

11262



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION

" SALVADOR ZUBIRAN "

**Expresión de E-cadherina y del Receptor de Factor
de Crecimiento Epidérmico en Carcinoma Papilar
Bien Diferenciado de Tiroides**

LIBRERIA
DE LA BIBLIOTECA

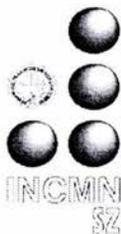
TESIS DE POSTGRADO

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS**

P R E S E N T A :

FERNANDO AURELIANO CANDANEDO GONZALEZ

Tutor: Dr. Armando Gamboa Dominguez



MEXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

	Página
Resumen	3
Introducción	4
Justificación	12
Objetivo	14
Hipótesis	15
Material y métodos	16
Análisis estadístico	23
Resultados	26
Discusión	39
Bibliografía	50
Anexo	60

Resumen

El carcinoma papilar de tiroides (CPT) bien diferenciado, es una neoplasia maligna que afecta más a mujeres, con peor pronóstico en pacientes mayores de 45 años.

Objetivo: Determinar la expresión de E-cadherina y del receptor del factor de crecimiento epidérmico en mujeres pre y posmenopáusicas con CPT bien diferenciado y correlacionar con estadio clínico y sobrevida libre de recurrencia.

Material y métodos: Se incluyeron mujeres con CPT que contaran con seguimiento e información sobre estado hormonal. La expresión de E-cadherina y del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) fueron evaluadas en forma cegada. El estadio clínico se obtuvo empleando la clasificación de la AJCC y los tumores fueron reclasificados de acuerdo al sistema de la OMS. **Resultados:** Se incluyeron 215 pacientes con seguimiento promedio de 71 meses. Fueron sometidas a tiroidectomía total 166 (77%) pacientes y resección subtotal 49 (23%). Además, a 61 (28%) pacientes se les practicó disección ganglionar. La edad promedio fue de 38 años. Las recurrencias se observaron en 15/154 (10%) pacientes premenopáusicas y en 15/61 (25%) posmenopáusicas ($p=0.008$). Las pacientes posmenopáusicas presentaron pT, pM y estadio clínico avanzado ($p=0.009$, $p<0.0001$ y $p<0.0001$, respectivamente). La expresión tanto de E-cadherina como de EGF-R no mostraron asociación con recurrencia. Sin embargo, EGF-R se encontró expresado principalmente en pacientes posmenopáusicas (23% vs 11%, $p<0.02$). En conclusión, el estado hormonal de las pacientes parece determinar un comportamiento más agresivo del CPT bien diferenciado, con mayor recurrencia de la enfermedad.

INTRODUCCION

El carcinoma papilar de tiroides (CPT) bien diferenciado, es la neoplasia maligna epitelial más frecuente de la glándula tiroides, afecta 8.5 veces más a mujeres durante la 4ª década de la vida y está constituida por células con diferenciación folicular y características nucleares distintivas. En general, el comportamiento biológico del CPT bien diferenciado es indolente con sobrevida libre de recurrencia de 85% a 10 años (Herrera y cols., 1996; Rodríguez y cols., 1993). Sin embargo, un subgrupo de pacientes portadores de CPT bien diferenciado exhiben comportamiento más agresivo. Estos generalmente son individuos mayores de 40 años de edad al momento del diagnóstico, que presentan tumor ≥ 3 cm, invasión local, metástasis a ganglios linfáticos y menor sobrevida libre de enfermedad (Herrera y cols., 1996; Rodríguez y cols., 1993). Se ha sugerido que en estos pacientes existen alteraciones del ciclo celular, expresión de polisacáridos de matriz extracelular (Böhm y cols., 2002), sobre expresión de telomerasa (Bornstein y cols., 2003) y mutaciones de ret-PTC (Santoro y cols., 1992), que favorecen un comportamiento más agresivo. Sin embargo, en la actualidad no existe forma de discriminarlos morfológicamente.

El control de la adhesión y motilidad celular son cruciales en el crecimiento y diferenciación celular, alteraciones de dichos mecanismos son responsables del inicio y la progresión tumoral. Desde hace ya una década se comenzaron a estudiar algunas moléculas de adhesión celular en diferentes neoplasias tiroideas, incluyendo al CPT. Estas moléculas son importantes en la formación de complejos de unión célula-célula dependientes de Ca^{2+} y juegan un papel importante en el

establecimiento y mantenimiento de la morfología normal y diferenciación (Brabant y cols., 1993; Sheumman y cols., 1995; von Wasielowski y cols., 1997; Soares y cols., 1997; Graff JR y cols., 1998; Naito y cols., 2001; Shapiro y cols., 1995; Gumbiner y cols., 1996).

La E-cadherina es la proteína de adhesión más importante de las células epiteliales. Se localiza en la superficie celular, principalmente en la zona adherente (Shapiro y cols., 1995). El gen que codifica para E-cadherina (CDH1) está en el cromosoma 16q22.1. Su producto es una glicoproteína de 120 kDa con un dominio largo extracelular, un segmento transmembranal y un dominio corto citoplasmático que forma complejos de unión con α -, β - y γ -cateninas, que a su vez median la unión de E-cadherina con microfilamentos de actina y son parte de una estructura proteica altamente ordenada que las conecta con proteínas citoplasmáticas y transmembranales. La adhesión entre células es mediada a través de interacciones homotípicas de los dominios extracelulares de E-cadherina en un proceso de dimerización lateral. Los dímeros paralelos son capaces de interdigitarse con dímeros de las células vecinas formando puntos de adhesión (Ver diagrama) (Gumbiner y cols., 1996; Nose y cols., 1990; Eidelman y cols., 1989; Barth y cols., 1997).

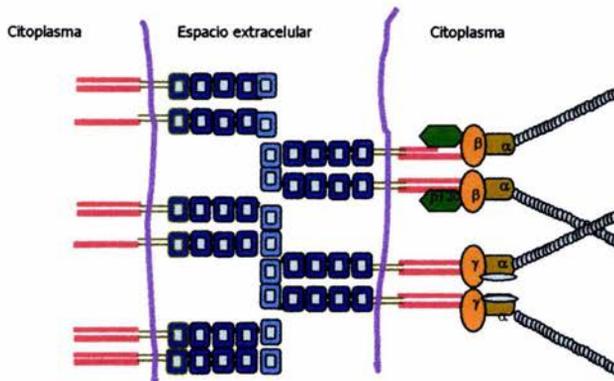


Diagrama de componentes de las uniones adherentes. E-cadherina (cuadros azules) forma complejos de unión con α -catenina (círculos azules), β - y γ -cateninas (anaranjados), que a su vez median la unión con microfilamentos de actina (líneas azules) en el citoplasma. La adhesión entre células es mediada a través de interacciones homotípicas de los dominios extracelulares de E-cadherina en un proceso de dimerización paralela, formando puntos de adhesión.

La supresión de la expresión de E-cadherina es considerada la principal alteración molecular responsable de la disfunción de la adhesión celular. La ruptura del complejo de E-cadherina/catenina, puede facilitar la pérdida de la adhesión celular, lo cual es una característica fundamental de las células neoplásicas y que les permite invadir localmente y a distancia (Gumbiner y cols., 1996; Eidelman y cols., 1989; Yoshiura y cols., 1995). Esta pérdida o reducción de la expresión de E-cadherina se ha observado en muchos carcinomas y es más acentuada en tumores poco diferenciados, invasores y en estadios avanzados (Brabant y cols., 1993; von Wasielewski y cols., 1997; Graff y cols., 1998).

En tejido tiroideo normal E-cadherina y cateninas constituyen el principal complejo de adhesión celular (Brabant y cols., 1993). Estudios de inmunohistoquímica han revelado que diferentes tipos histológicos de CPT

muestran heterogeneidad en la expresión de E-cadherina y que el CPT que carece de expresión de E-cadherina es con mayor frecuencia metastásico (Brabant y cols., 1993; Sheumann y cols., 1995; von Wasielewski y cols., 1997; Graff y cols., 1998; Naito y cols., 2001).

Existen varios mecanismos que inhiben el adecuado funcionamiento del complejo E-cadherina-catenina. La hipermetilación de la región promotora 5' CpG es la principal causa de la expresión reducida de *CDH1* en tiroides. Esta metilación aberrante es evidente en 83% de los CPT (Graff y cols., 1998; Yoshiura y cols., 1995). Sin embargo, aún no está claro qué impacto pueden tener estas alteraciones moleculares en la recurrencia y el pronóstico de la enfermedad. En algunos casos, la pérdida parece estar mediada por modificaciones transduccionales de las cateninas (fosforilación de tirosina cinasa) y en contados casos puede deberse a la inactivación mutacional o pérdida alélica del gen (Soares y cols., 1997).

El significado pronóstico de la expresión de E-cadherina en CPT se ha evaluado en un par de trabajos, en los que se ha observado que cuando disminuye E-cadherina existe menor grado de diferenciación, mayor progresión de la enfermedad, metástasis y menor sobrevida de los pacientes (Sheumman y cols., 1995; von Wasielewski y cols., 1997). Sin embargo, en ninguno de los trabajos se realizó análisis individualizando los grupos de CPT bien diferenciados. Los dos estudios analizan carcinomas papilares bien y poco diferenciados reconocibles morfológicamente, además estas neoplasias fueron agrupadas con carcinomas foliculares (CF) bien diferenciados cuyo comportamiento clínico y pronóstico son diferentes (Sheumman y cols., 1995; von Wasielewski y cols.,

1997). En la Tabla 1 se resumen las principales características de los trabajos que se han realizado hasta el momento sobre la expresión de E-cadherina en CPT y las conclusiones a las que se ha llegado.

Tabla 1. Resumen de los trabajos que han analizado la expresión de E-cadherina (E-CD) en lesiones tiroideas y que incluyeron al CPT.

Ref.	Objetivo	Estudio	Tipo de Lesión	N	Seguimiento	Conclusión
Brabant 1993	Analizar la expresión en	Prolectivo	B CPT	21 23	No	Pérdida variable de la expresión
Suiza	tejido normal y tumoral.		CF CA	9 6		
Sheumman 1995	Evaluar E-CD como marcador	Prolectivo	CPD CBD	7 44	4.5 años	La expresión se asocia a
Alemania	pronóstico.		CPT CF CA	37 7 7		pronóstico
von Wasielewski 1997	Correlacionar la expresión en	Retrolectivo	CPT CF	88 24	12 años	Indicador pronóstico
Alemania	CTBD con metástasis					independiente
Naito 2001	Significado clínico	Retrolectivo	NL AF	60 82	No	La pérdida de expresión se
Japón			CPT CF CA CM	53 4 5 2		asocia a metástasis ganglionar

B: bocio; CPT: carcinoma papilar de tiroides; CF: carcinoma folicular; CA: carcinoma anaplásico; CPD: carcinoma poco diferenciado; CBD: carcinoma bien diferenciado; AF: adenoma folicular; CTPD: carcinoma tiroideo poco diferenciado; NL: tejido normal; CM: carcinoma medular.

