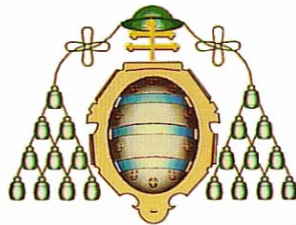


UNIVERSIDAD DE OVIEDO

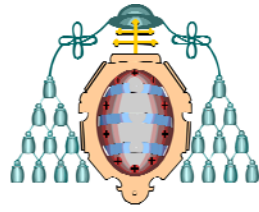
Departamento de Cirugía y Especialidades
Médico-Quirúrgicas



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**GALECTINA-3 COMO MARCADOR EN LOS
NÓDULOS TIROIDEOS**

M^a Jesús Álvarez Zapico



Reservados todos los derechos
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo
Biblioteca Universitaria, 2009
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 50
ISBN 978-84-692-1366-7
D.L.: AS. 00735-2009

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una ayuda a la investigación por parte del Fondo de Investigación Sanitaria Instituto Carlos III (FIS N° 01/1450)

Deseo expresar mi **AGRADECIMIENTO** a las siguientes personas, sin cuya imprescindible colaboración no habría sido posible la realización de este trabajo:

Dr. José Luis Llorente Pendás, por sus enseñanzas y su continuo apoyo. Su inestimable ayuda y experta dirección han sido fundamentales para mi formación científica y clínica.

Dr. Marcos Carreño Villarreal, por ser el promotor de este trabajo, por su total disponibilidad, formidable ayuda e inagotable paciencia.

Dr. Francisco Domínguez Iglesias, que me enseñó todo lo que sé sobre inmunohistoquímica. Sin su ayuda la realización de este trabajo de investigación habría sido imposible.

Profesor Carlos Suárez Nieto, que fue mi maestro en la otorrinolaringología, por su continuo ejemplo, profesionalidad y capacidad para transmitir a sus discípulos su extremada inquietud científica.

Dr. Eduardo Fuente Martín, por haberme proporcionado parte del material de este estudio.

A todo el personal de los laboratorios de Anatomía Patológica del Hospital Valle de Nalón y del Hospital de Cabueñes.

A mi familia

ABREVIATURAS

AGES: Edad, Extensión, y Tamaño del tumor

BMN: Bocio multinodular

CD 26/DPPIV: Dipeptidilpeptidasa IV

CD44V6: Glicoproteína de la familia de moléculas de adhesión de los receptores del ácido hialurónico

CFMI: Carcinoma folicular mínimamente invasivo

CRD: Dominio de reconocimiento de carbohidratos

CK 19: Citoqueratina 19

EORTC: Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer

HBME-1: Anticuerpo contra las microvellosidades de superficie de las células mesoteliales

HE: Hematoxilina-eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

MACIS: Metástasis, Edad, Resección, Invasión y Tamaño del tumor

MEN: Neoplasia endocrina múltiple

NTCTCS: Asociación Nacional para el Estudio y Tratamiento del Cáncer Tiroideo

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAAF: Punción aspiración con aguja fina

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

RNM: Resonancia nuclear magnética

RT-PCR: Transcripción inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa

TAC: Tomografía axial computerizada

TNM: Clasificación en categorías del tumor, ganglios linfáticos regionales y metástasis a distancia

TPO: Peroxidasa tiroidea

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	12
1. PATOLOGÍA TIROIDEA.....	13
1.1. NÓDULO TIROIDEO.....	13
1.1.1. Epidemiología.....	13
1.1.2. Etiopatogenia.....	14
1.1.3. Histología.....	15
1.1.4. Clínica.....	18
1.1.5. Diagnóstico.....	19
1.1.5.1. <i>Técnicas de imagen</i>	19
1.1.5.2. <i>Punción aspiración con aguja fina (PAAF)</i>	20
1.1.5.3. <i>Marcadores tumorales</i>	22
1.1.6. Tratamiento.....	22
1.1.7. Pronóstico.....	23
2. GALECTINA-3.....	24
2.1. DESCRIPCIÓN.....	24
2.2. APLICACIONES.....	26
2.3. APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL NÓDULO TIROIDEO.....	27
.	.
II.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	31
III.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	34
IV.- MATERIAL Y MÉTODO.....	36
1. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	37
2. SUJETOS DEL ESTUDIO.....	38

3. TÉCNICAS.....	40
3.1.TÉCNICA DEL BLOQUE TISULAR CITOLÓGICO.....	40
3.2.MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	41
3.3.CUANTIFICACIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	44
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
5. BIBLIOGRAFÍA DE REFERENCIA.....	46
V.- RESULTADOS.....	47
1. PATRONES DE EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN MUESTRAS TISULARES.....	48
1.1.DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	48
1.2.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL.....	51
1.3.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN LESIONES BENIGNAS.....	51
1.4.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CARCINOMAS.....	53
2. PATRONES DE EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN MUESTRAS CITOLÓGICAS (PAAF).....	64
2.1.DATOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	64
2.2.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL.....	66
2.3.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN LESIONES BENIGNAS.....	66
2.4.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CARCINOMAS.....	68
2.5.EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CITOLOGÍA SOSPECHOSA DE MALIGNIDAD.....	75

2.6.CORRELACIÓN ENTRE EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO (PAAF) Y EL DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	75
VI.- DISCUSIÓN.....	81
1. EXPRESIÓN EN MUESTRAS HISTOLÓGICAS.....	84
1.1.EXPRESIÓN EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL.....	84
1.2.EXPRESIÓN EN LESIONES BENIGNAS.....	84
1.3.EXPRESIÓN EN CARCINOMAS PAPILARES.....	89
1.4.EXPRESIÓN EN CARCINOMAS FOLICULARES.....	92
1.5.EXPRESIÓN EN CARCINOMAS DE CÉLULAS DE HÜRTHLE.....	96
1.6.EXPRESIÓN EN METÁSTASIS GANGLIONARES DE CARCINOMAS TIROIDEOS DIFERENCIADOS.....	97
1.7.EXPRESIÓN EN CARCINOMAS ANAPLÁSICOS.....	99
1.8.EXPRESIÓN EN CARCINOMAS MEDULARES.....	100
2. EXPRESIÓN EN MUESTRAS CITOLÓGICAS OBTENIDAS MEDIANTE PAAF.....	102
2.1.EXPRESIÓN EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL.....	102
2.2.EXPRESIÓN EN LESIONES BENIGNAS.....	103
2.3.EXPRESIÓN EN CARCINOMAS.....	105
2.3.1. Carcinoma papilar.....	105
2.3.2. Carcinoma folicular.....	106
2.3.3. Carcinoma anaplásico.....	107
2.4.EXPRESIÓN EN LESIONES DIAGNOSTICADAS EN PAAF COMO SOSPECHOSAS DE MALIGNIDAD.....	108

3. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	110
VII.- CONCLUSIONES.....	113
VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	116

I.- INTRODUCCIÓN

1.- PATOLOGIA TIROIDEA

La patología de la glándula tiroides constituye un problema de salud muy frecuente, pues aproximadamente el 11% de la población general presenta algún tipo de alteración, ya sea neoplásica, inflamatoria o en relación con su función endocrina¹. Las manifestaciones clínicas van a depender de la alteración en la producción hormonal y de los cambios en el tamaño de la glándula, que puede ser difuso o focal. El término “nódulo tiroideo” implica un aumento del tamaño o de la consistencia de una parte de la glándula, y puede ser la expresión de múltiples patologías.

