

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Médicas

**“CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PERFILES DE
EXPRESIÓN GENÓMICA DIFERENCIAL POR ANÁLISIS DE
MICROARREGLOS DE ADN ENTRE HIPERPLASIA Y ADENOMA
PARATIROIDEOS EN PACIENTES CON
HIPERPARATIROIDISMO PRIMARIO NO FAMILIAR”**

***Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,
Odontológicas y de la Salud
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina***

***Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán***

Dr. David Velázquez Fernandez.

Alumno

Dr. Miguel F. Herrera Hernández.

Tutor, Departamento de Cirugía, INCMNSZ

Dr. Armando Gamboa Domínguez.

Cotutor, Departamento de Anatomía Patológica, INCMNSZ

Dr. Alfredo Reza Albarrán.

Cotutor, Departamento de Endocrinología, INCMNSZ



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.

INDICE

Resumen	3
Antecedentes	4
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos Principales	22
Material y Métodos	23
<i>Estructura del Estudio</i>	23
<i>Definiciones Operacionales</i>	23
<i>Población Seleccionada</i>	25
<i>Criterios de Inclusión</i>	25
<i>Criterios de Exclusión</i>	26
<i>Criterios de Eliminación</i>	26
<i>Número de Sujetos</i>	26
<i>Extracción de ARN</i>	27
<i>Procesamiento del Microarreglo</i>	29
<i>Descripción General del Arreglo</i>	33
<i>Clasificación Funcional de los Genes del Arreglo</i>	35
<i>Lectura e interpretación del Microarreglo</i>	37
<i>Análisis e Interpretación del Microarreglo</i>	39
<i>Análisis Histopatológico</i>	42
Resultados	43
<i>Adenoma Paratiroideo versus Paratiroides Normal</i>	46
<i>Hiperplasia Paratiroidea versus Paratiroides Normal</i>	48
<i>Hiperplasia Paratiroidea versus Adenoma Paratiroideo</i>	51
Discusión	53
Adenoma Paratiroideo	54
Hiperplasia Paratiroidea	56
Otros Estudios	58
<i>En búsqueda de una firma molecular</i>	60
Conclusiones	61
Bibliografía	63
Publicación	67

RESUMEN:

Antecedentes: El hiperparatiroidismo primario (HPTP) es un problema clínico relativamente frecuente, ocasionado por una secreción anormalmente elevada de paratohormona (PTH) por las glándulas paratiroides. Esto produce una elevación anormal del calcio en la sangre lo que produce muy diversa y heterogénea sintomatología. La causa más frecuente de HPTH es adenoma (aproximadamente en el 80%), seguido por hiperplasia (15%) y cáncer o adenomas dobles (5%). La indicación de cirugía de una manera oportuna es de vital relevancia para el manejo de estos pacientes, así como para evitar la aparición de complicaciones como la insuficiencia renal por nefrocalcinosis o litiasis. A pesar de las nuevas herramientas de diagnóstico histopatológico, el diagnóstico diferencial entre adenoma e hiperplasia en el HPTP todavía sigue siendo un problema clínico vigente. Aunque algunos parámetros morfológicos pueden ayudar a categorizar estas entidades, ninguno es requisito absoluto para el diagnóstico. Hasta la fecha no existe ningún marcador clínico, celular, histológico, genético, bioquímico o molecular que pueda diferenciar de una manera eficiente y precisa al adenoma de la hiperplasia paratiroides.

Hipótesis: La expresión genómica diferencial obtenida por análisis de microarreglos de ADN complementario (ADNc) permitirá diferenciar al adenoma de la hiperplasia paratiroides por patrones o grupos de genes en pacientes mexicanos con HPTP esporádica.

Objetivos: Evaluar las diferencias en los perfiles de expresión genómica transcripcional entre hiperplasia paratiroides esporádica (SPH), adenoma y tejido paratiroides normal por medio de microarreglos de expresión formato I (spotted microarrays).

Material y Métodos: Se decidió incluir muestras de tejido paratiroides de 12 pacientes con adenoma paratiroides, 2 con SPH y 2 biopsias de glándulas paratiroides normales. Todos los casos fueron seleccionados, diagnosticados, operados y seguidos por al menos 6 meses en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). En los casos de adenoma se requirió de al menos 6 meses de normocalcemia después de la cirugía para confirmar el diagnóstico. Se realizaron hibridaciones competitivas de ADNc obtenido a partir de RNA total en microarreglos que contenían 19,968 clonas de ADNc humano incluyendo replicados contiguos. Se realizaron comparaciones directas mediante marcaje fluorescente reverso entre muestras conjuntas por entidad (pool). Los niveles de expresión fueron analizados utilizando algunos programas como SAM, SMA, LIMMA, Cluster y PAM de ambiente R para complementar el análisis computacional estadístico.

Resultados: En nuestros resultados encontramos diferencias significativas entre adenomas y SPH. En la comparación directa entre estas dos entidades, un total de 200 genes resultaron diferencialmente expresados (DE) con un valor de $p < 0.03$ de los cuales 61 genes se encontraron sobrerregulados (>1.6 veces) y 139 infraregulados (>1.6 veces) con un valor $B > 4.7$. Cuando SPH fue comparada contra tejido normal, 50 genes resultaron DE, 42 sobrerregulados (>1.9) y 8 infraregulados (>1.7) con un valor de $B > 4.3$. Al menos 17 genes DE fueron útiles para discriminar SPH de adenoma o tejido normal. Los genes sobrerregulados estaban principalmente relacionados a funciones celulares como inhibición de apoptosis, proliferación celular, actividad transcripcional y adhesión celular entre otras. Los genes infraregulados estaban principalmente involucrados en actividad de bombas iónicas, lipopolisacáridos, actividad enzimática (vgr. La prostaglandin-sintasa) y en la síntesis de proteínas integrales de membrana.

Conclusión: Nuestros resultados indican que es posible diferenciar a SPH de adenoma en base a sus firmas moleculares, y que teóricamente estas firmas podrían ser utilizadas para el diagnóstico diferencial entre estas dos entidades y respecto a tejido paratiroides normal.

ANTECEDENTES:

El hiperparatiroidismo primario (HPTP) es una enfermedad que se caracteriza por la secreción aumentada anormal de la hormona paratiroidea (PTH) por las glándulas paratiroides. Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son muy variadas, presentándose desde simple constipación, náusea, poliuria y fatiga hasta manifestaciones graves como uremia, miopatía, psicosis, estupor, asistolia y coma¹⁻³. Todos estos hallazgos clínicos corresponden a la hipercalcemia debido a la hipersecreción de PTH, aunque es importante reconocer que existen otras causas que también elevan de manera anormal la concentración del calcio en la sangre. Otras causas de hipercalcemia son secundarias al uso de algunos medicamentos como las tiazidas o las neoplasias malignas¹. Si bien aproximadamente el 80% de las hipercalcemias son debidas a HPTP (debido a la sobreactividad de la glándula paratiroides) en algunas ocasiones esta enfermedad cursa asintomática.

El HPTP tiene una prevalencia en población general de hasta 1 en 200 (independientemente del género), siendo además es más frecuente en mujeres (principalmente en posmenopáusicas) y en mayores de 60 años²⁻⁵. El HPTP es un problema relativamente frecuente, diagnosticándose aproximadamente 100,000 casos cada año en los EEUU. En el 90% de los casos de pacientes ambulatorios con hipercalcemia, la causa es el HPTP^{1,2,6}.

En aproximadamente el 80% de los casos la causa más frecuente del HPTP es el crecimiento de una de las cuatro glándulas paratiroides, denominándose en este caso adenoma. Mientras que la segunda causa en la proporción restante de los casos puede ser debido a cualquiera de las siguientes entidades: hiperplasia primaria de las paratiroides (15%), carcinoma paratiroideo (1-2%), o adenomas dobles (2-3%)^{1,2,4,7-10} que son habitualmente más frecuentes (9%) en personas mayores de 60 años¹. Otras causas menos frecuentes de HPTP son las de origen familiar, como la que ocurre en los síndromes de neoplasia endocrina múltiple (NEM). Algunos fármacos también pueden ocasionar hipercalcemia, como la terapia con litio en pacientes con trastornos bipolares de la personalidad, el abuso de fármacos como diuréticos tiazídicos, estrógenos, andrógenos, tamoxifeno, el síndrome de leche-álcali y la intoxicación con vitamina A o D^{1,2}. Para establecer una modalidad terapéutica adecuada es necesario distinguir si la

causa del hiperparatiroidismo es primaria o secundaria. En el caso del HPTP, el tratamiento puede ser médico o quirúrgico.

El tratamiento quirúrgico del HPTP esporádico está indicado en aquellos casos sintomáticos o con complicaciones como la nefrolitiasis o enfermedad ósea, y en aquellos casos que siendo la hipercalcemia asintomática el paciente presenta cualquiera de las siguientes condiciones^{5,10-12}.

- 1) Una reducción en la depuración de creatinina en un 30% en relación a personas normales pareadas por edad,
- 2) excreción de calcio urinario confirmado en un volumen total de orina de 24 horas superior a los 400 mg (10 mmol),
- 3) densidad ósea reducida en más de 2.5 desviaciones estándar (en score de t) por debajo de la densidad ósea en sujetos controles pareados por edad, género y raza,
- 4) si el paciente es menor a los 50 años,
- 5) Calcio sérico de 1 a 1.6 mg/dL (0.25 a 0.4 mM) por arriba del rango normal de referencia aceptado, y
- 6) Pacientes en quienes la vigilancia y seguimiento médico no sean factibles^{11,13}.

La paratiroidectomía o resección de la(s) glándula(s) paratiroides es la alternativa que actualmente se considera la base del tratamiento definitivo del HPTP, aunque la estrategia quirúrgica depende de la causa del hiperparatiroidismo y esta puede ser decidida transoperatoriamente por el cirujano. En algunos casos se cuentan con estudios de localización preoperatorios, que en caso de confirmar la presencia de un adenoma (una sola glándula crecida) podría favorecer el abordaje quirúrgico mínimamente invasivo de manera ambulatoria (ya sea endoscópico o mínimo con anestesia regional)^{3,14-16}. Desafortunadamente la localización preoperatoria no siempre es útil ni totalmente discriminatoria para poder establecer de manera contundente el diagnóstico de adenoma o hiperplasia, requiriéndose en una proporción de hasta el 50% de los casos de la exploración bilateral con la visualización directa de las 4 glándulas paratiroides³. Por tal motivo se ha establecido que el mejor método para localizar la glándula paratiroides patológica es la exploración transoperatoria efectuada por un cirujano experimentado. Así de manera convencional, cuando no se cuenta con estudios de localización

preoperatorios se recomienda la exploración de las 4 glándulas paratiroides. Ahora bien, si se descubre durante la cirugía que alguna glándula paratiroides tiene un tamaño aumentado (> 7 mm en el diámetro mayor^{1,13}), ésta puede considerarse un adenoma y debe removerse, mientras que las demás glándulas deben de ser visualizadas y en caso necesario (cuando se duda de su apariencia normal) pueden incluso ser biopsiadas. Si las demás glándulas son pequeñas, el diagnóstico final muy probablemente sea el de un adenoma paratiroides. Ahora bien, si coexisten varias glándulas crecidas, el diagnóstico más probable será el de hiperplasia paratiroides y en este caso se deberá realizar una paratiroidectomía de 3½ de las glándulas paratiroides (fig 1), dejando el tejido remanente suficiente sólo para prevenir hipocalcemia¹⁻³.

En algunas ocasiones se pueden encontrar dobles adenomas (2-5%)^{1,3} lo que complica aún más la decisión durante la cirugía sobre cuántas y cuáles glándulas son las que se deben extirpar. En muchos de estos casos el análisis histopatológico es desafortunadamente de poca utilidad en la determinación de tejido paratiroides normal, adenoma e hiperplasia, ya que estos diagnósticos se basan en la morfología observada (tamaño y diferencia de tamaño con las otras glándulas) durante la cirugía^{1,2}. La tasa de recurrencia de hipercalcemia es alta cuando el diagnóstico fue el de hiperplasia, principalmente para los casos no esporádicos o familiares de NEM, en los que puede existir una predisposición genética para el desarrollo neoplásico. En tales casos, el remanente paratiroides debe de removerse del cuello e implantarse fraccionado en los músculos del antebrazo para permitir su remoción subsecuente en caso de que la hipercalcemia recurra.

En manos de un cirujano experimentado, la tasa de curación de un adenoma paratiroides es superior al 95%, mientras que para hiperplasia es más baja porque existe la posibilidad de glándulas no exploradas y por tanto de una mayor probabilidad de recurrencia del hiperparatiroidismo, principalmente en pacientes con NEM. En estos casos existe una frecuencia del 20% de hipercalcemia persistente o recurrente. Es por este motivo que resulta muy importante no sólo identificar el adenoma sino identificar también a las otras glándulas para estar completamente seguro de que no hay otra anormal. El tratamiento quirúrgico adecuado durante el transoperatorio define la evolución y pronóstico de la enfermedad^{5, 9, 10, 12, 15, 16}.

Las complicaciones de la cirugía incluyen lesión al nervio laríngeo recurrente, y lesión o devascularización de las glándulas paratiroides remanentes, lo que produciría por lo tanto hipoparatiroidismo o secreción deficiente de PTH. El paciente con hipoparatiroidismo desarrolla hipocalcemia como consecuencia de la producción deficiente de esta hormona. En manos de un cirujano con amplia experiencia la frecuencia de estas complicaciones es menor al 1%^{1,2,4,17}.

De acuerdo a estudios previos^{1,2,18}, la adecuada diferenciación entre adenoma e hiperplasia paratiroidea ha demostrado ser un determinante crítico en el éxito de la intervención quirúrgica para el HPTP. La discriminación entre enfermedad uni- o poliglandular, parece ser tan fundamental para el éxito de esta cirugía como lo son el conocimiento adecuado por parte del cirujano de la embriología, anatomía y variantes en la localización de las glándulas paratiroides.

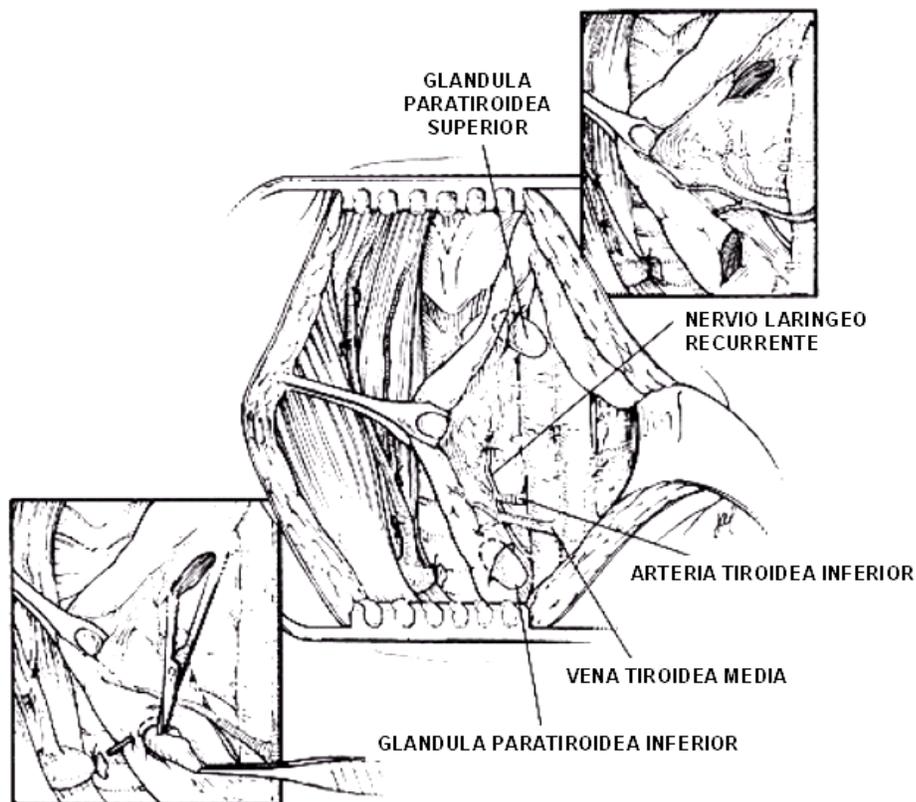


Figura 1. Resección quirúrgica de las paratiroides. Identificación y disección de las glándulas paratiroides izquierdas, identificación del nervio laríngeo recurrente y exéresis de las glándulas. En los casos de hiperplasia se realiza la resección de 3 ½ glándulas, dejando marcada con hemoclips la glándula restante.

Para el diagnóstico definitivo entre adenoma e hiperplasia paratiroides, actualmente se cuenta con dos métodos: la apariencia macroscópica de las glándulas y el análisis histopatológico (por microscopía de luz). Sin embargo, ambos métodos son poco específicos y no discriminan al menos un 30% de los casos con hiperplasia, diagnosticándolos equívocamente como adenomas^{1,2}. Tampoco se ha observado alguna correlación entre el tipo celular predominante y la magnitud de la hiperfunción resultante^{1,2}. Sin embargo, existen algunas características o criterios morfológicos que pueden ayudar a diferenciar a estas dos entidades. En el caso del adenoma paratiroideo, este se considera una neoplasia benigna cuyo peso puede ser variable (de decenas a cientos de miligramos de tejido, considerando que el peso normal es de hasta 70 mg), de forma ovoidea, bien encapsulado, blando, ocasionalmente con áreas de hemorragia o espacios quísticos, que está compuesto de tipos celulares puros o con poblaciones celulares mixtas en algunas ocasiones^{1,2,7}.

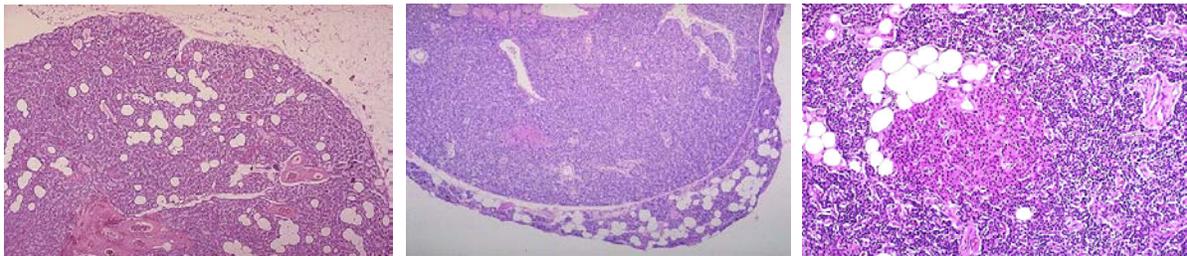


Figura 2. Aspecto microscópico de las paratiroides normal (izquierda) en la cual se puede apreciar la proporción de células grasas (espacios vacíos) y oxifílicas (rosas), mientras que en adenoma (centro) éstas se encuentran formando un “anillo” periférico al adenoma en la que las células oxifílicas ocupan una mayor densidad, mientras que en hiperplasia (derecha) esta proporción, como en la paratiroides normal, es muy variable (tomado de <http://library.med.utah.edu/WebPath/jpeg4/ENDO044.jpg>).

La variedad más común de adenoma se compone de células principales, pero también se presentan con frecuencia muchas células transicionales oncocíticas y células oxifílicas. A menudo las células principales son ligeramente mayores de lo normal, con variaciones en el tamaño tanto de las propias células como de sus núcleos. A veces se observan en estas lesiones benignas núcleos pleomórficos hiper cromáticos, en ocasiones de forma binucleada. En casos poco frecuentes, el adenoma se compone en gran parte de células claras. Son extremadamente raros los casos de adenoma que están compuestos básicamente por células oxifílicas. Algunas veces se puede observar en el exterior de la

cápsula un anillo de tejido paratiroideo normal (figura 2), lo que puede servir para diferenciar la lesión adenomatosa de la hiperplasia difusa, aunque éste no es un requisito absoluto para el diagnóstico de adenoma ya que sólo se identifica entre el 50 al 60% de estos casos ^{1,2 7,19}.

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)²⁰, se consideraron los siguientes parámetros para el diagnóstico histopatológico de la causa del HPTH en 40 pacientes. Los parámetros utilizados para diferenciar adenoma de hiperplasia fueron: la presencia de células grasas, la presencia de un anillo de tejido normal en la periferia y el número de células diferentes. La concordancia entre tres histopatólogos para estas características y por tanto para el diagnóstico diferencial entre adenoma e hiperplasia fue relativamente bajo (menor a 0.56), confirmándose el diagnóstico entre adenoma e hiperplasia paratiroides todavía sigue siendo un problema clínico vigente.

Debido a este problema en los últimos años han aparecido algunos estudios clínicos, histopatológicos y moleculares con el propósito de diferenciar al adenoma de la hiperplasia, con el objetivo práctico de facilitar el diagnóstico y manejo clínico de estos pacientes. Sin embargo, hasta la fecha ninguno de estos estudios ha logrado identificar algún marcador clínico, celular, histológico, genético, bioquímico o molecular que pueda diferenciar de una manera categórica y precisa a estas dos entidades^{1,21}.

Aún cuando se especula que el aumento en el número de células paratiroides (masa de células o volumen) es lo que determina la hipersecreción de PTH, se ha demostrado que más bien es la combinación de la proliferación anormal con la secreción modificada de PTH lo que determina la hipercalcemia¹. De hecho se ha sugerido que la mutación primaria sería la responsable de una hipersecreción de PTH lo que ocasionaría un incremento en la proliferación celular y posteriormente del volumen de las glándulas. El estímulo de PTH se detendría cuando se alcanzara el nivel de calcio plasmático genéticamente determinado por las células paratiroides hipersecretoras^{1,22}.

El recambio de las células paratiroides es normalmente muy bajo, aunque en algunas situaciones como hipocalcemia y deficiencia de calcitriol las células paratiroides son estimuladas a salir de una fase G₀ para entrar en división celular^{1,23, 24}. Esta circunstancia

podría explicar la predisposición que tienen los ancianos a desarrollar hiperparatiroidismo secundario, principalmente en climas asociados a una exposición solar limitada.