La adhesión mediada por E-cadherina es un proceso dinámico que está regulado por varias vías de transducción. Su interacción con factores de crecimiento es crucial en la regulación de migración, proliferación, apoptosis y diferenciación epitelial normal y en la patogénesis de carcinomas (Jawhari y cols., 1999). A nivel experimental se ha observado que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R) participa como uno de los mecanismos reguladores de adhesión celular al influir sobre β -catenina e interactuar con otras moléculas como receptores hormonales (Gumbiner y cols., 1996; Jawhari y cols., 1999; Hoschuetzky y cols., 1994).

EGF-R es una proteína transmembranal con dominios extracelular, transmembranal e intracelular, este último con actividad tirosina cinasa intrínseca (Jawhari y cols., 1999). Muchos carcinomas se caracterizan por mostrar sobre expresión y activación constitutiva del EGF-R con señalización autócrina, que resulta en mayor proliferación celular (Jawhari y cols., 1999). Algunas evidencias experimentales sugieren que el EGF-R puede inactivar al complejo E-cadherina/catenina en células neoplásicas mediante la fosforilación de β - ó γ -cateninas y modular la aparición de un fenotipo más agresivo en las células neoplásicas (Shiozaki y cols., 1995; Al Moustafa y cols., 1999).

El incremento de la expresión del EGF-R y la pérdida de E-cadherina se han implicado en el desarrollo y progresión de numerosas neoplasias (Shiozaki y cols., 1995; Al Moustafa y cols., 1999; Sorcher y cols., 1995; Jones y cols., 1996; Akslen y cols., 1993). Por diferentes métodos se ha demostrado que el CPT también expresa EGF-R (Akslen y cols., 1993; Aasland y cols., 1990; Ness y cols.,

1996). Sin embargo, aún no está completamente comprendido el significado biológico de las alteraciones en EGF-R, ni la relación que guarda con las modificaciones en la expresión de E-cadherina.

Es bien reconocido que los tumores tiroideos ocurren con mayor frecuencia en mujeres que en hombres (Wang y cols., 1997). Debido a la alta incidencia del CPT en mujeres y su relativo mejor pronóstico, especialmente en mujeres premenopáusicas, es razonable especular que el tumor podría estar influenciado por hormonas sexuales, principalmente estrógenos. Hallazgos epidemiológicos y experimentales sugieren la posible participación de los esteroides sexuales en la patogénesis y desarrollo de varios desórdenes tiroideos (Kawabata y cols., 2003; Carruba y cols., 1995).

Al parecer el estado hormonal de las pacientes puede tener una función reguladora sobre el complejo de adhesión celular (Carruba y cols., 1995; Nass y cols., 2000). Sin embargo, aún no está bien comprendida su participación en el CPT bien diferenciado. Al respecto, sólo en un trabajo se ha observado asociación clínica entre género femenino y nivel de expresión de E-cadherina, con diferencias significativas en la sobrevida libre de enfermedad entre el grupo de mujeres con tumores positivos y aquellos sin expresión de E-cadherina ($p = 0.0033$) (von Wasielewski y cols., 1997).

Se ha considerado que las diferencias en la expresión de E-cadherina están asociadas a regulación mediada por estrógenos y por el EGF-R (Nass y cols., 2000; Akslen y cols., 1995). La estimulación por estrógenos induce sobreexpresión de E-cadherina que conlleva a mayor adhesión intercelular y disminución en la expresión del EGF-R. Mientras que un aumento en la expresión

del EGF-R se asocia con disminución de E-cadherina (Shiozaki y cols., 1995; Al Moustafa y cols., 1999; Sorcher y cols., 1995).

Por otra parte, se ha descrito que la disminución en la expresión de la proteína p29, relacionada con el receptor de estrógenos, se asocia con menor sobrevida libre de recurrencia, lo que sugiere un efecto protector de los estrógenos circulantes (Akslen y cols., 1995). El trabajo citado analizó la expresión de p29 y del EGF-R por inmunohistoquímica en 127 pacientes con CPT. El análisis uni y multivariado demostró que la expresión del EGF-R y la disminución de p29 se asociaron significativamente con recurrencias (Akslen y cols., 1995).

Se ha descrito que pacientes posmenopáusicas con menores niveles séricos de estrógeno tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama (Handerson y cols., 1982; Muti y cols., 2000; Berrino y cols., 1996). El único trabajo que analiza concentraciones séricas del EGF-R en mujeres sanas, encontró que los niveles del EGF-R son significativamente mayores en premenopáusicas (Baron y cols., 2001). Sin embargo, no existen estudios semejantes en pacientes con CPT.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Existen pacientes portadores de CPT bien diferenciado de comportamiento agresivo a quienes es importante identificar para agregar maniobras de tratamiento y seguimiento. No es posible establecer dicha separación en bases morfológicas y lo que se conoce respecto a expresión de E-cadherina y EGF-R en CPT no identifica asociaciones con estado pre/posmenopáusico, estadio y recurrencia de la enfermedad.

No existen estudios que evalúen el comportamiento clínico exclusivamente del CPT bien diferenciado en base a la presencia de recurrencia, estadio y mucho menos en mujeres en etapas pre y posmenopáusicas. Hay evidencias no concluyentes de que el estadio clínico y la función ovárica se asocian con la expresión de moléculas de adhesión en CPT. Sin embargo, no hay trabajos que analicen la expresión de E-cadherina y del EGF-R en pacientes pre y posmenopáusicas estratificando por estadio del CPT bien diferenciado. La identificación de diferentes índices de expresión de E-cadherina y del EGF-R en pacientes pre y posmenopáusicas con CPT bien diferenciado con y sin recurrencia, permitirá sugerir el comportamiento de esta neoplasia en ambos grupos.

Es necesario investigar si la recurrencia en mujeres pre y posmenopáusicas tiene alguna relación con la expresión de E-cadherina y del EGF-R. Si los CPT bien diferenciados que afectan a mujeres posmenopáusicas son diferentes de aquellos que afectan a premenopáusicas, entonces es probable que la evolución

de dichas neoplasia tiroideas en posmenopáusicas sea modificada por administración de estrógenos exógenos o bloqueadores de hormonas sexuales.

El presente proyecto planteó las siguientes preguntas:

1. ¿Existe diferencia en la expresión de E-cadherina y del EGF-R en el tejido tiroideo de mujeres con y sin recurrencia de CPT bien diferenciado?
2. ¿Existe diferencia en la expresión de E-cadherina y del EGF-R en el tejido tiroideo de mujeres en estado pre y posmenopáusico con recurrencia de CPT bien diferenciado?
3. ¿Existe diferencia en la expresión de E-cadherina y del EGF-R en mujeres con CPT bien diferenciado en estadios pT₁₋₂ y pT₃₋₄?

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar la expresión de E-cadherina y del receptor del factor de crecimiento epidérmico en mujeres con carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado.

Específicos

- 1.- Analizar la expresión de E-cadherina y del EGF-R en mujeres con y sin recurrencia de CPT bien diferenciado.
- 2.- Analizar la expresión de E-cadherina y del EGF-R en mujeres con CPT bien diferenciado en estado pre y posmenopáusico.

Secundarios

- 1.- Analizar la asociación del estado pre y posmenopáusico con estadio, pTNM, tamaño del tumor, invasión extra-tiroidea y metástasis.
- 2.- Analizar si existe correlación entre la expresión de E-cadherina y EGF-R.
- 3.- Analizar si existe correlación entre la expresión de E-cadherina/EGF-R y el subtipo histológico.

Hipótesis

1.- La expresión de E-cadherina será mayor en los casos no recurrentes y menor en los recurrentes, mientras que la expresión del EGF-R será inversa.

2.- La expresión de E-cadherina será mayor en mujeres premenopáusicas con CPT bien diferenciado mientras que la del EGF-R será mayor en posmenopáusicas con CPT bien diferenciado.

MATERIAL Y METODOS

Diseño

Estudio retrolectivo de casos y controles anidado en una cohorte.

Periodo de estudio: De 1980 a 2002.

Sitio

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) es un hospital de tercer nivel de atención médica que cuenta con 159 camas y consulta externa de especialidades y subespecialidades de medicina interna y cirugía. La clínica de tiroides recibe enfermos referidos por endocrinología, medicina interna y cirugía, por problemas médicos que ameriten exploración endocrinológica. En el departamento de patología se reciben entre 6,000 y 6,500 especímenes quirúrgicos anualmente. Al mes se reciben en promedio 5 casos de CPT.

Población de estudio

1. Pacientes mujeres mayores de 16 años atendidas en el departamento de endocrinología y/o cirugía del INCMNSZ con diagnóstico de CPT bien diferenciado.
2. Con muestreo adecuado del tumor que contarán con al menos un bloque de parafina y una laminilla.

Criterios de inclusión

1. Pacientes mujeres mayores de 16 años con diagnóstico de CPT bien diferenciado.
2. Pacientes que contarán con expediente clínico.
3. Que contarán con suficiente tumor bien conservado en bloques de parafina. Debido a que se ha demostrado que la expresión de E-cadherina es similar tanto en el tumor primario como en las metástasis o bien en la recurrencia, decidimos incluir casos que contarán con tejido en cualquiera de estas condiciones (von Wasielewski y cols., 1997; Schipper y cols., 1991).

Criterios de exclusión

1. Pacientes hombres con diagnóstico de CPT.
2. Pacientes que no contarán con adecuado muestreo del tumor.
3. Pacientes que presentaran CPT poco diferenciado o bien CPT bien diferenciado asociado a carcinoma anaplásico.
4. Pacientes con CPT bien diferenciado y otras neoplasias malignas asociadas ya sea en forma sincrónica o metacrónica.
5. Pacientes que no contarán con expediente clínico o bloques de parafina.

Variables a medir

La variable dependiente o de desenlace fue recurrencia.

Las variables independientes fueron:

1. Edad: variable dimensional y discreta, considerada como edad al momento de ingreso al Instituto por su problema tiroideo.
2. Menopausia: evaluada como variable dicotómica (pre y posmenopausia) (Nass y cols., 2000).
3. Estadio del tumor: se dividió en dos grupos pT₁₋₂ y pT₃₋₄.
4. Tipo de cirugía: considerada como tiroidectomía total, subtotal, con o sin disección radical de cuello.
5. Expresión de E-cadherina: evaluada como variable dicotómica (presente, ausente) y como variable ordinal medida en porcentajes de expresión en las células neoplásicas (100% o expresión normal, expresión heterogénea 75%, 50%, 25% y negativa).
6. Expresión del EGF-R: la cual fue evaluada como variable dicotómica (expresión positiva o negativo), y como variable ordinal (expresión 0+, 1+, 2+ y 3+).

