir su comportamiento biológico. Por lo tanto, es indispensable identificar características de expresión génica que permitan clasificar mejor a la neoplasia maligna más frecuente de la glándula tiroides.

OBJETIVO GENERAL

1. Analizar la expresión de la actividad de telomerasa en tejido fresco congelado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-*Polimerase Chain Reaction*) -TRAP en carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Identificar la expresión diferencial de telomerasa en carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides en estadios I, II, III y IV mediante PCR (TRAP).
2. Comparar la expresión de telomerasa con el tamaño del tumor, invasión extratiroidea y metástasis a ganglios linfáticos regionales.



HIPOTESIS NULA

1. La expresión de telomerasa será igual en los estadios clínicos I, II, III y IV del carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides.

HIPOTESIS ALTERNATIVA

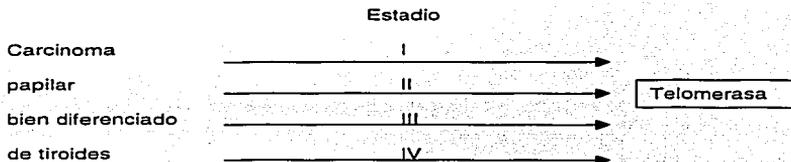
1. La expresión de telomerasa será diferente en los estadios clínicos I, II, III y IV del carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides.



MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Retrolectivo, prolectivo, transversal y comparativo.



DEFINICIONES OPERACIONALES

Carcinoma papilar bien diferenciado: Neoplasia tiroidea con diferenciación folicular y con núcleos claros, hendiduras y pseudoinclusiones.

PCR (Polimerase Chain Reaction): La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación directa de segmentos cortos de material genético.

TRAP (Telomeric repeat amplification protocol): Ensayo basado en PCR que incrementa la sensibilidad, velocidad y eficacia en la detección de la actividad de



telomerasa. En este ensayo los productos de extensión sintetizados por la telomerasa sirven como andamios para la amplificación por PCR.

SEDES

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán es un hospital de tercer nivel de atención médica, cuenta con 159 camas y consulta externa de especialidades y subespecialidades de medicina interna y cirugía.

La clínica de tiroides ha funcionado desde 1953. Es un centro de referencia de enfermedades tiroideas que brinda métodos de detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento de pacientes. Al mes en promedio atiende a 800 pacientes. El 90% con hipo o hiperfunción tiroidea, tiroiditis o hiperplasia (bocio). El restante 10% por neoplasias benignas y malignas de la glándula tiroides.

El Departamento de Patología cuenta con la infraestructura suficiente para realizar métodos de detección molecular de material genético mediante PCR.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes sometidos a primera resección de tejido tiroideo con diagnóstico morfológico de carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides.
2. Pacientes con carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides clasificables en estadios clínicos I, II, III y IV.



3. Pacientes con carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides que cuenten con tejido fresco congelado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Pacientes sometidos a resección quirúrgica de tiroides con diagnóstico de carcinoma papilar bien diferenciado que muestren infiltrado linfoplasmocitario en el estroma neoplásico.
2. Casos de carcinoma papilar bien diferenciado de tiroides en los que no se cuente con laminillas o bloques de parafina.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se utilizará la fórmula de comparación de proporciones

$$n = \frac{2 PQ (Z\alpha + Z\beta)^2}{\Delta^2}$$

$$\text{donde } P = \frac{P_1 + P_2}{2}$$

Se calculará con base en las prevalencias esperadas en estadios I y II (expresión de telomerasa 20%⁴¹) y en estadios III y IV (expresión de telomerasa



65%⁴⁰) de carcinoma papilar diferenciado de tiroides, tomando en cuenta α .05 y β .20 ($Z\alpha$ 1.96, $Z\beta$.84).

Al realizar la operación se obtiene una n por estadio de 10 pacientes y una n total de **40 pacientes**. Este valor será suficiente para identificar diferencias entre los grupos.

HOJA DE CAPTURA

En todos los casos se revisaron los expedientes clínicos y se obtuvo información con respecto a antecedentes a favor del desarrollo de neoplasias tiroideas, sintomatología general y regional del cuello, así como el tiempo de evolución de los síntomas (anexo I).

ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Inmediatamente después de la resección del tejido tiroideo neoplásico se obtuvo 1cm³ de tejido neoplásico que se congeló a -70°C. La pieza quirúrgica se utilizó para los cortes por congelación e improntas convencionales y se estableció el diagnóstico transoperatorio. La descripción macroscópica de la pieza incluyó tamaño y localización del tumor, afección capsular, extratiroidea o a ganglios linfáticos regionales. En los cortes definitivos se corroboró la apreciación



macroscópica y se clasificó el tumor de acuerdo a los subtipos de carcinoma papilar bien diferenciado descritos por la OMS/UICC.

Se realizaron cortes por congelación utilizando un criostato (Microm HM505N) a -31°C . El tejido obtenido se fijó en alcohol 96° y fue teñido mediante hematoxilina y eosina. La laminilla fue evaluada por dos observadores en un microscopio Olympus CH-2 con dos cabezales. Se identificó la presencia de las células neoplásicas y la ausencia de infiltrado linfoplasmocitario en el estroma neoplásico.

ANÁLISIS MOLECULAR

Para el análisis molecular se determinó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford⁴⁸. Los productos protéicos se sometieron a amplificación por PCR utilizando el método *telomeric repeat amplification protocol* (TRAP) con el iniciador TS marcado con $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$. Con el amplificado se realizó la evaluación de actividad de telomerasa mediante autoradiografía del patrón electroforético en geles de poliacrilamida al 12.5%.

Extracción de proteínas

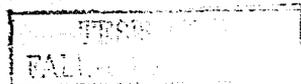
Se colocaron 100 mg de tejido en un mortero estéril y se añadió nitrógeno líquido para congelarla. Se pulverizó y se transfirió a un tubo estéril de 1.5 ml para



microcentrífuga y se resuspendió en 200 μ l de buffer de lisis 1X CHAPS. Posteriormente, se incubó la suspensión en hielo durante 30 minutos y se centrifugó a 12000 X g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril. La concentración de proteínas se calculó utilizando el ensayo de Bradford⁴⁸.

Ensayo de Telomerasa

La actividad de telomerasa fue determinada utilizando el kit de detección TRAPEze (Oncor Inc, Gaithersburg, MD). El iniciador TS fue marcado utilizando polinucleotido cinasa T4 (New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass) con [γ ³²P]-ATP (NEN Life Science Products, Boston, Mass). Posteriormente, se realizó la extensión durante 20 min a 37 °C utilizando 0.5 μ g de extracto de proteínas. El ensayo se realizó en una mezcla de reacción de 25 μ l que contenía 2.5 μ l de amortiguador 10X TRAP, 0.5 μ l de dNTPs, 1.0 μ l de iniciador ³²P-TS, 0.5 μ l de mezcla de iniciador y 2 U (0.2 μ l) de Taq polimerasa. Después la mezcla se incubó 30 minutos a 30°C y fue sometida a una fase de desnaturalización inicial a 94 °C por 30 segundos, una fase de alineación a 54 °C por 30 segundos y una fase de extensión a 72 °C por 5 minutos, por 30 ciclos. Los productos de PCR fueron separados en geles de poli(acrilamida) al 12.5% a 400v durante 6 horas. Se secaron los geles y se sometieron a autoradiografía a 80 °C por 3 horas. Las placas de autoradiografía se colocaron en un analizador de imágenes (Leica Q 532) y se determinó el área bajo la curva producido por la intensidad de la señal



de las bandas consecutivas de 6 pares de bases del control positivo y de los casos.

En todos los casos el ensayo de telomerasa fue realizado utilizando 0.5 µg de proteínas. En los casos que resultaron negativos se volvió a realizar el ensayo utilizando 0.35 µg de proteínas para descartar resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores de telomerasa en las muestras.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó prueba exacta de Fisher (SPSS 10.0 for Windows, SPSS, Chicago, Illinois, USA) para realizar el análisis comparativo bivariado de estadio clínico y variables clinicopatológicas independientes (edad >45 años, género, tamaño del tumor > 4 cm, metástasis ganglionares e invasión extratiroidea) con actividad de telomerasa. Para determinar el riesgo de presentar actividad de telomerasa con respecto a invasión extratiroidea o determinado estadio clínico se calculó razón de momios (IC 95%). El análisis multivariado se realizó con regresión logística en modo Enter y Forward Wald, utilizando como variable blanco la presencia o no de actividad de telomerasa en CP bien diferenciado de tiroides. Se consideró estadísticamente significativo a valores de $p < 0.05$ a dos vías.