1.1.- NÓDULO TIROIDEO

1.1.1- Epidemiología

Los nódulos tiroideos son un problema clínico común y constituyen la alteración tiroidea más frecuente. Se detectan por palpación en el 4-7% de la población general, y su incidencia en estudios ecográficos rutinarios y en necropsias alcanza el 60%, debido al descubrimiento de nódulos menores de 1 cm que no se aprecian en la exploración clínica^{2,3}. La mayoría son benignos, correspondiendo a carcinomas aproximadamente el 10% del total de los nódulos, aunque los rangos de malignidad pueden variar según las series entre el 5% y el 20%^{4,5,6}.

Pueden aparecer a cualquier edad, aunque la mayor incidencia se sitúa entre los 40-60 años, con una distribución por sexos de 5-6:1 con

predominio del sexo femenino. En los grandes estudios de población, como el de Framingham (Estados Unidos), en el que se examinaron 5.127 personas, el 6.4% de las mujeres y el 1.6% de los varones presentaban por palpación un nódulo tiroideo⁷.

1.1.2- Etiopatogenia

Los nódulos tiroideos se observan más frecuentemente en personas que viven en áreas geográficas deficientes de yodo, siendo en estas zonas más frecuentes los carcinomas foliculares, que representan más del 50% de los carcinomas diferenciados, mientras que en áreas no bociógenas no supera el 10%. En Europa, después de los programas que se realizaron de yodación de la sal se produjo una disminución de la incidencia del carcinoma folicular, por lo que se ha señalado el déficit de yodo como un factor etiopatogénico para este tipo de neoplasias^{8,9}.

La relación entre exposición a la radiación y el cáncer de tiroides está demostrada desde que en 1950 Duffy y Fitzgerald¹⁰ apreciaron en niños con carcinoma tiroideo con frecuencia antecedentes de radiación terapéutica por hipertrofia adenoamigdalor o hipertrofia tímica, correspondiendo la mayoría de ellos a carcinomas papilares. El riesgo de sufrir un carcinoma tiroideo tras la exposición a radiación está en relación inversa con la edad, de forma que cuanto más temprana es la edad de exposición mayor es el riesgo. El riesgo máximo de aparición de estos carcinomas radioinducidos está entre los 10-20 años tras la exposición, y de manera característica presentan mayor tasa de multicentricidad y mayor agresividad^{11,12}.

Esta mayor susceptibilidad de la glándula en los niños se puso de manifiesto tras el accidente nuclear de Chernobyl en abril de 1986^{13,14}.

Otro factor implicado en la génesis del carcinoma tiroideo es la herencia. Es bien conocido que el 20% de los carcinomas medulares son familiares, siendo la mutación del protooncogén *RET*, localizado en el cromosoma 10 el responsable de esta lesión. La mayor parte se asocian al síndrome MEN (Neoplasia Endocrina Múltiple). Últimamente se han acumulado más datos que sugieren un origen genético de algunas otras neoplasias tiroideas, encontrándose implicados varios genes. Por un lado, los oncogenes con actividad tirosina-quinasa, que están relacionados de forma específica con el carcinoma papilar (reordenamientos del protooncogén *RET* y el *TRK*) que se encuentra activado en aproximadamente el 20% de estos carcinomas¹⁵. La familia de oncogenes *RAS* (*N-RAS*, *H-RAS* y *K-RAS*) presentan mutaciones principalmente en los adenomas y carcinomas foliculares¹⁶. Otras alteraciones encontradas son ciertas mutaciones o deleciones completas del gen p21, deleciones en el gen del retinoblastoma (aparece hasta en el 55% de los tumores malignos tiroideos, pero no en los benignos) y mutaciones del gen p53, que se encuentran con una frecuencia de hasta el 70% en los carcinomas anaplásicos^{17,18}.

1.1.3.- Histología

Histológicamente los nódulos pueden corresponder a formaciones hiperplásicas más o menos delimitadas por las fascias conjuntivas, o bien a verdaderos nódulos tumorales con presencia de una cápsula completa. Estos pueden ser tumores benignos (adenomas) o neoplasias malignas. Los estudios histológicos sobre piezas quirúrgicas tiroideas extirpadas muestran que aproximadamente el 50% corresponden a neoplasias¹⁹, de las que solamente el 10% son carcinomas.

La clasificación histológica de los tumores tiroideos según la Organización Mundial para la Salud (OMS)^{20,21} se expone en la tabla 1. Los tumores epiteliales de la glándula tiroides suponen más del 95% del total de las neoplasias malignas. El más frecuente es el carcinoma papilar, que representa el 70-80% del total de los tumores tiroideos²². Su diagnóstico histológico se basa en características estructurales así como cambios nucleares típicos (núcleo grande y ópticamente vacío, nucleolo pequeño, hendiduras nucleares y pseudoinclusiones), algunos de los cuales se pueden observar en preparaciones citológicas.

Los carcinomas foliculares suponen el 10-20% del total de los tumores malignos tiroideos siendo el criterio de malignidad la existencia de invasión de la cápsula o de los vasos sanguíneos,^{23,24} lo que impide su diagnóstico mediante el estudio de muestras citológicas obtenidas mediante PAAF.

Los carcinomas medulares representan menos del 10% del total de las neoplasias tiroideas, siendo familiar su presentación en aproximadamente un 20% de los casos.

TUMORES EPITELIALES	
Benignos	Adenoma folicular Otras variantes: adenoma tóxico, atípico, trabecular hialinizante y de células de Hürthle
Malignos	Carcinoma folicular: mínimamente invasivo y extensamente invasivo Carcinoma de células de Hürthle Carcinoma papilar: variante folicular, de células altas, esclerosante difusa, otras Carcinoma pobremente diferenciado (incluye carcinoma insular) Carcinoma medular Carcinoma indiferenciado (anaplásico) Otros
TUMORES NO EPITELIALES	
Linfomas Sarcomas Hemangiopericitomas	

Tabla 1: Clasificación histológica de los tumores tiroideos (OMS)

1.1.4.- Clínica

La forma más habitual de presentación de un nódulo tiroideo es una tumoración en la región anterior del cuello, asintomática, que descubre el médico o el propio paciente. Pueden referir esporádicamente sensación de opresión en el cuello o dolor, que suelen ir asociados a la presencia de una hemorragia dentro del nódulo. Los pacientes con nódulos tiroideos suelen tener niveles hormonales normales, y sólo el 1% de ellos presentan clínica de hipotiroidismo o tirotoxicosis.²⁵ Son signos que sugieren malignidad en un nódulo tiroideo el crecimiento rápido, la consistencia dura del nódulo, y la existencia de signos de invasión de estructuras vecinas como disfonía, disfagia o disnea, bien por compresión o infiltración traqueoesofágica, o por afectación del nervio recurrente.