Desde el punto de vista molecular, se ha especulado que hasta el 75% de los adenomas paratiroides podrían tener un origen monoclonal^{1,21,25}, lo que quiere decir que es probable que haya ocurrido una mutación oncogénica en la célula original o progenitora de la clona^{2,7,8}. Esta hipótesis ha tenido sustento en el hecho de que algunas mutaciones son comunes para todas las células del adenoma de paratiroides.

Por otro lado también se ha reportado que alrededor del 25% de los adenomas paratiroides esporádicos tienen una delección del brazo largo del cromosoma 11 (11q12-13), que se piensa elimina un gen con actividad supresora de tumores^{2,8,21,26}. Este locus corresponde al gen mutado en la neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (*MEN1*) el cual codifica para una proteína denominada menina que supuestamente tiene un papel relevante en la producción de esta endocrinopatía familiar múltiple con una herencia mendeliana de tipo autosómica dominante^{3,21,27}.

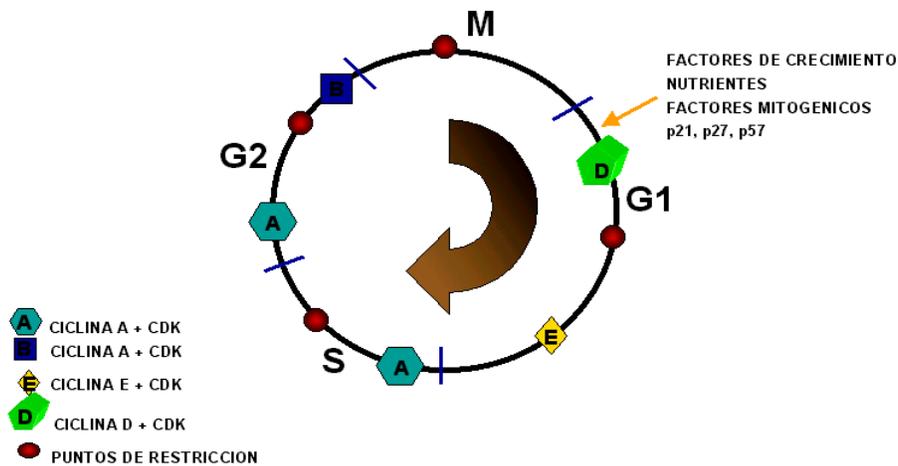


Figura 3. Ciclinas participantes en las diversas fases del ciclo celular.

Otro 40% de los adenomas muestran una pérdida alélica en el brazo corto del cromosoma 1 que involucra al telómero (1p32-pter)^{2,28}. Todavía no se ha identificado ningún gen específico pero es posible que también se trate de un gen supresor de tumores^{2,8,28}. Otra

mutación más rara, pero no menos interesante, y presente en la mayoría de los adenomas esporádicos de gran tamaño, es el rearrreglo cromosómico por inversión del cromosoma 11 que involucra a un gen denominado *CCND1* que juega un papel regulatorio en el ciclo celular (codifica para una ciclina D) y cuya expresión se encuentra regulada por el promotor del gen de PTH. Este rearrreglo da por resultado la sobreexpresión marcada de *PRAD1* (del inglés parathyroid adenoma 1, oncogen de ciclina D1) en la célula paratiroidea^{17,21,29}. Este gen codifica para una proteína reguladora del ciclo celular denominada ciclina D1, la cual se expresa normalmente con niveles elevados en la fase G₁ del ciclo celular^{17,21,29} (fig 3) y permite la entrada de la célula a la fase mitótica. Además esta ciclina no sólo tiene actividad al inicio de G₁, al parecer también participa durante las fases restantes, induciendo la actividad de otras ciclinas como la E, A y B para continuar con las diversas fases del ciclo celular (fig 4)¹⁷.

En un trabajo publicado por Imanishi y cols.²⁹ en un modelo experimental transgénico en ratones, se demostró que la mutación de *PRAD1* y la sobreexpresión de la ciclina D1 no sólo produjo el desarrollo de una proliferación celular anormal de las glándulas paratiroideas, sino también el desarrollo de un hiperparatiroidismo crónico, bioquímicamente demostrado por la elevación persistente de PTH y el calcio sérico³⁰. Este es el primer modelo animal en el que se logra reproducir el HPTP humano estableció una evidencia sólida respecto a la proliferación excesiva o anormal producida directamente por la simple sobreexpresión de la ciclina D1. Estos mismos autores sugirieron que la regulación alterada de las proteínas que regulan el ciclo celular es la causa de las diferencias entre la hiperplasticidad y la secreción anormal hormonal de PTH que muy probablemente están asociadas a otras mutaciones o defectos en la regulación del ciclo celular de la célula paratiroidea³⁰.

El tejido paratiroideo normal habitualmente se encuentra en fase G₀, por lo que la expresión de la ciclina D1 es baja o casi nula (<6%) según lo demostrado por algunos autores³¹. Sin embargo en el tejido anormal (hiperplásico) o tumoral (adenoma), esta ciclina por el contrario se encuentra sobre-expresada, al igual que en otras neoplasias malignas como son el linfoma de células B, el cáncer de mama y el cáncer del esófago^{1,8,28}. Con esta evidencia, la ciclina D1 ha sido implicada en la evolución neoplásica o de la proliferación anormal del tejido paratiroideo y de otros tejidos principalmente de estirpe epitelial^{1,2,8}.

Se han documentado otras pérdidas alélicas en HPTH que se cree puedan corresponder a algunos genes supresores de tumores. Algunas de las pérdidas se encontraron en los cromosomas 1q, 6q, 9p, 15q, 16p y 19q^{8,26,27}. Esta información podría enfatizar la heterogeneidad molecular subyacente en el proceso de la adenomatosis paratiroidea^{8,26}.

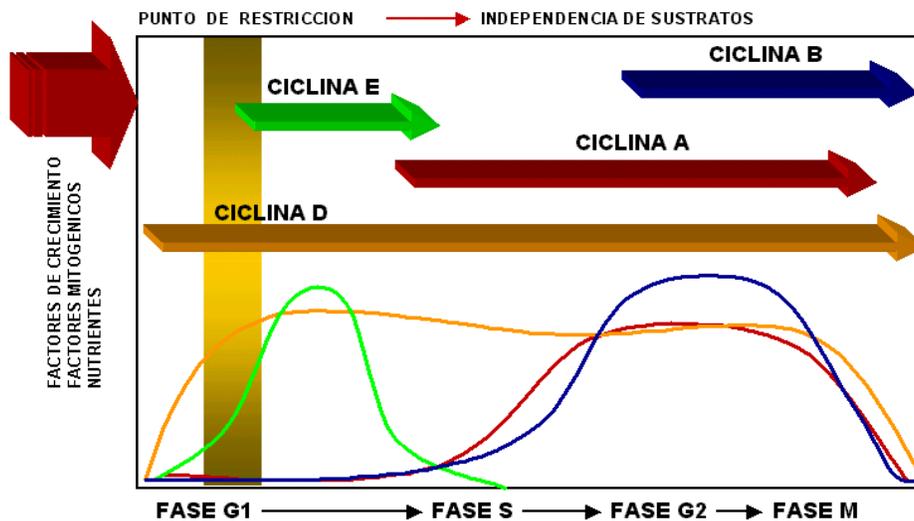


Figura 4. Síntesis y actividad de cada una de las ciclinas a lo largo del ciclo celular.

Existen otras proteínas cuya actividad, aunque es menor en la regulación del ciclo celular, también producen la progresión a la división y proliferación celulares. Así, muchos factores de crecimiento (principalmente en la paratiroides) activan a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PIP_2) en dos segundos mensajeros: el diacilglicerol (DAG) y el inositol 1,4,5, trifosfato (IP_3). El DAG es capaz de activar a la proteincinasa C (PKC), la cual estimula la transcripción génica y proliferación celular. A esta vía se le conoce como la vía de PKC y es una de las vías de activación de la transcripción más importantes^{1,17,32}. PKC también tiene una función establecida en la célula paratiroidea. Se cree que esta vía contribuye a la hipersecreción de PTH en el contexto del HPTH¹. Esta hipersecreción también puede ser resultado de una disminución en el número de receptores sensibles al calcio en la célula paratiroidea, la cual al perder

la sensibilidad normal al calcio extracelular no suprime la síntesis del ARN mensajero para PTH, lo que podría agravar clínicamente el HPTP^{1,22,33}.

Por otro lado es posible que algunas mutaciones influyan también en la expresión de todos estos genes, principalmente en las vías de señalización intracelular como la activación constitutiva del receptor sensor del calcio y la vía de PLC/PKC. Estas mutaciones también podrían contribuir al desarrollo de los adenomas paratiroideos esporádicos. Se cree que mutaciones en esta vía podrían modificar la sensibilidad del receptor sensible al calcio en la célula paratiroidea, u otras proteínas corriente abajo en la vía de señalización, lo que puede conducir a la proliferación anormal del tejido paratiroideo^{1,8}.

Ahora bien y como se comentó previamente, la segunda causa del HPTP es la hiperplasia, por lo que se convierte en el primer diagnóstico diferencial a estudiar. La hiperplasia paratiroidea ocurre de manera espontánea ocasionando del 12 al 15% de los casos con HPTP de origen esporádico, así como otras tres formas de hiperparatiroidismo de origen familiar que son: NEM1, NEM2a y el hiperparatiroidismo familiar aislado^{1,2,34}.

Desde el punto de vista histopatológico, la hiperplasia paratiroidea se define como el incremento absoluto de células principales, células oncocíticas y oncocíticas transicionales, mezcladas con elementos estromales que afectan a múltiples glándulas paratiroideas en ausencia de un estímulo conocido para la hipersecreción de PTH¹. Clínicamente la hiperplasia no es diferente al adenoma, aunque la hiperplasia se asocia más frecuentemente a síndromes familiares como NEM. Morfológicamente la hiperplasia puede adquirir cualquiera de tres patrones: un patrón clásico (células principales mezcladas con células transicionales y oncocíticas en un arreglo nodular), patrón pseudoadenomatoso (con elementos estromales) y un patrón oculto (se confunde con un adenoma paratiroideo). Si bien estas características podrían ayudar a establecer el diagnóstico entre adenoma e hiperplasia, ninguna de ellas es categórica para el diagnóstico, y la concordancia entre patólogos es muy baja²⁰.

Por otro lado, tradicionalmente la hiperplasia paratiroidea es vista como un ejemplo de verdadera hiperplasia, es decir, de una expansión policlonal del número de células paratiroideas y no exclusivamente de una sola célula original mutada como en el

adenoma^{1,2}. La expansión policlonal se ha asociado a la estimulación de factores tróficos o factores genéticos comunes en todo el tejido involucrado (vgr. mutación en el gen *RET*), mientras que la expansión monoclonal se ha asociado principalmente a una mutación somática que le confiere ciertas ventajas a esa clona como una mayor supervivencia o proliferación^{29,35}. Tanto la expansión policlonal como la hiperplasia pueden ocurrir en tejidos epiteliales con función endocrina, en los casos en los que una hormona trófica como la hormona estimulante de la corteza adrenal o adrenocorticotropa (ACTH) se encuentra en exceso, como por ejemplo en la hiperplasia adrenal bilateral. En la hiperplasia paratiroidea, esta condición es debida directamente a la hipocalcemia, o niveles bajos de calcitriol (que es el estímulo principal en el hiperparatiroidismo secundario)^{1,29}, hiperfosfatemia y a la influencia de algunos factores de crecimiento locales. El efecto final de todos estos factores sobre la célula paratiroidea es la secreción de PTH, cuya función secretora aumenta^{1,2,7,8,23}. Esta función incrementada se puede deber ya sea a la pérdida de función de genes supresores de tumores (como ocurre en NEM1), o a la ganancia de función o sobreexpresión de algunos genes como *RET* (en NEM2A) que actúan como factores de crecimiento^{1,7}. Algunas de las características morfológicas y moleculares tanto del adenoma como de la hiperplasia paratiroideas se resumen en el cuadro 1.

Una situación diferente ocurre en el carcinoma paratiroideo, en la que se han determinado otros factores moleculares y genéticos. En éste, frecuentemente ocurre una pérdida alélica de un gen supresor de tumores que también interviene en fases tempranas del ciclo celular y que es conocido como gen *RB1* (de retinoblastoma, porque fue descrito en esta enfermedad por primera vez). De hecho, las ciclinas D y E tienen actividad sobre la proteína *RB1* que funciona como un represor transcripcional y que al ser bloqueado por estas ciclinas se inhibe su actividad y se inicia la producción de cinasas que promueven la progresión del ciclo celular. Es indispensable la actividad de la ciclina D para la transición del punto de restricción en G₁³⁶. Algunos otros carcinomas muestran pérdidas alélicas de otro gen: el *P53*; aunque cabe mencionar que las mutaciones en *P53* y *RB1* no ocurren comúnmente en los adenomas como en otros tipos de carcinomas^{1,2}.

Además se ha sugerido que el adenoma podría ser una condición precedente al de carcinoma de paratiroides. Esta hipótesis se basa en las pérdidas tempranas de 1p y 11q13 que se han documentado en adenomas y que preceden a otras pérdidas alélicas en los carcinomas con diferencias significativas en mayor número de pérdidas alélicas,

principalmente en loci candidatos de genes supresores de tumores y oncogenes que potencialmente podrían jugar un papel importante en la carcinogénesis paratiroidea^{37, 38}. Algunos otros oncogenes se han encontrado también asociados a carcinoma paratiroideo, como la expresión incrementada de *C-MYC* y *C-FOS* que han sido asociados a proliferación no controlada de las células paratiroideas¹. Las mutaciones en oncogenes como *RET*, aún cuando son frecuentes en síndromes como NEM2, realmente son muy raras en tumores paratiroideos esporádicos^{1,2}.

ADENOMA	HIPERPLASIA
<i>Responsable del 80% de casos con HPTH Neoplasia benigna</i>	<i>Responsable del 15% de casos con HPTH Hiperplasia verdadera</i>
<i>Población pura de células principales, oncocíticas y transicionales (apariencia monomórfica) Células más grandes de lo normal, núcleos hipercromáticos, atipia y con aumento en el contenido de ADN Muchos patrones histológicos Pocas células grasas o ausentes Ribete de tejido paratiroideo normal (60%) Áreas de hemorragia o espacios quísticos de manera ocasional</i>	<i>Incremento de células principales, oncocíticas y transicionales (apariencia polimórfica) mezclada con elementos estromales Arreglo nodular al principio</i>
<i>Afecta a 1 ó 2 glándulas. La glándula se encuentra crecida al doble del tamaño normal y el resto es normal.</i>	<i>Afecta a múltiples glándulas, usualmente a las cuatro, aunque puede haber hiperplasia asimétrica.</i>
<i>Expansión monoclonal de células</i>	<i>Expansión policlonal de células</i>
<i>Mutaciones somáticas Mutaciones en proteínas de ciclo celular y proto-oncogenes Alteraciones en la vía de la PKC y del receptor sensible al calcio 25-40% del 11q12 (NEM1) 40% del 1p32-pter 20-40% inversión pericentromérica del cromosoma 11 (PRAD1/ciclina D1) 40% sobreexpresan ciclina D1</i>	<i>Estimulación de factores tróficos y hormonas Asociada principalmente a endocrinopatías familiares (NEM1 y RET) 61% (11/18) sobreexpresan ciclina D1³¹</i>

Cuadro 1. Resumen de algunas características morfológicas y moleculares entre el adenoma y la hiperplasia de las glándulas paratiroideas.

Por otra parte, se ha documentado que los factores de crecimiento con limitada actividad sobre la célula paratiroidea como lo son: el factor de crecimiento similar a la insulina (Insulin-like growth factor – I ó *IGF-I*), el factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor ó *EGF*) y el factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblastic Growth Factor ó *FGF*), podrían tener un efecto pro-mitogénico en el tejido paratiroideo^{1,39}. Muchos de estos factores de crecimiento no sólo promueven el ciclo celular sino que simultáneamente pueden inhibir la muerte celular programada o apoptosis, acentuando

aún más el efecto de otros factores mitogénicos y de crecimiento e induciendo mayor proliferación^{17,35,40}.

Aunque los conocimientos actuales son todavía muy fragmentados o aislados, existe evidencia de que la progresión neoplásica en la glándula paratiroidea muy probablemente involucre modificaciones tanto en ciclo celular como en la muerte celular programada⁴⁰. La muerte celular programada o apoptosis, se define como una serie de eventos normales que ocurren dentro de una célula que llevan a la muerte celular, en la cual se fragmenta el ADN nuclear por enzimas específicas denominadas caspasas. Las caspasas son proteasas ricas en cisteína que escinden proteínas después de un residuo de asparagina (de ahí su nombre de c-asp-asas). A pesar de que existen múltiples vías como la de la MAP cinasa (MAPK) y PKC que comparten vías de transducción de señal para la inhibición de la apoptosis, con la estimulación del ciclo celular, las dos vías de la apoptosis comparten un efector común final: la caspasa 3, que es la encargada de la fragmentación del ADN.

Algunos estudios han sugerido que alteraciones en el balance de ciclo celular y apoptosis podrían inducir a la hipersecreción crónica de PTH³⁰. En estos trabajos se han investigado algunos marcadores de apoptosis como Bax y Bcl-2 (los dos participantes de la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis) encontrándose significativamente más expresados en tejido paratiroideo anormal (tanto en HPTH como en secundario) que en el tejido paratiroideo normal⁴¹. Sin embargo ninguno de estos estudios fue más allá en la diferenciación de adenoma con hiperplasia por lo que sus conclusiones no son definitivas. Otro estudio demostró que el péptido relacionado a PTH (PTHrp) y PTH pueden regular el ciclo celular y la apoptosis en osteoclastos y en algunos tipos de cáncer, como el mamario^{42,43}.

Con el advenimiento de la genómica, se ha logrado la secuenciación sistemática y completa de algunos genomas vegetales y animales. Esto se ha podido lograr debido a los avances en la biología molecular, principalmente en la síntesis artificial de ADN (ácido desoxirribonucleico), ya sea por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por la síntesis química de desoxi-oligonucleótidos. Con estas herramientas actualmente es posible obtener en un laboratorio el genoma completo de un organismo, generando cada uno de los marcos de lectura abierta (ORFs) completos o fragmentos de cada uno de

ellos. También estos genomas se pueden adquirir en forma de bibliotecas o colecciones completas de genes de organismos como el humano, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, entre muchas otros. Estas bibliotecas de ADN se depositan en microplacas de 384 pozos (denominados microarreglos), en donde se ubican en columnas y renglones por lo que se conoce su ubicación exacta dentro de la microplaca. De tal manera que en un solo análisis se pueden estudiar miles de genes y analizar un genoma de manera parcial o global en relativamente poco tiempo^{44,45}.

Estos microarreglos utilizan frecuentemente ARN total. Este ARN se obtiene con los métodos convencionales, sólo que debe de tener ciertos requisitos particulares: 1) se debe obtener lo más concentrado posible, 2) la banda ribosomal mayor (28S) debe de ser al menos dos veces más intensa que la banda menor (18S), 3) se requieren de al menos 5 microgramos de ARN total para realizar un análisis, 4) no se requiere aislar exclusivamente el ARN mensajero y 5) no es importante la presencia de ADN genómico, aunque es recomendable su ausencia.

El ARN total se expone a desoxi-oligonucleótidos poli-T y a un conjunto de hexámeros al azar, permitiendo que reconozcan sus sitios en el ARN mensajero. Posteriormente se agregan los desoxinucleótidos adenina, citosina, guanina y timina, y una proporción de un desoxinucleótido T marcado con una molécula fluorescente (comercialmente se obtienen dUTP-Cy3, dUTP-Cy5, dUTP-alexa3 y dUTP-alexa5, aunque también se pueden obtener los mismos fluoróforos unidos a dCTP). A esta mezcla se le agrega una transcriptasa reversa que sintetiza el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN mensajero (que se obtuvo del tejido de interés), incorporando el desoxinucleótido T marcado todo en dos reacciones estándar. Finalmente, el ADNc marcado se purifica para eliminar el desoxinucleótido fluorescente no incorporado al ADN complementario (ADNc) y se tiene la sonda marcada, lista para probarla en un microarreglo.

La hibridación de un microarreglo no difiere de otras técnicas y condiciones para éstas como las de Southern o Northern blot. Dependiendo del experimento se fijará la temperatura y a otras condiciones de optimización en la solución de hibridación como la concentración de iones magnesio. Las diferencias entre el microarreglo y las otras pruebas mencionadas básicamente son que el volumen de hibridación no es superior a 50 microlitros y que en el microarreglo se prueban dos condiciones de manera simultánea.

Esta tecnología ha sido utilizada recientemente para diferenciar células normales y malignas. Esta tecnología es muy útil ya que distingue no sólo entre diferentes tipos de expresión en calidad (sobreexpresión y represión) sino también lo hace semi-cuantitativamente de acuerdo a las variaciones en la expresión de diferentes grupos de genes relacionados al cáncer o proliferación celular^{46,47}. Estos arreglos contienen un conjunto completo de diferentes genes o polimorfismos (incluso mutaciones frecuentes) que participan de una manera importante en el desarrollo de neoplasias⁴⁶. De esta manera se podría hacer un diagnóstico molecular de diferentes fenotipos neoplásicos con el objeto de categorizarlos con fines diagnósticos y pronósticos⁴⁶⁻⁴⁹. Con estos fines existen hasta la fecha cuatro tipos de estrategias experimentales para el uso de estos arreglos: 1) comparar tejidos afectados contra controles (frecuentemente de diversos pacientes normales) en el cual el transcriptoma de un tumor se compara con el del tejido normal, 2) comparación de diferentes estadios del tumor, 3) comparación molecular de diferentes estirpes histopatológicas del tumor, y 4) modificaciones de la expresión genómica en tumores tratados médicamente. Los arreglos disponibles para este tipo de estudios pueden ser de dos tipos: los arreglos basados en tejidos y los genómicos (o de expresión genómica). En los primeros, múltiples secciones microscópicas de diferentes tejidos (de aproximadamente 600 micras en diámetro y 5 micras de grueso) se colocan sobre un portaobjetos. Cada tejido se prueba con diferentes marcadores que pueden ser proteínas, ADN, ARN, etc. En el segundo tipo de arreglo, se tienen secuencias reconocidas de bibliotecas que pueden ser oligonucleótidos, ESTs, ADN, ARN proteínas u otros ligandos y se agregan los marcadores de prueba para hibridar y determinar aquellas secuencias presentes o ausentes en la muestra en estudio en relación a las secuencias o marcadores que se están probando en el microarreglo.