EVALUACIÓN

Las muestras sometidas al análisis de actividad de telomerasa fueron evaluadas por dos observadores cegados. Se determinó la presencia de las células foliculares neoplásicas y la ausencia de inflamación en el estroma de la neoplasia.

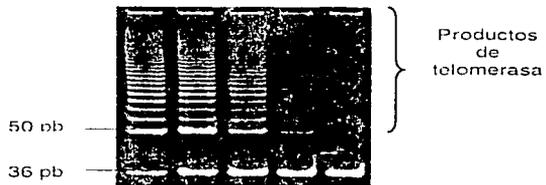
En los cortes definitivos ambos evaluadores establecieron el tipo de carcinoma papilar, invasión a la cápsula, invasión a tejidos blandos peritiroideos y metástasis a ganglios regionales. Con los datos anteriores se estableció el estadio clinicopatológico de cada paciente.

Los productos protéicos y la amplificación de telomerasa fueron evaluados y gradificados por un observador cegado a la información morfológica y al estadio clinicopatológico de cada una de las muestras. Se consideró positivo cuando se identificaron tres o más bandas consecutivas de 6 pares de bases (Figura 5).

El análisis cuantitativo de la actividad de telomerasa se realizó mediante la medición del área bajo la curva producido por la intensidad de la señal de las bandas consecutivas de 6 pares de bases. Este valor fue estandarizado con respecto al control positivo y los valores se expresaron en unidades arbitrarias.



Figura 5. Actividad de telomerasa en líneas celulares con diferentes diluciones (carriles 1-4). Se considera positivo cuando se identifica el control de PCR (banda de 36 pb) y 3 o más bandas consecutivas que inician en 50 pb.

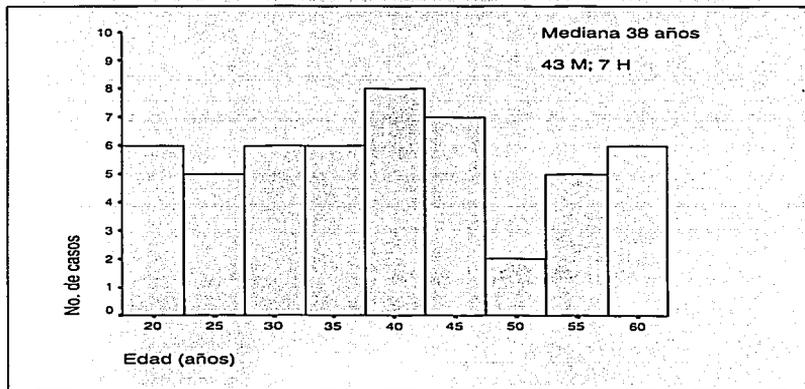


RESULTADOS

Características clinicopatológicas

Se identificaron 67 pacientes con diagnóstico de CP y tejido fresco congelado, tres casos mostraron células altas (>30%) y 14 casos presentaron estroma linfoide intratumoral, los cuales fueron excluidos. En el estudio se incluyeron 50 pacientes con CP bien diferenciado en 43 mujeres y 7 hombres con una mediana de edad de 38 años (Figura 6).

Figura 6. Distribución por edad de 50 pacientes con CP bien diferenciados.