En ocasiones debutan con la aparición de una metástasis ganglionar cervical en un paciente con una glándula clínicamente normal, pero que contiene un carcinoma oculto de tamaño inferior a 0.5 cm²⁶. Estos casos suelen corresponder a carcinomas papilares. Las metástasis ganglionares son clínicamente evidentes en el 30-60% de los carcinomas papilares, mientras que solo las presentan entre el 5-20% de los carcinomas foliculares^{27,28}. Las metástasis a distancia son más frecuentes en los carcinomas foliculares, estando presentes en el momento del diagnóstico en el 5-33% de los pacientes, fundamentalmente en pulmón y hueso²⁹. No obstante, en la mayoría de las ocasiones los tumores malignos del tiroides no presentan ningún signo de malignidad en el momento de la cirugía, salvo la presencia del nódulo.

1.1.5.- Diagnóstico

1.1.5.1.- Técnicas de imagen

La ecografía es la prueba de imagen que se utiliza de manera más generalizada en la evaluación de los nódulos tiroideos. Una ecografía de alta resolución puede descubrir nódulos sólidos de 3 a 4 mm y nódulos quísticos de 2 mm de diámetro. Es una prueba segura, económica, no invasiva e inocua. Existen una serie de características ecográficas que sugieren malignidad como son la ausencia del signo del halo, quiste sólido o hipoecogénico, ecoestructura heterogénea, borde irregular, presencia de calcificaciones finas y extensión extraglandular. La TAC y la RNM no suelen utilizarse de manera rutinaria, reservándose habitualmente para estudios de extensión.

Las exploraciones gammagráficas del tiroides nos informan de la existencia o no de captación por parte del nódulo tiroideo. En la actualidad se pueden realizar con I^{131} o con Tc^{99} . Aproximadamente el 80-85% de los nódulos tiroideos se comportan como fríos en la gammagrafía y de ellos sólo el 10-15% se demuestra que son malignos. Por el contrario, sólo el 5% es gammagraficamente caliente, con un riesgo de neoplasia maligna menor del 1%.

1.1.5.2.- Punción aspiración con aguja fina (PAAF)

Las primeras referencias a la citología por punción con aguja fina del tiroides se encuentran en el artículo de Martin y Ellis³⁰ publicado en 1930, siendo una técnica generalizada por la American Thyroid Association en la década de 1980. En la actualidad es la herramienta diagnóstica fundamental en el diagnóstico diferencial del nódulo tiroideo, pues nos permite establecer un diagnóstico a través del análisis citológico de la muestra. Su objetivo principal sería predecir cuando un nódulo tiroideo es maligno, mediante la presencia de células con características de malignidad. En centros con experiencia, se han alcanzado cifras de sensibilidad de 65-93%, con una especificidad de 72-96% para el diagnóstico de malignidad^{31,32,33}.

Es una técnica sencilla, barata y poco traumática. Las complicaciones son poco importantes e infrecuentes, siendo las más habituales dolor, hematoma y tumefacción transitoria de la glándula.

Los informes citológicos están estandarizados; en el año 1996 la Papanicolaou Society publicó las directrices actuales, siendo cuatro las categorías de PAAF^{34,35}:

- **Maligna**: representa el 3-5% del total de las PAAF. Se atribuye a aquellos nódulos que tienen características citológicas inequívocas y típicas de una neoplasia maligna.
- **Benigna**: son las más frecuentes, y suponen entre el 60-75% de las punciones. En el 90% de los casos corresponden al nódulo hiperplásico y al bocio nodular y en el otro 10% a lesiones inflamatorias crónicas (tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica aguda y tiroiditis De Quervain).

- **No diagnóstica:** las muestras “insuficientes” o “no diagnósticas” se deben a la ausencia de componentes celulares en el aspirado, y representan el 7-29% del total. Una extensión adecuada requiere seis o más grupos de células foliculares, de modo que cada grupo contenga un mínimo de 10 células. Cuando se obtiene este resultado está indicada la repetición de la punción, que puede realizarse con control ecográfico para mejorar el rendimiento.
- **Sospechosa:** suponen el 7-30% de la totalidad de las punciones. La identificación de lesiones como “sospechosas” en la PAAF se debe a la imposibilidad de detectar de manera inequívoca los rasgos citológicos de neoplasia benigna o maligna. La causa más frecuente es la incapacidad de diferenciar un adenoma folicular de un carcinoma folicular debido a que el diagnóstico de este está definido por la presencia de invasión capsular y vascular de la neoplasia, lo que requiere la extirpación quirúrgica de la lesión para su estudio histopatológico, y la demostración de la invasión. Son frecuentes también estos resultados en las neoplasias de células de Hürthle, la variante folicular de carcinoma papilar, el carcinoma papilar de bajo grado, el adenoma trabecular hialinizante, la tiroiditis de Hashimoto con metaplasia y el bocio adenomatoso con predominio de estructuras microfoliculares.

Aunque la PAAF ha mejorado el manejo clínico del nódulo tiroideo, tiene aún importantes limitaciones, por lo que se ha intentado incrementar su rendimiento mediante la aplicación de nuevas técnicas, destacando entre ellas el estudio de marcadores moleculares de malignidad.

1.1.5.3.- Marcadores tumorales

En los últimos años, al igual que en otras patologías, en el estudio del nódulo tiroideo se ha introducido el uso de los marcadores tumorales con el objetivo de mejorar el rendimiento diagnóstico. Con esta finalidad se ha estudiado la expresión selectiva de ciertas proteínas en tumores malignos mediante técnicas de inmunohistoquímica, así como los RNAm de dichas proteínas mediante técnicas de transcripción inversa asociada a la reacción de la cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Se han realizado estudios con varias moléculas, y aunque varios de estos marcadores están asociados con el cáncer de tiroides, la mayoría no demuestran utilidad en el estudio clínico de los nódulos tiroideos. Algunos de los marcadores estudiados para distinguir lesiones benignas y malignas tiroideas incluyen la Telomerasa, la CK 19, fibronectina-1, HBME-1 (marcador de células mesoteliales), oncofetal-fibronectin, CD26, TPO, CD44v6, proteína del gen del retinoblastoma (pRb), galectina-1 y galectina-3^{36,37,38,39,40,41,42,43}.

1.1.6.- Tratamiento

El objetivo principal de la evaluación de los nódulos tiroideos es identificar aquellos que potencialmente puedan ser malignos, para optimizar la selección de los pacientes remitidos al cirujano. Los nódulos tiroideos benignos son susceptibles de una actitud conservadora, recomendándose la observación y el seguimiento del paciente, mientras que en los nódulos malignos está indicada de manera clara la resección quirúrgica, aunque existen controversias en cuanto a la extensión de la cirugía^{44,45}.

Los pacientes que presentan un mayor problema son aquellos cuyo estudio citológico es informado como “sospechoso de malignidad”, ya que la duda diagnóstica condiciona en la práctica la indicación quirúrgica, lo que supone un elevado coste personal, económico y social, especialmente si tenemos en cuenta que sólo en aproximadamente el 10% de las intervenciones se termina confirmando una lesión maligna^{4,46,47}. Además, la tiroidectomía puede presentar complicaciones entre el 0.2 y el 6.9% de los casos, dependiendo de la extensión de la resección y de la experiencia del equipo quirúrgico⁴⁸.