Hasta la fecha son pocos los estudios que han abordado al tejido paratiroideo normal y neoplásicos desde esta perspectiva molecular. En un estudio reciente realizado por Stojadinovic y cols.⁵⁰ se utilizó la tecnología con microarreglos (sólo de tejidos). Estos autores encontraron una diferencia significativa entre los patrones de expresión de proteínas como Ki-67 y p27 entre 45 adenomas paratiroideos y 20 carcinomas paratiroideos. Este trabajo además aportó conocimientos sobre los diferentes fenotipos con multimarcadores positivos, patrones mucho más complejos en los carcinomas que en los adenomas, patrones que resultaron predictivos incluso de recurrencia. Sin embargo en este estudio sólo se incluyeron microarreglos de tejidos parafinados (tissue

microarrays), sin hacer uso de otros análisis moleculares más específicos sino sólo de la inmunohistoquímica para 7 marcadores diferentes⁵⁰. Tampoco existen en la literatura estudios prospectivos que utilicen la tecnología de microarreglos basados en ARN (de expresión genómica) que exploren patrones moleculares diferenciales entre el adenoma y la hiperplasia paratiroides comparados con la evolución clínica y comportamiento de los mismos en seguimiento clínico. Por tal razón es importante analizar la expresión de genes que tienen una mayor participación en vías de señalización para algunas funciones celulares como proliferación celular, apoptosis (muerte celular programada) y ciclo celular (ver apéndice A), con el objeto de tratar de clasificar molecularmente los perfiles de expresión genómica entre estas dos entidades que son hasta la fecha difíciles de diferenciar clínica e histopatológicamente como ya he mencionado previamente.

JUSTIFICACIÓN

La adecuada diferenciación del adenoma e hiperplasia paratiroides permitirá al cirujano y médico endocrinólogo tratar de una manera más exitosa a los pacientes con HPTP, por lo que la determinación de patrones de expresión genómica diferenciales podría ser útil para:

- Establecer un diagnóstico diferencial y etiológico más preciso del HPTP,
- Seleccionar un tratamiento quirúrgico y médico mucho más específico basado en la causa (adenoma o hiperplasia), mejorando la eficiencia del tratamiento de estos pacientes,
- Establecer un pronóstico clínico y vigilancia, al seguir más de cerca los casos con el diagnóstico de hiperplasia ya que la recurrencia es más probable,
- Contribuir al conocimiento de la fisiopatología del HPTP, conociendo la expresión diferencial de genes relevantes en la evolución y desarrollo de la enfermedad, así como su diferente comportamiento clínico y biológico
- Sentar las bases para otras neoplasias, en el conocimiento de entidades morfológicas o clínico-patológicas precedentes al cáncer
- La identificación de marcadores moleculares o bioquímicos que puedan diferenciar de una manera más directa (e incluso económica) al adenoma de la hiperplasia

Además no existe en la literatura algún estudio que integre el perfil de expresión genómica funcional en el tejido paratiroideo normal o patológico (como en el caso de adenoma e hiperplasia). La identificación de patrones de expresión genómica diferencial pudiera contribuir de una manera importante en el conocimiento de otros aspectos de señalización intracelular bioquímica y activación génica que probablemente intervengan en la progresión molecular o desarrollo de la hiperplasia y el adenoma de las glándulas paratiroides.

HIPÓTESIS

La expresión genómica diferencial obtenida por análisis de microarreglos de ADNc permitiría diferenciar por patrones o grupos de genes, al adenoma de la hiperplasia paratiroides en pacientes mexicanos con HPTP de origen esporádico.

OBJETIVOS PRINCIPALES

1. Identificar perfiles diferenciales de expresión genómica entre hiperplasia y adenoma paratiroides en pacientes con HPTP no familiar.
2. Identificar perfiles diferenciales de expresión genómica entre adenomas paratiroides y tejido paratiroides normal.
3. Identificar perfiles diferenciales de expresión genómica entre hiperplasia paratiroides y tejido paratiroides normal.
4. Clasificar a estas entidades desde el punto de vista molecular, y establecer una propuesta de firma molecular con el grupo de genes que resulten diferenciales entre estas dos entidades y con respecto al tejido normal.

MATERIAL Y METODOS

1. ESTRUCTURA DEL ESTUDIO

De acuerdo a su estructura este estudio puede ser considerado según Feinstein: como de propósito comparativo (casos contra controles), con un agente de procedimiento, de asignación observacional, con un seguimiento longitudinal, con una colección de datos de temporalidad mixta (tanto pro-como retrolectiva), y con un punto de muestreo de casos y controles, a partir del diagnóstico final.

De acuerdo a su diseño este es un estudio de casos y controles, observacional, comparativo y analítico.

2. DEFINICIONES OPERACIONALES

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

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

Hiperplasia paratiroidea como causa de HPTP: Es el incremento absoluto de células principales, oncocíticas y transicionales que se mezclan con elementos estromales en múltiples glándulas paratiroides en ausencia de un estímulo conocido para la hipersecreción de PTH. Las glándulas pueden ser de tamaño normal o anormal (si se

trata de una hiperplasia asimétrica), sin que ninguna predomine. Es responsable del 15% de los casos con hiperparatiroidismo primario.

Carcinoma paratiroideo: Es una neoplasia maligna de la glándula paratiroides, de lento crecimiento, con proliferación de las células parenquimatosas que muestran atipia, figuras mitóticas, e invasión capsular o vascular. Es responsable del 0.5 al 2% de los casos con hiperparatiroidismo primario.

Hiperparatiroidismo: Condición patológica caracterizada por una hipersecreción de PTH de una o más glándulas paratiroides y que puede o no ocasionar diversas manifestaciones clínicas que pueden variar dependiendo del órgano o sistema afectados y de los niveles de calcio circulantes. Las causas pueden ser múltiples, y el hiperparatiroidismo puede ser primario, secundario o terciario.

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

Hiperparatiroidismo secundario: Es la hiperfunción de las glándulas paratiroideas debida a factores externos que las estimulan y que eventualmente pueden producir un crecimiento hiperplásico o adenomatoso de las mismas. La causa más frecuente es la insuficiencia renal crónica. Los niveles crónicamente bajos de calcio o altos de fósforo son los factores más importantes en el estímulo de proliferación (hiperplasia) de las glándulas paratiroideas.

Hiperparatiroidismo terciario: Se refiere al desarrollo de un hiperparatiroidismo autónomo (respuesta de PTH autónoma no reactiva al tratamiento), con paratiroides no sensibles al calcio después de una estimulación prolongada secundaria como insuficiencia renal (hiperparatiroidismo no reactivo al trasplante renal). Es un hiperparatiroidismo secundario persistente después de un trasplante renal exitoso debido a una función autónoma del tejido paratiroideo.

Ciclo celular: Es una serie de eventos celulares ordenados y concatenados que dan por resultados la duplicación y división de una célula. Este proceso requiere la síntesis completa del ADN genómico celular, segregación cromosómica, mitosis y duplicación del contenido celular. Consiste en varias fases de crecimiento (G_1 y G_2), una fase de síntesis de ADN (S) y una fase de división celular o mitosis (M). Cada una de las fases del ciclo

tiene puntos de control que regulan por medio de proteínas, que cada una de las fases se cumpla sin errores.

Apoptosis: Antes denominada necrobiosis, y se define como una serie de eventos normales que ocurren dentro de una célula que llevan a la muerte celular (programada), en la cual se fragmenta el ADN nuclear por enzimas específicas. También se puede definir como el proceso genéticamente determinado de muerte celular, en la cual habitualmente no interviene un proceso inflamatorio sino como parte normal de los procesos de regeneración tisular.

Necrosis.- Son los cambios morfológicos ocasionados por muerte celular o del tejido, debido a enfermedad o lesión (muerte no programada) localizada en alguna parte específica del organismo. También se puede definir como la suma de cambios irreversibles bioquímicos y estructurales que dan por resultado la muerte celular. Es un proceso pasivo accidental que no ocurre de manera fisiológica en el tejido normal, muchas veces esta asociado a un evento inflamatorio o relacionado a inflamación.

3. POBLACIÓN SELECCIONADA

Se incluyeron todos los pacientes intervenidos quirúrgicamente en el INCMNSZ por HPTP no familiar (esporádico) a partir de Agosto de 1991 y hasta la fecha que desearon participar de manera voluntaria en el presente estudio.

4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1) Se incluyeron todos los pacientes intervenidos quirúrgicamente por hiperparatiroidismo primario esporádico (no familiar) en el INCMNSZ.
- 2) Pacientes con expediente, no necesariamente hospitalizados. También se incluyeron a pacientes que ingresaron por estancia corta para ser operados por HPTP con cualquier diagnóstico (adenoma o hiperplasia)
- 3) Se incluyeron sólo a aquellos pacientes que desearon participar voluntariamente en el estudio (que firmaron el consentimiento informado, ver Apéndice A).

- 4) Se incluyeron los tejidos criopreservados o congelados (a -70 a -80°C) de pacientes operados previo consentimiento de los pacientes, a partir de 1991 en nuestro instituto.

5. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1) Pacientes con carcinoma paratiroideo o cualquier otro diagnóstico histopatológico que no correspondió a los de interés.
- 2) Pacientes con cáncer tiroideo u otro de localización cervical que hayan invadido las paratiroides.
- 3) Pacientes reoperados por HPTP.
- 4) Pacientes con otras formas de hiperparatiroidismo que no fueron el primario (secundario y terciario).
- 5) Pacientes que tuvieron o reportaron antecedentes de tumores paratiroideos, endócrinos múltiples o hipercalcemia en otros individuos de la familia de primer y segundo grado (patología paratiroidea de origen familiar).
- 6) Pacientes que no cumplieron con cuando menos 6 meses de seguimiento por consulta externa (preferentemente en la consulta de cirugía endocrina).

6. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- 1) Pacientes en los cuales no se extrajo ARN de buena calidad o en cantidad suficiente (cuando menos 30 nanogramos de ARN) para realizar el estudio por microarreglos.
- 2) Tejidos o ARN que no fueron de buena calidad (preservación) para realizar la extracción o amplificación adecuada para el análisis por microarreglos.

7. NÚMERO DE SUJETOS

El tamaño muestral es complejo cuando se trata de comparaciones múltiples en escalas dimensionales (se comparan las expresiones de más de 1500 genes). Las comparaciones corresponderán a individuos como a “estados celulares” o fenotipos de expresión, como el

adenoma e hiperplasia, por lo que son comparaciones atípicas con variaciones no controladas pero biológicamente limitadas^{51,52}. Utilizando un programa estadístico propuesto por Zien y cols.⁵¹ (<http://cartan.gmd.de/-zien/classize/calculator.html>) con variabilidades multiplicativas a priori biológicas máximas de 0.5 ($\sigma=0.5$), con una variabilidad técnica estimada en 0.12, con un coeficiente lambda de 3 (radio de detección), un factor rho de interferencia de 3 (factor de exceso sobre la desviación estándar en la expresión de un gen a partir del fondo o background), esperando niveles de expresión promedios de 300 en un escalamiento dimensional (con interpretación para una correlación lineal pero no paramétrica), para 5 ensayos individuales en arreglos de 1900 genes (con un éxito diferencial esperado de al menos el 10% ó 10% de genes discriminatorios entre dos clases) se obtendría con estos 5 ensayos una p significativa menor a 0.01 (confianza del 99%) si se tiene esa proporción mínima de genes que diferencien clusters o patrones de expresión genómica entre dos entidades (discriminación de dos clases). Por lo tanto, con ese número de genes probados, y considerando el control de la variabilidad técnica y biológica, se estima que se puede alcanzar significancia estadística si cuando menos 5 ensayos (mínimo número de arreglos controlados necesarios) son llevados a cabo y se obtiene cuando menos un 10% de genes discriminatorios entre las patologías estudiadas.

8. METODOLOGÍA

a. Extracción de ARN:

Una vez que se realizó la exéresis quirúrgica de un fragmento de tejido paratiroideo (de adenoma, hiperplasia o de tejido normal), este fue seccionado por el patólogo en pequeños fragmentos con instrumentos estériles y sumergido dentro de crioviales en nitrógeno líquido para su transporte. Una vez que se decidió la extracción, se descongeló progresivamente el tejido y se sometió a una extracción de ARN en TRIZOL (Life Technologies Trizol® Reagent for Total RNA isolation, TECH-LINE™) de acuerdo a los siguientes pasos:

- 1) Se colocaron aproximadamente 50 a 100 microgramos en piezas o fragmentos en un tubo de Eppendorf de 1 ml con 1 ml de

TRIzol. El volumen de tejido no debe exceder el 10% del volumen total de TRIzol utilizado para la extracción.

- 2) **Homogenización:** Se homogenizó el tejido utilizando un sonificador o polytron en tiempos variables de pulso y continuo hasta que el tejido se disolvió en fragmentos diminutos o totalmente. Siempre se realizó dentro de hielo y de manera intermitente para evitar la degradación potencial del ARN.
- 3) **Separación de fases:** Se incubaron las muestras homogenizadas por 5 minutos a una temperatura de entre 15 y 30°C para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se adicionó 0.2 ml de cloroformo por mililitro de TRIzol. Se cierran herméticamente los tubos. Se agitó vigorosamente con las manos por 15 segundos y se incuban a 15-30°C por 2 o 3 minutos. Se centrifugaron las muestras a no más de 12 000 x g por 15 minutos a 2-8°C. Posterior a la centrifugación, la mezcla se separó en tres fases: una roja inferior de fenol-cloroformo, una intermedia delgada y una fase superior acuosa incolora. El ARN se queda exclusivamente en la fase acuosa superior. El volumen de la fase acuosa es alrededor del 60% del volumen del TRIzol utilizado para la homogenización.
- 4) **Precipitación del ARN:** Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio, y se guardó la fase orgánica si se requirió de la extracción de ADN o proteínas de manera adicional. Se precipitó el ARN de la fase acuosa mezclándola con alcohol isopropílico. Se utilizaron 0.5 ml de alcohol isopropílico por mililitro de TRIzol utilizado en los pasos previos. Se incubaron las muestras a 15-30°C por 10 minutos y se centrifugaron a no más de 12 000 x g por 10 minutos a 2-8°C. El ARN precipitado es frecuentemente invisible antes de la centrifugación, una vez que lo ha sido se observa como una pastilla ó pellet en forma de gel a un lado y al fondo del tubo de Eppendorf.
- 5) **Lavado del ARN:** Se tiró el sobrenadante una vez centrifugada la muestra. Se lavó la pastilla de ARN con etanol al 75%, agregándose al menos 1 ml de etanol al 75% por mililitro de

TRIzol utilizado para la homogenización inicial. Se mezcló la muestra por vórtex y se centrifugó a no más de 7 500 x g por 5 minutos a 2-8°C.

- 6) **Resuspensión del ARN:** Al final del proceso, se secó por un tiempo breve la pastilla de ARN (esto se realiza mediante una secadora de vacío con aire seco 5 a 10 minutos). No se debe de secar el ARN por centrifugación con vacío (vacufuge). Es importante no dejar secar la pastilla de ARN completamente porque esto disminuye su solubilidad de manera importante. El ARN parcialmente disuelto en agua con DPC o libre de RNAsas se conservó en una ultracongeladora tipo Revco a -70°C el tiempo que se desee. Cuando no se disuelve la pastilla completamente se puede hacer uso de micropipetas para facilitar con cuidado su disolución.
- 7) Con el objeto de comprobar la calidad del ARN, una alícuota de la muestra obtenida fue sometida a análisis espectrofotométrico (ya sea por nanodrop o el convencional) o bioanalizador (Agilent Technologies). Una razón A_{260}/A_{280} superior a 1.8 fue considerada recomendable para proseguir los siguientes pasos de la hibridación. Con objeto del análisis de microarreglos, se requirió de cuando menos 10 microgramos de ARN total diluido en el menor volumen de agua estéril posible. No es crítica la presencia de ADN genómico, así como tampoco trazas de ARN total, de transferencia o proteínas. Se tomaron fotografías de estos geles y se documentaron en un archivo computarizado.

b. Procesamiento del Microarreglo:

Se utilizó el ARN extraído del cual se había comprobado calidad y cantidad, mediante corrida en gel de azarosa con bromuro de etidio y espectrofotometría o bioanalizadores respectivamente, de acuerdo a lo mencionado previamente.

Se prepararon a continuación sondas de ADN complementario fluorescente para el ARN mensajero extraído, de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) Para alinear el primer (iniciador) se mezclaron 2 microgramos de ARN mensajero con 2 microgramos de un oligo-dT regular o anclado (5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N-3') en un volumen total de 15 µl:
 - ARNm 2 µg (Cy3 y Cy5)
 - Oligo-dT 2 µg (Cy3 y Cy5)
 - Volumen total 15 µg (Cy3 y Cy5)
- 2) Se calentó la muestra a 70°C por 10 minutos y se enfrió en hielo.
- 3) Se agregaron 15 microlitros de mezcla de reacción a cada una de las reacciones Cy3 y Cy5:
 - a) Mezcla de reacción: 6 µl de buffer de primera cadena 5X, 3 µl de DTT 0.1 M, 0.6 µl de dNTPs no marcados, 3 µl de Cy3 o Cy5 (1mM, Amersham), 2 µl de Superscript II (200 U/ul, Gibco, BRL) en un volumen total de 15 µl.
 - b) dNTPs no marcados: 25 µl de dATP (100 mM) con una concentración final de 25 mM, 25 µl de dCTP (100 mM) con una concentración final de 25 mM, 25 µl de dGTP (100 mM) con una concentración final de 25 mM y 15 µl de dTTP (100 mM) para una concentración final de 15 mM, agua bidestilada 10 µl. Con esto el volumen total es de 100 µl.
- 4) Buffer de primera cadena 5X: Se compone de 250 mM de Tris-HCL (equilibrado a un pH de 8.3), 375 mM de KCl y 15 mM de MgCl₂.
- 5) Se incubó a 42°C por 1.5 a 2 horas.
- 6) Se procedió a degradar el ARN agregando 15 µl de NaOH al 0.1N, y se incubó posteriormente a 70°C por 10 minutos.
- 7) Se neutralizó ahora el NaOH al agregar aprox. 15 µl de HCl 0.1N, y se llevó a un volumen de 500 µl con TE (compuesto con 10mM de Tris y 1mM de EDTA).
- 8) Se agregaron 20 µg de ADN humano Cot1 (Gibco-BRL) que se utilizó básicamente para disminuir el background al generar un bloqueo primario.

- 9) Se purificó la sonda por centrifugación en un micro-concentrador Centricon-30 (Amicon). Se verificó una concentración adecuada de la sonda "con color" en el centricon.
- 10) Se combinaron las sondas concentradas separadas (Cy3 y Cy5) en un centricon fresco o limpio, se llevaron a un volumen total de 500 ul con TE y se concentraron nuevamente a un volumen menor a los 7 ul.
- 11) Se agregó 1 µl de 10 ug/ul de ARN poly A (poliadenilado, Sigma #P9403) y 1 ul de 10 ug/ul de ARNt (Gibco-BRL, # 15401-011).
- 12) Se ajustó el volumen a 9.5 ul con agua destilada.
- 13) Para la preparación final de la sonda, se agregaron 2.1 µl de 20XSSC (compuesta por 1.5 M de NaCl, 150 mM de Citrato de sodio [pH 8.0]), y 0.35 ul de SDS al 10%. El volumen final de la sonda puede ajustarse entre 12 ul y 15 ul de acuerdo a la preferencia personal (el volumen requerirá también ser incrementado si los cubreobjetos son más grandes vgr. 22mm x 40 mm). Hay que asegurar una concentración de sales ajustada de manera proporcional.
- 14) Se desnaturalizó la sonda por calentamiento durante 2 minutos a 100°C, y posteriormente se incubó a 37°C por 20-30 minutos.
- 15) Se colocó sobre el arreglo debajo de un cubreobjetos de vidrio.
- 16)
- 17) Se hibridó a 65°C por 18 a 24 horas en una cámara de laminillas con una humedad mantenida por un reservorio pequeño de SSC 3X.
- 18) Se lavaron los arreglos por sumersión y agitación por 2 a 5 minutos en SSC 2X con SDS al 0.1%, seguido de SSC al 1X y SSC al 0.1X.
- 19) Se efectuó "spin" en seco por centrifugación por 2 minutos en un rack para laminillas en una centrífuga Beckman GS-6 en contenedores microplus a 650 rpm por 2 minutos.

El procedimiento de microarreglo consiste en la aplicación de la solución de hibridación con las sondas sobre la laminilla y cubrirla con un cubreobjetos para permitir que la

solución cubra todo el microarreglo, de igual forma que una preparación para microscopía. La reacción así es capilar y por eso requiere de muy poco volumen, por lo que hay que tener extrema precaución con la evaporación. Para evitar que esto suceda, los microarreglos se colocan dentro de cámaras húmedas diseñadas específicamente para este procedimiento. Al igual que para la hibridación, el lavado de un microarreglo utiliza las mismas reglas de temperatura y astringencia que en otros experimentos como el Northern blot, sólo que en este caso se requiere del secado de las laminillas. Para el secado es recomendable utilizar la centrifugación ya que cualquier residuo de sales por evaporación puede afectar la lectura.