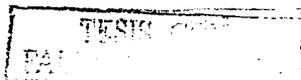
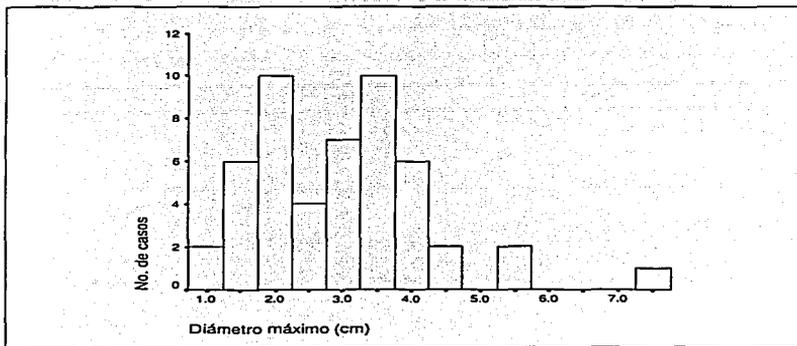


Se registraron 25 pacientes en estadio I/II y 25 en estadio III, no se identificó ningún caso en estadio IV. En 43 pacientes se identificaron uno o más

síntomas relacionados al cuello. Los síntomas más frecuentes fueron: presencia de tumor en cuello, dolor y disfagia. Además 12% de los casos presentaron adenomegalias cervicales palpables.

El tamaño promedio del tumor fue de 3.0 cm (DE 1.24 cm). La distribución del diámetro mayor del tumor primario se muestra en la Figura 7. En 40 pacientes el tumor era único y en 10 (20%) pacientes se identificaron dos o más focos de tumor. Se identificó invasión extratiroidea en 24 casos. Las estructuras involucradas con mayor frecuencia fueron los tejidos blandos y músculos peritiroideos. Se identificaron metástasis ganglionares en 10/24 (40%) de pacientes a los cuales se les realizó disección radical de cuello.

Figura 7. Distribución del tamaño del tumor en 50 pacientes con CP bien diferenciado de tiroides.



Morfológicamente se observaron 41 pacientes con patrón papilar, 8 con patrón folicular y un microcarcinoma papilar. En 41 (83%) pacientes se identificó una o más enfermedades tiroideas asociadas. La más frecuente fue bocio (50%) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Enfermedades asociadas con CP bien diferenciado.

Enfermedades asociadas	Frecuencia	%
Bocio	25	50
Tiroiditis linfocítica	4	8
Tiroiditis de Hashimoto	9	18
Varias	3	6
Ninguna	9	18
Total	50	100

Actividad de Telomerasa

Se identificó actividad de telomerasa en 21/50 pacientes (Figura 8). Seis casos en estadio I/II y 15 en estadio III ($p = 0.02$) (Cuadro 4).

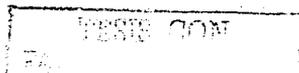
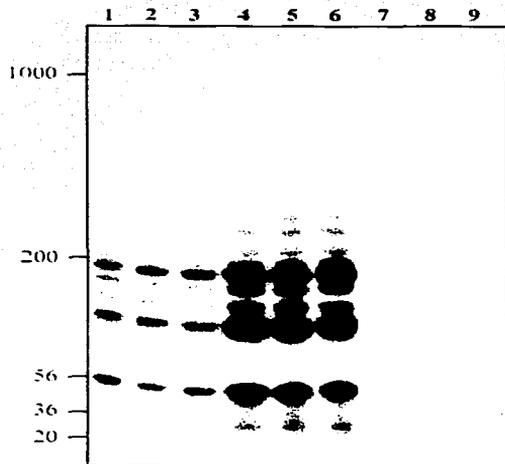


Figura 8. Actividad de telomerasa en CP bien diferenciado. Detección de actividad de telomerasa en CP en estadio I/II (1,2) y estadio III (carriles 3,4,5), carril 6, control positivo, carril 7 CP tratado con calor (control negativo), CP en estadio I/II sin actividad de telomerasa (carril 8), CP sin actividad de telomerasa en estadio III (carril 9).



Cuadro 4. Resultados del análisis de actividad de telomerasa en 50 pacientes con CP bien diferenciado (TNM/AJCC).

	Estadio I/II	Estadio III	Total
Actividad de telomerasa	6	15	21
Sin actividad de telomerasa	19	10	29
Total	25	25	50

$p = 0.02$ (Prueba exacta de Fisher)

Al calcular el riesgo se observó que la actividad de telomerasa es un factor significativo de enfermedad en estadio III ($p = 0.01$; OR 4.7 (IC95% 1.4-16.0). El valor cuantitativo de actividad de telomerasa fue 0.772 ± 0.135 unidades arbitrarias (rango 0.656 - 0.986). Aunque se identificaron mas pacientes con niveles elevados de telomerasa en estadio III (4/15 vs 2/6), esta diferencia no fue significativa.