1.1.7.- Pronóstico

En general, las neoplasias tiroideas son tumores de buen pronóstico. Han sido creados múltiples índices pronósticos para el cáncer tiroideo realizados por diferentes instituciones (EORTC⁴⁹, AGES⁵⁰, MACIS⁵¹, TNM⁵², NTCTCS⁵³) incluyendo todos similares variables. Es aceptado en general, que la edad del paciente, el sexo, el tipo histológico, el tamaño y la extensión del tumor, las metástasis y el tratamiento realizado son los factores que más influyen en el pronóstico⁵⁴.

La supervivencia a 10 años, que presenta pocas diferencias en la mayoría de las publicaciones es superior al 85% para los carcinomas diferenciados (92-98% para los carcinomas papilares y 85-92% para los carcinomas foliculares), y se encuentra entre el 62-80% para el carcinoma medular. Por el contrario, el carcinoma anaplásico es un tumor muy agresivo con una supervivencia que en la mayoría de las series está próxima al 0%.^{55,56,57}.

2.-GALECTINA-3

2.1.- DESCRIPCIÓN

Las galectinas son proteínas solubles con afinidad por carbohidratos β -galactosidos. Pueden encontrarse en tejidos de varias especies animales, desde invertebrados inferiores hasta mamíferos, incluyendo a humanos⁵⁸. Hasta la fecha han sido identificados 14 miembros de la familia de las galectinas⁵⁹. Los miembros de la familia de las galectinas se identifican por su afinidad por las betagalactosidasas y porque presentan secuencias de aminoácidos significativamente similares en el sitio de fijación de los carbohidratos.

Una de las proteínas pertenecientes a esta familia es la galectina-3, llamada también CBP-35 (proteína ligante de carbohidratos 35), Mac-2, IgEBP (Proteína ligante de Ig E), CBP-30, RL-29, L-29, L-31, L-34 y LBL. La galectina-3 es una proteína no glicosilada, soluble, monomérica y con un peso molecular variable dependiendo de la especie entre 26.200 y 30.300 kDa. Esta proteína se sintetiza en el citoplasma y habitualmente se localiza en este compartimento celular, aunque también ha sido detectada en el núcleo, en la superficie celular y en el líquido extracelular^{60, 61,62}. El gen que codifica la galectina-3 se denomina LGALS3 y se localiza en el cromosoma 14 (14q21-q22). Está compuesto por seis exones y cinco intrones y ocupa 17 kb en el genoma humano⁶³.

La molécula contiene tres dominios proteicos⁶⁴:

- El dominio amino terminal (dominio N) compuesto por 20 residuos de aminoácidos.
- Un dominio compuesto de diez aminoácidos repetidos, ricos en prolina, glicina y tironina, con un residuo aromático conservado, denominado dominio R.
- El dominio carboxi terminal (dominio C), de reconocimiento de carbohidratos (CRD), que está compuesto de 135 residuos aminoácidos; es la zona que define la molécula como una galectina.

Una característica particular de esta proteína es que carece de dominio transmembranal, por lo que necesita la presencia de glicoproteínas de superficie para interactuar con la célula.

La galectina-3 es expresada en condiciones normales en monocitos, eosinófilos y macrófagos, así como por una gran variedad de células epiteliales de diversos órganos de la economía (colon, mama, estómago, cerebro, ovario, hígado y riñón humano)^{65,66,67}. En condiciones patológicas está suprarregulada y se expresa en linfomas, células T infectadas por HTLV-1, carcinoma de mama, carcinoma de colon, hepatocarcinoma, melanoma y carcinoma tiroideo^{68,69,70}.

Varios trabajos han señalado su participación en diversos procesos biológicos como la embriogénesis, adhesión y proliferación celular, apoptosis, procesamiento de ARNm y modulación de la respuesta inmune^{71,72}. Además, las galectinas se relacionan con diversos procesos patológicos, incluyendo enfermedades autoinmunes, reacciones alérgicas, inflamación, aterosclerosis, complicaciones diabéticas y progresión tumoral⁷³.

2.2.- APLICACIONES

En los últimos años se ha hecho evidente la crucial importancia de las interacciones entre las células tumorales y las glicoproteínas durante la progresión tumoral, sugiriendo un papel clave para estas moléculas⁷⁴. Las glicoproteínas están presentes tanto en la superficie de todas las células como en la matriz extracelular, encontrándose a menudo alterada su biosíntesis durante la diferenciación celular y la transformación maligna^{75,76,77}. Algunos de estos cambios pueden ser detectados por proteínas ligantes de carbohidratos como la galectina-3, que presentan afinidad por oligosacáridos específicos^{78,79}. Se ha prestado una atención particular al papel que podrían desempeñar en la adquisición por parte de las células transformadas de las propiedades de invasividad y capacidad metastatizante. Existen evidencias que señalan que la galectina-3 juega un papel importante en la transformación maligna y en la adquisición de capacidades metastásicas en ciertas células y tejidos.

Los primeros estudios que se refieren a la expresión de galectina-3 en tumores aparecieron en los años 80 en relación con el cáncer de mama⁸⁰. Posteriormente se demostró un incremento de la expresión de esta proteína en carcinomas de colon (comparándolos con adenomas o con tejido adyacente normal)^{81,82}, así como en cánceres gástricos⁸³, carcinoma hepatocelular⁸⁴, carcinomas escamosos de cabeza y cuello⁸⁵ y carcinomas tiroideos^{86,87,88,89}.

La alta expresión de galectina-3 en células tumorales se ha confirmado de forma indirecta al constatarse que los niveles circulantes en suero de esta proteína son más elevados en pacientes con cáncer que en los controles

normales, y aún más alto en pacientes con enfermedad metastásica en cánceres de mama, gastrointestinal, pulmón , ovario, melanoma y linfoma no Hodking⁹⁰.

2.3.- APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DEL NÓDULO TIROIDEO

Como hemos comentado previamente, el problema fundamental que se plantea en la clínica ante la presencia de un nódulo tiroideo es saber si corresponde a una lesión benigna o maligna, ya que ello tiene importantes implicaciones terapéuticas. No existe en el momento actual ninguna prueba que nos permita determinar en todos los casos de manera fiable y previamente a la intervención la naturaleza benigna o maligna de un nódulo, siendo en muchas ocasiones necesaria la realización de una tiroidectomía y su posterior estudio histopatológico para el diagnóstico definitivo.

La PAAF es en la actualidad la herramienta más útil para el diagnóstico preoperatorio, obteniendo un diagnóstico correcto en cerca del 90% de los carcinomas indiferenciados y en casi el 80% de los carcinomas papilares⁹¹. Sin embargo, presenta limitaciones importantes, pues el 10-30% del total de los aspirados obtenidos muestran una citología folicular, lo que no permite un diagnóstico definitivo de malignidad, ya que la identificación correcta de algunas lesiones (nódulos adenomatosos hiperplásicos, carcinoma folicular bien diferenciado, carcinoma folicular mínimamente invasivo y variante folicular del carcinoma papilar) es difícil, incluso para los patólogos con más experiencia en PAAF⁹². Por este motivo, Rosai propuso el concepto de *neoplasia de comportamiento maligno incierto o indeterminado* recomendado posteriormente por otros autores para

aquellas lesiones en las que no es posible hacer un diagnóstico seguro de benignidad o malignidad⁹³. Las controversias respecto a la definición de estos nódulos están claramente delimitadas en la guía publicada recientemente por la American Thyroid Association⁹⁴. Las “lesiones indeterminadas” son descritas como aquellas que “tienen evidencia citológica que puede ser compatible con malignidad pero que no es diagnóstica”.