Definiciones operacionales (Anexo I)

Procedimientos para la recolección de datos

Se revisó el archivo de patología quirúrgica y expedientes clínicos del INCMNSZ para identificar todos los casos de mujeres con CPT bien diferenciado. De los expedientes clínicos se recolectó edad de las pacientes, presentación inicial, fecha de última menstruación, síntomas climatéricos -si es que los presentó

la paciente o fueron consignados en el expediente-, uso de terapia hormonal, tipo de cirugía, tiempo de evolución antes de la cirugía, tiempo de seguimiento, presencia o ausencia de recurrencia y fecha de presentación, metástasis a ganglios linfático y/o a distancia, si se encontraba viva sin enfermedad, viva con enfermedad, muerta sin enfermedad o bien muerta con enfermedad en la última visita al Instituto. Se obtuvieron bloques de parafina de productos de tiroidectomía total y subtotal con o sin disección radical de cuello del archivo de patología quirúrgica. Todos los casos fueron reevaluados por dos patólogos con experiencia en patología endocrina, de acuerdo a la clasificación histológica de la OMS para CPT bien diferenciado (Hedinger y cols., 1988). De los informes de patología se obtuvo tamaño del tumor, multicentricidad y/o bilateralidad.

Inicialmente se formaron dos grupos de pacientes en base a la presencia o ausencia de recurrencia. En el análisis de los resultados, se estratificó a los grupos por edad, estado pre y posmenopáusico, tipo de cirugía, uso de terapia hormonal, pTNM, tamaño del tumor, multicentricidad del tumor, invasión a tejido peritiroideo, invasión a la cápsula tumoral, metástasis a ganglios linfáticos en relación a la expresión de E-cadherina y EGF-R.

Inmunohistoquímica

Previo a la realización del estudio de inmunohistoquímica, se obtuvieron, de cada caso, cortes de 5 μ m teñidos con hematoxilina y eosina para confirmar el diagnóstico de CPT bien diferenciado. De esta forma se seleccionaron las áreas mejor conservadas que fueran representativas del tumor.

Microarreglos de tejido para estudio de inmunohistoquímica

Se seleccionaron cuatro áreas en los bloques de parafina de cada tumor para realizar biopsias en sacabocado de 0.3 mm de diámetro y construir microarreglos de tejido como previamente se ha descrito (Hoos y cols., 2001; Hoos y cols., 2002). Cada bloque de parafina que se construyó contenía ocho casos diferentes con su respectivo control de tejido no neoplásico. Se realizaron cinco cortes de 5 μ m que fueron colocados en laminillas con poly-L-lisina, los cuales fueron empleados para el estudio de inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica para E-cadherina

La determinación de E-cadherina fue realizada en forma automatizada de acuerdo a protocolos preestablecido (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ). Se eliminó la parafina en baños consecutivos en xilol y alcohol hasta llevar a PBS. Se realizó recuperación antigénica colocando las laminillas en microondas, usando EDTA a pH 8.0, 10mM por un máximo de 12 min. El anticuerpo empleado fue anti-CDH1 (monoclonal de ratón/NH-38; 1:100; DAKO). En todos los casos se obtuvieron controles negativos al omitir el paso que agrega el anticuerpo específico al procedimiento rutinario del marcaje y positivos que consistieron en tejido tiroideo no neoplásico vecino al tumor. La reacción se consideró positiva cuando más de 25% de las células mostraron marca café-ocre característica en la membrana.

Inmunohistoquímica para receptor del factor de crecimiento epidérmico

La inmunohistoquímica para EGF-R fue realizada empleando el sistema de detección Dako EGFRpharmDx™ (Dako Corporation, Carpinteria, CA) el cual reconoce al receptor transmembranal de 170 kDa que es codificado por el gen HER1, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó anticuerpo anti-EGF-R (monoclonal de ratón; prediluido; DAKO). Después de lavar en xilol, etanol al 100%, 95% y 70%, las laminillas fueron colocadas en medio húmedo para la digestión proteolítica con solución de proteinasa K (100 µl por 5 min.). El anticuerpo primario fue incubado por 30 minutos seguido por 30 minutos de incubación con polímero y DAB. Las laminillas se contrastaron con hematoxilina con 10 enjuagues posteriores en agua amoniacal al 37 mmol/L. El kit incluyó laminillas de control que sirvieron para validar el procedimiento del anticuerpo de Dako EGFRpharmDx™. Las laminillas de control positivo contenían células de la línea HT-29, fijadas en formol e incluidas en parafina con un moderado nivel de expresión de la proteína EGF-R (Score de tinción de 2.5 ± 0.5) y de un control negativo para EGF-R compuesto por la línea celular CAMA-1 (score 0).

Evaluación de la inmunohistoquímica

- a) Observador. Los cortes de inmunohistoquímica fueron revisados por dos patólogos de manera conjunta y en forma cegada. En los casos discrepantes, se obtuvo consenso entre los dos observadores mediante la revisión conjunta de las laminillas de inmunohistoquímica en un microscopio de dos cabezales.

- b) Previo a la evaluación inmunohistoquímica de toda la serie de casos, se calificó la reproducibilidad de la interpretación de la expresión de E-cadherina. Esta evaluación fue realizada por dos observadores que utilizando 10 casos de CPT, seleccionados aleatoriamente. Se empleó índice de Kappa para analizar la concordancia inter-observador. Para lo cual, se consideraron cuatro tipos de positividad (paranuclear, de membrana, citoplasmática y heterogénea). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Evaluación inmunohistoquímica estandarizada de E-cadherina.

Positividad	índice de Kappa
Paranuclear	0.25
Membrana	1.00
Citoplasma	0.33
Heterogénea	1.00

- c) Ceguedad. Las laminillas se identificaron con números aleatorios que impidieron conocer las características clínicas de cada caso.
- d) Estadificación: Se empleo la clasificación de pTNM para CPT (AJCC) (Greene y cols., 2002; Loh y cols., 1997).
- e) Morfología. Se utilizó la clasificación de la OMS para tumores tiroideos (Hedinger y cols., 1988).

Evaluación de la reactividad de E-CD

La evaluación inmunohistoquímica para E-cadherina se consideró positiva cuando se observó tinción café-ocre en la membrana de las células neoplásicas, teniendo como referencia los siguientes criterios:

- a) Negativa: No se observó tinción, o la tinción fue en < 25% de las células neoplásicas.
- b) Heterogéneo: Cuando se observó >25%, 50% y 75% de las células neoplásicas, con alternancia de células sin expresión.
- c) Normal: Expresión en la totalidad de la neoplasia.

Evaluación de la reactividad del EGF-R

Se evaluó tinción de membrana en las células neoplásicas, cuantificado y gradificado como:

- 0 Sin tinción o tinción de membrana en <10% de las células neoplásicas. Negativo
- 1+ Tinción de membrana débil completa o incompleta en > 10% de las células neoplásicas. Positivo.
- 2+ Tinción de membrana moderada completa y/o incompleta en > 10% de las células neoplásicas. Positivo.
- 3+ Tinción de membrana fuerte completa y/o incompleta en > 10% de las células neoplásicas. Positivo.

Tamaño de la muestra

Se utilizó la fórmula para comparación de proporciones

$$n = \frac{2 PQ (Z\alpha + Z\beta)^2}{\Delta^2} \quad \text{Donde } P = \frac{P1 + P2}{2}$$

Se calculó en base a las prevalencias esperadas en cada grupo (pacientes con CPT recurrente 26%, pacientes con CPT no recurrente 74% (Sheumman y cols., 1995) tomando en cuenta α 0.05 y β 0.20 ($Z\alpha$ 1.96, $Z\beta$ 0.80). $P1 = 0.26$, $P2 = 0.74$, $Q = 1-P$, $\Delta = 48\%$.

$$n = \frac{2(0.63)(0.37)[1.96 + 0.80]^2}{(0.48)^2}$$

$$n = \frac{2(0.23)(7.61)}{0.23} = 15$$

$$n = 15 \times 2 = 30$$

Al realizar la operación se obtuvo una n por grupo de 15 pacientes. Este valor fue suficiente para identificar diferencias entre los grupos.

Análisis estadístico

Las variables demográficas se analizaron con estadística descriptiva. Se empleó *Chi-cuadrada* o prueba exacta de *Fisher* para evaluar diferencias en proporciones para las variables categóricas entre casos y controles. La variable de desenlace fue recurrencia de la enfermedad definida como presencia de tumor en el lecho tiroideo, remanente tiroideo, tejidos vecinos o a distancia, después de 6 meses de haberse extirpado el tumor primario. El diagnóstico de recurrencia debió confirmarse por histología. La sobrevida libre de recurrencia se consideró de la fecha de la primera cirugía hasta el momento en que se presentó recurrencia de la enfermedad locorregional o a distancia. Las variables continuas como edad y

tamaño del tumor fueron divididas en un punto de corte que permitiera maximizar la posibilidad de predecir recurrencia. Se realizaron curvas de Kaplan-Meier, análisis univariado y prueba de asociación de log-rank para evaluar el valor pronóstico de la expresión de E-cadherina, EGF-R, pTNM y estatus hormonal con el tiempo de sobrevida libre de recurrencia. La asociación de recurrencia de la enfermedad con varias características de las pacientes fueron evaluadas por medio del modelo de riesgos proporcionales de Cox mediante el método Forward-LR en el que se identificó un modelo parsimonioso que incluyó la expresión de E-cadherina y EGF-R, edad (≥ 45 años), estado pre y postmenopáusico, estadio, pTNM, tipo de cirugía, suministro de terapia hormonal, tamaño del tumor (≥ 4 cm), multicentricidad del tumor, invasión a tejido peri-tiroideo, invasión a la cápsula tumoral y metástasis a ganglios linfáticos. Se calculó razón de momios (OR) con intervalo de confianza (IC) de 95%, para determinar la fuerza de asociación que pudiera tener la ausencia de expresión de E-cadherina o bien la expresión del R-FCE en CPT-BD con las demás variables. Para evaluar la posible correlación entre las variables continuas E-cadherina y EGF-R, se empleó prueba no paramétrica para coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p para dos colas ≤ 0.05 . El análisis estadístico fue realizado por SPSS versión 10.0 para Windows (Chicago, IL).

Aspectos éticos

Este protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ. Las pacientes incluidas en forma retrolectiva fueron programadas para cirugía en otro momento, independientemente de este protocolo. Por lo que no se requirió de

carta de consentimiento informado. Sin embargo, para aquellas pacientes que se incluyeron en forma prolectiva se solicitó consentimiento informado (Anexo II).

Financiamiento

Recursos humanos: Los departamentos de endocrinología y cirugía del INCMNSZ cuentan con personal médico y paramédico con amplia experiencia en la realización de procedimientos quirúrgicos. En el departamento de patología del INCMNSZ se reciben en promedio 5 casos de CPT al mes y los patólogos encargados de diagnosticar este material tienen amplio conocimiento de las enfermedades que en esta región se presentan.

Recursos materiales: debido a que las pacientes incluidas indiscutiblemente serían sometidas a tiroidectomía por indicaciones del personal médico del INCMNSZ, se utilizó el equipo disponible en el departamento de cirugía. El procesamiento del material quirúrgico se realizó utilizando el equipo disponible en el departamento de patología del INCMNSZ. El análisis inmunohistoquímico de la expresión de E-cadherina y del EGF-R en el tejido tiroideo se realizó en el área de inmunohistoquímica del departamento de patología del INCMNSZ y la inversión por el uso de consumibles corrió en parte por cuenta de la Unión Internacional de Lucha contra el Cáncer (UICC).