Descripción General del Microarreglo

- Microarreglo Formato II con anotación (GO y AccN)
- Fuente de Información: NCBI/GenBank
- Tamaño de sondas: 50 mers
- Oligos fabricados por: MWG Biotech
- Número de spots por gen: 2 (contiguos)
- Número total de spots: 19 968 (8 x 4 bloques)
- Número total de bloques: 32
- Número de spots por bloque: 624
- Columnas por bloque: 24
- Renglones por bloque: 26
- Controles positivos: 432
- Controles negativos: 432
- Area total del microarreglo: 18 x 36 mm
- Distancia entre spots: 185 μm

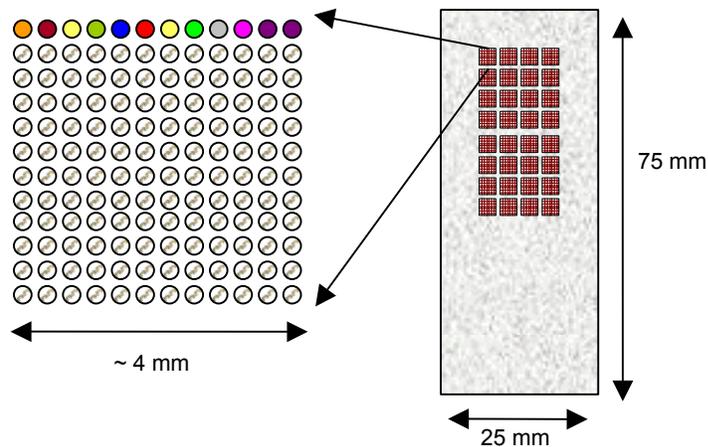


Figura 4. Características físicas del arreglo en la laminilla de vidrio preparada. Todos los spots son colocados por un robot que ajusta el tamaño del spot, las distancias entre los mismos y los bloques como se observa en el esquema.

Los genes que se exploraron corresponden a diversos genes con importancia estocástica en las células neoplásicas o hiperplásicas. La mayoría de estos participan en ciclo celular (como factores mitogénicos, tirosincinasas, factores de señalización, transducción, segundos mensajeros, ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas, proteínas de degradación como ubiquitinas, factores transcripcionales de varios grupos, proteínas estructurales, proteínas ribosomales, entre otras), proliferación (proteínas g, factores transcripcionales, oncogenes, ciclinas, genes homéoticos, tirosincinasas, cinasas dependientes de ciclinas, calicreínas, desacetilasas de histonas, metaloproteinasas, y proteínas de degradación, entre otras) y genes relacionados a apoptosis (caspasas, bcl-2, bax, bim, PDCDs, etc).

Otros genes incluidos en el microarreglo no se expresan en esas condiciones y por tanto sirven de controles negativos para el mismo experimento (vgr. oligonucleótidos de arabis control, precursor de lipoproteína surfactante pulmonar, etc). Se realizaron corridas adicionales o dobles de los microarreglos (casos y controles), como control interno para evaluar la reproducibilidad del método y minimizar los posibles sesgos técnicos en la hibridación y procesamiento del microarreglo.

Para obtener el listado completo de todos los genes incluidos en el arreglo, se puede visitar la página web de la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://microarrays.ifc.unam.mx/principal.html>), en la que en la etiqueta de productos, el correspondiente al Chip Humano 10K Oligo abre directo a un archivo ya sea de ASCII (text) o en Excell de Microsoft con un listado completo de los genes representados con sus números de identificación (accesion numbers e identificación) y localización dentro de la laminilla. Se anexan también en este sitio las características físicas del arreglo (ya mencionadas arriba) así como imágenes de arreglos ya hibridados en los que se pueden apreciar los puntos de diferentes colores. En el mismo sitio se pueden encontrar otros productos, así como videos que describen el proceso completo del arreglo desde la extracción hasta lectura e interpretación del mismo. También se enlistan algunas ligas a otras interfaces de Internet auxiliares tanto en el procesamiento matemático de los arreglos como la interpretación y clasificación funcional de los genes encontrados diferencialmente expresados entre las entidades probadas en el experimento (vgr. fatiGO y KEGG entre otros).

Clasificación Funcional de los Genes del Microarreglo

La clasificación funcional de todos los genes representados en el microarreglo de acuerdo al rubro de proceso biológico por babelomics (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>) basado en “*gene ontology*”, clasifica los genes en (nivel 5, proceso biológico):

Metabolismo de nucleótidos, nucleósidos y ácidos nucleicos	27.98%
Metabolismo celular macromolecular	27.55%
Metabolismo de proteínas	27.29%
Metabolismo de biopolímeros	23.35%
Regulación de metabolismo celular	19.65%
Transporte	18.81%
Cascada de señalización intracelular	11.63%
Receptores de membrana relacionados a señalización	11.41%
Biosíntesis celular	9.37%
Respuesta inmune	7.64%
Metabolismo del fósforo	7.38%
Biogénesis y organización de organelos	7.15%
Procesos fisiológicos celulares de regulación negativa	6.70%
Localización celular	6.47%
Establecimiento de localización celular	6.42%
Transporte intracelular	6.36%
Biosíntesis de macromoléculas	6.21%
Localización de proteínas	6.14%
Transporte de proteínas	5.86%
Muerte celular programada	5.73%
Respuesta a patógenos	5.45%
Regulación de ciclo celular	5.14%
Regulación del metabolismo de lípidos	4.89%
Procesos fisiológicos celulares de regulación positiva	4.74%
Generación de precursores de metabolismo y energía	4.56%
Catabolismo celular	4.30%

Metabolismo de ácidos orgánicos	4.10%
Metabolismo celular de lípidos	3.95%
Transporte mediado por vesículas	3.87%
Metabolismo de los carbohidratos	3.69%
Regulación de muerte celular programada	3.67%
Transporte iónico	3.59%
Metabolismo de aminas	3.56%
Percepción sensorial	3.54%
Regulación de proliferación celular	3.28%
Catabolismo de macromoléculas	2.85%
Metabolismo de aminoácidos y derivados	2.77%
Regulación de transducción celular	2.70%
Morfogénesis celular	2.65%
Transporte electrónico	2.65%
Secreción	2.65%
Motilidad celular	2.62%
Reparación de DNA	2.47%
Respuesta inflamatoria	2.47%
Mitosis	2.39%
Metabolismo de regulación negativa	2.32%
Fase M	2.32%
Transmisión de impulso nervioso	2.29%
Metabolismo de alcohol	2.19%
Vías secretoras	2.11%
Respuesta inmune humoral	2.01%
Regulación del metabolismo de las proteínas	1.96%
Biosíntesis de lípidos	1.93%
Desarrollo del sistema nervioso	1.60%
Regulación del tamaño celular	1.55%
Metabolismo de regulación positiva	1.50%
Regulación de actividad de cinasas	<1.5%
Metabolismo de cofactores y sulfuro	
Homeostasis de iones intracelulares	
Regulación de biosíntesis celular	

- Crecimiento celular
- Quimiotaxia
- Cicatrización
- Hemostasia
- Hemopoiesis
- Migración celular
- Transporte de lípidos e hidrógeno
- Respuesta a estrés oxidativo
- Etcétera

c. Lectura e Interpretación del Microarreglo:

Una vez que laminilla terminó el tiempo de hibridación a 42°C (por al menos 16 horas durante la noche), se lava con un buffer salino (SDS 1% + NaCl 0.5 mM) precalentado a 42°C igualmente para remover los coverslips incubando con agitación leve (70-71 rpms) por 5 minutos. Se dan dos lavados más con la misma solución pero a concentraciones descendentes para posteriormente secar la laminilla por minispin para laminillas y se pasan al escáner. Cada laminilla es escaneada con dos longitudes de excitación de onda a 532 y 635 nm con un escáner tipo Packard Bioship Scan Array 400 (GSI Packard Bioscience/Perkin Elmer, Minessota, USA) con microscopía confocal.

Existen dos tipos de lectores para microarreglos: los lectores con cámara digital y los lectores confocales. En los lectores con cámaras digitales se registra la imagen fluorescente como si se tomara una fotografía común, mientras que en los lectores confocales se hace una reconstrucción de la imagen utilizando los principios de la microscopía confocal, que consiste en la utilización de fotomultiplicadores para registrar la señal. Estos últimos, que fueron los utilizados para el presente proyecto, son posiblemente los mejores lectores para microarreglos; ya que permiten obtener una imagen de muy alta resolución, factor determinante en la obtención de resultados; desafortunadamente estos lectores son muy costosos.

En ambos tipos de lectores se utiliza un LASER para excitar las moléculas fluorescentes unidas al ADN complementario y poder obtener la imagen de cada una de las muestras contenidas en el microarreglo. Este procedimiento se hace para cada uno de los

fluoróforos obteniéndose dos imágenes, una para el fluoróforo Cy3 (rojo) y una para el fluoróforo Cy5 (verde). Para la obtención de estas imágenes se debe ajustar la intensidad del láser y la sensibilidad de la cámara o de los fotomultiplicadores, de tal forma que ambas imágenes den valores semejantes de fluorescencia total. Comúnmente para lograr esto, en los microarreglos se colocan controles o marcadores que se utilizan para ajustar la señal de fluorescencia para ambos fluoróforos o cianinas. Una vez obtenidas estas imágenes, pueden ser combinadas para obtener un aspecto visual del microarreglo. En un ejemplo, en el que podemos observar puntos amarillos, verdes, rojos y un sin número de tonalidades entre el verde y el rojo. Si para este experimento se marcó la muestra experimental en rojo y la muestra control en verde. Todos aquellos puntos que se ven rojos o tonalidades anaranjadas, pueden ser interpretados como genes que aumentaron su expresión. Los puntos verdes o tonalidades entre el amarillo y el verde serán aquellos genes que disminuyeron su expresión. Y finalmente los puntos amarillos representan a los genes que en ambas condiciones se expresan de igual forma (fig 4).

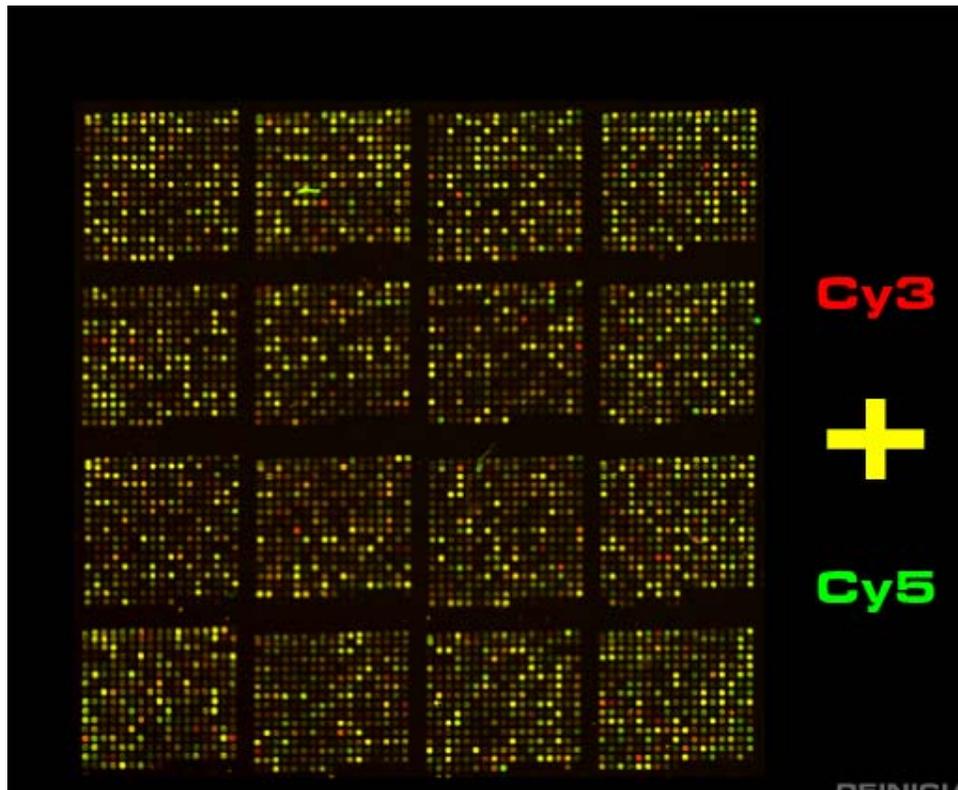


Figura 4. Apariencia de un arreglo hibridado con los dos fluorocromos Cy3 y Cy5. El color que predomina indica el transcrito más abundante que hibridó en el oligo.

d. Análisis e interpretación de los Microarreglos:

Para la obtención de los valores cuantitativos de cada una de las señales de fluorescencia contenidas en el microarreglo se requiere del análisis de imágenes. Comercialmente se pueden adquirir programas de cómputo para estos fines, también se les puede encontrar en sitios de internet con software libre. En la mayoría de estos programas existen una serie de pasos básicos para la interpretación de éstas imágenes. La apariencia real de una de las laminillas se muestra en la fig 5.

Las imágenes escaneadas fueron procesadas por un lector denominado Virtek Chip utilizando el programa Array Pro Analyzer de Media Cybernetics. Este software localiza cada spot o mancha con una trama programada (o retícula) para obtener la densidad promedio de la señal de cada spot y el fondo (offset) del área que rodea a cada punto o spot (fig 6).

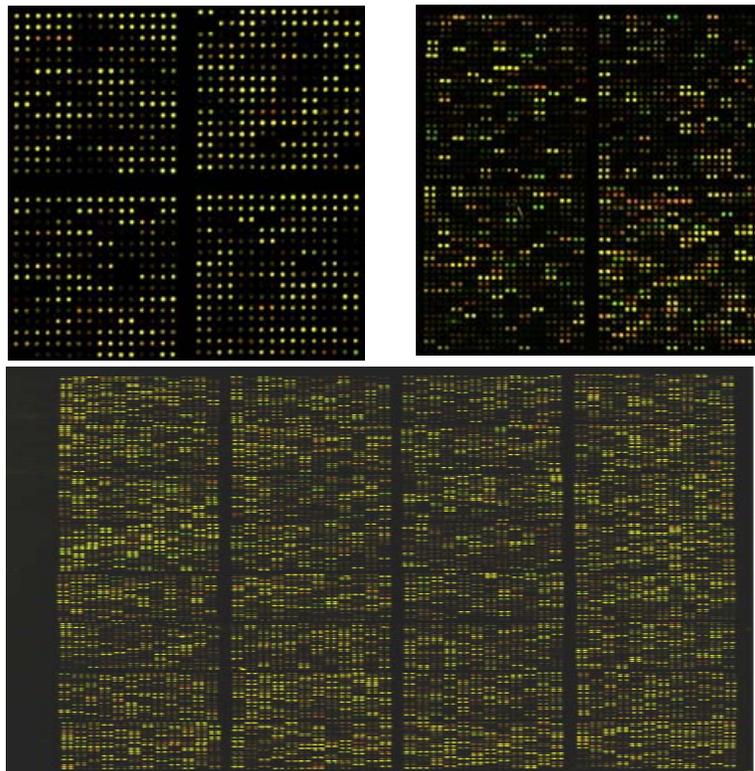


Figura 5. Apariencia real de una de los arreglos de este proyecto. En el cual se evalúa de manera general la apariencia de los spots, que no existan manchas u otras formas de contaminación que impidieran evaluar algunos de los spots o bloques enteros.

La imagen es inicialmente filtrada de pequeñas imperfecciones en el procesamiento que se observan como puntos más brillantes en el fondo que de manera general es oscuro o negro. Estas señales de error son desechadas junto con los puntos que pudieran ser adecuados pero que debido a este defecto no pueden ser evaluados de manera satisfactoria. Bloques completos de puntos pueden ser eliminados. En el caso de eliminar a más del 30% de los puntos o bloques, el arreglo tiene que repetirse. Cabe la pena aclarar que cada experimento (de comparación directa entre entidades patológicas) se repite una vez más con un cambio de fluorocromo para evitar el sesgo de marcaje del fluorocromo.

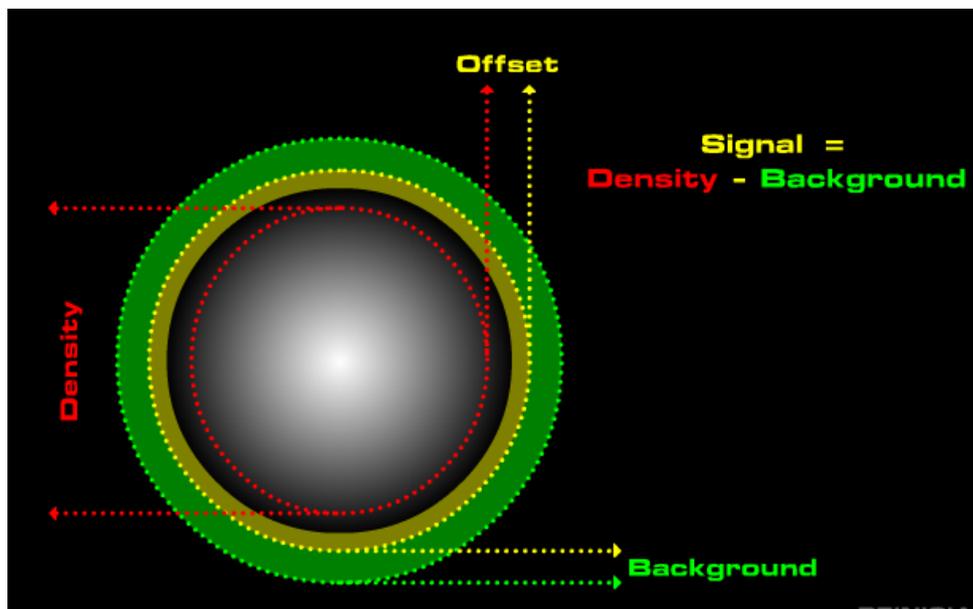
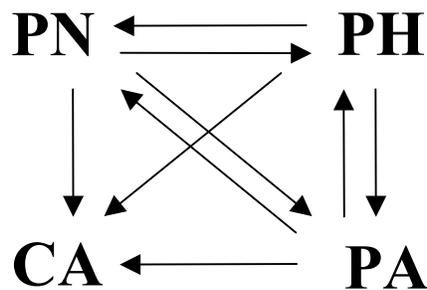


Figura 6. Areas consideradas por spot para la obtención de la intensidad de la señal. La sustracción del fondo y la consideración de un punto sin distorsión o error es vital en el momento del análisis.

A continuación, con la imagen ya filtrada de errores de intensidad de otros puntos o contaminantes, se coloca la retícula y se define la zona a incluir o excluir. Con esto empieza al trabajo manual de ajustar a cada punto la retícula de manera individual, tratando de eliminar de manera manual (posteriormente estadística) los puntos que no mostraron una hibridación adecuada. Una vez terminado este proceso se indica al programa el cálculo de todas las intensidades medias (en el punto medio de cada mancha) la magnitud de la intensidad para proceder a la semi-cuantificación. Todos los

puntos y sus replicados técnicos (tanto contiguos como del replicado experimental del arreglo) son entonces individualmente evaluados de acuerdo a algunos parámetros matemáticos para discriminar variabilidad inaceptable. Los puntos que pasen estos criterios son incluidos en el análisis estadístico de las intensidades de señal. Una razón de la intensidad entre Cy5 y Cy3 para cada punto representa la expresión relativa de los transcritos de RNA que se comparan de manera competitiva en el arreglo que se prueba. En cada arreglo se evaluó la correlación lineal para cada duplicado técnico con el objeto de sólo incluir a aquellos experimentos que tuvieran al menos 0.68 de correlación (de acuerdo al valor r para la prueba de Pearson) para todo el estudio. Los niveles de expresión de todos los genes fueron analizados utilizando un paquete estadístico por bioconductor denominado Ambiente R e incluyendo los siguientes programas: SAM, SMA, LIMMA, análisis de clusters y PAM para bioinformática (<http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray/pages/kthpackagetransfer.html>). Debido a la complejidad de este análisis se solicitó la intervención de una alumna de Doctorado en bioinformática, experta en este tipo de análisis (Dra. Cecilia Laurell) del Instituto de Tecnología Real de Estocolmo, misma que fungió como co-autora en la publicación final de este trabajo. La información final obtenida semi-cuantitativa de los niveles de expresión diferencial del grupo o grupos de genes encontrados, fue complementada con otras bases de datos del NCBI en donde se puede obtener una información más extensa de cada uno de ellos tanto en trabajos publicados como en estudios de biología molecular y expresión, como “*gene ontology*”, para su posterior definición, clasificación y comparación. Las comparaciones fueron realizadas de acuerdo al siguiente plan experimental (PN: Paratiroides normal; PH: hiperplasia paratifoidea, CA: cáncer de paratiroides y PA: adenoma de paratiroides):



Se incluyeron en el análisis otros datos relevantes para la interpretación de los datos como son: los datos demográficos descriptivos del paciente (sexo, edad), fecha de la cirugía, diagnóstico preoperatorio, evolución, sintomatología, lado afectado, tratamiento empleado, duración del tratamiento, diagnóstico transoperatorio, calcio, fósforo y PTH MI preoperatorios y postoperatorios, estirpe histopatológica del tumor (en caso de adenoma), características histopatológicas (adipositos, lobulación ribete de tejido normal, vascularidad, tipos celulares y cápsula), localización del criovial y tiempo de evolución clínica postoperatoria fue de al menos seis meses para descartar recurrencia de hipercalcemia u otro diagnóstico diferente al preoperatorio.

Como parte final, los resultados de este proyecto fueron presentados en el congreso internacional de la Asociación Internacional de Cirujanos Endocrinos, llevada a cabo en Durban, Sudáfrica el año pasado, del cual se emitieron algunos comentarios que resultaron de mucha utilidad para el progreso y terminación de nuestro proyecto.

e. Análisis histopatológico

Se realizó dentro del departamento de patología de nuestro instituto (INCMNSZ) por un patólogo experto en paratiroides y cotutor del alumno (AGD). Se evaluaron las características morfológicas de la muestra que entre otras están: tamaño de la glándula, proporción de adipocitos (presente/ausente), lobulación (presente/ausente), ribete de tejido normal (presente/ausente), tipos celulares (uno o más de uno), vascularidad (vasos delgados/gruesos), y cápsula (presente/ausente) principalmente. Se estableció un diagnóstico, aunque el diagnóstico definitivo se estableció después del seguimiento de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio.