Incluso el diagnóstico histológico de las piezas quirúrgicas de algunas lesiones tiroideas puede entrañar dificultades para los patólogos. Saxen et al⁹⁵ estudiaron la reproductibilidad de la clasificación OMS en carcinomas tiroideos. Encontraron que todos los observadores estaban de acuerdo en el diagnóstico de sólo el 58% de los casos revisados, y que la discordancia era menor para los carcinomas papilares (7%) que para los foliculares (27%). Más recientemente, en una revisión de 41 carcinomas foliculares por cinco patólogos con experiencia en tiroides, el acuerdo para malignidad varió del 5% entre los cinco patólogos al 56% cuando eran dos los observadores⁹⁶. Esto es debido a que son necesarios criterios específicos para el diagnóstico de carcinoma folicular, particularmente la demostración de manera inequívoca de invasión capsular y vascular, por lo que las lesiones malignas foliculares bien diferenciadas pueden ser difíciles de distinguir de los adenomas. Esto subraya la necesidad de disponer de marcadores adicionales al estudio morfológico para el diagnóstico de las lesiones tiroideas.

Una de las moléculas que más interés ha suscitado en la última década como marcador tumoral en la patología del tiroides es la galectina-3. Varios estudios demostraron su expresión en células tiroideas malignas tanto a nivel de ARNm como de proteína ^{97,98,99}. Los primeros análisis se realizaron en muestras histológicas y posteriormente en material citológico obtenido por PAAF.

El primer trabajo publicado del que tenemos referencias sobre la utilidad de la galectina-3 aplicada al diagnóstico diferencial de las neoplasias tiroideas mediante técnicas inmunohistoquímicas fué realizado por Xu et al en 1995. Estudió 41 muestras histológicas procedentes de piezas quirúrgicas que incluía BMN, adenomas, carcinomas papilares, carcinomas foliculares y carcinomas anaplásicos. Todas las muestras de tumores malignos de origen epitelial presentaron tinciones inmunohistoquímicas positivas para la galectina-3, mientras que no se detectó en neoplasias benignas ni en tejido tiroideo normal.

Un paso más en la aplicación de la galectina-3 al estudio de la patología tiroidea lo dieron Orlandi et al , quienes en 1998 aplicaron esta técnica a las muestras citológicas obtenidas mediante PAAF, encontrando que podían distinguir la mayoría de las lesiones tiroideas benignas y malignas. En el mayor estudio publicado hasta la fecha, (internacional y multicéntrico), coordinado por Bartolazzi et al¹⁰⁰, se estudiaron 1009 casos con lesiones tiroideas; 783 retrospectivamente (618 muestras histológicas y 165 bloques celulares) y 226 muestras citológicas de manera prospectiva que fueron obtenidas por PAAF de nódulos tiroideos en pacientes candidatos a cirugía y realizadas con control ecográfico. Señalaron que la especificidad y sensibilidad de la inmunodetección de galectina-3 en distinguir lesiones tiroideas benignas y malignas era del 98% y 99% respectivamente. El valor

predictivo positivo y la exactitud diagnóstica fueron del 92% y 99% respectivamente. Con posterioridad, otros autores han señalado la utilidad de la galectina-3 en el diagnóstico de las neoplasias tiroideas en estudios realizados tanto en muestras citológicas como histológicas^{101,102, 103,104}.

Por el contrario, hay publicaciones que presentan resultados en contradicción con los anteriores, considerando que esta proteína no es útil en el diagnóstico diferencial entre lesiones tiroideas benignas y malignas, ya que señalan expresión de galectina-3 en carcinomas, pero también en lesiones benignas^{105,106,107,108,109}.

Ante la evidencia de estas discrepancias existentes en los resultados obtenidos por los diferentes autores, creemos que son necesarias nuevas investigaciones para intentar clarificar la utilidad de la galectina-3 como un marcador fiable de malignidad tiroidea. En un intento de aportar nuevos datos estudiamos por métodos inmunohistoquímicos la expresión de galectina-3 en un grupo de muestras tiroideas, tanto tisulares como citológicas, que incluyen tejido tiroideo normal, lesiones benignas y neoplasias benignas y malignas.

II.- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los nódulos tiroideos suponen un problema de salud importante en la población debido a su alta incidencia. Ante la posibilidad de que un nódulo tiroideo sea maligno, una de las actitudes fundamentales es decidir si es o no quirúrgico. En el momento actual, aunque disponemos de buenos métodos diagnósticos, con frecuencia se plantean problemas de diagnóstico diferencial entre las lesiones benignas (no quirúrgicas habitualmente) y las lesiones malignas bien diferenciadas (subsidiarias de tratamiento quirúrgico), lo que puede originar intervenciones quirúrgicas no necesarias. Por ello, es importante disponer de un método diagnóstico prequirúrgico fiable que permita al clínico seleccionar adecuadamente aquellos casos que precisan cirugía, evitando la realización de tiroidectomías innecesarias.

La galectina-3 puede expresarse en condiciones normales en diversos tejidos y tipos celulares y se ha visto sobreexpresada en ciertos tumores malignos, incluyendo neoplasias tiroideas, por lo que su análisis podría ser de interés en el estudio de las lesiones malignas de tiroides. De acuerdo con el conocimiento disponible hasta el momento presente, formulamos la siguiente hipótesis de trabajo:

1. La expresión de la galectina-3 en tejido tiroideo está asociada a lesiones malignas. En particular, la expresión de galectina-3 puede diferenciar lesiones proliferativas benignas de carcinomas bien diferenciados de tiroides. Las lesiones benignas y el tejido tiroideo normal no expresan galectina-3, o su expresión es significativamente menor que en los tumores malignos.

2. La expresión de galectina-3 puede estudiarse, por un procedimiento inmunohistoquímico, en muestras tisulares procedentes de archivo (parafinadas y teñidas) y en muestras citológicas obtenidas mediante punción-aspiración con aguja fina.

3. El estudio de la expresión de galectina-3 en la evaluación preoperatoria de nódulos tiroideos es una herramienta diagnóstica de alta sensibilidad y especificidad para una selección adecuada de pacientes subsidiarios de tratamiento quirúrgico.

III.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

1. Estudiar mediante inmunohistoquímica la expresión de galectina-3 en muestras histológicas de tejido tiroideo obtenidas del archivo histopatológico y procedentes de intervenciones quirúrgicas por patología tiroidea. Las muestras corresponden a tejido tiroideo normal y a todo el espectro de las lesiones tiroideas, benignas y malignas.
2. Establecer la expresión de la galectina-3 en muestras citológicas obtenidas mediante PAAF de nódulos tiroideos, y su relación con el diagnóstico histopatológico definitivo.
3. Determinar la sensibilidad y especificidad de la expresión de la galectina-3 como marcador de malignidad en los tumores de la glándula tiroidea tanto en muestras tisulares como citológicas.
4. En muestras de PAAF, comparar la utilidad de la determinación de la galectina-3 frente al diagnóstico citológico convencional en el estudio y evaluación preoperatoria de los pacientes con nódulos tiroideos.