RESULTADOS

Características clinicopatológicas

La presencia de tumor en cara anterior de cuello fue la manifestación clínica más frecuente en 208 (97%) pacientes con un tiempo promedio de evolución previo al diagnóstico de 36 meses (intervalo de 0-336 meses). Fueron sometidos a tiroidectomía total 166 (77%) pacientes y a resección subtotal 49 (23%). Además, a 61 (28%) pacientes se les practicó disección ganglionar. La edad promedio al momento del diagnóstico fue de 38 años (intervalo de 16-80 años), la mayoría menores de 45 años, con función ovárica normal y sin recurrencia de la enfermedad ($p=0.008$). Las recurrencias se identificaron con mayor frecuencia en pacientes con tumores invasores en cápsula/tejido peri-tiroideo (pT_{3-4} , $p=0.009$), y en estadios clínico avanzados (III-IV, $p<0.0001$). El 80% de posmenopáusicas y 66% de premenopáusicas se encontraron en etapas pT_{3-4} del tumor ($p=0.047$).

La multicentricidad, localización, tamaño y ganglios linfáticos con metástasis no se asociaron con mayor tasa de recurrencia. Se administró terapia hormonal 4/30 (13%) pacientes con recurrencia y a 54/181 (29%) sin recurrencia ($p = 0.050$). De las cuales 3 (75%) pacientes fueron posmenopáusicas y 1 (25%) premenopáusica. De acuerdo a la estadificación de la AJCC, se identificaron 138 (64%) pacientes en estadio I, 12 (6%) en estadio II, 6 (3%) en estadio III y 59 (27%) en estadio IV. La variable que mostró mayor asociación con el desarrollo de recurrencias fue la presencia de metástasis a distancia ($p<0.0001$). La Tabla 3 resume las principales características clinicopatológicas de las 215 mujeres con CPT bien diferenciado, con y sin recurrencias.

El tiempo promedio de seguimiento de las pacientes fue de 70.98 ± 56.89 meses (intervalo de 2-234). Los casos recurrentes ocurrieron en 15/154 (10%) pacientes premenopáusicas y en 15/61 (25%) posmenopáusicas (Figura 1; $p=0.008$). La recurrencia loco regional y a ganglios del cuello fue el evento observado con mayor frecuencia. Únicamente se identificaron 11 (5%) metástasis a distancia, ocho en mujeres mayores de 45 años ($p=0.021$). Los principales sitios de afección fueron pulmón (9), mediastino (2) y piel (1).

La mayoría de los tumores fueron únicos (71%) y con invasión extratiroidea (63%). La invasión a tejido peritiroideo se observó principalmente en posmenopáusicas ($p=0.001$). El mayor número de casos con metástasis ganglionares (59/154, $p=0.01$) se identificó en premenopáusicas (Tabla 4).

Tabla 3. Características clinicopatológicas de 215 pacientes con carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado.

Variable	N = 30 Casos Recurrentes		N = 185 Controles No recurrentes		Valor de p	OR	IC95%
	N	(%)	N	(%)			
Edad							
<45 años	12	(40)	123	(66)	0.008*	2.976	(1.348-6.568)
>45 años	18	(60)	62	(34)			
Menopausia							
Pre	15	(50)	139	(75)	0.008*	3.022	(1.372-6.655)
Post	15	(50)	46	(25)			
Terapia hormonal							
Si	4	(13)	54	(29)	0.050*	0.373	(1.24-1.220)
No	26	(87)	131	(71)			
Aspecto macroscópico							
Unico	16	(53)	104	(56)	0.768	0.890	(0.411-1.930)
Multicéntrico	14	(47)	81	(44)	0.830	1.088	(0.502-2.360)
Bilateral	9	(30)	53	(29)	0.880	1.067	(0.459-2.481)
Unilateral	21	(70)	132	(71)	0.928	0.962	(0.414-2.234)
Estadio							
I-II	12	(40)	138	(75)	<0.0001*	4.404	(1.975-9.821)
III-IV	18	(60)	47	(25)			
pT							
pT1-2	3	(10)	62	(34)	0.009*	4.539	(1.324-15.540)
pT3-4	27	(90)	123	(66)			
Tamaño del tumor							
< 4 cm	18	(60)	139	(75)	0.083	2.014	(0.903-4.496)
>4cm	12	(40)	46	(25)			
Invasión extratiroidea							
Si	27	(90)	108	(58)	0.001*	6.417	(1.879-21.911)
No	3	(10)	77	(42)			
Ganglios							
Positivos	14	(47)	57	(31)	0.087	1.965	(0.899-4.286)
Negativos	16	(53)	128	(69)			
Metástasis a distancia							
Si	9	(30)	2	(1)	<0.0001*	39.214	(7.938-193.713)
No	21	(70)	183	(99)			

(*): Prueba exacta de Fisher.

Tabla 4. Estado hormonal y etapificación en 215 CPT bien diferenciado

	Estado Hormonal				Valor de p	OR	IC95%
	Pre-menopausica N/154 (%)		Post-menopausica N/61 (%)				
Aspecto macroscópico							
Unico	86	(56)	34	(56)	0.989	0.996 (0.548-1.809)	
Multicéntrico	69	(45)	27	(44)	0.912	0.967 (0.532-1.757)	
Bilateral	42	(27)	20	(33)	0.421	1.301 (0.685-2.471)	
Unilateral	111	(72)	41	(67)	0.480	0.794 (0.419-1.506)	
Estadio							
I-II	138	(90)	12	(20)	<0.0001*	35.2 (15.668-9.674)	
III-IV	16	(10)	49	(80)			
pT							
pT1-2	53	(34)	12	(20)	0.034*	2.143 (1.050-4.373)	
pT3-4	101	(66)	49	(80)			
Tamaño del tumor							
<4 cm	112	(73)	45	(74)	0.877*	0.948 (0.484-1.856)	
>4 cm	42	(27)	16	(26)			
Extensión extra-tiroidea							
Si	86	(56)	49	(80)	0.001*	3.229 (1.592-6.547)	
No	68	(44)	12	(20)			
Ganglios							
Positivos	59	(38)	12	(20)	0.009*	0.394 (0.194-0.802)	
Negativos	95	(62)	49	(80)			
Metástasis							
Si	6	(4)	5	(8)	0.300**	2.202 (0.646-7.505)	
No	148	(96)	56	(92)			

(*): Prueba de χ^2 ; (**): prueba exacta de Fisher.

Características morfológicas

El tamaño promedio de los tumores fue de 3.2 cm ($DE \pm 2.1$ cm). La tercera parte de los carcinomas fueron mayores de 4 cm de diámetro y casi la mitad multicéntricos. Histológicamente se identificaron patrones clásico, folicular y mixto en 42, 11 y 47%, respectivamente (Figura 1 A, B, C).

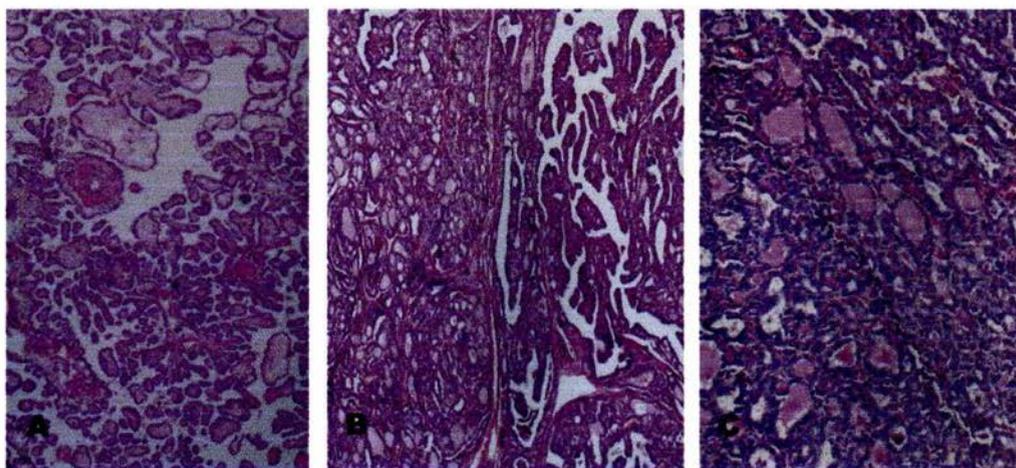


Figura 1. CPT bien diferenciado. Patrones papilar (A); mixto –papilar/folicular- (B) y folicular (C).

Expresión de E-cadherina (CDH1)

La expresión normal de E-cadherina fue observada en 18/215 (8%) pacientes, expresión heterogénea en 137/215 (64%, Figura 2) y no se identificó en 60/215 (28%). La comparación de la expresión de E-cadherina entre el grupo de pacientes con y sin recurrencia no mostró diferencias significativas. Situación

semejante a lo observado al comparar los porcentajes de expresión de la proteína y el desarrollo de recurrencia.

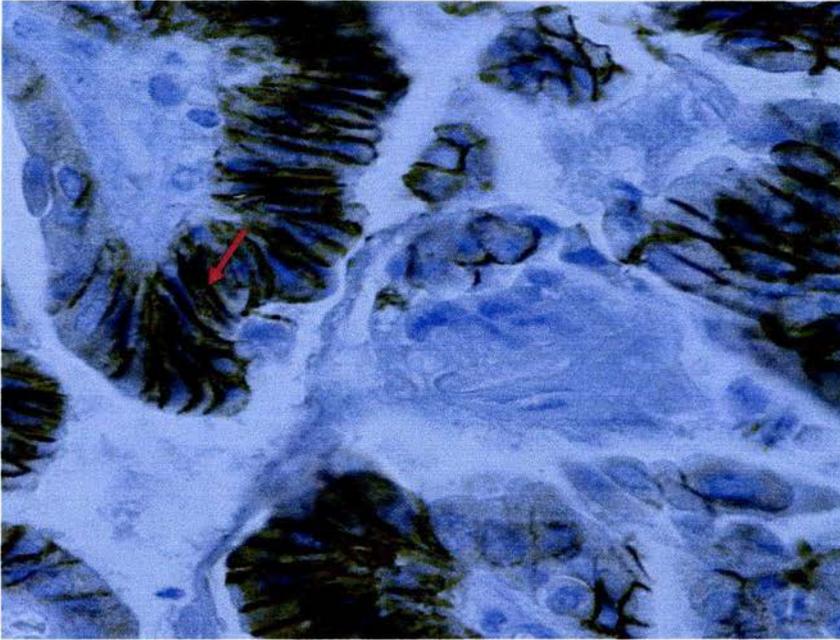


Figura 2. CPT bien diferenciado. La marca café ocre en bordes laterales (flecha) de grupos de células epiteliales que alternan con disminución y ausencia de expresión de E-cadherina caracteriza los casos con expresión heterogénea de la proteína.

La expresión normal o anormal de E-cadherina no se asoció con las variables demográficas ni con estadio del tumor (Tabla 5).

Tabla 5. Expresión de E-cadherina y características clinicopatológicas en carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado (n = 215).