RESULTADOS

Un total de 20 pacientes fueron seleccionados de manera inicial para el estudio, de los cuales 12 fueron diagnosticados de manera definitiva como adenomas, 3 hiperplasias primarias, 3 pacientes con cáncer paratiroideo y 2 muestras de tejido paratiroideo normal. Las muestras de pacientes con cáncer no fueron elegidos para los objetivos de este proyecto. El resto de las muestras fueron incluidas en el análisis, excepto por una de las muestras de hiperplasia que no alcanzó con los criterios de suficiente calidad para ser incluida en las hibridaciones. La mediana para la edad del grupo total de pacientes incluidos fue de 54 años (rango 26-75). La mediana de seguimiento en todos los casos fue de 20 meses (rango 16-32 meses). Del grupo total 4 eran varones (20%) y las 16 restantes mujeres (80%). Excepto por un adenoma, todos estuvieron localizados en el lado derecho y de localización inferior (91.7%). Todas las hiperplasias fueron bilaterales. En todos los casos se confirmó el diagnóstico por patología, el cual fue revisado por uno de los autores y con el seguimiento de al menos 6 meses. Toda la información antes mencionada se puede observar en la tabla 1.

Paciente	Etiqueta	Diagnóstico	Género	Edad	Lado	Sup/Inf	Seguimiento
1	A0	Adenoma	F	70	Derecho	Ambos	25
2	A2	Adenoma	F	51	Derecho	Inferior	24
3	A3B	Adenoma	M	26	Derecho	Inferior	24
4	ARDM	Adenoma	F	50	Derecho	Inferior	24
5	N1	Normal	F	52	NE	NE	20
6	A145	Adenoma	F	53	Derecho	Inferior	32
7	A148	Adenoma	M	62	Derecho	Inferior	32
8	C259	Cáncer	F	33	Derecho	Inferior	25
9	N2	Normal	F	48	NE	NE	20
10	ALSA2	Adenoma	F	63	Izquierdo	Superior	19
11	AMAGP1	Adenoma	F	65	Derecho	Inferior	19
12	A4	Adenoma	F	75	Derecho	Inferior	17
13	A5	Adenoma	F	54	Derecho	Inferior	16
14	A6	Adenoma	F	47	Derecho	Inferior	16
15	A7	Adenoma	F	65	Derecho	Inferior	16
16	CIHM	Cáncer	M	44	Derecho	Inferior	20
17	CG	Cáncer	M	62	Derecho	Inferior	18
18	H1	Hiperplasia	F	54	Bilateral	Ambos	20
19	H2	Hiperplasia	F	NE	Bilateral	Ambos	24
20	H3	Hiperplasia	F	63	Bilateral	Ambos	19

Tabla 1. Algunas características y diagnóstico definitivo de los pacientes incluidos en el presente estudio.

Una vez obtenidos los datos que fueron válidos desde el punto de vista matemático y una vez excluidos todos aquellos spots en los que la señal no fue adecuada o defectuosa, se obtuvo la información total por chip y por experimento. Para que un spot fuera considerado adecuado tendría que haber sido homogéneo, con una intensidad apropiada para la señal promedio de fondo, superior a la intensidad promedio de la señal por chip y con una alta correlación con su spot contiguo (en el mismo arreglo) y con sus análogos en el experimento contrario (en otro arreglo). Sólo los spots que cumplieron con estos requisitos fueron considerados como válidos para ser incluidos dentro de la evaluación estadística ulterior.

Cuando se consideraron los experimentos en forma de pares (con el cambio de fluorocromo o dye swap) se calculó de primera instancia la variabilidad entre experimentos con las mismas entidades patológicas pero con un cambio en el fluorocromo, es decir adenoma vs normal en sus dos versiones: adenoma/Cy3 vs normal /Cy5 contra adenoma/Cy5 vs normal/Cy3. De manera interesante, la variabilidad de expresión en estas hibridaciones fue más pequeña que la observada para la primera comparación entre dos paratiroides normales (fig 7).

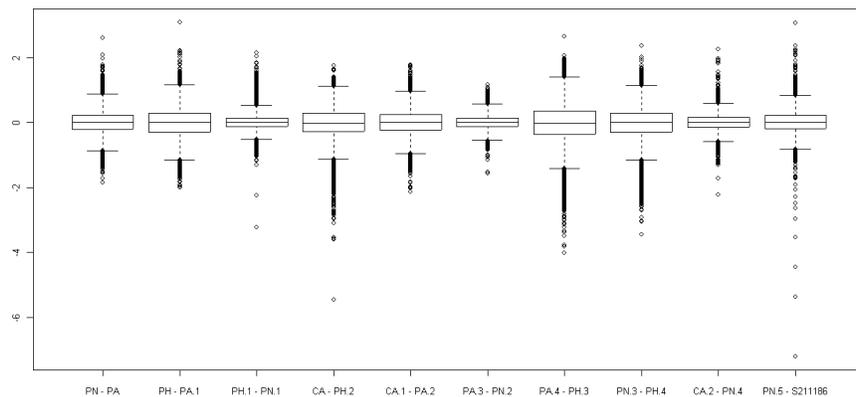


Figura 7. Diagramas de cajas y bigotes para observar la dispersión de la distribución de los valores de intensidad obtenida por comparación. La mayor dispersión se observa en la última caja a la derecha que corresponde a la comparación de dos paratiroides normales.

Esta variabilidad parece haber disminuido al hacer pools de las muestras, con la ventaja resultante de una homogeneidad lograda de manera artificial sin modificar los patrones de

expresión porque se obtienen de alguna manera “promedios” biológicos. Como desventaja de este procedimiento, al hacer pooles se perdieron las diferencias individuales pero se ganó la representatividad de la patología en estudio. Esta maniobra adicionalmente nos permitió observar potenciales marcadores entre los genes diferencialmente expresados (DE) en las comparaciones pero por este diseño no es posible detectar fluctuaciones o diferencias individuales en cada patología.

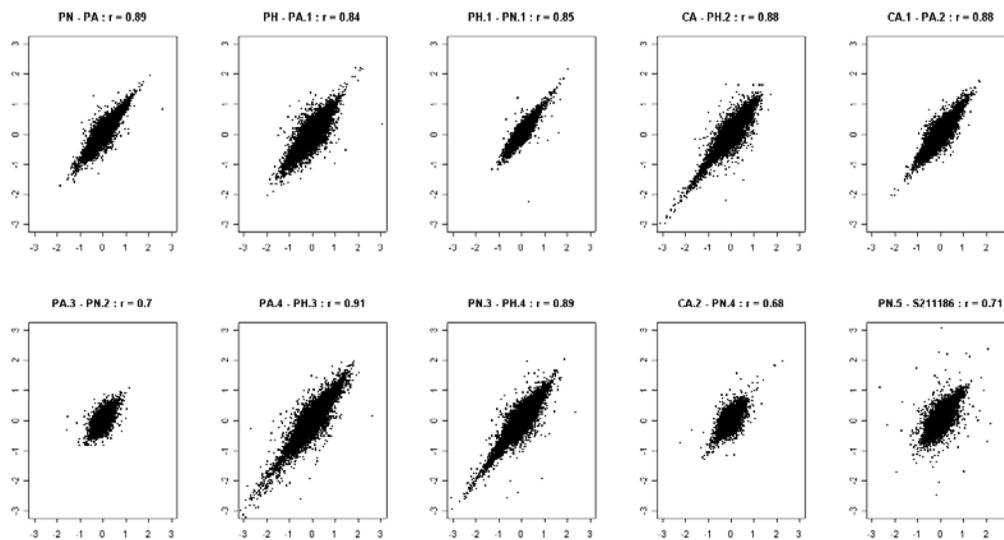


Figura 8. Correlaciones lineales por pareja de experimentos.

La correlación lineal observada por los pares de experimentos por patología fue también adecuada, siendo la menor de 0.68 (r de Pearson), por lo que pudieron todas estas comparaciones ser consideradas como un experimento exitoso único al eliminar el potencial sesgo por afinidad del fluorocromo (fig 8).

El grado de correlación representa la concordancia o similitud que tienen las intensidades de los cuatro puntos (dos contiguos de un arreglo con los otros dos contiguos del replicado técnico con intercambio de fluorocromo). Una concordancia superior al 60% (0.6) es más que satisfactoria para aplicar pruebas estadísticas en el promedio aritmético de la intensidad de los 4 puntos por gen.

Una vez evaluados los grupos de spots se obtuvieron los genes diferencialmente expresados por cada entidad y se compararon éstos para obtener los significativos de acuerdo a cada comparación. A continuación se describen algunos de los genes que resultaron diferencialmente expresados por comparación o experimento.

Adenoma Paratiroideo contra Tejido Paratiroideo Normal

Este experimento incluyó a 12 pacientes con adenomas paratiroideos únicos, es decir, pacientes con sólo una glándula paratiroidea crecida de manera anormal con datos clínicos de hiperparatiroidismo primario esporádico, y que adicionalmente durante el seguimiento clínico y bioquímico de al menos 6 meses el paciente no presentó ninguna evidencia de enfermedad recurrente, otro adenoma o hiperplasia.

En la comparación adenoma contra tejido paratiroideo normal sólo 8 genes resultaron diferencialmente expresados (DE) entre las muestras. Cinco de ellos estuvieron sobrerregulados (upregulated) y 3 infraregulados (downregulated); estos genes se enlistan en la tabla 2. Todos los genes DE tuvieron una B mayor a 3.97 por análisis Bayesiano, lo que significa que se tiene un 98.15% de probabilidad de que los genes sean realmente diferenciales para ambas entidades tomadas como categorías. El resto de los parámetros también fue significativo (t, p y M).

El gen de mayor sobreexpresión fue *Madh3* con 2.94 veces sobreexpresado en tejido adenomatoso en relación a tejido paratiroideo normal, con una B de 9.38 y p de 0.00008. *Madh3* es la abreviación de la palabra inglesa “*mothers against decapentaplegic homolog 3*” (también denominado *SMAD3*), cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 15q21 (OMIM *603109).

El gen más infraregulado en adenomas fue un factor de elongación traduccional eucarionte cuyas siglas en inglés son *eef1a1* (de eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1). Este gen codifica para una isoforma de la subunidad alfa del complejo del factor-1 de elongación responsable de trasladar los aminoacil-RNAs de transferencia (aRNAt) al ribosoma. Se encuentra localizado en el cromosoma 6q14 y codifica para una proteína de aprox. 462 aminoácidos. No hay estudios reportados en la literatura sobre el efecto de la expresión de este gen en tejido paratiroideo (búsqueda realizada en PubMed). Otros

genes infraregulados en adenoma fueron: el factor 65 gamma asociado a staff o también denominado *staf65* gamma (1.69) y una proteína relacionada a diferenciación o *dif13* (1.59).

El segundo gen más sobreexpresado en tejido adenomatoso resultó ser un homólogo de factores de intercambio de GDP a GTP putativo denominado *rab5* (*RABEX5*). Este gen resultó estar sobrerregulado 1.95 veces más en adenomas que en tejido normal con una B de 5.67 y una p de 0.008. *RABEX-5* forma un complejo con rabaptina-5 que es requerido para la endocitosis (fusión de membrana durante la endocitosis). Se encuentra localizado en 7q11 y tampoco existe ningún estudio reportado en la literatura sobre la expresión de este gen en tejido paratiroideo (PubMed).

Adicionalmente la muestra de adenomas también reveló la sobrerregulación relativa de algunos otros genes interesantes como la sintasa de prostaglandina D, los cuales no alcanzaron una significancia estadística muy probablemente por el tamaño de la muestra. Independientemente del poder estadístico alcanzado, algunos de estos genes aparecieron en otro experimento o consideramos que a pesar de mostrar una sobreexpresión acentuada pero sin poder, valdría la pena mencionarlos por la relevancia del papel biológico que juegan. Por ejemplo, esta sintasa de prostaglandina D se encuentra relacionada a una producción de prostanoideos e interesantemente también tiene una actividad de tumor supresor de tumores⁵³. Este gen se encontró sobreexpresado 1.72 veces arriba del nivel de transcrito presente en tejido paratiroideo normal.

Description	Regulation	Fold	p	B
Mad, mothers against decapentaplegic homolog 3 (<i>madh3</i>)	Up	2.94	0.00008	9.38
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (<i>eef1a1</i>)	Down	1.88	0.004	6.16
Putative rab5 gdp/gtp exchange factor homologue (<i>rabex5</i>)	Up	1.95	0.008	5.67
Primase, polypeptide 2a (<i>prim2a</i>)	Up	1.71	0.03	4.47
Sptf-associated factor 65 gamma (<i>staf65 gamma</i>)	Down	1.70	0.03	4.47
Peptide yy precursor variant	Up	2.01	0.04	4.13
Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (<i>trem2</i>)	Up	1.68	0.05	3.99
Differentiation-related protein dif13 (<i>loc51212</i>)	Down	1.59	0.05	3.97

Tabla 2. Comparación Adenoma Paratiroideo contra Tejido Paratiroideo Normal. Los genes se encuentran enlistados de acuerdo a su significancia estadística.

Otros genes también interesantes encontrados fueron *TOPBP1*, que codifica para una proteína de unión a la DNA topoisomerasa II (2.36 veces incrementada su expresión en

adenomas en relación a tejido paratiroideo normal), la cual se encuentra relacionada a reparación de DNA y el receptor del factor de crecimiento epidérmico ó *EGFR* por sus siglas en inglés (Epidermal Growth Factor Receptor) que se encontró 1.49 veces incrementada su expresión en adenomas. Este receptor que juega un papel central en proliferación celular

La sobreexpresión de este receptor ha sido reportada en varios tipos de cáncer como el ovárico⁵⁴, mamario⁵⁵ y carcinomas neuroendócrinos de pulmón⁵⁶. La sobreexpresión de este gen ha sido asociada al fenotipo invasor de algunos carcinomas como el de vejiga⁵⁷ y el hepatocelular⁵⁸.

Hiperplasia Paratiroidea contra Tejido Paratiroideo Normal

Para la comparación entre hiperplasia paratiroidea y tejido paratiroideo normal también se hicieron pooles. Se incluyeron 2 muestras de glándulas normales y 3 muestras de hiperplasia primaria de pacientes con hiperparatiroidismo primario esporádico (puramente hiperplasia confirmada también en el seguimiento clínico de al menos 6 meses). El análisis estadístico en estos casos con una muestra pequeña debe de ser más astringente para obtener sólo aquellos genes realmente diferenciales, que aunque por el número de genes esta probabilidad se eleva (aproximadamente 10 000 genes repetidos por arreglo con 2 repetidos contigüos, en 2 repetidos técnicos) por la potencia del instrumento que estamos utilizando. Esta “compensación” técnica o tecnológica nos ayudó a determinar los genes diferenciales con una significancia estadística adecuada (para los valores de M, t, B y p).

En esta comparación 50 genes resultaron diferencialmente expresados: 42 de los cuales estuvieron sobrerregulados (con más de 1.89 veces de sobreexpresión) y 8 infraregulados (con más de 1.7 veces negativas de expresión). La tabla 3 resume los 20 genes más relevantes encontrados para esta comparación. Valores de B arriba de 4.26 indican una probabilidad del 98.6% de que estos genes estén realmente diferencialmente expresados.

Description	Regulation	Fold	p	B
Hook1 protein	Up	3.86	0.00002	11.52
Hypothetical protein flj22215	Up	2.67	0.0004	8.78
Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (utf1)	Up	2.42	0.001	7.93
Hypothetical protein xp_016397	Up	2.3	0.001	7.83
Hepatitis delta antigen-interacting protein a (dipa)	Up	2.34	0.001	7.75
Heat shock 70-kd protein 2 (hspa2)	Up	2.68	0.001	7.61
Mast cell tryptase beta 3; tryptaseb	Up	2.33	0.002	7.39
Ficolin 1 precursor (fcn1)	Up	2.82	0.002	7.28
Thromboxane a ₂ receptor (<i>tbxa2r</i>)	Up	2.2	0.002	7.22
Hypothetical protein flj10385	Up	2	0.002	7.20
Mad, mothers against decapentaplegic homolog 3 (<i>madh3</i>)	Up	2.44	0.003	7.03
Kiaa0215 gene product (<i>kiaa0215</i>)	Down	2.01	0.003	6.85
Hypothetical protein <i>flj10734</i>	Down	1.83	0.009	5.88
H1 histone family, member 0 (h1f0)	Down	1.79	0.01	5.60
Hypothetical protein flj13842	Down	1.81	0.02	5.29
Hypothetical protein flj10057	Down	2.15	0.02	4.95
Keratin 12 (krt12)	Down	1.92	0.03	4.79
Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase; grhpr	Down	1.7	0.04	4.48
Methionine synthase reductase, isoform 2 (mtrr)	Down	1.76	0.04	4.42
Hypothetical protein dkfzp586h0623	Down	1.68	0.05	4.17
Hypothetical protein flj10620	Down	1.79	0.05	4.04

Tabla 3. Comparación Hiperplasia Paratiroidea contra Tejido Paratiroideo Normal. Los genes se encuentran enlistados de acuerdo a su significancia estadística.

Uno de los genes sobreexpresados fue el gen *HOOK1* con una razón de 3.86 veces sobreexpresado en relación al tejido paratiroideo normal. El locus de este gen se encuentra en 1p32.1 y codifica para una proteína de localización citosólica de aproximadamente 137 aminoácidos (85 kDa). La función de este gen se encuentra relacionada a la unión de microtúbulos y organelos por medio de sus dominios amino y carboxiterminal durante la mitosis²⁹. Interacciona con algunas familias de proteínas GTPasas como rab para procesos celulares de endocitosis y tráfico intracelular hacia el citoesqueleto. No hay reportado en PubMed ningún artículo que relaciona *HOOK1* con cáncer, aunque en la base de expresión (GEO del NCBI) se ha reportado su sobreexpresión en líneas celulares de cáncer de mama y leucemia (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene&cmd=Display&dopt=unigene_GEO&from_uid=202862).

Otro gen sobreexpresado fue el gen de la tríada de histidinas cuyas siglas en inglés son *FHIT* con una razón de 3.01 veces de sobreexpresión, pero con valores de p mayores a los 0.05. El locus de este gen se encuentra en 3p14.2, y codifica para una hidrolasa de aproximadamente 147 aminoácidos que participa en el metabolismo de las purinas (replicación del ADN). La función de este gen se encuentra asociada a la inhibición de la proliferación celular. Se postula que la delección de este gen puede estar asociada al desarrollo de cáncer³¹. De hecho el nombre de este gen es debido a que pertenece a un

sitio de fragilidad cromosómica denominado *FRA3B* (sinónimo del gen u otro alias) el cual puede romperse por algunos carcinógenos y producir translocaciones o transcripción aberrante. Según el catálogo de enfermedades mendelianas en Internet (OMIM *601153) del NCBI (OMIM en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) los transcritos aberrantes de este gen se pueden encontrar en cerca de la mitad de los carcinomas esofágicos, escamosos de cabeza y cuello, gástricos, de pulmón y de colon.

De manera muy interesante y similar a lo encontrado en adenomas, otro gen sobreexpresado fue *MADH3*, con una razón de 2.44 mayor expresión en hiperplasias que en tejido normal. Como ya se había comentado arriba, *MADH3* también denominado *SMAD3*, codifica para una proteína que participa en la vía de señalización del TGF-beta, con regulación del ciclo celular. La gran diferencia en cuanto a la expresión en relación a tejido paratiroideo normal podría suponer de alguna utilidad en la clínica para diferenciar estados patológicos de lo normal, como por ejemplo hiperplasias no obvias a diferencia del tejido normal. La mayor utilidad se determinaría para discernir entre hiperplasia y adenoma como posteriormente se analizará.

Otro gen interesante de los sobreexpresados en hiperplasias en relación con tejido paratiroideo normal, es el receptor para Tromboxanos a2 (*TBXA2R*) con una razón de 2.2 veces sobreexpresado en hiperplasias en relación a tejido paratiroideo normal. El locus de este gen se encuentra localizado en 19p13.3 y codifica para una proteína de cerca de 40 kDa. Este receptor es un miembro de los receptores de membrana asociados a una proteína G, cuya función es esencial en hemostasia al generar la agregación plaquetaria una vez que se ha unido a su ligando el Tromboxano A2. Su mutación germinal general un fenotipo de sangrado que se hereda en forma autosómica dominante, por una falta de agregación plaquetaria debida a la insensibilidad de las plaquetas al Tromboxano A2. Se reportado en la literatura un valor pronóstico en algunos cánceres como el de mama, en los cuales se encuentra sobreexpresado en tumores agresivos clínicamente y por tanto con mal pronóstico^{20,59}.

Hiperplasia Paratiroidea contra Adenoma Paratiroideo

Para esta comparación se utilizaron los 12 adenomas únicos contra las 3 muestras de hiperplasia paratiroidea primaria esporádica. En esta comparación 200 genes resultaron diferencialmente expresados entre estas entidades de los cuales 61 estuvieron sobrerregulados (con más de 1.65 veces sobreexpresión) y 139 infraregulados (más de 1.58 veces infraregulación). La tabla 4 enlista los 20 genes con mayor significancia estadística para esta comparación de acuerdo a los valores de p y B. Un valor de B superior a 4.68 significa una probabilidad superior al 99.1% de que estos genes estén realmente diferencialmente expresados.