IV.-MATERIAL Y MÉTODO

1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio de la expresión de la galectina-3 sobre muestras de tiroides se realizó en 2 fases:

- Primera fase

Estudio retrospectivo para la valoración de la expresión de galectina-3 en material tisular procedente de intervenciones quirúrgicas por patología tiroidea realizadas entre los años 1984-2002. El objeto de esta fase del estudio fué el de establecer los patrones de expresión de galectina-3 en todo el espectro de la patología tiroidea, así como en el tejido tiroideo normal. Posteriormente, se evaluó la utilidad de la galectina-3 como marcador de malignidad en material tisular.

- Segunda fase

Estudio prospectivo de la expresión de galectina-3 en material citológico procedente de muestras de punción-aspiración con aguja fina de pacientes con nódulos tiroideos diagnosticados entre los años 2002-2004. La expresión de la galectina-3 se estudió en bloques citológicos (en los casos en los que el bloque tisular rindió celularidad para diagnóstico) y sobre extensiones citológicas. Asimismo en esta fase se correlacionó el diagnóstico realizado por punción-aspiración con el diagnóstico histológico final en los casos en los que se realizó intervención quirúrgica posterior. El objetivo de esta fase del estudio fue el de valorar la eficacia diagnóstica y valor predictivo de la expresión de galectina-3 aplicada a la citología obtenida por PAAF como marcador para malignidad e indicación quirúrgica en pacientes con nódulos tiroideos dominantes.

2.- SUJETOS DEL ESTUDIO

Para la primera fase del estudio, se seleccionaron retrospectivamente de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica de los Hospitales *Valle del Nalón* (Langreo, Asturias) y *Cabueñes* (Gijón, Asturias), 239 muestras de tejido fijadas en formol, procesadas de manera rutinaria y embebidas en parafina, procedentes de intervenciones quirúrgicas. Corresponden a 95 lesiones benignas, 75 neoplasias malignas y 69 casos de tejido tiroideo normal.

El criterio de selección único aplicado en esta fase del estudio fue la existencia de muestras tisulares representativas de las lesiones o tumores para estudio histopatológico e inmunohistoquímico. Los datos de edad y sexo de los pacientes se extrajeron de los informes anatomopatológicos y, en los casos necesarios, de las historias clínicas.

Todas las secciones histológicas disponibles, teñidas con hematoxilina-eosina, fueron revisadas por un patólogo (Francisco Domínguez Iglesias) en orden a confirmar o, en caso necesario, modificar el diagnóstico previo. Los diagnósticos de trabajo para la presente tesis fueron los de la revisión. El número de secciones por caso osciló entre 4 y 21 (media 8, mediana 9). Adicionalmente se seleccionaron secciones y muestras de tejido tiroideo normal, alejado de las lesiones o tumores.

Para la segunda fase se estudiaron prospectivamente extensiones citológicas de material procedente de punción-aspiración con aguja fina, teñidas con May-Gruwald-Giemsa y con tinción de Papanicolaou, así como centrifugados realizados con citocentrífuga Cytospin (Shandon. UK) de

lavados de aguja de las punciones, teñidos con Papanicolaou, y bloques citológicos realizados con el lavado de la aguja, realizados según el procedimiento descrito más adelante. Estas punciones eran realizadas durante el estudio de pacientes con nódulos tiroideos dominantes.

El criterio de selección único aplicado para la selección de casos en esta segunda fase fue la presencia de celularidad representativa para diagnóstico en alguno de los tipos de muestra (extensión citológica, centrifugado citológico o bloque citológico).

El estudio citológico se realizó en 92 pacientes (10 casos de tejido tiroideo normal, 50 lesiones benignas y 32 neoplasias malignas). El material aspirado obtenido se analizó en forma de extensiones citológicas y en 46 casos además fue procesado como bloques citológicos. El estudio histológico definitivo se realizó en 87 casos de las 92 PAAF realizadas, ya que cinco pacientes no fueron intervenidos quirúrgicamente (corresponden a dos nódulos coloides y tres carcinomas anaplásicos). Los diagnósticos realizados sobre las muestras citológicas obtenidas mediante la PAAF son: negativo para malignidad (sin especificar otro diagnóstico), nódulo coloide/nódulo adenomatoide poco celular, enfermedad de Graves-Basedow, tiroiditis de Hashimoto, adenoma folicular, nódulo adenomatoide celular/patrón proliferativo folicular, carcinoma folicular, carcinoma papilar, carcinoma anaplásico y punción sospechosa de malignidad.

3.- TÉCNICAS

3.1 - TÉCNICA DEL BLOQUE TISULAR CITOLÓGICO

Para la realización de los bloques tisulares procedentes de material citológico se empleó el siguiente procedimiento:

1. Tras realizar las extensiones citológicas del material extraído con la punción-aspiración se realiza el lavado de la aguja utilizada en la toma de espécimen con 3 cc de suero fisiológico recogiendo el producto del lavado en un tubo de ensayo.
2. A continuación se centrifuga el líquido de lavado a 1600 revoluciones por minuto durante 15 minutos en una centrífuga Kubota 5100.
3. Posteriormente se procede a decantar y se añaden (dependiendo del sedimento) de 3 a 8 gotas de Tromboplastina (IL test PT-fibrinogen HS), y se mezcla con el vortex durante 2 minutos.
4. Se añade la misma cantidad (3-8 gotas) de plasma al sedimento y se mezcla con el vortex durante otros 2 minutos.
5. Finalmente se pone el tubo de centrífuga en una gradilla durante 2 minutos hasta que el coágulo esté formado. En los casos en que no se forma el coágulo, se recentrifuga el espécimen y se deja reposar, boca arriba, durante 5 minutos.

3.2 - MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron sobre secciones de bloques de tejido, bloques citológicos y en extensiones citológicas sin teñir o previamente teñidas con Papanicolaou.

Para el estudio realizado sobre cortes de bloques tisulares de archivo (fase 1) se elaboraron bloques multitejido de manera similar a la técnica descrita por Battifora y Metha¹¹⁰. Para ello se seleccionaron “áreas representativas” en las laminillas teñidas con hematoxilina eosina (HE) de secciones de los tejidos de interés; a continuación estas áreas se delimitaron en los bloques tisulares de parafina sobreponiendo el portaobjetos con la sección teñida al bloque. El área de tejido de interés se talla con un bisturí y el fragmento seleccionado se pone en un nuevo paramol verticalmente, junto a otros fragmentos representativos de otras lesiones. Cada nuevo bloque así realizado contiene seis fragmentos tisulares de distintas piezas. El control de las secciones de cada multibloque se realizó con una planilla cuadrículada en la que figuraban el número del bloque y el orden y número de biopsia correspondiente a cada fragmento de tejido. Como control adicional, en todos los bloques así elaborados el primer fragmento tisular correspondía a un fragmento de tejido distinto, lo que permitía orientar el orden de lectura de las secciones.