Se observó actividad de telomerasa en 15 de 21 neoplasias con extensión extratiroidea ($p = 0.04$). Al calcular el riesgo, se observó que la actividad de telomerasa aumenta el riesgo de extensión extratiroidea en pacientes con CP bien diferenciado ($p = 0.04$; OR 3.6 (IC95% 1.1-11.7). En seis de 10 pacientes con metástasis a ganglios linfáticos regionales se identificó actividad de telomerasa ($p = NS$). Los pacientes ≥ 45 años mostraron mayor frecuencia de actividad de

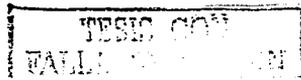
telomerasa que pacientes jóvenes ($p = 0.02$). No fue posible establecer correlación entre actividad de telomerasa y género, tamaño del tumor (≥ 4 cm) y variante de CP bien diferenciado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Correlación entre actividad de telomerasa y variantes clinicopatológicas en CP bien diferenciado.

Variable n	Telomerasa Positivo 21	Telomerasa Negativo 29	Valor p
Edad			0.02
< 45 años	9	22	
≥ 45 años	12	7	
Género			0.46*
Hombres	2	5	
Mujeres	18	25	
Subtipo Histológico			0.65*
Papilar	18	23	
Folicular	3	5	
Microcarcinoma	0	1	
Tamaño (x)			0.28*
< 4 cm	15	25	
≥ 4 cm	6	4	
Invasión extratiroidea	13	9	0.04*
Metástasis ganglionares	6	4	0.22*

*Prueba exacta de Fisher

En el análisis multivariado utilizando regresión logística con el método Enter y Forward Wald, se corroboró que la actividad de telomerasa es un factor significativo de enfermedad en estadio III ($p = 0.004$) y de invasión extratiroidea ($p = 0.01$). La edad (≥ 45 años) y el resto de las variables exploradas fueron excluidas del modelo y no mostraron significancia estadística.

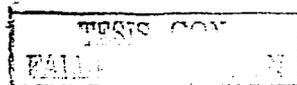


DISCUSIÓN

En esta serie se identificó actividad de telomerasa en 42% de CP bien diferenciados. Aunque 6/25 (24%) neoplasias en estadio I/II presentaron actividad de la enzima, la frecuencia fue notablemente mayor en estadios avanzados ($p=0.02$). Estos resultados pueden reflejar dos hechos: primero, como se ha informado previamente⁴³, la telomerasa no se reactiva en todos los CP y segundo, es probable que la actividad de la enzima sea un evento tardío en el desarrollo del tumor.

Varias características clinicopatológicas han mostrado tener importancia pronóstica. En general se considera que la edad (≥ 45 años), estadios clínicos avanzados, invasión extratiroidea y metástasis a distancia son factores pronósticos importantes para la supervivencia a largo plazo¹⁸⁻²¹. En el presente estudio se ha demostrado que las neoplasias incluidas en estadio III, o sea, tumores de cualquier tamaño con invasión extratiroidea, tienen incremento de la actividad de telomerasa y que en estos pacientes el riesgo de presentar enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico es 4.7 veces mayor.

Al analizar la correlación entre la actividad de telomerasa y la invasión extratiroidea, se encontró que los tumores con invasión extratiroidea presentaron un incremento significativo de actividad de telomerasa. Además, los pacientes con



tumores telomerasa positivos presentaron riesgo 3.6-veces mayor de presentar invasión extratiroidea.

De acuerdo al sistema de estratificación TNM/AJCC, los pacientes con carcinoma papilar mayores de 45 años tienen peor pronóstico que pacientes jóvenes; en este estudio, con análisis bivariado, se identificó una correlación significativa entre la edad mayor de 45 años y la actividad de telomerasa. Por lo tanto, la actividad de telomerasa puede ser un marcador importante de agresividad y mal pronóstico en CP bien diferenciado y puede ser de utilidad para identificar pacientes de alto riesgo que puedan beneficiarse con terapia adyuvante.