Description	Fold	Regulation	P	B
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eef1a1)	2.66	Up	0.000006	12.86
Hook1 protein (hook1)	4.07	Up	0.000008	12.54
Hypothetical protein flj10385 (flj10385)	2.55	Up	0.00001	12.06
Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (scnn1b)	3.37	Down	0.00001	12.06
Prostaglandin-d synthase (pgds)	2.94	Down	0.00002	11.7
Methionine synthase reductase, isoform 2 (mtrr)	2.49	Down	0.00002	11.52
V-crk avian sarcoma virus ct10 oncogene homolog-like (crkl)	2.53	Down	0.00003	11.35
Heparan sulfate d-glucosaminyl 3-o-sulfotransferase 1 precursor	2.82	Down	0.00003	11.31
Keratin 12 (krt12)	2.66	Down	0.00005	10.83
Primase, polypeptide 2a (prim2a)	2.29	Down	0.00006	10.73
Cd36 antigen (collagen type i receptor, thrombospondin receptor)-like 2 (lysosomal integral membrane protein 2)	2.29	Down	0.00006	10.72
Taste receptor, type 2, member 7 (tas2r7)	2.39	Down	0.00007	10.5
Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (trem2)	2.23	Down	0.0001	10.07
Mast cell tryptase beta 3 (tryptaseb)	2.70	Up	0.0001	10.01
Transforming growth factor, beta 4 (ebaf)	2.10	Up	0.0002	9.374
Keratin 9 (krt9)	2.64	Up	0.0004	8.88
Thromboxane a ₂ receptor (tbxa2r)	2.38	Up	0.0004	8.826
Sptf-associated factor 65 gamma (staf65)	2.06	Up	0.0004	8.783
Hepatitis delta antigen-interacting protein a (dipa)	2.46	Up	0.0004	8.772
Transcription factor (p38 interacting protein)	2.19	Down	0.0005	8.689
Fragile histidine triad gene; thit	3.10	Up	0.0017	7.542
V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog b	2.96	Up	0.0254	4.867

Tabla 4. Comparación Hiperplasia Paratiroidea contra Adenoma Paratiroideo. Los genes se encuentran enlistados de acuerdo a su significancia estadística.

Entre los genes sobrerregulados se confirmaron algunos de los cuales ya se habían encontrado en las comparaciones previas, por lo que consideramos una doble confirmación (primero al haberlos encontrado significativos estadísticamente en los replicados técnicos y segundo por confirmarse en otro experimento independiente y con su réplica igualmente). Uno de estos genes confirmados es hook1 que se encontró 4.07

veces más expresado en hiperplasia que en adenoma, con una mayor diferencia proporcional que la encontrada en la comparación previa contra el tejido paratiroideo normal (ver antes). Otros genes confirmados fueron el receptor del Tromboxano A2 ó *tbxa2r* (2.38 veces sobreexpresado) y el gen del sitio frágil de tríada de histidinas (3.1 veces de cambio) asociado a una inhibición de proliferación celular como ya comentamos.

Entre los genes infraregulados también se confirmaron el gen de la sintasa de prostaglandina d (2.94 veces expresado negativamente en hiperplasia en relación a adenoma) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico o *EGFR* (2.28 veces regulado negativamente en hiperplasia o positivamente en adenoma, como se quiera ver).

DISCUSIÓN

En la práctica clínica el diagnóstico definitivo de adenoma paratiroideo se puede establecer después de que el cirujano ha extirpado una de las cuatro glándulas paratiroideas, debido a que una de ellas se encontraba anormalmente crecida, junto con la normalización del calcio sérico en el postoperatorio^{7,8,25,35}. Con el advenimiento de novedosas técnicas bioquímicas como el ensayo rápido intraoperatorio de la paratohormona (ioPTH), este diagnóstico se ha visto facilitado durante el transoperatorio, ya que una disminución superior al 50% de los niveles de paratohormona en plasma en los primeros 10 minutos posteriores a la remoción de la glándula anormalmente crecida puede establecer el diagnóstico definitivo de adenoma, sin requerir de la vigilancia postoperatoria del calcio y PTH molécula intacta^{7,25,35}. La utilización de este ensayo intraoperatorio y de otros estudios de localización que de manera preoperatorio pueden no sólo definir la ubicación de la glándula enferma sino además de establecer la enfermedad monoglandular, ha beneficiado mucho a estos pacientes. La localización preoperatorio de una glándula afectada ha llevado a la aplicación de novedosas técnicas quirúrgicas como la de la resección paratiroidea (paratiroidectomía) mínimamente invasiva. Esta técnica tiene la ventaja de una menor cicatriz en comparación con la exploración bilateral tradicional, y por tanto de una recuperación más rápida, menos dolorosa y más estética. Sin embargo en un porcentaje de pacientes estos estudios pueden ser erróneos llevando a que la hipercalcemia recurra en estos pacientes, con consecuencias para el paciente que requeriría en este caso de una re-exploración quirúrgica^{8,17,25,35}. En ausencia de algún parámetro bioquímico, radiológico, histopatológico o morfológico confiable para el diagnóstico diferencial entre adenoma e hiperplasia paratiroideos, la búsqueda de marcadores moleculares para diferenciar estas entidades patológicas parece no sólo interesante sino hasta necesaria en algunos casos. La capacidad para diferenciar estas dos entidades conllevaría a ventajas no sólo clínicas sino económicas en el tratamiento de estos pacientes.

Las técnicas de caracterización de la expresión genética a gran escala como los microarreglos de expresión de ADN complementario (ADNc) determinan de una manera más eficiente y rápida que el abordaje genético tradicional, los marcadores genéticos útiles que puedan categorizar o definir mejor a entidades clínicas o patológicas. La

tecnología de microarreglos de ADNc ya ha demostrado su capacidad para discernir entre dos o más entidades clínicas basándose en los perfiles de expresión genómica diferencial a nivel de transcritos de ARN mensajero^{27,33,37,39}. Esta técnica explora miles o cientos de miles de genes de manera simultánea, incrementando la eficiencia de búsqueda al mismo tiempo que disminuyendo radicalmente la variabilidad experimental. La utilización de los microarreglos no sólo tiene ventajas en términos de reproducibilidad experimental sino en tiempo y costos.

Nuestros resultados muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los perfiles de expresión genómicos de las dos patologías paratiroides más frecuentes: adenoma e hiperplasia primaria en relación al tejido paratiroideo normal. Si bien este objetivo es ambicioso, y debido a lo limitado del tamaño muestral es complicado de alcanzar, creemos que las diferencias en la expresión fueron tan obvias que alcanzaron una buena potencia aún con este tamaño muestral reducido por lo difícil de coleccionar de los casos con hiperplasia. Por consiguiente, en este primer esfuerzo para identificar la firma molecular diferencial entre entidades tendrá en un futuro que verse consolidada con el uso de otras técnicas menos costosas y más accesibles para los clínicos como es la inmunohistoquímica.

De acuerdo a nuestros resultados los siguientes genes podrían conformar la “firma” molecular para cada entidad patológica:

Adenoma Paratiroideo

Los genes **sobreexpresados** principales fueron *MADH3*, *RABEX5*, *PRIM2A*, *TREM2* y el *PÉPTIDO YY* (ver tabla 2). Estos genes tienen diferentes funciones a nivel celular. Por ejemplo, *madh3* (*smad3*) como ya se mencionó previamente juega un papel importante de adherencia intercelular y durante el ciclo celular. Este gen participa en dos de las más importantes vías de señalización en cáncer: TGF-beta y Wnt, por lo que algunos lo han considerado un factor transcripcional. La proteína de este gen participa activamente en la vía de señalización celular del TGF-beta cuyos genes blanco son algunas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Shattuck et al⁶⁰ analizaron la pérdida de heterocigocidad de este gen (*SMAD3*) en 20 tumores enteropancreáticos (endocrinos) y 67 adenomas paratiroides. Estos autores reportaron una pérdida de heterocigocidad de 20 y 24%

respectivamente para este gen. Desafortunadamente estos mismos autores después de secuenciar este gen para todos los casos con pérdida de la heterocigosidad y algunas más, no encontraron ninguna mutación somática clonal, delección o microdelección en *SMAD3* por lo que su función real como un supresor de tumores en estas patologías todavía es dudosa.

El gen *RABEX5* se encuentra localizado en 7q11.21 y es considerado un factor de intercambio de nucleótidos que también regula la fusión de endosomas. Debido a esto, algunos autores consideran que juega un papel relevante en la unión de ADN y endocitosis³⁰.

PRIM2A codifica para una proteína que básicamente participa en la replicación del ADN y fragmentos de Okazaki, mediante la síntesis de oligoribonucleótidos. Este gen se encuentra localizado en 6p12-p11⁴¹. Hay muy poco publicado sobre este gen (sólo dos artículos en el pubmed).

TREM2 tiene actividad como receptor de membrana, jugando un papel importante en la respuesta humoral del sistema inmune. Se encuentra localizado en 6p21.1 y codifica para una proteína que también tiene función de diferenciación en los precursores mieloides mononucleares así como en los osteoclastos multinucleados funcionales. Además, los pacientes que tienen una deficiencia de este factor (*trem2*) presentan una acumulación de grandes agregados de osteoclastos inmaduros con una consiguiente resorción ósea anormal^{42,43}.

Finalmente el *PEPTIDO YY* es considerado una hormona natural del intestino delgado que ha sido identificada en algunos tumores carcinoides (neuroendócrinos) del intestino delgado. La expresión disminuida de este gen se ha asociado al desarrollo y progresión del adenocarcinoma de colon¹¹. También se ha documentado que el uso de este péptido disminuye el crecimiento y progresión de tumores pancreáticos^{3,59} y de la glándula mamaria^{21,617}.

Los genes principalmente ***infra regulados*** fueron *EEF1A1*, *STAF65 GAMMA* y *DIF13*. Estos genes también tienen diferentes funciones celulares y moleculares.

STAF65 gamma también es denominado *SUPT71* y *ART1*. Este gen codifica para un antígeno que se encuentra presente en algunos adenocarcinomas con una función molecular todavía desconocida hasta la fecha⁵⁰. Se encuentra localizado en 2pter25.1.

Curiosamente, otro gen infra regulado, *DIF13*, también ha sido considerado por algunos autores como un marcador tumoral, reportándose sobreexpresado en adenocarcinoma mamario (GEO GDS850, GDS807, GDS1090 y GDS1091) y leucemia. La infra regulación de estos dos últimos genes, además de la sobreexpresión del *péptido yy*, podría apoyar la hipótesis de que los adenomas son condiciones neoplásicas benignas, pero un paso previo al desarrollo de cáncer.

Hiperplasia Paratiroidea

Entre los genes más importantes **sobreexpresados** en hiperplasia (ver tabla 3) está el gen *MADH3*. Este gen es tal vez responsable de la actividad transcripcional y mitótica elevada presentes tanto en hiperplasia como en adenomas paratiroideos, pero mínimamente activo en el tejido paratiroideo normal. Esto es biológicamente congruente con la observación de que ambas entidades son condiciones celulares de una proliferación acentuada con un potencial todavía desconocido de tumorigénesis. Otros genes como *HOOK1* (1p32.1) tienen un papel en el ensamblaje del citoesqueleto y diferenciación celular al igual que el gen *WDR79* (17p13.1) que contiene un dominio repetido WD.

Otros genes interesantes que también se encontraron sobreexpresados en hiperplasia paratiroidea fueron *dipa* (11p12.1), la cual tiene una función en adipogénesis, *TPSB2* (16p13.3) el cual está involucrado en desórdenes inflamatorios; *ficolina 1* (9q34) en la presentación celular de antígenos y opsonización; *TBXA2R* (19q13.3) el receptor del Tromboxano A2 acoplado a una proteína G que interviene en angiogénesis (por tratarse de un receptor de prostanoides) y *UTF1* (10q26) que es un reconocido factor transcripcional expresado de manera normal en células embrionarias poco diferenciadas.

Otro gen que se encontró exclusivamente sobreexpresado en hiperplasia fue *FHIT*, un miembro de la familia de los genes de la tríada de histidinas que se encuentra asociado a

un sitio de fragilidad cromosómica reconocido (FRA3B) en el cromosoma 3. Como ya comentamos previamente, este sitio inducido por carcinógenos puede llevar a la producción de translocaciones cromosómicas o transcritos aberrantes de este gen. Estos transcritos anormales pueden encontrarse en más de la mitad de los casos de carcinoma de esófago¹¹, estómago⁵² y colon⁴⁶. Este hallazgo podría apoyar la hipótesis de que hiperplasia es una condición más premaligna que adenoma.

Entre los genes ***infraregulados*** en hiperplasia (enlistados en la tabla 3) fue interesante notar un alto número de reguladores transcripcionales, principalmente proteínas que contienen dedos de zinc tales como *PHF16* (Xp11.3), *ZMAT4* (8p11.21) y *ZCWPW1* (7q22.1). La importancia biológica de este hallazgo debe de ser ulteriormente explorada para determinar la función de estos genes en el desarrollo neoplásico de las glándulas paratiroides.

Un gen que adicionalmente se encontró infraregulado en nuestro estudio fue *H1FO*, localizado en 22q13.1. Este gen sin intrones codifica para una proteína miembro de la familia de las histonas H1. Interviene durante la diferenciación celular normal y ha sido especulado que algunos factores derivados de tumores pueden afectar la diferenciación normal al interferir con la acción de este gen al afectar la expresión de su proteína H1. Este hallazgo también contribuye a la observación de que la hiperplasia paratiroidea podría ser más heterogénea y compleja desde el punto de vista de expresión genómica que el adenoma, lo cual podría llevar a interesantes cuestionamientos sobre el comportamiento biológico neoplásico registrado en algunos casos⁴⁸.

Por supuesto que estos genes además de mostrar utilidad para la diferenciación de hiperplasia contra tejido normal, pudieran tener una ventaja adicional al diferenciar hiperplasia de tejido adenomatoso. Traducido en la clínica podría auxiliar al clínico para indicar cuándo un paciente no tiene una evidencia obvia de crecimiento glandular, se tratara de una hiperplasia verdadera en una glándula de dimensiones cercanas a las normales, y por tanto de la indicación certera de una resección casi total (de tres y media glándulas) de las glándulas paratiroides. Los autores creemos que esta sería la mayor ventaja de este estudio hacia los cirujanos endocrinos o cualquier otro que se enfrenta con el dilema de paratiroides de tamaño cercano al normal en un paciente operado por hiperparatiroidismo primario esporádico.

Otros Estudios

Cuando nuestros resultados fueron comparados con otros previamente publicados por otros autores^{18,33,44,45,49}, encontramos que algunos genes coincidieron aún cuando la tecnología o técnica utilizada fue diferente. Esto de alguna manera podría tomarse como una validación externa de nuestros resultados, ya que por otros métodos se encontraron resultados similares. Por ejemplo CDH1 una cadherina, la encontramos sobreexpresada 2.61 veces más en hiperplasia primaria al compararse con adenoma. Con nuestros resultados pudimos concluir que este gen podría ser utilizado como un marcador para hiperplasia. En un extraordinario artículo publicado previamente por Haven y su grupo, con tecnología similar, CDH1 se determinó como útil para distinguir los tumores paratiroideos, principalmente de cáncer⁴⁴.

En otro interesante estudio⁴⁵ dos proteínas, jun-b y p38 fueron reportadas como sobreexpresadas en los adenomas paratiroideos. En nuestro arreglo también encontramos una expresión incrementada para ambos genes en adenomas paratiroideos al ser comparados contra tejido paratiroideo normal e hiperplasia primaria. Esto podría estar relacionado a la activación “corriente abajo” de la MAP cinasa por el receptor sensible al calcio.

Por otro lado, un artículo muy interesante publicado por Schachter y su grupo¹⁸ presentaron la experiencia inicial en la literatura del uso de un microarreglo de ADN complementario para explorar estas entidades patológicas de las glándulas paratiroideas. En su artículo, estos autores propusieron por primera vez, que es posible diferenciar categóricamente al adenoma de la hiperplasia primaria por medio de los patrones diferenciales promedios de genes específicos que codifican para proteincinasas. En nuestro estudio encontramos a algunos genes que codifican para cinasas sobreexpresados como CDC2, la mapk6 (mitogen-activated protein kinase 6), gprk5 (g protein-coupled receptor kinase 5), non-metastatic cells 5 (nme5), entre algunas otras que estaban predominantemente expresadas en los adenomas paratiroideos. Desafortunadamente también encontramos algunas otras cinasas tales como la proteincinasa 3 asociada a estrés (stress-activated protein kinase 3 ó mapk12) entre otras

cinastas con una expresión elevada en los casos de hiperplasia paratiroidea primaria cuando se compararon contra tejido normal e inclusive también contra adenoma.

Otras cinastas con una expresión elevada en hiperplasia (contra tejido normal y adenoma) fueron: la cinasa de la cinasa de la proteincinasa activada 11 por mitosis (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 ó map3k11), un ligando de la tirosincinasa 3 similar a fms (flt3lg), la cinasa 10 dependiente de ciclinas isoforma 1 (cdk10) y una diacilglicerolcinasa teta (dgkg).

Desafortunadamente en nuestros resultados el patrón de cinastas no resultó ser tan específico para una entidad, o la potencia no es suficiente para confirmar tal hallazgo. En cualquier caso sería necesario validar sólo el grupo de cinastas específicas publicada por Schachter y su grupo¹⁸ para reproducir sus resultados de una manera similar. Cabe mencionar que ningún otro grupo ha reproducido sus mismos resultados o validado este grupo de cinastas como un instrumento diagnóstico en los casos de hiperparatiroidismo primario¹⁸.

Algunos otros hallazgos también han sido documentados previamente por otros autores, como por ejemplo Rosen y su grupo⁴⁹. Estos autores encontraron que el antígeno cd36 (collagen type 1 receptor, thrombospondin receptor-like 2) y el precursor de fibulina 2 (fbln2) estuvieron sobreexpresados en adenomas. De manera interesante nosotros encontramos resultados similares, aunque ellos utilizaron en la metodología una referencia estándar común para todas sus comparaciones que según nuestra opinión es de mayor magnitud y proporción para las comparaciones que estos autores obtuvieron, en relación por supuesto a nuestro estudio. Esto de alguna manera también acredita la comparación múltiple bajo la referencia estándar (comparaciones indirectas al contrario de directas entre entidades como nuestro estudio), que ha sido por algunas criticada por obtener resultados diferentes, en este caso tiene concordancia con la comparaciones directas de nuestro estudio.

En búsqueda de una firma molecular

Considerando los perfiles de expresión genética mostrados por nuestro microarreglo, podría proponerse una firma molecular (fig 9) que ayudara a diferenciar dos condiciones: adenoma de hiperplasia paratiroidea primarias. De acuerdo a nuestros resultados los genes *HOOK2*, *FHIT* y *TBXA2* se encontraron predominantemente sobreexpresados en hiperplasia y mínimamente expresados en adenomas, mientras que el gen de *la sintasa de prostaglandina D* y el *EGFr* fueron encontrados sobreexpresados en adenomas y mínimamente expresados en hiperplasia. Adicionalmente estos genes se encontraron ausentes o mínimamente expresados en el tejido paratiroideo normal.

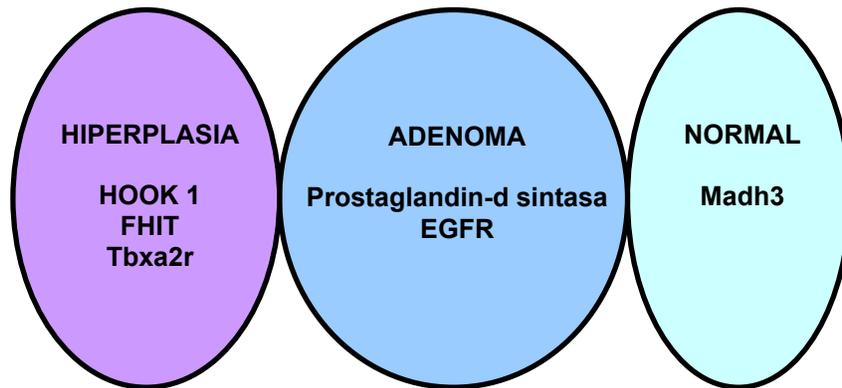


Figura 9. Firma molecular propuesta con el mínimo número de genes que pueden discernir tres entidades de manera categórica.

De manera interesante el gen *madh3* (*smad3*) se encontró exclusivamente expresado en tejido normal, lo cual podría conferir una utilidad clínica para diferenciar las entidades patológicas más frecuentes paratiroideas: adenoma e hiperplasia (cerca del 95% de los casos) en relación a tejido paratiroideo normal. Sin embargo se requiere de un análisis ulterior con otras técnicas para determinar el valor de este hallazgo en una mayor muestra de casos y para investigar el papel de estos genes diferenciales en el hiperparatiroidismo primario no familiar.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestros arreglos de ADNc, nos atreveríamos a especular que la condición de hiperplasia paratiroidea es una condición más heterogénea que adenoma desde el punto de vista de expresión genómica. Esta suposición parte de que el número de genes diferencialmente expresados fue mucho mayor en hiperplasia que en los adenomas. Esta hipótesis ha sido propuesta por otros autores como Giordano y su grupo³³, los cuales han sugerido que la variabilidad y por lo tanto heterogeneidad genómica de las hiperplasias es mucho mayor debido a que son condiciones policlonales en las que la proliferación celular está incrementada, mientras que el adenoma podría ser una condición monoclonal preneoplásica. Esta hipótesis no ha sido del todo explorada ni estudiada debido a las dificultades para obtener tamaños muestrales adecuados para demostrar varianzas heterogéneas en grupos de comparación relativamente pequeños.

Las funciones biológicas y celulares de todos los genes mostrados como diferencialmente expresados en nuestros resultados, requiere ser complementado con otros estudios y/o técnicas de biología molecular que puedan precisar o profundizar en el detalle de genes individuales^{14,24,38,47}. Otra vez el uso de técnicas como los microarreglos de ADNc, sólo sirven para recolectar una gran escala de genes que pudieran servir como marcadores diagnósticos o pronósticos para alguna categoría o enfermedad individual, pero no deben considerarse como estudios cuantitativos o exactos de diferencias genéticas.