Variable	E-CD				X ² Valor de p	OR	IC95%
	N = 154 Positivos		N = 61 Negativos				
	N	(%)	N	(%)			
Menopausia							
Pre	111	(72)	43	(70)	0.816	0.925 (0.482-1.778)	
Post	43	(28)	18	(30)			
Edad							
>45 años	61	(40)	19	(31)	0.247	1.450 (0.772-2.725)	
<45 años	93	(60)	42	(69)			
Estadio							
I-II	107	(69)	18	(30)	0.884	1.049 (0.549-2.007)	
III-IV	47	(31)	43	(70)			
pT							
pT1-2	49	(32)	16	(26)	0.421	0.762 (0.392-1.480)	
pT3-4	105	(68)	45	(74)			
Tamaño del tumor							
<4 cm	116	(75)	41	(67)	0.227	0.672 (0.351-1.284)	
>4 cm	38	(25)	20	(33)			
Extensión extra-tiroidea							
Si	93	(60)	42	(69)	0.247	0.690 (0.367-1.296)	
No	61	(40)	19	(31)			
Ganglios							
Positivos	50	(32)	21	(34)	0.783	0.916 (0.489-1.714)	
Negativos	104	(68)	40	(66)			
Metástasis							
Si	8	(5)	3	(5)	0.934	1.059 (0.272-4.133)	
No	146	(95)	58	(95)			
Recurrentes							
Si	21	(14)	9	(14)	0.831	0.912 (0.392-2.122)	
No	133	(86)	52	(86)			

Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico

Se identificaron 31 pacientes con tumores positivos para EGF-R (14%) de los 215 analizados. En 55% (17/31) de los casos positivos la reactividad fue focal en membrana (1+), en 32% (10/31) fue 2+ y en 13% (4/31) intensa (3+). La marca útil para identificar a los casos positivos se localizó en la membrana plasmática principalmente en los bordes laterales de las células neoplásicas (Figura 3).

En forma global, la presencia o ausencia de EGF-R no se asoció con recurrencia. Sin embargo, niveles altos de expresión de la proteína en las membranas de las células neoplásicas (1+, 2+ vs 3+) mostraron tendencia a la asociación con recurrencia de la enfermedad (7% vs 1%; $p=0.095$; Tabla 6).

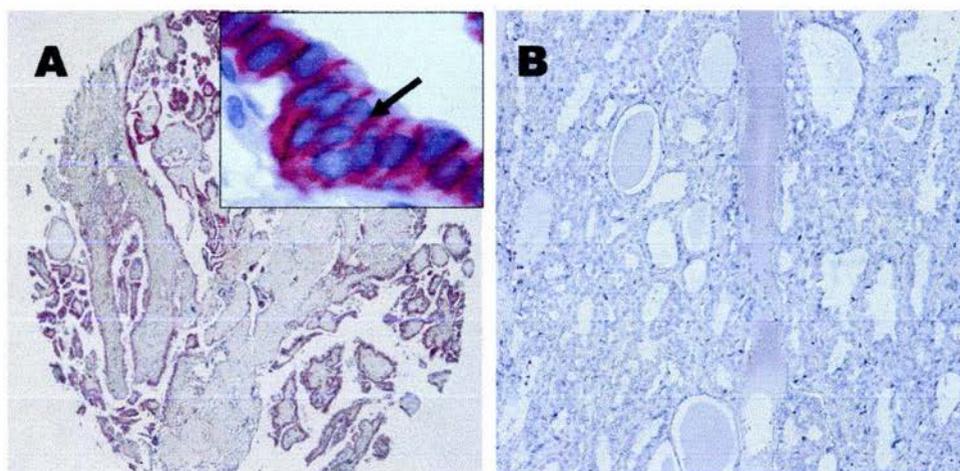


Figura 3. Inmunohistoquímica para EGF-R en microarreglos de CPT bien diferenciado. Expresión en membranas plasmáticas del 100% de células neoplásicas (A y recuadro), ausencia de expresión (B).

Tabla 6. Niveles de expresión del EGF-R en 215 CPT bien diferenciado.

Expresión de EGF-R	N = 30		N = 185		Valor de p^*
	Recurrentes		No recurrentes		
	N	(%)	N	(%)	
0	24	(80)	160	(86)	0.348
1+	3	(10)	14	(8)	0.210
2+	1	(3)	9	(5)	0.712
3+	2	(7)	2	(1)	0.095*

(*) Prueba exacta de Fisher.

Los CPT bien diferenciados de pacientes premenopáusicas mostraron asociación con expresión débil (1+) del EGF-R en 55% de los casos ($p=0.016$). En contraste, se observó tendencia a la asociación de estadio avanzado (III-IV) con la sobre expresión intensa (3+) del receptor ($p=0.084$). No se identificaron asociaciones con el resto de las variables medidas (Tabla 7).

Tabla 7. Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico y características clinicopatológicas en carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado (n = 215).

Variable	EGF-R				X ² Valor de p	OR	IC95%
	N = 31		N = 184				
	Positivos N	Negativos (%)	Positivos N	Negativos (%)			
Menopausia							
Pre	17	(55)	137	(74)	0.025	2.401	(1.099-5.242)
Post	14	(45)	47	(26)			
Edad							
<45 años	15	(48)	120	(65)	0.073	2.000	(0.929-4.306)
>45 años	16	(52)	64	(35)			
Estadio							
I-II	17	(55)	133	(72)	0.050	2.148	(0.987-4.673)
III-IV	14	(45)	51	(28)			
pT							
pT1-2	6	(20)	59	(32)	0.154	1.967	(0.760-5.051)
pT3-4	25	(80)	125	(68)			
Tamaño del tumor							
<4 cm	23	(74)	134	(73)	0.874	0.932	(0.931-2.220)
>4 cm	8	(26)	50	(27)			
Extensión extra-tiroidea							
Si	24	(77)	111	(60)	0.069	2.255	(0.924-5.503)
No	7	(23)	73	(40)			
Ganglios							
Positivos	7	(23)	64	(35)	0.181	0.547	(0.223-1.338)
Negativos	24	(77)	120	(65)			
Metástasis							
Si	2	(6)	9	(5)	0.715	1.341	(0.276-6.522)
No	29	(94)	175	(95)			
Recurrentes							
Si	24	(77)	6	(20)	0.348	1.600	(0.595-4.301)
No	160	(86)	25	(14)			

Correlación de E-cadherina con EGF-R

Veinte pacientes de 171 con disminución en la expresión de E-cadherina mostraron sobre expresión del receptor *versus* 10/43 con expresión normal de E-cadherina ($r=0.130$; $p=0.05$). En la Tabla 8 se aprecia correlación inversa entre la expresión de E-cadherina y del EGF-R.

Tabla 8. Correlación de E-cadherina y del EGF-R en 215 pacientes con CPT-BD

		EGF-R			
		0+	1+	2+	3+
E-cadherina	< 70 %	33	7	1	2
	> 70 %	152	10	8	2

Análisis de sobrevida

El análisis univariado para sobrevida libre de recurrencia mostró que el estatus posmenopáusico (log rank, $p=0.0004$), edad >45 años (log rank, $p=0.021$), pTNM (log rank, $p=0.0136$) y extensión extra-tiroidea (log rank, $p=0.0027$) resultaron ser variables significativas, pero no lo fueron la expresión de E-cadherina y EGF-R (Figura 4). Los resultados del análisis son mostrados en la Tabla 9.

Cuando se comparó por estadios I-II versus III-IV, el patrón de tinción de E-cadherina no influyó en la sobrevida libre de recurrencia. El análisis multivariado de sobrevida libre de recurrencia (*regresión de Cox*) que incluyó edad, estatus posmenopáusico, estadio, expresión de E-cadherina y EGF-R, mostró que sólo la edad >45 años ($p=0.003$), estatus posmenopáusico y pTNM ($p=0.034$) permanecieron como variables independientes (Tabla 9).

Table 9. Asociación con recurrencia en 215 pacientes con CPT bien diferenciado.

Característica	Pacientes		Prueba de log-rank	Multivariado*
	N	(%)		
Posmenopáusica	61	(28)	0.0004	0.003
Edad > 45 años	80	(37)	0.0021	0.003
Invasión extratiroidea	135	(63)	0.0027	NS
Estadio III-IV	65	(30)	0.0136	0.034
Tamaño > 4 cm	58	(27)	0.2510	NS
Expresión E-CD	155	(72)	0.5457	NS
Expresión EGF-R	47	(22)	0.6282	NS

(*): *Regresión de Cox*; NS: no significativo. E-CD: E-cadherina; EGF-R: receptor del factor de crecimiento epidérmico

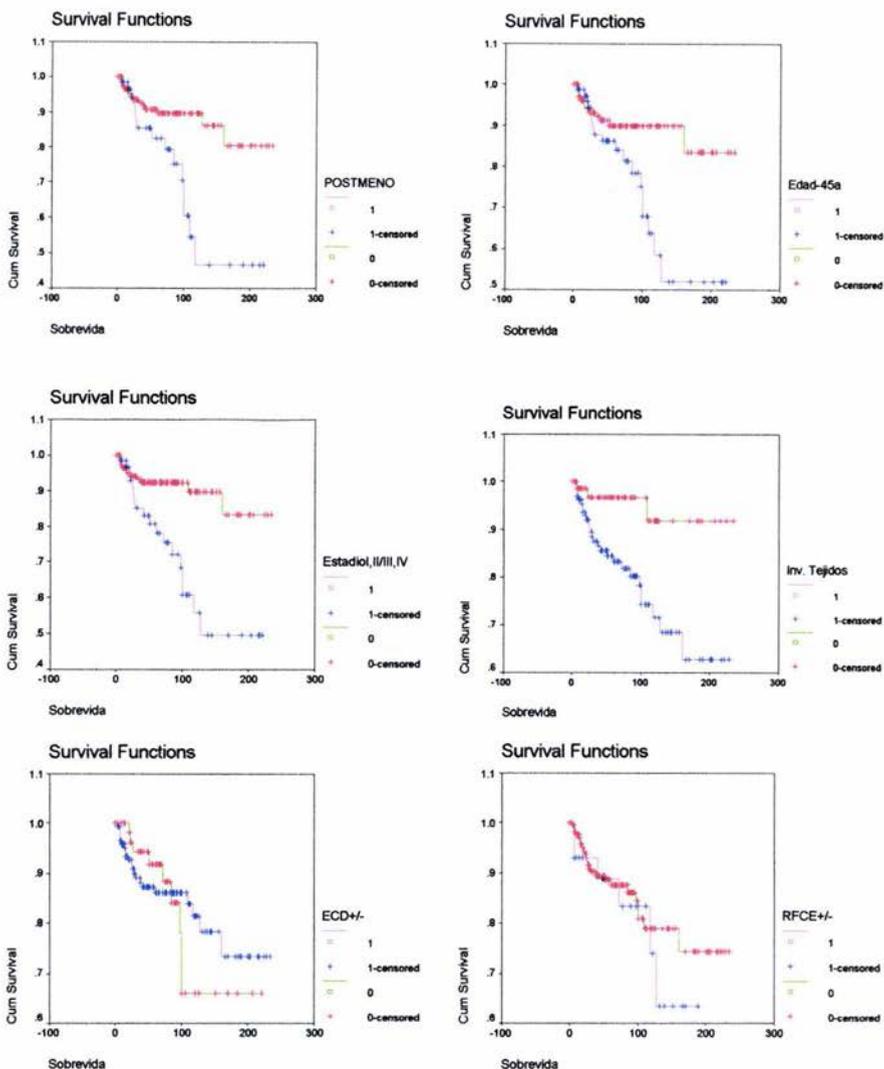


Figura 4. Sobrevida libre de recurrencia de 215 pacientes con CPT bien diferenciado. A) Menopausia (Pre/Pos); B) Edad (< o >45 años); C) Estadio (I-II vs III-IV); D) Invasión extratiroidea (Si/No); E) Expresión de E-cadherinas (+/-); F) Expresión del EGF-R (+/-).