No fue posible establecer una correlación significativa entre metástasis ganglionares y actividad de telomerasa ya que solo 6 de 10 casos con metástasis ganglionares mostraron actividad de la enzima ($p=NS$). Onada et al.,⁴⁵ informaron que 4 de 5 casos con metástasis ganglionares fueron telomerasa positivos. Aunque existe una clara tendencia hacia la positividad para telomerasa, el número de casos con metástasis ganglionares en ambos estudios es muy pequeño para determinar inferencias definitivas. Asimismo, en CP las metástasis a ganglios linfáticos no necesariamente reflejan agresividad de la neoplasia, ya que se han asociado a mayor riesgo de recurrencia local pero no con supervivencia a largo plazo²².

Los CP telomerasa positivos se ajustan al modelo clásico en el cual después de un período inicial de erosión telomérica, se adquiere actividad de

TESIS CON
FALLA DE CENSUR

telomerasa con suficiente tiempo para estabilizar los telómeros y evitar la crisis de muerte celular. Estas células se consideran inmortales e involucradas en la progresión tumoral. Estudios previos han informado intervalos muy amplios de detección de actividad de telomerasa en CP; los cuales van desde 20 hasta 100% de expresión^{42, 43}. Esta variación puede tener por lo menos dos explicaciones posibles: resultados falsos positivos debido a la presencia de infiltrado inflamatorio en el estroma neoplásico, en series que reportan alta prevalencia de actividad de telomerasa^{38, 43}, como en el estudio de Yashima³⁹, que muestra una asociación directa entre la actividad de telomerasa y el grado de inflamación. También la inclusión de neoplasias poco diferenciadas puede contribuir a identificar falsos positivos.

Posiblemente sean más interesantes los CP telomerasa-negativos (58% de los tumores en este estudio), los cuales en muchos casos, se encontraban en el mismo estadio clínico que los casos positivos. Una posible explicación para las neoplasias que no muestran actividad de telomerasa es que estas células desarrollan vías alternativas (telomerasa-independientes) de elongación y mantenimiento de los telómeros⁴⁷. Se han identificado en líneas celulares y algunas muestras de tejidos⁴⁷. Este fenómeno se basa en la identificación de telómeros extremadamente largos en células telomerasa-negativas⁴⁹. Otra teoría para explicar la falta de actividad de telomerasa es la regulación postranscripcional de la enzima por proteínas de unión a telomerasa, como TP1/TPL1 y TRF1⁵⁰. Estas proteínas y el componente de ARNm de la telomerasa interactúan para coordinar la activación de la enzima. También, es posible que estas neoplasias

aún se encuentren en fase de erosión telomérica y por lo tanto no sean inmortales, pero que hayan adquirido anomalías asociadas a genes supresores, lo que permite su proliferación anormal. Por lo tanto, es posible que un CP pueda ser clínicamente evidente sin un mecanismo de estabilización telomérica⁴⁷.

Los hallazgos en esta serie muestran que los CP bien diferenciados presentan mayor actividad de telomerasa cuando invaden la cápsula o tejidos peritiroideos. Debido a los requerimientos técnicos del ensayo de telomerasa, este abordaje no es adecuado para estudios retrospectivos. Se necesitan estudios prospectivos, con seguimiento a largo plazo, para determinar el impacto pronóstico de la actividad de telomerasa en CP.

ESTA TESIS NO SE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE CARGEN

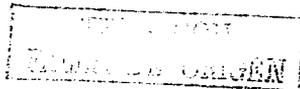
CONCLUSIONES

La actividad de telomerasa se detectó en 42% de carcinomas papilares bien diferenciados y fue mas frecuente en neoplasias en estadios avanzados (estadio III) y en CP con invasión extratiroidea. Por lo tanto, la actividad de la enzima puede ser de utilidad en la selección de pacientes con cursos clínicos desfavorables que puedan beneficiarse con tratamiento adyuvante. Además, recientemente se ha propuesto el uso de inhibidores de telomerasa como tratamiento antineoplásico. Es posible que esta modalidad de tratamiento se pueda aplicar a un subgrupo de CP bien diferenciados.