Otras técnicas adicionales como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o inmunohistoquímica, podrían complementar este estudio para analizar el detalle o cuantificar el número de transcritos de ciertos genes específicos mostrados en estudios como el presente. El uso de la inmunohistoquímica es en muchas ocasiones el preferido de los dos métodos mencionados, debido al relativo bajo costo, rapidez, eficiencia y relativa simplicidad en el análisis. Desafortunadamente sólo los genes que tienen diferencias importantes en los niveles de expresión pueden ser probados, puesto que al tratarse de procesos de tinción, diferencias mínimas no pueden ser discriminadas fácilmente por el ojo humano. Una diferencia importante en la intensidad de la tinción – que nadie ha establecido en magnitud o cuantificado- sería la que contrastaría y por tanto orientaría mejor al diagnóstico categórico entre dos o más entidades clinicopatológicas. El

siguiente paso será entonces evaluar el impacto clínico y real de estos hallazgos en muestras cegadas al diagnóstico histopatológico o clínico.

Los resultados mostrados en este trabajo arrojan algunas claves para el mejor entendimiento del desarrollo y comportamiento molecular de estas condiciones patológicas, y proponer algunas rutas para el desarrollo de nuevos marcadores diagnósticos para estas enfermedades. El uso racional y cauteloso de esta información podría conducir al ulterior estudio de grupos de genes que podrían ser utilizados como marcadores (firmas) moleculares con aplicación clínica directa para el médico tratante y más específicamente para el cirujano endocrino que confronta día con día el dilema de la resección completa o parcial de las glándulas paratiroides en pacientes con claro hiperparatiroidismo primario esporádico.

BIBLIOGRAFIA

1. Clark OH, Quan-Yang D. Textbook of Endocrine Surgery. Primera edición. Editorial W.B. Saunders. 1997.
2. Greenspan FS, Strewler GJ. Basic & clinical endocrinology. 5ta edición. Editorial Appleton & Lange. 1997.
3. Kinder BK, Stewart AF. Hypercalcemia. Current Problems in Surgery vol. 39(4): pp 445, 2002.
4. Weber AL, Randolph G, Aksoy FG. The thyroid and parathyroid glands. CT and MR imaging and correlation with pathology and clinical findings. Radiologic Clinics of North America, vol. 38(5), 2000.
5. Rao, D. Sudhaker a; Rao, Sunil D. b Treatment of primary hyperparathyroidism. Current Opinión in Endocrinology and Diabetes. Vol 10(6):394-399, 2003.
6. Melton III J. The Epidemiology of Primary Hyperparathyroidism in North America. Journal of Bone and Mineral Research vol. 17(2):N12-17, 2002.
7. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Capítulo 26: Sistema Endocrino, del libro Patología estructural y funcional, pp 1204-10. 3ra edición. Editorial Interamericana. 1988.
8. Arnold A, Stewart AF. Capítulo 51: Disorders of the parathyroid gland, pp 475. Del libro Jameson, JL. Principles of molecular medicine. 1a edición. Humana Press 1998.
9. Ruda JM, Hollenbeak CS, Stack BC Jr. A systematic review of the diagnosis and treatment of primary hyperparathyroidism from 1995 to 2003. Otolaryngology and Head and Neck Surgery. Vol 132(3):359-72, 2005.
10. Bilezikian, JP, Brandi M, Rubin M, Silverberg SJ. Primary hyperparathyroidism: new concepts in clinical, densitometric and biochemical features. Journal of Internal Medicine. Vol 257(1):6-17, 2005.
11. Bilezikian JP, Potts JT, Fuleihan GE, Kleerekoper M, Neer R, Peacock M, Rastad J, Silverberg SJ, Udelsman R, Wells SA. Summary Statement from a workshop on asymptomatic primary hyperparathyroidism: a perspective for the 21st century. Journal of Bone and Mineral Research vol. 17(2):N2-11, 2002.
12. Bilezikian, JP; Rubin, Mishaela; Silverberg, Shonni J Primary hyperparathyroidism: diagnosis, evaluation, and treatment. Current Opinión in Internal Medicine. Vol 4(1):67-74, 2005.
13. Norton JA, Sugg SL. Surgical Management of hyperparathyroidism. Capítulo 65 pp 1106, del libro de De Groot LJ. Endocrinology 3ra edición. Volumen 2. W.B. Saunders Company. 1994.
14. Berri RN, Lloyd LR. Detection of parathyroid adenoma in patients with primary hyperparathyroidism: the use of office-based ultrasound in preoperative localization. American Journal of Surgery. Vol 191(3):311-4, 2006.
15. Grant CS, Thompson G, Farley D, van Heerden J. Primary hyperparathyroidism surgical management since the introduction of minimally invasive parathyroidectomy: Mayo Clinic experience. Archive of Surgery. Vol 140(5):472-8, 2005.
16. Irvin, George L. III MD; Carneiro, Denise M. MD; Solorzano, Carmen C. MD Progress in the Operative Management of Sporadic Primary Hyperparathyroidism Over 34 Years. Annals of Surgery. Vol 239(5):704-711, 2004.
17. Nguyen LQ, Jameson JL. Capítulo 6: The Cell Cycle, pp 65. Del libro Jameson, JL. Principles of molecular medicine. 1a edición. Humana Press 1998.
18. Howe JR. Minimally invasive parathyroid surgery. Surgical Clinics of North America, vol. 80(5):280, 2000.
19. Cheung C, Rotstein L, Asa SL. Parathyroid Pathology: A Practical Approach. Pathology Case Review. Vol 8(1):34-41, 2003.
20. Bornstein-Quevedo L, Gamboa-Domínguez A, Angeles-Angeles A, Reyes-Gutierrez E, Vargas-Vorackova F, Gamino R, Herrera MF. Histologic diagnosis of primary hyperparathyroidism: a concordance análisis between three pathologists. Endocrine Pathology 12(1):49-54, 2001.
21. Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, Krebs LJ, Costa J, Gallagher J, Wild Y, Saucier K. Molecular Pathogenesis of Primary Hyperparathyroidism. Journal of Bone and Mineral Research vol. 17(2):N30-36, 2002.
22. Cetani F, Picone A, Cerrai P, Vignali E, Borsari S, Pardi E, Viacava P, Naccarato A, Miccoli P, Kifor O, Brown E, Pinchera A, Marcocci C. Parathyroid expresión of calcium-sensing receptor protein and in vivo parathyroid hormone-Ca²⁺ set-point in patients with primary hyperparathyroidism. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol. 85(12), 2000.
23. Canalejo A, Almaden Y, Torregrosa V, Gomez-Villamandos JC, Ramos B, Campistol JM, Felsenfeld AJ, Rodriguez M. The in vitro effect of calcitriol on parathyroid cell proliferation and apoptosis. Journal of the American Society of Nephrology. Vol. 11(10), 2000.
24. Ozbey N, Erbil Y, Ademoglu E, Ozarmagan S, Barbaros U, Bozbora A. Correlations between vitamin D status and biochemical/clinical and pathological parameters in primary hyperparathyroidism. World Journal of Surgery. Vol 30(3):321-6, 2006.

Differential RNA Expression Profile by cDNA Microarray in Sporadic Primary Hyperparathyroidism (pHPT): Primary Parathyroid Hyperplasia versus Adenoma

David Velázquez-Fernández, MD, MSc,¹ Cecilia Laurell, MSc,²
Milena Saqui-Salces, Chem,³ Juan Pablo Pantoja, MD,¹
Fernando Candanedo-Gonzalez, MD, MSc,³ Alfredo Reza-Albarrán, MD,⁴
Armando Gamboa-Dominguez, MD, PhD,³ Miguel F. Herrera, MD, PhD¹

¹Department of Surgery, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14000, Mexico D.F., Mexico

²Department of Biotechnology, The Microarray Resource Center, KTH-The Royal Institute of Technology, SE-106 91 Stockholm, Sweden

³Department of Human Pathology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14000, Mexico D.F., Mexico

⁴Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, 14000, Mexico D.F., Mexico

Abstract

Background: Differential diagnosis between adenoma and hyperplasia in primary hyperparathyroidism (pHPT) remains a dilemma. The aim of this study was to assess differences in transcriptional genomic expression profiles between sporadic (nonfamilial) parathyroid hyperplasia (SPH), adenoma, and normal tissue.

Methods: Parathyroid tissue from 12 patients with parathyroid adenoma, 3 with SPH, and 2 with normal glands was selected for analysis. Histopathology was reviewed in all cases, and all patients with adenomas presented normocalcemia for a minimum of 6 months after one gland resection. Hybridizations were performed in a microarray containing 19,968 human cDNA clones including contiguous replicates. Direct comparisons were performed with reverse labeling for every different pooled sample entity. Expression levels were analyzed using the SAM, SMA, LIMMA, Cluster, and PAM packages in the R environment for statistical computing.

Results: There were significant statistical differences between SPH and adenomas. In the direct comparison, a total of 200 genes showed differential expression ($P < 0.03$): 61 genes were upregulated (> 1.65 -fold increase) and 139 were downregulated (> 1.58 -fold decrease) with a B value > 4.68 (99.08% probability of real differential expression). When SPH was compared to normal parathyroid tissue, 50 genes were differentially expressed: 42 were upregulated (> 1.89) and 8 were downregulated (> 1.7) with a B > 4.26 (98.6% probability of real differential expres-

sion). At least 17 genes were differentially expressed and able to discriminate SPH from adenoma or normal tissue. Upregulated genes were related to apoptosis inhibition, cell proliferation, transcriptional activity and cell adhesion, among other activities. Downregulated genes were mainly related to ion channel activity, lipopolysaccharides, prostaglandin-d synthase, and integral membrane proteins.

Conclusions: Our data suggest that SPH and adenoma have a singular molecular signature that, theoretically, could be used for the differential diagnosis of these entities and normal parathyroid tissue.

Primarily hyperparathyroidism (pHPT) accounts for more than 90% of nonhospitalized patients presenting with hypercalcemia.^{1,2} The condition is more frequent in women and in people older than 60 years of age¹. Most cases are sporadic, with approximately 5% related to familial syndromes.² Primary HPT occurs as a consequence of excessive secretion of parathyroid hormone (PTH) by one or more of the parathyroid glands.² Between 80% and 85% of patients with pHPT have uniglandular enlargement, also called adenoma; in 4%–15% of cases double adenomas are responsible for the disease, and 15%–20% of patients have multiglandular disease caused by SPH.^{2–6} Approximately 1% of patients present with parathyroid carcinoma.⁴

At present, surgery is considered the first choice of treatment for most patients with pHPT.^{2,3} In general, the surgical strategy is uniglandular resection in patients with parathyroid adenoma, resection of 3½ glands in patients with SPH, and en bloc resection in the presence of cancer.^{1–3} Preoperative localization studies—e.g., sestamibi scintigraphy and percutaneous ultrasound—allow a focused approach in many cases.^{4,5,7,8} However, the differential diagnosis and the extent of surgical resection are based primarily on the gross appearance of the glands or their size and the normalization of PTH levels during and after surgery.^{3,5,7} Some histological features can help differentiate adenomas from hyperplasia, but the histological diagnosis is inconclusive in many patients.⁹ Unfortunately, inadequate discrimination between adenoma and hyperplasia by the operating surgeon may lead to treatment failure or persistent/recurrent pHPT.^{4,5}

According to some molecular studies, parathyroid adenoma has a monoclonal origin in at least the 75% of cases.^{10,11} Additionally, some genes such as *PRAD1* (cyclin D1) have been found to be overexpressed in patients with parathyroid adenoma, and *menin* (*MEN1*) is often underexpressed.^{1,10,12,13} In contrast, it seems that SPH may be different from the molecular point of view, because this entity is frequently related to familial inherited disorders and, additionally, it is considered polyclonal. However, despite multiple studies on the

molecular biology of these entities,^{11,14–16} a reliable molecular marker to clearly differentiate SPH from adenoma in pHPT is still missing.¹⁷

Microarray technology has made it possible to distinguish two or more clinical entities based on their multiple genetic expression levels when their respective messenger ribonucleic acid (mRNA) is quantified.^{18–21} With this technology, thousands of genes can be explored simultaneously. The aim of the present study was to investigate differences in the genetic expression patterns of SPH and adenoma as compared with normal glands, using a microarray containing 10,000 genes.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Samples

Parathyroid tissue from 15 patients with pHPT (12 adenomas and 3 SPH), and 2 normal glands were included. All procedures in this protocol were previously approved by the institutional review board for human research. Therefore informed consent was signed for all patients. Parathyroid adenoma was diagnosed in the presence of uniglandular enlargement and normal levels of Ca^{2+} and PTH for at least 6 months after excision of the abnormal gland. Sporadic parathyroid hyperplasia was diagnosed in the presence of multiglandular enlargement with no familial or personal history of components of the multiple endocrine neoplasia (MEN) syndromes. Normal tissue was considered whenever the parathyroid gland weight and size were within normal limits and the patients was normocalcemic. All histopathology specimens were re-reviewed by an experienced pathologist (A.G.).

RNA Preparation and Hybridizations

Once the tissue was obtained from patient at the operating room, it was fragmented into small pieces under sterile conditions. Tissue fragments were then snap-frozen and stored in liquid nitrogen in cryovials. RNA was

extracted from tissue pieces which weighed from 50 to 100 μg . RNA extraction was performed after homogenization in liquid nitrogen (Life Technologies Trizol® reagent for Total RNA isolation, TECH-LINE™). According to the standard protocol, total RNA was purified and dissolved in RNase-free water (treated with DEPC). Finally, total RNA was stored in an ultrafreezer at -70°C for later use. Quality was assessed using Agarose/Glyoxal gels and light spectrophotometry. Samples showing a spectrophotometry ratio above 1.8 and clear bands in the gel were considered optimal for further use in the array. An aliquot of 10 μg of total RNA was used for the first strand amplification, using the reverse transcriptase Superscript II (200 U/ μl , Gibco, BRL) in a total final volume of 100 μl with a mix including buffers, water, dNTPs, and random hexamers. Complementary DNA (cDNA) was fluorescently labeled with Cy3 and Cy5 (1 mM, Amersham Inc.), purified, and prepared for hybridization according to a standard protocol provided by the laboratory. All hybridizations were performed at 65°C for 14 to 18 hours into a humidified chamber with SSC $3\times$. Hybridizations were performed in a spotted microarray containing 19,968 human cDNA clones (50mer oligos from MWG Biotech, <http://www.mwg-biotech.com/html/all/index.php>) including contiguous replicates. The array included 432 positive and negative controls in an 18×36 -mm area with a distance of 185 μm between applications (2 applications per gene). The array was fully robotically fabricated at the Institute of Cellular Physiology, UNAM, Mexico. After incubation all slides were washed several times in decreasing concentrations of SSC buffer and then dried carefully in an automated vacuum drier. Then, slides were scanned at 532 nm and 635 nm excitation lengths with a Packard Bioship Scan Array 4000 (GSI Packard Bioscience/PerkinElmer, Minnesota, USA). Direct comparisons were performed with reverse labeling (dye swaps in order to decrease the dye bias) for every different pooled sample (entity): SPH, adenoma, and normal parathyroid tissue. Contiguous replicates were considered technical duplicates for every comparison.

Analysis

Scanned images were processed in a Virtek Chip Reader using an Array Pro analyzer (Media Cybernetics). This software localizes every spot with a programmed grid to obtain an averaged signal density of each spot and background (offset) of the area surrounding the spot. The image was initially filtered from little imperfections and wrong signals, followed by the grid formation and definition of desired zone of inclusion and exclusion for inten-

sity quantification. All spots and their technical and contiguous duplicates were then individually evaluated according to some statistical parameters (M, B, p , and t values) to avoid unacceptable variability. Once variability and correlation were accepted, the spots were integrated to the final analysis. A ratio of Cy5 to Cy3 intensity for each spot represented RNA expression relative to the compared sample. Linear correlation assessment was performed for every duplicate in order to only include arrays with good correlation ($r > 0.5$). Correlation of replicate spots was at least 0.68 (Pearson's correlation r) for all experiments. Expression levels were analyzed using the SAM, SMA, LIMMA, Cluster, and PAM packages in the R environment for statistical computing <http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray/packages/kthpackagegettransfer.html>.

RESULTS

Expression variability across hybridizations (adenoma, SPH, and normal pools) was smaller than individual normal comparison. Thus it seems that variability was slightly reduced by pooling samples, with the resulting advantage of increasing homogeneity. Pooling samples leveled out individual differences. This maneuver allowed us to look for potential markers among the differentially expressed (DE) genes as comparing entities but not individual patients.

Adenoma versus Normal

In comparing tissue from adenomas with normal tissue samples, 8 genes were found to be differentially expressed (DE): 5 were upregulated and 3 were downregulated (Table 1) with $B > 3.97$ (98.15% probability of the genes being truly DE). Adenoma displayed relative upregulation of some other specific genes such as prostaglandin-d synthase, which is involved in prostanoid production (1.72-fold expression) and suppression of tumor growth²²; TOPBP1 (topoisomerase DNA II binding protein; 2.36 fold) involved in DNA repair²³; EGFR (epidermal growth factor receptor (1.49-fold) involved in cell proliferation²⁴; and Madh3 (mad, mothers against decapentaplegic homolog 3; 2.94-fold change), which is related to apoptosis inhibition.²⁵ Additional overexpressed genes in adenoma were *rabex5*, *prim2a*, *trem2*, and peptide *yy* (Table 1).

Adenoma displayed downregulation of some genes such as the staf-associated factor 65 gamma (1.69), also called staf65 gamma, eukaryotic translation elongation factor (eef1a1) 1 alpha 1 (1.88), and differentiation-related protein, or dif13 (1.59).

Table 1.
Parathyroid adenoma pool against normal parathyroid tissue pool

Description	Regulation	Fold	<i>p</i>	B
Mad, mothers against decapentaplegic homolog 3 (<i>madh3</i>)	Up	2.94	0.00008	9.38
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (<i>eef1a1</i>)	Down	1.88	0.004	6.16
Putative rab5 gdp/gtp exchange factor homologue (<i>rabex5</i>)	Up	1.95	0.008	5.67
Primase, polypeptide 2a (<i>prim2a</i>)	Up	1.71	0.03	4.47
Sptf-associated factor 65 gamma (<i>staf65 gamma</i>)	Down	1.70	0.03	4.47
Peptide yy precursor variant	Up	2.01	0.04	4.13
Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (<i>trem2</i>)	Up	1.68	0.05	3.99
Differentiation-related protein dif13 (<i>loc51212</i>)	Down	1.59	0.05	3.97

Comparison of Adenoma against Normal Parathyroid Tissue

Note: Genes are listed according to their decreasing statistical importance. Upregulation and downregulation were found in adenoma in comparison to the expression level found in normal parathyroid tissue pool. This could suggest markers useful to diagnose parathyroid adenoma when the tissue is being targeted against normal parathyroid tissue.

Table 2.
Parathyroid hyperplasia pool against normal parathyroid tissue pool

Description	Regulation	Fold	<i>p</i>	B
Hook1 protein	Up	3.86	0.00002	11.52
Hypothetical protein flj22215	Up	2.67	0.0004	8.78
Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (<i>utf1</i>)	Up	2.42	0.001	7.93
Hypothetical protein xp_016397	Up	2.3	0.001	7.83
Hepatitis delta antigen-interacting protein a (<i>dipa</i>)	Up	2.34	0.001	7.75
Heat shock 70-kd protein 2 (<i>hspa2</i>)	Up	2.68	0.001	7.61
Mast cell tryptase beta 3; tryptaseb	Up	2.33	0.002	7.39
Ficolin 1 precursor (<i>fcn1</i>)	Up	2.82	0.002	7.28
Thromboxane a ₂ receptor (<i>tbxa2r</i>)	Up	2.2	0.002	7.22
Hypothetical protein flj10385	Up	2	0.002	7.20
Mad, mothers against decapentaplegic homolog 3 (<i>madh3</i>)	Up	2.44	0.003	7.03
Kiaa0215 gene product (<i>kiaa0215</i>)	Down	2.01	0.003	6.85
Hypothetical protein flj10734	Down	1.83	0.009	5.88
H1 histone family, member 0 (<i>h1f0</i>)	Down	1.79	0.01	5.60
Hypothetical protein flj13842	Down	1.81	0.02	5.29
Hypothetical protein flj10057	Down	2.15	0.02	4.95
Keratin 12 (<i>krt12</i>)	Down	1.92	0.03	4.79
Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase; <i>grhpr</i>	Down	1.7	0.04	4.48
Methionine synthase reductase, isoform 2 (<i>mtrr</i>)	Down	1.76	0.04	4.42
Hypothetical protein dkfzp586h0623	Down	1.68	0.05	4.17
Hypothetical protein flj10620	Down	1.79	0.05	4.04

Comparison of Hyperplasia against Normal Parathyroid Tissue

Note: Genes are listed according to their decreasing statistical importance. Upregulation and downregulation were found in hyperplasia in comparison to the expression level found in normal parathyroid tissue pool. This could suggest markers useful to diagnose primary parathyroid hyperplasia when the tissue is being targeted against normal parathyroid tissue.