DISCUSION

Los resultados obtenidos al analizar 215 mujeres con CPT bien diferenciado demuestran que las pacientes posmenopáusicas, se encontraron con mayor frecuencia en estadios avanzados (III-IV), con extensión extra tiroidea, metástasis a distancia al momento del tratamiento quirúrgico y con mayor tasa de recurrencia durante el seguimiento ($p=0.008$). Los carcinomas de pacientes posmenopáusicas en estadios III-IV presentaron mayor expresión del EGF-R ($p=0.025$). A diferencias de otros estudios, no observamos diferencias significativas en la expresión de E-cadherina asociadas con característica clinicopatológica de peor pronóstico.

Posmenopausia y CPT

El CPT en población mexicana afecta 8.5 veces más a mujeres que a hombres, con un mayor riesgo de presentar la neoplasia entre las pacientes posmenopáusicas (Rodríguez y cols., 1993; Rossing y cols., 1998; Negri y cols., 1999; La Vecchia y cols., 1999; Mack y cols., 1999). En nuestra serie, 80% de las pacientes posmenopáusicas presentaron CPT bien diferenciado con extensión extra tiroidea ($p<0.0001$) y en estadio III-IV ($p=0.001$) al momento de la resección quirúrgica. Estos resultados concuerdan con datos obtenidos en otros estudios clínicos y epidemiológicos que sugieren una probable participación de los estrógenos en la patogénesis y desarrollo del CPT (Kawabata y cols., 2003; Akslen y cols., 1995; Rossing y cols., 1998; Negri y cols., 1999; La Vecchia y cols., 1999; Mack y cols., 1999).

E-cadherina y características clinicopatológicas

En la presente serie, la expresión normal de E-cadherina fue observada en tan sólo 8% de las pacientes mientras que 64% tuvieron expresión heterogénea y en 28% de los casos no se identificó expresión, datos semejantes a lo informado por Brabant y cols., que analizaron 16 CPT y encontraron que en 9 casos el nivel de E-cadherina fue reducido en forma heterogénea. E-cadherina juega un papel importante en el comportamiento de las células neoplásicas como supresor de invasión y metástasis. La disminución en la expresión de E-cadherina en carcinomas tiroideos se ha asociado con progresión de la enfermedad (Brabant y cols, 1993; Sheumman y cols., 1995; von Wasielewski y cols., 1997; Naito y cols., 2001). En un estudio reciente utilizando inmunohistoquímica se observó que los carcinomas tiroideos bien diferenciados en etapa pT₃₋₄, presentaron con mayor frecuencia pérdida de la expresión de E-cadherina (von Wasielewski y cols., 1997). Por su parte, Secheumman y cols., concluyeron que la ausencia de expresión de E-cadherina en tumores en etapa pT₄ se asoció con mayor tasa de recurrencia y metástasis. Lo anterior sugirió que E-cadherina podría ser útil como marcador pronóstico. No obstante, en el trabajo citado no se hizo análisis de supervivencia. Naito y cols., compararon la expresión de E-cadherina en CPT con y sin metástasis ganglionar e identificaron reducción significativa de su expresión en los CPT con metástasis ganglionar ($p < 0.05$), sugiriendo que la ausencia de expresión favorece mayor migración a ganglios linfáticos regionales y por ende comportamiento más agresivo de la neoplasia. Sin embargo, es bien reconocido que ni el tamaño (pT) ni las metástasis a ganglios linfáticos regionales son factores de peor pronóstico en CPT (Herrera y cols., 1996). Las variaciones en los resultados obtenidos en los diferentes estudios pueden deberse a diferencias en la

metodología utilizada, a un escaso número de pacientes incluidos o a la inclusión de diversas variedades de carcinoma papilar de tiroides con cursos clínicos diferentes.

Nuestros resultados no mostraron asociación de la expresión de E-cadherina con ninguna de las variables clinicopatológicas útiles para identificar pronóstico en CPT. Una explicación a la falta de asociación con la conducta biológica de la neoplasia pudiera deberse a que la presente serie incluyó únicamente CPT bien diferenciado en pacientes sometidas a tiroidectomía total en la mayoría de los casos. Al generar un grupo de estudio más homogéneo se obtuvieron resultados con mayor validez. Si a lo anterior se agrega que utilizamos variables de desenlace "duras", como estadio y desarrollo de recurrencia de la enfermedad, creemos que utilizar únicamente la ausencia de expresión inmunohistoquímica de E-cadherina para predecir mayor agresividad del CPT debe tomarse con muchas reservas.

Expresión de E-cadherina y género

Estudios experimentales indican que los niveles de estrógenos regulan la expresión de E-cadherina (Carruba y cols., 1995). Sin embargo, en estudios clínicos aún no se comprenden los mecanismos de regulación y si la expresión de E-cadherina se asocia con el estado hormonal de las pacientes (von Wasielewski y cols., 1997). von Wasielewski y cols., exploraron en forma dirigida la asociación de la expresión de E-cadherina en carcinoma tiroideo bien diferenciado y género.⁸ En dicho estudio, la expresión de E-cadherina en hombres no mostró diferencias mientras que en las mujeres las curvas de supervivencia mostraron diferencias

significativas cuando se compararon casos positivos y negativos para la proteína de adhesión ($p=0.0229$). En el trabajo se identificó disminución significativa en la expresión de E-cadherina en las mujeres mayores de 45 años. Lo que sugiere que el estado hormonal de las pacientes podría tener alguna participación en la regulación de la expresión de E-cadherina en los carcinomas tiroideos bien diferenciado. Sin embargo, al igual que lo informado por Naito y cols., en nuestro estudio la ausencia o disminución en la expresión de E-cadherina no se asoció con el estado hormonal ($p=0.816$) ni con la edad (>45 años) de las pacientes ($p=0.247$). Este resultado es inconsistente con la hipótesis de que los estrógenos regulan la expresión de E-cadherina en el CPT bien diferenciado (von Wasielewski y cols., 1997; Carruba y cols., 1995; Brake y cols., 1994; Fujimoto y cols., 1996; Fialka y cols., 1996).

En este sentido, debe tomarse en cuenta que los autores de los estudios citados han estimado el estado hormonal de las pacientes en base únicamente a la edad de las pacientes incluidas (≥ 45 años) (von Wasielewski y cols., 1997). En el presente trabajo se utilizaron la edad y la fecha de última menstruación como indicadores de función ovárica. Consideramos que la fecha de última menstruación es el dato más confiable para definir la situación hormonal en pacientes con CPT bien diferenciado. Es probable que el papel que juegan las hormonas femeninas en la patogénesis del CPT sea a través de otras vías, quizá más complejas, que la sola regulación de E-cadherina y éstas probablemente incluyan receptores de factores de crecimiento.

Expresión del EGF-R y estado hormonal

La activación del receptor de estrógenos por medio de factores de crecimiento en ausencia de estrógenos es un fenómeno bien reconocido a nivel experimental en líneas celulares. En particular, la interacción del EGF-R con el receptor de estrógeno parece estimular en forma significativa la proliferación celular, diferenciación y progresión tumoral (Marquez y cols., 2001; Wilson y cols., 2002). La interacción comentada no se había explorado en pacientes con CPT y nuestro estudio es el primero que determina el papel del EGF-R en pacientes portadoras de CPT en etapas pre y posmenopáusicas. EGF-R estuvo expresado en 14% de los casos, en su mayoría en posmenopáusicas ($p=0.025$) con carcinomas en estadios avanzados ($p=0.050$), pero sin asociación con metástasis ganglionares o a distancia ni con menor supervivencia libre de enfermedad. Lo que indica que la sobreexpresión de EGF-R en CPT bien diferenciado puede ser un evento temprano en la progresión tumoral y de alguna forma relacionado con los niveles de hormonas sexuales. La relación inversa de expresión del EGF-R con el estado funcional de ovarios y su asociación con etapas más avanzadas de la enfermedad neoplásica permite suponer que ésta es una vía con implicaciones importantes en la neoplasia más frecuente de la glándula tiroides.

Correlación ECD y EGF-R

Es aceptado que E-cadherina y EGF-R son marcadores de diferenciación celular (Oka y cols., 1992; Oka y cols., 1993). Ensayos "*in vitro*", sugieren que el EGF-R puede inactivar al complejo E-cadherina/catenina en las células neoplásicas mediante fosforilación de β -catenin (Shiozaki y cols., 1995; Al

Moustafa y cols., 1999; Hoschuetzky y cols., 1994; Lui y cols., 2002). El incremento en la expresión del EGF-R y la desregulación de E-cadherina se han asociado con comportamiento más agresivo en cáncer de mama (Oka y cols., 1993), vejiga (Bringuier y cols., 1993), próstata (Umbas y cols., 1992), páncreas (Pignatelli y cols., 1994), colo-rectal (Nigam y cols., 1993), y estómago (Jawhari y cols., 1997). En nuestro estudio observamos correlación entre la expresión anormal o ausente de E-cadherina y la sobre expresión del EGF-R ($r=0.130$; $p=0.05$). La relación inversa observada en el presente trabajo de la expresión de E-cadherina y EGF-R confirma observaciones previas en líneas celulares. En dichos estudios se utilizaron líneas celulares de cáncer de esófago y pulmón, observando interacción recíproca de E-cadherina y EGF-R que se tradujo en control reversible de adhesión intercelular y proliferación celular (Jawhari y cols., 1999; Hoschuetzky y cols., 1994; Shiozaki y cols., 1995; Al Moustafa y cols., 1999; Sorcher y cols., 1995). Sin embargo, no encontramos correlación entre la expresión de ambas proteínas y el subtipo histológico. Esto parece indicar que ambas proteínas tienen poca o nula participación en la definición del fenotipo del carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado.