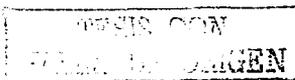
BIBLIOGRAFIA

1. Wang C, Grapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinol Clin North Am* 1997; 26:189-218.
2. Franceschi S, La Vecchia C: Thyroid cancer: Trends in cancer incidence and mortality. *Cancer Surv* 1994; 19:393-400.
3. Registro histopatológico de neoplasias malignas. Compendio/ Mortalidad/ Morbilidad/ 1999. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud.
4. Herrera MF, López-Graniel CM, Gamboa-Domínguez A, et al. Papillary thyroid carcinoma in Mexican patients: Clinical aspects and prognostic factors. *World J Surg* 1996; 20:94-100.
5. Rodríguez-Cuevas S, Labastida S, Reyes JM, Rodríguez E. Papillary thyroid cancer in Mexico: Review of 409 cases. *Head Neck* 1993; 5:537-42.
6. Gamboa-Domínguez A, Vieitez-Martínez I, Barredo-Prieto BA, Richaud-Patin Y, Herrera MF, Angeles-Angeles A. Macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocrine Pathology* 1996; 7:303-308.
7. Gamboa-Domínguez A, Candanedo-González F, Uribe-Urbe NO, Angeles-Angeles A. Tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. A cytohistologic correlation. *Acta Cytol* 1997; 41:672-676.
8. Evans HL. Columnar cell carcinoma of the thyroid. A report of two cases of an aggressive variant thyroid carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1986; 85:77-80.
9. Carcangiu ML, Bianchi S. Diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. Clinicopathologic study of 15 cases. *Am J Surg Pathol* 1989; 13:1041-1049.

10. Rosal J, Carcangiu ML, DeLellis RA. Tumors of the thyroid gland. Armed Forces Institute of Pathology. Bethesda, Maryland 1992.
11. Albores-Saavedra J, Gould E, Vardaman C, Vuitch F. The macrofollicular variant of papillary thyroid carcinoma. A study of 17 cases. Hum Pathol 1991; 22:1195-1205.
12. Bondeson L, Ljungberg O. Occult papillary thyroid carcinoma in the young and the aged. Cancer 1984; 53:1790-1792.
13. Evans HL. Encapsulated papillary neoplasms of the thyroid. A study of 14 cases followed for a minimum of 10 years. Am J Surg Pathol 1987; 11:592-597.
14. Tielsen ET, Sherman SI, Hruban RH, Ladenson PW. Follicular variant of papillary thyroid carcinoma. A clinicopathologic study. Cancer 1994; 73:424-431.
15. Johnson TL, Lloyd RV, Thompson NW, Beierwaltes WH, Sisson JC. Prognostic implications of the tall cell variant of papillary thyroid carcinoma. Am J Surg Pathol 1988; 12:22-27.
16. Beahrs HO, Henson DE, Huter RV, Myers MH, eds. Manual for staging of cancer. 3rd ed. American Joint Committee on Cancer. Philadelphia: JP Lippincott Co., 1988:57-62.
17. Moreno-Egea A, Rodríguez-González JM, Sola-Pérez J, Soria-Cogollos T, Parrilla-Paricio P. Multivariate analysis of histopathological features as prognostic factors in patients with papillary thyroid carcinoma. British J Cancer 1995; 82:1092-1094.
18. Sobin LH, Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours. 5th ed. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1997.



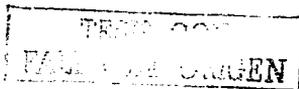
19. Hay ID, Grant CS, Taylor WE, McConahey WM. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 1997; 102: 1088-95.
20. Hay ID, Bergstralh EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predictive outcome in papillary thyroid carcinoma: development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993; 114:1050-7.
21. Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Arch Surg* 1998;133: 419-25.
22. Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP. Pathological Tumor-Node-Metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular Thyroid carcinomas: A retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3553-3562.
23. Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, et al. Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2006-9.
24. Russo D, Arturi F, Schlumberger M, et al. Activating mutations of the TSH receptor in differentiated thyroid carcinoma. *Oncogene* 1995; 11: 1907-11.
25. La Perle KM, Jhiang SM, Capen CC. Loss of p53 promotes anaplasia and local invasion in ret/PTC1-induced thyroid carcinomas. *Am J Pathol* 2000;157: 671-7.
26. Klobutcher LA, Swanton MT, Donini P, Prescott DM. All gene-sized DNA molecules in four species of hyopnchs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:3015-3019.



27. Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH. DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 1984; 310:154-157.
28. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nature Genetics* 1997;17:498-502.
29. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345:458-460.
30. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346:866-868.
31. Harley CB. Telomere loss: Mitotic clock or genetic time bomb. *Mutat Res* 1991; 256: 271-282.
32. Prescott J, Blackburn EH. Telomerase RNA mutations in *Saccharomyces cerevisiae* alter telomerase action and reveal nonprocessivity in vivo and in vitro. *Genes Dev* 1997; 11:528-540.
33. Tsao DA, Wu CW, Lin YS. Molecular cloning of bovine telomerase RNA. *Gene* 1998; 221:51-58.
34. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-2014.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

35. Zakian VA. Telomeres: Beginning to understand the end. *Science* 1995; 270:1601-1607.
36. Shay JW, Bacchetti. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur Journal of Cancer* 1998; 33: 787-791.
37. Haugen BR, Nawaz S, Markham N, Hashizumi T, Shroyer AL, Wemess B, Shroyer KR. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997; 7:337-342.
38. Yashima K, Vultch F, Gazdar AF, Fahey TJ. Telomerase activity in benign and malignant thyroid diseases. *Surgery* 1997; 122:1141-1146.
39. Cheng AJ, Lin JD, Chang T, Wang TCV. Telomerase activity in benign and malignant human thyroid tissues. *Br J Cancer* 1998; 77:2177-2180.
40. Saji M, Westra W, Chen H, Umbricht CB, Tuttle RM, Box MF, Udelsman R, Sukumar S, Zeiger MA. Telomerase activity in the differential diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Surgery* 1997; 122:1137-1140.
41. Brousset P, Chaouche N, Leprat F, Branet-Brousset F, Trouette H, Zenou RC, Merlio JP, Delsol G. Telomerase activity in human thyroid carcinomas originating from the follicular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4214-4216.
42. Ahn MJ, Tae K, Park YS. Telomerase activity in benign and malignant thyroid nodules. *Exp Mol Med* 1997; 29: 157-160.
43. Aogi K, Kitahara K, Buley I. Telomerase activity in lesions of the thyroid application to diagnosis and clinical samples of fine-needle aspirates. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1965-1970.



44. Okayasu L, Osakabe T, Fujiwara M. Significant correlation of telomerase activity in thyroid papillary carcinomas with cell differentiation, proliferation and extrathyroidal extension. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 965-970.
45. Onada M, Ishikawa T, Yoshikawa K. Telomerase activity in thyroid tumors. *Oncol Rep* 1998; 5: 1447-1450.
46. Lo CY, Lam KY, Chan KT. Telomerase activity in thyroid tumors. *Thyroid* 1999; 9: 1215-1220.
47. Matthews P, Jones CJ, Skinner J, Haughton M, de Micco C, Wyndford Thomas D. Telomerase activity and telomere length in thyroid neoplasia: biological and clinical implications. *J Pathol* 2001; 194: 183-193.
48. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
49. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, et al. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Med* 1997; 3:1271-1274.
50. Harrington L, McPhail T, Mar V. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 1997; 275: 973-977.
51. Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res* 2002;30: 839-865.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE

Anexo I

Hoja de captura que evalúa síntomas y duración de las manifestaciones de alteraciones de la función tiroidea o presencia de tumor en cara anterior del cuello.

Nombre:

Edad:

Género:

Registro

Lugar de origen/residencia:

	Si	No	Tipo	Duración	Tx/Dosis
Antecedente de					
-radiación					
-bocio					
-autoinmune					

Pruebas de función tiroidea:

Eutiroidismo

Hipotiroidismo

Hipertiroidismo

Síntomas

Evolución:

No

Tumor en cuello

(nódulo)

Disfagia

Hipoactividad

Odinofagia

Ateración en voz

Nerviosismo

Dolor en cuello

Pérdida de peso

Asintomático

ESTADO DE GUATEMALA