Hyperplasia versus Normal

Fifty genes were DE in this comparison: 42 were up-regulated (with more than a 1.89-fold increase), and 8 were downregulated (with more than 1.7-fold increase). Table 2 shows the 20 most relevant genes from this comparison. The B value was above 4.26, which means a 98.6% probability that these genes are truly DE. Upreg-

ulated genes were the hook 1 protein (3.86-fold change), related to microtubule binding and mitosis²⁶; the fragile histidine triad gene (*FHIT* with a 3.01-fold change), which is associated with cell proliferation inhibition and its deletion to cancer development²⁷; the *madh3* (2.44-fold change), *tbxa2r*, or thromboxane a₂ receptor (2.2-fold), also related to G protein signaling which once activated has significant prognostic value in breast cancer²⁸ (it also

Table 3.
Parathyroid hyperplasia pool against parathyroid adenoma pool

Description	Fold	Regulation	P	B
Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (<i>eef1a1</i>)	2.66	Up	0.000006	12.86
Hook1 protein (<i>hook1</i>)	4.07	Up	0.000008	12.54
Hypothetical protein flj10385 (<i>flj10385</i>)	2.55	Up	0.00001	12.06
Sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (<i>scnn1b</i>)	3.37	Down	0.00001	12.06
Prostaglandin-d synthase (<i>pgds</i>)	2.94	Down	0.00002	11.7
Methionine synthase reductase, isoform 2 (<i>mtrr</i>)	2.49	Down	0.00002	11.52
V-crk avian sarcoma virus ct10 oncogene homolog-like (<i>crkl</i>)	2.53	Down	0.00003	11.35
Heparan sulfate d-glucosaminyl 3-o-sulfotransferase 1 precursor	2.82	Down	0.00003	11.31
Keratin 12 (<i>krt12</i>)	2.66	Down	0.00005	10.83
Primase, polypeptide 2a (<i>prim2a</i>)	2.29	Down	0.00006	10.73
Cd36 antigen (collagen type i receptor, thrombospondin receptor)-like 2 (lysosomal integral membrane protein 2)	2.29	Down	0.00006	10.72
Taste receptor, type 2, member 7 (<i>tas2r7</i>)	2.39	Down	0.00007	10.5
Triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (<i>trem2</i>)	2.23	Down	0.0001	10.07
Mast cell tryptase beta 3 (<i>tryptaseb</i>)	2.70	Up	0.0001	10.01
Transforming growth factor, beta 4 (<i>ebaf</i>)	2.10	Up	0.0002	9.374
Keratin 9 (<i>krt9</i>)	2.64	Up	0.0004	8.88
Thromboxane α_2 receptor (<i>tbxa2r</i>)	2.38	Up	0.0004	8.826
Sptf-associated factor 65 gamma (<i>staf65</i>)	2.06	Up	0.0004	8.783
Hepatitis delta antigen-interacting protein a (<i>dipa</i>)	2.46	Up	0.0004	8.772
Transcription factor (p38 interacting protein)	2.19	Down	0.0005	8.689
Fragile histidine triad gene; <i>fhit</i>	3.10	Up	0.0017	7.542
V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog b	2.96	Up	0.0254	4.867

Comparison of Hyperplasia against Adenoma

Note: Genes are listed according to their decreasing statistical importance. Upregulation and downregulation were found in hyperplasia in comparison to the expression level found in the adenoma pool. This could suggest markers useful to diagnose primary parathyroid hyperplasia from adenoma.

induces DNA synthesis and cell proliferation); and CDH1, a cadherin 1, type 1 preproprotein (2.61-fold change) well known as a calcium-dependent cadherin.

Hyperplasia versus Adenoma

For this comparison, 200 genes were DE: 61 of them were upregulated (> 1.65-fold increase) and 139 were downregulated (> 1.58-fold decrease or overexpressed in adenoma). Table 3 shows the 20 most statistically significant genes (according to *p* and B values) for this comparison. The B value was above 4.68 with a probability of 99.1% true DE. Among the upregulated genes were the *hook1* protein (4.07-fold change), the *tbxa2r* or thromboxane A_2 receptor (2.38-fold), and the *FHIT*, or fragile histidine triad, gene (3.1-fold change) associated with proliferation inhibition. Among the downregulated genes were the prostaglandin-d synthase gene (2.94-fold change expressed in adenoma or negatively downregu-

lated in hyperplasia) and *EGFR* (2.28-fold change as expressed in adenoma or negatively expressed in hyperplasia). Interestingly, the *MADH3* gene did not appear in this comparison as DE.

A Molecular Signature

Considering the genetic profiles found in the study, a molecular signature to differentiate adenoma from hyperplasia could be hypothetically proposed. We could therefore suggest that in hyperplasia some genes like *HOOK1*, *FHIT*, and *TBXA2E* were predominantly overexpressed but minimally expressed in adenoma, whereas prostaglandin-d synthase and *EGFR* were overexpressed in adenoma but minimally expressed in hyperplasia. These genes were absent or minimally expressed in normal parathyroid tissue.

The *MADH3* gene was exclusively expressed in normal tissue, which could make it useful in differentiating

between pathologic glands and normal glands. However, further analysis is necessary to investigate the role of these genes in pHPT.

DISCUSSION

In clinical practice, normalization of serum calcium after removal of one gland in patients with uniglandular enlargement is the most common way to support the diagnosis of adenoma.^{3-5,7} With the widespread use of the quick intraoperative PTH assay, a decrease in this hormone equal or superior to 50% within 10 minutes of gland removal is indicative of adenoma.^{3,5,7} The use of this assay and improved preoperative localization studies have made focused parathyroidectomy a feasible and attractive alternative to traditional bilateral exploration.^{3-5,7} However, in a small percentage of patients the test could be equivocal, and hypercalcemia might reappear over time.⁴⁻⁷

In the absence of any reliable histological parameter or other morphological, biochemical or molecular markers to differentiate between these entities, we decided to evaluate potential molecular differences using a powerful molecular tool such as the cDNA microarray.

Microarray technology in some instances may be able to distinguish two or more clinical entities based on their multiple genetic expression profiles, regarding their mRNA levels.¹⁸⁻²¹ With this technology, thousands of genes can be simultaneously explored. Our results pointed to several statistical differences in the genetic expression profiles (considering the overexpressed and underexpressed genes) among normal parathyroid tissue, adenomas, and hyperplastic glands.

Parathyroid Adenoma

The main *overexpressed* genes in adenoma were *madh3*, *rabex5*, *prim2a*, *trem2*, and peptide *yy* (Table 1). These genes display heterogeneous cellular functions. For example, *madh3*, which is located on chromosome 15q22.3, has activity in junction adherence and the cell cycle. This gene is also involved in the TGF beta and Wnt signaling pathways, and it is considered to be a transcription factor. *Rabex5* is located on chromosome 7q11.21, a nucleotide exchange factor that also regulates endosome fusion (involved in DNA binding and endocytosis).²⁹ *Prim2a* is a factor involved basically in DNA replication. This gene is located on chromosome 6p12-p11.1.³⁰ *Trem2* has a receptor activity attached to the membrane, and it plays an important role in humoral

immune response. It is located on chromosome 6p21.1, and its product is involved also in the differentiation of mononuclear myeloid precursors into functional multinucleated osteoclasts. Moreover, patients with a *Trem2* deficiency have large aggregates of immature osteoclasts with impaired bone resorption activity.^{31,32} Finally, peptide *yy* is a naturally occurring gut hormone that has been identified in several carcinoid tumors. Its decreased expression may be relevant to the development and progression of colon adenocarcinoma.³³ It has been documented that the use of this peptide decreases the growth of pancreatic^{34,35} and breast tumors.^{36,37}

Downregulated genes in adenoma were *eef1a1*, *staf65 gamma*, and *dif13*. These genes also display heterogeneous cellular and molecular functions. *Eef1a1* is involved in gene translation (a translation elongation factor during protein synthesis in the ribosome), and it is located on chromosome 6q14.1. The *staf65* gene product (also designated *Supt7l* or *ART1*) has been considered to be an adenocarcinoma antigen with unknown molecular function.³⁸ Its gene is located on chromosome 2pter-p25.1. Curiously, another gene, *dif13*, has been also considered a tumor marker. This gene has been documented to be overexpressed in breast carcinoma (GEO GDS850, GDS807, GDS1090, GDS1091) and leukemia. The downregulation of these two genes, in addition to the overexpression of peptide *yy*, might support the benign nature of adenomas.

Parathyroid Hyperplasia

Among *overexpressed* genes in hyperplasia (Table 2) is the *madh3* gene. This may be responsible for the increased transcriptional activity and the increased cell proliferation present in both hyperplasia and adenoma, but minimally active in normal tissue. This is biologically congruent with the observation that both entities are cellular hyperproliferative states with an unknown potential for tumorigenesis. Other genes are involved in cytoskeleton assembly, such as *hook1* (1p32.1) in microtubule and cell differentiation and *wdr79* (17p13.1) containing a wd repeat domain. We also found other interesting overexpressed genes, such as *dipa* (11q12.1), which is involved in adipogenesis; *tpsb2* (16p13.3), which is involved in inflammatory disorders; *ficolin1* (9q34), which is involved in antigen binding and opsonization; *tbxa2r* (19p13.3), a thromboxane receptor or G protein that is also involved in angiogenesis (prostanoid TP receptor); and *utf1* (10q26), a well-known transcription factor that is involved in undifferentiated embryonic cells.

Another gene found exclusively overexpressed in hyperplasia was *fhit*, a member of the histidine triad gene family that encompasses a common fragile site (*FRA3B*) on chromosome 3, where carcinogen-induced damage can lead to translocations and aberrant transcripts of this gene. More interestingly, aberrant transcripts from this gene have been found in about half of all esophageal,³⁹ stomach,⁴⁰ and colon carcinomas.⁴¹ This observation could support the hypothesis that hyperplasia could be closer to being a malignant neoplastic condition than adenoma is.

Among *downregulated* genes in hyperplasia (Table 2), it was interesting to see a high number of transcriptional regulators, mainly genes coding for zinc finger proteins such as *phf16* (Xp11.3), *zmat4* (8p11.21), and *zcwpw1* (7q22.1). The biological importance of this finding should be further explored and determined with other molecular biology tools. An additional downregulated gene found in our study was *h1fo* (22q13.1). This is an intronless gene that encodes for a member of the histone H1 family. It codes for an important factor in normal cell differentiation. It has been speculated that tumor-derived factors might inhibit normal differentiation by affecting H1 expression. This finding, in addition to the observation that hyperplasia showed a more heterogeneous and complex expression profile pattern, could address interesting questions about its neoplastic biological behavior.⁴²

Other Studies

When our results were compared to other previously published studies,^{15,18,43–45} we found that some genes were coincidentally found, even when the technology used was different. This supports our findings to a degree. For example *CDH1*, was found in our study with a 2.61-fold change in SPH when compared to adenoma. We conclude that this gene could be used as a marker for hyperplasia. In a published article by Haven *et al.*, who used similar technology, *CDH1* was found to be useful for distinguishing parathyroid tumors, mainly from cancer.⁴³

In another interesting study,⁴⁴ two proteins, Jun-b and p38, were shown to be overexpressed in adenomas. Our array results also demonstrated an increased expression of both genes in adenomas when compared to normal tissue and SPH. This could be related to a downstream activation of MAPK by CaR activation. On the other hand, a very interesting article published by Schachter *et al.*¹⁵ presented an initial experience using this array technology. These authors proposed to differentiate adenoma from primary hyperplasia by means of a differential pattern of protein kinases. We found similar results with kinase-related genes, such as *Cdc2*, mitogen-activated

protein kinase 6 (*mapk6*), G protein-coupled receptor kinase 5 (*gprk5*), non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase; *nme5*), adenylate kinase 3 (*ak3*) predominantly expressed in adenomas. By contrast, we also found that some kinases, such as the stress-activated protein kinase 3 (*mapk12*), were overexpressed in SPH when compared to both normal tissue and tissue from adenoma, and we observed that other kinases were overexpressed in hyperplasia when compared to normal tissue. These include the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11 (*map3k11*), *fms*-related tyrosine kinase 3 ligand (*flt3lg*), cyclin-dependent kinase 10, isoform 1 (*cdk10*), and diacylglycerol kinase, theta (*dgkq*). Unfortunately in our results this kinase pattern was not potent enough to be used for differentiating these entities. This could be related to several factors, included the number of comparisons or sample size.

Some of our findings were also previously documented by Rosen *et al.*⁴⁵ These authors found that the cd36 antigen (collagen type 1 receptor, thrombospondin receptor)-like 2 (0.6–1.19 log₂ ratio) and the fibulin 2 precursor (*fbln2*; 1.77–1.99 log₂ ratio) were overexpressed in adenomas. Interestingly, their results were similar to ours, although they used a common reference standard for their comparisons, because it has been a general belief that using a reference standard (indirect comparison) instead of direct comparisons could lead to quite different results.

CONCLUSIONS

Based on our results, we can speculate that hyperplasia is a more heterogeneous condition than adenoma, because the number of differently expressed genes was bigger than for adenomas. This hypothesis has been suggested also by Giordano.¹⁸ A possible explanation could be the increased heterogeneity in hyperplasias and the fact that adenoma is a pre-neoplastic condition, whereas hyperplasia could merely be an increased cellular proliferation state.

The biological role of the previously shown differentially expressed genes in neoplasia is required to be further explored by other techniques. The next step in its evaluation should be at the molecular level or at the clinical level with the use, for example, of immunohistochemistry. This could reveal the real utility of these findings in the clinical setting. Even though this method could challenge the array results more than other more specific methods, such as real time polymerase chain reaction

(RT-PCR). However it is our belief that studies like ours should address potentially useful molecular markers, therefore routine clinical methods such as immunohistochemistry should be tried before setting up these studies formally in the clinic.

Furthermore, the selection of some of these genes as diagnostic or prognostic tools could be based either on the magnitude of their genetic expression or their biological importance.⁴⁶⁻⁴⁹ Moreover, the implication of the previously described genes in parathyroid tumor genesis should be further established and studied by other molecular and clinical tools.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was made possible by the financial support of the National Council for Science and Technology of Mexico (CONACYT, Beca No. 153290).

The authors are grateful to Elizabeth Langley, Amilkar Flores, Christofer Juhlin, and Roberto Vázquez, all friends, for their valuable contributions to this article. Our thanks also to the DNA Microarrays Unit from the Institute of Cellular Physiology in Mexico City (UNAM) for the development and processing of the arrays.

REFERENCES

1. Kinder BK, Stewart AF. Hypercalcemia. *Current Prob Surg* 2002;39:445.
2. Bilezikian JP, Brandi ML, Rubin M, *et al.* Primary hyperparathyroidism: new concepts in clinical, densitometric and biochemical features. *J Intern Med* 2005;257:6-17.
3. Utiger RD. Treatment of primary hyperparathyroidism. *N Engl J Med* 1999;341:1301-1302.
4. Caron NR, Sturgeon C, Clark OH. Persistent and recurrent hyperparathyroidism. *Curr Treat Options Oncol* 2004;5:335-345.
5. Lee JA, Inabnet WB, 3rd. The surgeon's armamentarium to the surgical treatment of primary hyperparathyroidism. *J Surg Oncol* 2005;89:130-135.
6. Milas M, Wagner K, Easley KA, *et al.* Double adenomas revisited: nonuniform distribution favors enlarged superior parathyroids (fourth pouch disease). *Surgery* 2003;134:995-1003; discussion 1003-1004.
7. Chen H, Mack E, Starling JR. A comprehensive evaluation of perioperative adjuncts during minimally invasive parathyroidectomy: which is most reliable? *Ann Surg* 2005;242:375-380.
8. Grant CS, Thompson G, Farley D, *et al.* Primary hyperparathyroidism surgical management since the introduction of minimally invasive parathyroidectomy: Mayo Clinic experience. *Arch Surg* 2005;140:472-478.
9. Bornstein-Quevedo L, Gamboa-Domínguez A, Angeles-Angeles A, *et al.* Histologic diagnosis of primary hyperparathyroidism: a concordance analysis between three pathologists. *Endocr Pathol* 2001;12:49-54.
10. Correa P, Juhlin C, Rastad J, *et al.* Allelic loss in clinically and screening-detected primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56:113-117.
11. Mallya SM, Gallagher JJ, Arnold A. Analysis of microsatellite instability in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1248-1251.
12. Silver J. Cycling with the parathyroid. *J Clin Invest* 2001;107:1079-1080.
13. Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, *et al.* Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted over-expression of cyclin D1 in transgenic mice. *J Clin Invest* 2001;107:1093.
14. Agarwal SK, Schrock E, Kester MB, *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of human parathyroid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;106:30-36.
15. Schachter PP, Ayes S, Schneider T, *et al.* Expression of kinase genes in primary hyperparathyroidism: adenoma versus hyperplastic parathyroid tissue. *Surgery* 2002;132:1094-1098; discussion 1098-1099.
16. Garcia JL, Tardio JC, Gutierrez NC, *et al.* Chromosomal imbalances identified by comparative genomic hybridization in sporadic parathyroid adenomas. *Eur J Endocrinol* 2002;146:209-213.
17. Stojadinovic A, Hoos A, Nissan A, *et al.* Parathyroid neoplasms: clinical, histopathological, and tissue microarray-based molecular analysis. *Hum Pathol* 2003;34:54-64.
18. Giordano TJ. Gene expression profiling of endocrine tumors using DNA microarrays: progress, promise. *Endocr Pathol* 2003;14:107-116.
19. Barden CB, Shister KW, Zhu B, *et al.* Classification of follicular thyroid tumors by molecular signature: results of gene profiling. *Clin Cancer Res* 2003;9:1792-1800.
20. Mohr S, Leikauf GD, Keith G, *et al.* Microarrays as cancer keys: an array of possibilities. *J Clin Oncol* 2002;20:3165-3175.
21. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, *et al.* Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med* 2001;344:539-548.
22. Kim J, Yang P, Suraokar M, *et al.* Suppression of prostate tumor cell growth by stromal cell prostaglandin D synthase-derived products. *Cancer Res* 2005;65:6189-6198.
23. Garcia V, Furuya K, Carr AM. Identification and functional analysis of TopBP1 and its homologs. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:1227-1239.
24. Murakawa T, Tsuda H, Tanimoto T, *et al.* Expression of KIT, EGFR, HER-2 and tyrosine phosphorylation in undifferentiated thyroid carcinoma: implication for a new therapeutic approach. *Pathol Int* 2005;55:757-765.
25. Li F, Cao Y, Townsend CM Jr, *et al.* TGF-beta signaling in colon cancer cells. *World J Surg* 2005;29:306-311.

26. Weimer JM, Chattopadhyay S, Custer AW, *et al.* Elevation of Hook1 in a disease model of Batten disease does not affect a novel interaction between Ankyrin G and Hook1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:1176–1181.
27. Zhao P, Liu W, Lu YL. Clinicopathological significance of FHIT protein expression in gastric adenocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* 2005;11:5735–5738.
28. Watkins G, Douglas-Jones A, Mansel RE, *et al.* Expression of thromboxane synthase, TBXAS1 and the thromboxane A2 receptor, TBXA2R, in human breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* 2005;2:23.
29. Mattera R, Arighi CN, Lodge R, *et al.* Divalent interaction of the GGAs with the Rabaptin-5-Rabex-5 complex. *EMBO J* 2003;22:78–88.
30. Shiratori A, Okumura K, Nogami M, *et al.* Assignment of the 49-kDa (PRIM1) and 58-kDa (PRIM2A and PRIM2B) subunit genes of the human DNA primase to chromosome bands 1q44 and 6p11.1-p12. *Genomics* 1995;28:350–353.
31. Cella M, Buonsanti C, Strader C, *et al.* Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals. *J Exp Med* 2003;198:645–651.
32. Paloneva J, Mandelin J, Kialainen A. DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 2003;198:669–675.
33. Tseng WW, Liu CD. Peptide YY and cancer: current findings and potential clinical applications. *Peptides* 2002;23:389–395.
34. Liu CD, Rongione AJ, Garvey L, *et al.* Adjuvant hormonal treatment with peptide YY or its analog decreases human pancreatic carcinoma growth. *Am J Surg* 1996;171:192–196.
35. Heisler T, Towfigh S, Simon N, *et al.* Peptide YY augments gross inhibition by vitamin E succinate of human pancreatic cancer cell growth. *J Surg Res* 2000;88:23–25.
36. Grise KR, Rongione AJ, Laird EC, *et al.* Peptide YY inhibits growth of human breast cancer in vitro and in vivo. *J Surg Res* 1999;82:151–155.
37. Heisler T, Towfigh S, Simon N, *et al.* Peptide YY and vitamin E inhibit hormone-sensitive and -insensitive breast cancer cells. *J Surg Res* 2000;91:9–14.
38. Koch-Nolte F, Glowacki G, Bannas P, *et al.* Use of genetic immunization to raise antibodies recognizing toxin-related cell surface ADP-ribosyltransferases in native conformation. *Cell Immunol* 2005;236:66–71.
39. Noguchi T, Takeno S, Kimura Y, *et al.* FHIT expression and hypermethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2003;11:441–447.
40. Xiao YP, Han CB, Mao XY, *et al.* Relationship between abnormality of FHIT gene and EBV infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:3212–3216.
41. Luceri C, Guglielmi F, De Filippo C, *et al.* Clinicopathologic features and FHIT gene expression in sporadic colorectal adenocarcinomas. *Scand J Gastroenterol* 2000;35: 637–641.
42. Gabrilovich DI, Cheng P, Fan Y, *et al.* H1(0) histone and differentiation of dendritic cells. A molecular target for tumor-derived factors. *J Leukocyte Biol* 2002;72:285–296.
43. Haven CJ, Howell VM, Eilers PH, *et al.* Gene expression of parathyroid tumors: molecular subclassification and identification of the potential malignant phenotype. *Cancer Res* 2004;64:7405–7411.
44. Corbetta S, Lania A, Filopanti M, *et al.* Mitogen-activated protein kinase cascade in human normal and tumoral parathyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2201–2205.
45. Rosen JE, Costouros NG, Lorang D, *et al.* Gland size is associated with changes in gene expression profiles in sporadic parathyroid adenomas. *Ann Surg Oncol* 2005;12: 412–416.
46. Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. Discovering molecular functions significantly related to phenotypes by combining gene expression data and biological information. *Bioinformatics* 2005;21:2988–2993.
47. Smid M, Dorssers LC. GO-Mapper: functional analysis of gene expression data using the expression level as a score to evaluate Gene Ontology terms. *Bioinformatics* 2004;20: 2618–2625.
48. Liang Y, Kelemen A. Associating phenotypes with molecular events: recent statistical advances and challenges underpinning microarray experiments. *Funct Integr Genomics* 2005;15:1–13.
49. Morrison JL, Breitling R, Higham DJ, *et al.* GeneRank: using search engine technology for the analysis of microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2005;6:233.