La técnica inmunohistoquímica se realizó de acuerdo con la metodología expuesta a continuación:

1. Se realizan secciones de cinco micras de grosor de cada multibloque tisular, en un microtomo de rotación Shandon AS325 (Anglia Scientific Inst LTD. Cambridge. UK.).

2. Las secciones son colocadas sobre portaobjetos especiales Gap microscope slides (DakoCytomation. Dinamarca)
3. El desparafinado se realiza por calentamiento en estufa a 37°C.
4. La desparafinización se completa en 2 baños de xilol de 15 min cada uno.
5. Rehidratación: Se realiza introduciendo las preparaciones en baños de alcohol de concentración decreciente de 100, 96 y 70°, durante 5-10 minutos cada uno.
6. Lavado en agua destilada.
7. Técnica de recuperación antigénica. A continuación y con objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica de detección se realiza técnica de recuperación antigénica consistente en el tratamiento de las secciones con calentamiento en olla a presión durante 5 minutos en una solución de buffer citrato comercial (Lab Sistem). Posteriormente las secciones se dejan enfriar a temperatura ambiente.
8. A continuación las secciones se lavan con TBS (Tris-buffer salino). A partir de este paso el resto de la técnica se realiza en un teñidor automático TechMate 500 (BioTekSolutions. Dako, Dinamarca)
9. Inhibición de la peroxidasa endógena. Se realiza introduciendo las secciones en una solución al 1% de peróxido de hidrógeno al 30% en agua destilada con azida sódica al 1/1000, durante 30 minutos.
10. Lavado con agua destilada.
11. Inhibición de la tinción inespecífica. Se realiza con suero inespecífico.

12. Anticuerpo primario. Las secciones se incuban con el Anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal anti-Galectina-3 (AM anti-galectina-3. Clon 9C4. Novocastra Lab., Gran Bretaña), a una dilución 1:50, durante 30 minutos.
13. Anticuerpo secundario y sistema de detección. Se realiza con un sistema supersensible Envision (ChemMate Dako Envision Detection Kit Peroxidase DAB, Rabbit/Mouse. DakoCytomation, Dinamarca). El revelado se realiza con 3.3 diaminobenzidina (DAB).
14. Contratinción. Las secciones se contratiñeron con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos.
15. Tras lavados, se llevan las secciones a deshidratación en alcoholes de concentración creciente y se aclaran en xilol.
16. Montaje. Las secciones son por último montadas con un medio de montaje Entellan (Merck).

La técnica inmunohistoquímica realizada en bloques tisulares de material citológico fue la descrita anteriormente. La técnica realizada en las extensiones citológicas fue la misma, obviándose el paso de recuperación antigénica. En los casos en que la tinción inmunohistoquímica se realizó en frotis previamente teñidos con Papanicolaou, los cristales no fueron desteñidos previamente a la tinción inmunohistoquímica, lo cual no dificultó la técnica ni la interpretación posterior de los resultados.

Se utilizaron controles negativos de tinción en los que se omitió el anticuerpo específico y otros en los que se utilizaron anticuerpos no relacionados. Asimismo, se utilizaron controles positivos, procedentes de casos positivos evaluados previamente al estudio.

3.3 - CUANTIFICACIÓN DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las secciones inmunoteñidas fueron evaluadas en un microscopio óptico. Se utilizó un método semicuantitativo de valoración de la tinción, de la siguiente manera:

- Tinción negativa (0): ausencia de tinción en las células epiteliales problema
- Tinción débil (1): tinción en $\leq 10\%$ de las células problema
- Tinción moderada (2): tinción en las células problema entre el 11-49%
- Tinción intensa (3): tinción en las células problema $\geq 50\%$.

Cada caso era adicionalmente calificado como positivo o negativo en función de la presencia de tinción, independientemente del porcentaje de células teñidas.

La tinción fue finamente granular-difusa, presente en citoplasmas y núcleos celulares de células epiteliales en los casos positivos. Una tinción similar se observó en macrófagos y endotelios vasculares, guardándose el debido cuidado de diferenciar las células problema de estos para la valoración de la tinción como positiva/negativa. En el presente estudio no se diferenció entre tinción nuclear o citoplasmática a efectos de cómputo y estadístico, así como tampoco se valoró la intensidad de tinción. Todos los casos con tinción, considerados positivos, mostraron una alta y similar intensidad de tinción. En aquellos casos en que la tinción fue focal y podía afectar a la diferenciación entre lesión benigna y maligna, se especificó la focalidad de la tinción y la topografía de la misma.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete informático “Statistical Package for the Social Science” SPSS para Windows versión 11.0 (SPSS® Inc. Illinois, EEUU).

Se calculó la sensibilidad, especificidad, falsos positivos y falsos negativos, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método inmunodiagnóstico para la galectina-3 mediante el programa EPIDAT versión 3.0. El diagnóstico histomorfológico definitivo se tomó como el “modelo estandar”.

Como indicador adicional de la precisión de una prueba diagnóstica realizamos el cálculo de la curva ROC (Receiver-Operating Characteristic), que relaciona mediante un sistema de coordenadas cartesianas la sensibilidad y especificidad de la misma. Una prueba perfecta es aquella que se eleva verticalmente hacia el ángulo superior izquierdo, mientras que la que tiene un trayecto diagonal es considerada inútil. El área bajo la curva es el mejor indicador global de la precisión de una prueba diagnóstica: a mayor área mejor es la prueba. El valor “1” indica una discriminación perfecta del test^{111,112}.

5.- BIBLIOGRAFÍA DE REFERENCIA

Para la búsqueda de referencias bibliográficas se empleó la consulta de manuales generales de cada tema y fundamentalmente la base de datos Medline.

Habitualmente es necesario establecer una estrategia de búsqueda para filtrar y seleccionar los artículos de mayor interés. El primer paso fue seleccionar del índice electrónico el término “thyroid nodules”, y posteriormente acotar la búsqueda con los descriptores “galectin-3” y “neoplasm”. En nuestro caso, el estudio de la galectina-3 es un tema de investigación relativamente reciente y más aún aplicado a la patología tiroidea, por lo que el número de publicaciones sobre el tema es limitado. Las publicaciones obtenidas de esta forma también sirvieron como fuente de otras referencias bibliográficas no indexadas en Medline.

V.- RESULTADOS

1.- PATRONES DE EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN MUESTRAS TISULARES

1.1.- DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

De los 170 pacientes con patología tiroidea estudiados, 121 casos (71%) corresponden a mujeres y 49 son varones, con una media de edad de 49 años (rango: 16-83).