Sobrevida y factores pronóstico

Existen pocos estudios que analicen por separado la expresión de E-cadherina y del EGF-R en CPT, en relación al tiempo de sobrevida de los pacientes (Sheumman y cols., 1995; von Wasielewski y cols., 1997; Akslen y cols., 1993; Kapran y cols., 2002). Los resultados obtenidos en un estudio han evidenciado que pacientes con carcinomas tiroideos con expresión anormal de E-

cadherina cursan con menor sobrevida libre de recurrencia ($p < 0.024$) (von Wasielewski y cols., 1997), y por lo tanto, se ha teorizado que la disminución de la expresión sea considerada como marcador pronóstico que identifique pacientes de alto riesgo. Sin embargo, el estatus hormonal de las pacientes se estimó únicamente en base a edad > 45 años y se analizó al CPT junto con CF, lo que podría ser un confusor importante. En nuestro estudio, sólo las pacientes mayores de 45 años, posmenopáusicas con extensión extra tiroidea y en estadios avanzados (III-IV), estuvieron asociadas con menor sobrevida libre de recurrencia y mostraron mayor tasa de muerte relacionada con la enfermedad. No se identificaron diferencias en la sobrevida de los grupos con y sin recurrencia, al analizar la expresión de E-cadherina, estratificando por estadios. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros grupos (Kapran y cols., 2002). Las diferencias observadas pudieran deberse a un incremento en el tiempo de seguimiento de los pacientes y al mayor número de pacientes incluidos en la presente serie. Aunque no se identifique impacto de la disminución de E-cadherina en la supervivencia de las pacientes tratadas quirúrgicamente en el seguimiento a siete años, es indispensable ampliar el seguimiento de la presente serie porque en esta neoplasia las principales variaciones en las curvas de supervivencia ocurren después de 15 ó 20 años de seguimiento (Herrera y cols., 1996; Gillilan y cols., 1997; Sanders y cols., 1998; Hay y cols., 1999).

En CPT es bien conocido que la frecuencia de recurrencia aumenta con la edad, de hecho las reglas internacionales de estadificación ubican en estadios diferentes a pacientes con tumores idénticos dependiendo si son o no mayores de

45 años (Greene y cols., 2002). Es probable que dicho fenómeno se deba a un cambio en el estado hormonal de las pacientes más que a una disminución en la expresión de E-cadherina o a la activación de otras vías de señalización.

Las neoplasias malignas frecuentemente muestran sobre expresión del EGF-R, proteína que participa en la progresión tumoral mediante estimulación de la proliferación celular, invasión y metástasis (Gabler y cols., 1997). Inclusive en algunas neoplasias malignas la sobre expresión del EGF-R se ha relacionado con menor sobrevida (Gamboa y cols., 2004). En tiroides la sobre expresión del EGF-R en CPT se ha asociado con mayor extensión extra tiroidea ($p=0.009$) (Akslen y cols., 1993). En nuestro estudio la expresión membranosa del EGF-R, no mostró asociación con sobrevida libre de recurrencia. Estos datos coinciden con lo informado por Akslen y cols., que analizaron la expresión del EGF-R en 173 pacientes con CPT y no encontraron asociación de la expresión membranosa del receptor con sobrevida libre de recurrencia (Akslen y cols., 1993).

Al considerar la intensidad de expresión de EGF-R además del porcentaje de células marcadas, observamos mayor expresión en los casos recurrentes. Este resultado favorece la idea de que EGF-R sea un blanco potencial en el tratamiento del CPT. Sin embargo, creemos que se debe ampliar el número de casos de CPT bien diferenciado con recurrencias antes de avalar por completo lo anterior. En la presente serie, la posibilidad de sesgo en identificar el valor pronóstico de E-cadherina y EGF-R con respecto a sobrevida por efecto del tipo histológico se eliminó.

Riesgo relativo

Existen varios factores útiles para clasificar a los pacientes con CPT en grupos de alto riesgo (Sugitani y cols., 2004). Sin embargo, la importancia de factores pronósticos que incluyen al estatus hormonal de las pacientes, la expresión de E-cadherina y la del EGF-R, aún no está bien comprendida. En nuestro estudio, se estimó el riesgo que tenían las pacientes postmenopáusicas de desarrollar recurrencia del CPT, en comparación con las pacientes premenopáusicas. El grupo de pacientes postmenopáusicas presentó tres veces mayor riesgo de desarrollar recurrencia de la enfermedad (OR=3.022; IC 95%:1.372-6.655), diagnosticarse en estadios avanzados (OR=35.2; IC 95%:15.668-9.674), con extensión extra tiroidea (OR=3.229; IC 95%:1.592-6.547) y metástasis a ganglios linfáticos (OR=0.394; IC 95%:0.194-0.802), en el momento del tratamiento quirúrgico. Los resultados muestran un efecto benéfico del estatus premenopáusico y abre la posibilidad de alternativas de tratamiento con terapia de reemplazo hormonal en posmenopáusicas con CPT bien diferenciado, con la finalidad de disminuir las probabilidades de desarrollo de recurrencia de la enfermedad. En favor de esta idea, observamos que las pacientes posmenopáusicas que refirieron haber recibido terapia hormonal presentaron menor riesgo de recurrencia (OR=0.373; IC 95%:1.24-1.220).

Las pacientes posmenopáusicas y las que se encontraron en estadios III-IV en el momento del tratamiento quirúrgico, presentaron dos veces más riesgo de expresar EGF-R que las premenopáusicas (OR=2.401; IC 95%:1.099-5.242, OR=2.148; IC 95%:0.929-4.673, respectivamente). Además observamos que los tumores con sobre expresión del receptor mostraron una mayor tendencia a la

invasión extra tiroidea (OR=2.255; IC 95%:0.924-5.503). Lo anterior, junto con publicaciones previas de nuestro grupo (Bornstein y cols., 2003), confirma "*in vivo*" observaciones realizadas en líneas celulares mostrando que EGF-R estimula la proliferación celular del CPT (Gabler y cols., 1997). Estas observaciones nos permiten sugerir que la sobre expresión del EGF-R juega un papel importante en el crecimiento del CPT en pacientes posmenopáusicas. La no contribución de la expresión disminuida o ausente de E-cadherina al riesgo de desarrollar recurrencias, debe restarle importancia a esta proteína como predictora de mayor agresividad en CPT bien diferenciado.

CONCLUSIONES

- 1) El estado hormonal de las pacientes parece determinar un comportamiento más agresivo del CPT bien diferenciado, con mayor riesgo de desarrollar recurrencia de la enfermedad.
- 2) Sólo las pacientes postmenopáusicas en estadios avanzados se asociaron con menor sobrevida libre de recurrencias.
- 3) La ausencia de expresión de E-cadherina no se correlacionó en forma significativa con sobrevida, menopausia, metástasis ganglionares, estadio, ni con mayor agresividad de la neoplasia.
- 4) La sobre expresión de EGF-R en CPT bien diferenciado se asoció en forma significativa con estadio avanzado (III-IV) y menopausia.
- 5) Es probable que las hormonas femeninas participen en la regulación del estatus funcional del EGF-R y que esto se asocie a incremento en la proliferación del CPT bien diferenciado, invasión extra tiroidea y mayor agresividad.

BIBLIOGRAFIA

Aasland R, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Co-expression of the genes encoding transforming growth factor- α and its receptor in papillary carcinomas of the thyroid. *Int J Cancer* 1990;46:382-387.

Akslen LA, Myking AO, Salvesen H, Varhaug JE. Prognostic impact of EGF-receptor in papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 1993;68:808-812.

Akslen LA, Varhaug JE. Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma. Presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient survival. *Cancer* 1995;76:1643-1654.

Al Moustafa AE, Yansouni C, Alaoui-Jamali MA, O'Connor-McCourt M. Up-regulation of E-cadherin by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 1999;5:681-686.

Baron AT, Lafky JM, Suman VJ, Hillman DW, Buenafe MC, Boardman CH, Podratz KC, Perez EA, Maihle NJ. A preliminary study of serum concentrations of soluble epidermal growth factor receptor (sErbB1), gonadotropins, and steroid hormones in healthy men and women. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 2001;10:1175-1185.

Barth AI, Nathke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:683-690.

Berrino F, Muti P, Micheli A, Bolelli G, Krogh V, Sciajno R, Pisani P, Panico S, Secreto G. Serum sex hormone levels after menopause and subsequent breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:291-296.

Böhm J, Niskanen L, Tammi R, Tammi M, Eskelinen M, Pirinen R, Hollmen S, Alhava E, Kosma VM. Hyaluronan expression in differentiated thyroid carcinoma. *J Pathol* 2002;196:180-185.

Bornstein QL, Gamboa DA. Telomerase activity in well-differentiated papillary thyroid carcinoma correlates with advanced clinical stage of the disease. *Endocrin Pathol* 2003;14:213-219.

Brabant G, Hoang-Vu C, Cetin Y, Dralle H, Scheumann G, Molne J, Hansson G, Jansson S, Ericson E, Nilsson M. E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 1993;53:4987-4993.

Brake ME, Charlier C, Bruyneel EA, Labit C, Mareel MM, Castronovo V. Tamoxifen restores the E-cadherin function in human breast cancer MCF-7/6 cells and suppresses their invasive phenotype. *Cancer Res* 1994;54:4607-4609.

Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. Decreased E-cadherin immunoreactivity correlates with poor survival in patients with bladder tumors. *Cancer Res* 1993;53:3241-3245.

Carruba G, Miceli D, D'Amico D, Farrugglio R, Comito L, Montesanti A, Polito L, Castagnetta LAM. Sex steroids up-regulate E-cadherin expression in hormone-responsive LNCaP human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;212:624-631.

Eidelman S, Damsky CH, Wheelock MJ, Damjanov I. Expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/180 in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 1989;135:101-110.

Fialka I, Schwarz H, Reichmann E, Oft M, Busslinger M, Beng H. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 1996;132:1115-1132.

Fujimoto J, Ichigo S, Hori M, Morishita S, Tamaya T. Progestins and danazol effects on cell-to-cell adhesion, and E-cadherin and α - and β -catenin mRNA expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1996;57:275-282.

Gabler B, Aicher T, Heiss P, Senekowitsch-Schmidtke R. Growth inhibition of human papillary thyroid carcinoma cells and multicellular spheroids by anti-EGF-receptor antibody. *Anticancer Res* 1997;17:3157-3159.

Gamboa Domínguez A, Domínguez Fonseca C, Quintanilla Martínez L, Reyes Gutierrez E, Green D, Angeles Angeles A, Busch R, Hermannstadter C, Nahrig J, Becker I, Hofler H, Fend F, Luber B. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using standardize immunohistochemical detection System. *Mod Pathol* 2004;17:579-587.

Graff JR, Greenberg VE, Herman JG, Westra W, Boghaert ER, Ain KB, Saji M, Zeiger MA, Zimmer SG, Baylin SB. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998;58:2063-2066.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz AG, Balch ChM, Haller DG, Morrow M, editors. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.

Gillilan FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15,698 cases from the surveillance, epidemiology and end results (SEER) program 1973-1991. *Cancer* 1997;79:564-573.

Gumbiner BM. Cell adhesión: The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996;84:345-357.

Hay ID, Bergstralh EJ, Grant CS, McIver B, Thompson GB, van Heerden JA, Goellner JR. Impact of primary surgery on outcome in 300 patients with pathologic tumor node-metastases stage III papillary thyroid carcinoma treated at one institution from 1940 through 1989. *Surgery* 1999;126:1173-1181.

Hedinger C, Williams Ed, Sobin LH. Histological typing of thyroid tumors. WHO international histological classification of tumors, 2nd ed. Berlin: Springer Verlag, 1988:9-11.

Henderson BE, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT. Endogenous hormones as a major factor in human cancer [Abstract]. *Cancer Res* 1982;42:3232-3239.

Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogen as a cause of human cancer: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 1988;48:246-253.

Herrera MF, López-Graniel CM, Saldaña J, Gamboa-Domínguez A, Richaud PY, Vargas-Vorackova F, Angeles AA, Llorente L, Castillo C, Pérez B, Rivera R,

González O, Rull J. Papillary thyroid carcinoma in mexican patients: clinical aspects and prognostic factors. *World J Surg* 1996;20:94-100.

Hoos A, Urit MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas M, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol* 2001;158:1245-1251.

Hoos A, Stojadinovic A, Singh B, Dudas ME, Leung HY, Shaha AR, Shah JP, Brennan MF, Cordon-Cardo C, Ghossein R. Clinical significance of molecular expression profiles of Hürthle cell tumors of the thyroid gland analyzed via tissue microarrays. *Am J Pathol* 2002;160:175-183.

Hoschuetzky H, Aberle H, Kemler R. Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 1994;127:1375-1380.

Jawhari A, Poole S, Jordan S, Browne P, Pignatelli M, Farthing MJG. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin-catenin complex in gastric carcinoma: relationship with patient survival. *Gastroenterol* 1997;112:46-54.

Jawhari AU, Farthing JG, Pgnatelli M. The E-cadherin/epidermal growth factor receptor interaction: A hypothesis of reciprocal and reversible control of intercellular adhesion and cell proliferation. *J Pathol* 1999;187:155-157.

Jones JL, Royall JE, Walker RA. E-cadherin relates to EGFR expression and lymph node metastasis in primary breast carcinoma. *Br J Cancer* 1996;74:1237-1241.

Kapran Y, Ozbey N, Molvalilar S, Sencer E, Dizdaroglu F, Ozarmagan S. Immunohistochemical detection of E-cadherin, alpha- and beta-catenins in papillary thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest* 2002;25:578-585.

Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H. Estrogen receptors (α and β) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible *in situ* estrogen synthesis and actions. *Mod Pathol* 2003;16:437-444.

La Vecchia C, Ron E, Franceschi S, Dal Maso L, Mark SD, Chatenoud L, Braga C, Preston-Martin S, McTiernan A, Kolonel L, Mabuchi K, Jin F, Wingren G, Galanti MR, Hallquist A, Lund E, Levi F, Linos D, Negri E. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. III. Oral contraceptives, menopausal replacement therapy and other female hormones. *Cancer Causes Control* 1999;10:157-166.

Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PPB. 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.

Lui VW, Grandis JR. EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* 2002;22:1-11.

Mack WJ, Preston-Martin S, Bernstein L, Qian D, Xiang M. Reproductive and hormonal risk factors for thyroid cancer in Los Angeles County females. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1999;8:991-997.

Marquez DC, Lee J, Lin T, Pietras RJ. Epidermal growth factor and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor. *Endocrine* 2001;16:73-81.

Muti P, Bradlow HL, Micheli A, Krogh V, Freudenheim JL, Schunemann HJ, Stanulla M, Yang J, Sepkovic DW, Trevisan M, Berrino F. Estrogen metabolism and risk of breast cancer: a prospective study of the 2:16 alpha-hydroxyestrone ratio in premenopausal and postmenopausal women. *Epidemiology* 2000;11:635-640.

Naito A, Iwase H, Kuzushima T, Nakamura T, Kobayashi S. Clinical significance of E-cadherin expression in thyroid neoplasms. *J Surg Oncol* 2001;76:176-180.

Nass SJ, Herman JG, Gabrielson E, Iversen PW, Parl FF, Davidson NE, Graff JR. Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. *Cancer Res* 2000;60:4346-4348.

Negri E, Dal Maso L, Ron E, La Vecchia C, Mark SD, Preston-Martin S, McTiernan A, Kolonel L, Yoshimoto Y, Jin F, Wingren G, Galanti MR, Hardell L, Glatte E, Lund E, Levi F, Linos D, Braga C, Franceschi S. A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. II. Menstrual and reproductive factors. *Cancer Causes Control* 1999;10:143-155.

Ness GO, Dagny R, Haugen F, Varhaug JE, Akslen LA, Lillehaug JR. Cytoplasmic localization of EGF receptor in papillary thyroid carcinomas: association with the 150-kDa receptor form. *Int J Cancer* 1996;65:161-167.

Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB, Stamp GW, Liu D, Pignatelli M. Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1993;68:507-514.

Nose A, Tsuji K, Takeichi M. Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* 1990;61:147-155.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Tahara H, Tamura S, Miyata M, Doki Y, Iihara K, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Immunohistochemical evaluation of E-cadherin adhesion molecule expression in human gastric cancer. *Virchow Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421:149-156.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res* 1993;53:1696-1701.

Pignatelli M, Ansari TW, Gunter P, Liu D, Hirano S, Takeichi M, Kloppel G, Lemoine NR. Loss of membranous E-cadherin expression in pancreatic cancer: correlation with lymph node metastasis, high grade and advanced stage. *J Pathol* 1994;174:243-248.

Rodríguez-Cuevas S, Labastida AS, Reyes CJM, Rodríguez ME. Papillary thyroid cancer in Mexico review of 409 cases. *Head & Neck* 1993;15:537-545.

Rossing MA, Voigt LF, Wicklund KG, Williams M, Daling JR. Use of exogenous hormones and risk of papillary thyroid cancer (Washington, United States). *Cancer Causes Control* 1998;9:341-349.

Sanders LE, Cady B. Differentiated thyroid cancer: reexamination of risk groups and outcome of treatment. *Arch Surg* 1998;133:419-425.

Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Porta GD, Berger N, Peix JL, Paulin C, Fabien N, Vecchio G, Jenkins RB, Fusco A. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest* 1992;89:1517-1522.

Shapiro L, Fannon AM, Kwong PD, Thompson A, Lehmann MS, Grubel G, Legrand JF, Als-Nielsen J, Colman DR, Hendrickson WA. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature* 1995;374:327-327.

Sheumman GFW, Hoang-Vu C, Cetin Y, Gimm O, Behrends J, von Wasielewski R, Georghi A, Birchmeier W, von Zur MA, Dralle H, Brabant G. Clinical significance of E-cadherin as a prognostic marker in thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2168-2172.

Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M, Mori T. Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer* 1995;71:250-258.

Schipper JH, Frisen UH, Behrens J, Unger A, Janke K, Birchmeier W. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991;51:6328-6337.

Soares P, Berx G, van Roy F, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene alterations are rare events in thyroid tumors. *Int J Cancer* 1997;70:32-38.

Sorcher SM, Russack V, Graziano S, Cagle M, Feramiso JR, Green MR. Immunohistochemical evaluation of E-cadherin and epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 1995;8:450-455.

Sugitani I, Kasai N, Fujimoto Y, Yanagisawa A. A novel classification System for patients with PTC: addition of the new variables of large (3 cm or greater) nodal metastases and reclassification during the follow-up period. *Surgery* 2004;135:139-148.

Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, Carter BS, Karthaus HFM, Schaafsma HE, Debruyne MS. Expression of cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high grade prostate cancer. *Cancer Res* 1992;52:5104-5109.

von Wasielewski R, Rhein A, Werner M, Scheumann GFW, Dralle H, Potter E, Brabant G, Georgii A. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinomas correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997;57:2501-2507.

Wang C, Crapo LM. The epidemiology of thyroid disease and implications for screening [Abstract]. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26:189-218.

Wilson MA, Chrysogelos SA. Identification and characterization of a negative regulatory element within the epidermal growth factor receptor gene first in hormone-dependent breast cancer cells. *J Cell Biochem* 2002;85:601-614.

Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, Simoyama Y, Sugimura T, Hirohashi S. Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7416-7419.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

APÉNDICE

Anexo I. Definiciones operacionales

Recurrencia de la enfermedad: se consideró cuando hubo actividad tumoral loco-regional o metastásica a distancia posterior a que hubieran transcurrido 6 meses o más después de la tiroidectomía (Herrera y cols., 1996).

Persistencia de la enfermedad: aquellos casos que presentaron actividad tumoral loco-regional antes de los primeros 6 meses después de la tiroidectomía (Herrera y cols., 1996).

Tiempo de sobrevida libre de recurrencia: a partir de la fecha de la cirugía y hasta el momento en que se presentó la variable de desenlace o bien hasta la última consulta o revisión asentada en el expediente clínico, cuando no hubo recurrencia de la enfermedad.

Menopausia fisiológica: Definida como la ausencia de sangrado menstrual definitivo relacionado a insuficiencia ovárica por un periodo de tiempo mayor a 12 meses con o sin síntomas climatéricos. Para lo cual, se consideró la fecha de última menstruación (Henderson y cols., 1988)

Menopausia artificial: debida a ooforectomía bilateral o bien a histerectomía con ooforectomía bilateral.

Tiroidectomía total: cuando se resecó ambos lóbulos tiroideos e istmo.

Tiroidectomía subtotal: cuando se resecó completamente un lóbulo y parcialmente el lóbulo contralateral.

Paciente viva con enfermedad: aquella paciente que en la última revisión clínica presentó actividad tumoral.

Paciente muerta con enfermedad: aquella paciente que falleció con actividad tumoral loco-regional o metastásica.

Paciente viva sin enfermedad: aquella paciente que en su última consulta no presentó actividad tumoral loco-regional o metastásica.

Paciente muerta sin enfermedad: aquella paciente que falleció por otras causas, menos por el CPT bien diferenciado.

Adecuado muestreo del tumor: cuando existió material histológico suficiente del CPT bien diferenciado para realizar microarreglos de tejido.

Carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado: tumor epitelial maligno con diferenciación folicular y caracterizado por la formación de papilas, folículos, o bien mixto, con hendiduras nucleares, pseudoinclusiones nucleares y núcleos en vidrio esmerilado (Hoos y cols., 2001).

Tumor encapsulado: tumor rodeado completa o parcialmente por tejido fibroconectivo propio de la neoplasia.

Invasión a tejidos peritiroideos: corroborado en el análisis histológico con invasión a músculo o tejido adiposo peritiroideo.

CPT multicéntrico: aquel tumor que presentó más de un nódulo tumoral en uno o ambos lóbulos tiroideos.

ANEXO II

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F. a _____ de _____ del _____

A quien corresponda:

Yo _____ estoy informada sobre el estudio titulado **"Expresión de E-cadherina y del receptor de factor de crecimiento epidérmico en carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado"**.

Estoy enterada, de que se trata de un estudio de carácter pronóstico que analiza la expresión de E-cadherina y estado hormonal en pacientes con carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado y su asociación con el comportamiento clínico del tumor en nuestra población. Me han informado que no existe riesgo en mi persona. En cambio, se obtendrán beneficios como es iniciar una línea de investigación en busca de nuevos tratamientos que mejoren la sobrevida de las pacientes con carcinoma papilar de tiroides bien diferenciado de alto riesgo. Por otra parte, si rehusó a participar en el estudio, no afectará en absoluto sobre la calidad de atención médica que vengo recibiendo.

Atentamente

Participante en el estudio

Testigo

Testigo

Dr. Fernando Candanedo Glez.
Responsable