La neoplasia maligna más frecuente es el carcinoma papilar, seguido del carcinoma folicular. El adenoma folicular es la patología más frecuente del estudio, y la tiroiditis De Quervain la más infrecuente. En las neoplasias malignas, exceptuando el carcinoma folicular, el porcentaje de varones es siempre mayor del 40%, mientras que en las lesiones benignas está entre el 10-27%, siendo más infrecuentes los hombres en las tiroiditis (0-10% de varones). La distribución de los casos según el diagnóstico histológico se muestra en la tabla 1 y su relación con el sexo en la tabla 2

Diagnóstico histológico	Nº de casos	%
Hiperplasia nodular	19	11.2%
Enfermedad de Graves-Basedow	10	5.9%
Tiroiditis de Hashimoto	10	5.9%
Tiroiditis De Quervain	3	1.8%
Adenoma folicular	42	24.7%
Adenoma de células de Hürthle	11	6.5%
Carcinoma folicular mínimamente invasivo	14	8.2%
Carcinoma folicular extensamente invasivo	12	7.1%
Carcinoma papilar	30	17.6%
Carcinoma de células de Hürthle	7	4.1%
Carcinoma medular	6	3.5%
Carcinoma anaplásico	6	3.5%
Total	170	100%

Tabla 1: Distribución de los casos según el diagnóstico histológico

Diagnóstico histológico	Varones	Mujeres	Total
Hiperplasia nodular	4 (21.1%)	15 (78.9%)	19
Enfermedad de Graves-Basedow	2 (20%)	8 (80%)	10
Tiroiditis de Hashimoto	1 (10%)	9 (90%)	10
Tiroiditis De Quervain	-	3 (100%)	3
Adenoma folicular	10 (23.8%)	32 (76.2%)	42
Adenoma de células de Hürthle	3 (27.3%)	8 (72.7%)	11
Carcinoma folicular mínimamente invasivo	3 (21.4%)	11 (78.6%)	14
Carcinoma folicular extensamente invasivo	4 (33.3%)	8 (66.7%)	12
Carcinoma papilar	13 (43.3%)	17 (56.7%)	30
Carcinoma de células de Hürthle	3 (42.9%)	4 (57.1%)	7
Carcinoma medular	3 (50%)	3 (50%)	6
Carcinoma anaplásico	3 (50%)	3 (50%)	6
Total	49 (28.8%)	121 (71.2%)	170

Tabla 2 : Relación sexo/diagnóstico histológico

1.2.- EXPRESION DE GALECTINA-3 EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL

De las 69 muestras de tejido tiroideo normal analizadas en nuestro estudio, solamente se encontró positividad para la galectina-3 en una de ellas (1.4 %), con tinción en menos del 50% de las células. Todos los demás casos fueron negativos.

1.3.- EXPRESION DE GALECTINA-3 EN LESIONES BENIGNAS

De las 95 lesiones benignas estudiadas solamente se encontró inmunorreactividad para la galectina-3 en 8 casos (8.4%), siendo las restantes 87 muestras negativas (91.6%). Todos los casos considerados positivos presentaban tinción en menos del 10% de las células.

Ningún caso de hiperplasia nodular (19 muestras) ni de Enfermedad de Graves-Basedow (10 casos) mostró reactividad para la galectina-3.

Con respecto a las tiroiditis, las 3 tiroiditis De Quervain fueron negativas, mientras que de los 10 casos de Tiroiditis de Hashimoto, 2 muestras fueron positivas.

En cuanto a los adenomas, sólo cuatro casos de los 42 adenomas foliculares mostraron reactividad para la galectina-3 (9%). Del mismo modo, de los 11 casos de adenoma de células de Hürthle, la positividad para la proteína sólo fue observada en dos muestras (18%).

La figura 1 muestra una hiperplasia nodular de tiroides teñida con hematoxilina-eosina, y en la figura 2 se aprecia la ausencia de tinción de esta lesión tras el análisis inmunohistoquímico con galectina-3 (página 55).

En la tabla 3 se resumen los patrones de expresión de la galectina-3 en las muestras histológicas de las lesiones benignas.

Diagnóstico histológico	Nº de casos	Galectina-3 +
Hiperplasia nodular	19	0
Graves-Basedow	10	0
Tiroiditis de Hashimoto	10	2
Tiroiditis De Quervain	3	0
Adenoma folicular	42	4
Adenoma células Hürthle	11	2
Total	95	8

Tabla 3: Patrones de expresión de la galectina-3 en las muestras histológicas de las lesiones benignas

1.4.-EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CARCINOMAS

Entre las 69 lesiones tiroideas malignas de origen epitelial (excluyendo por tanto los carcinomas medulares) de diferentes tipos histológicos y grados de diferenciación que hemos analizado, 67 fueron positivas para la galectina-3 (97%), y solamente en dos casos no se detectó inmunorreactividad para la proteína.

Los carcinomas papilares expresaron la galectina-3 en el 100% de los casos. En la mayoría de ellos (26 casos) se identificó la tinción en más del 50% de la células. Las figuras 3 y 4 muestran un carcinoma papilar clásico (página 55) y las figuras 5 y 6 un carcinoma papilar variante folicular (página 56).

Igualmente, todos los carcinomas foliculares extensamente invasivos estudiados presentaron una tinción positiva para galectina-3 (100 %), presente en todos los casos en más del 10% de las células (ocho muestras con más del 50% y cuatro entre el 11-49%) (figuras 7 y 8, página 56).

De los 14 carcinomas foliculares mínimamente invasivos dos fueron negativos, encontrándose positividad en 12 casos (85%). El porcentaje de células teñidas era mayor del 50% en siete casos, y menos del 10% solamente en dos muestras.

Todos los carcinomas de células de Hürthle mostraron una reacción positiva para la galectina-3 (100 %) con un porcentaje de células teñidas siempre mayor del 11%. De la misma forma, todos los carcinomas anaplásicos (6 casos) fueron galectina-3 positivos.

Los seis carcinomas medulares no mostraron tinción alguna.

En la tabla 4 se muestran los resultados de los diferentes patrones de expresión de galectina-3 en muestras histológicas de carcinomas.

Diagnóstico histológico	Nº de casos	Gal-3 positivo	Cuantificación		
			<10%	11-49%	>50%
Carcinoma papilar	30	30	1	3	26
Ca folicular extensamente invasivo	12	12	0	4	8
Ca folicular mínimamente invasivo	14	12	2	3	7
Carcinoma de células de Hürthle	7	7	0	3	4
Carcinoma medular	6	0	0	0	0
Carcinoma anaplásico	6	6	1	3	2
Total	75	67	4	16	47

Ca folicular: Carcinoma folicular **Gal-3:** galectina-3

Tabla 4: Patrones de expresión de galectina-3 en muestras histológicas de carcinomas

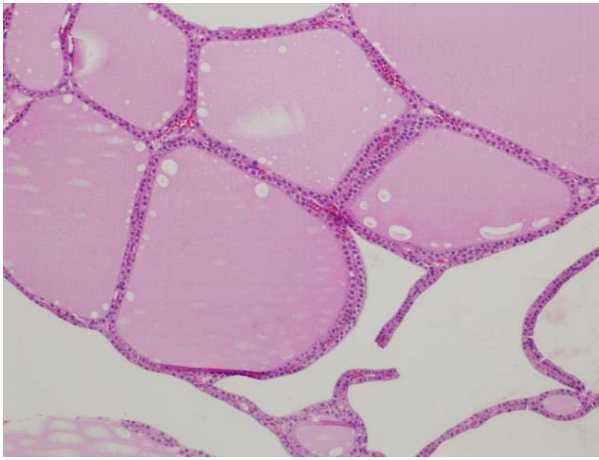


Figura 1: Hiperplasia nodular tiroidea (HE x100)



Figura 2: Hiperplasia nodular tiroidea. Tinción para galectina-3 negativa en epitelio folicular. Se observa tinción positiva en macrófagos (IHQ anti galectina-3 x 10)

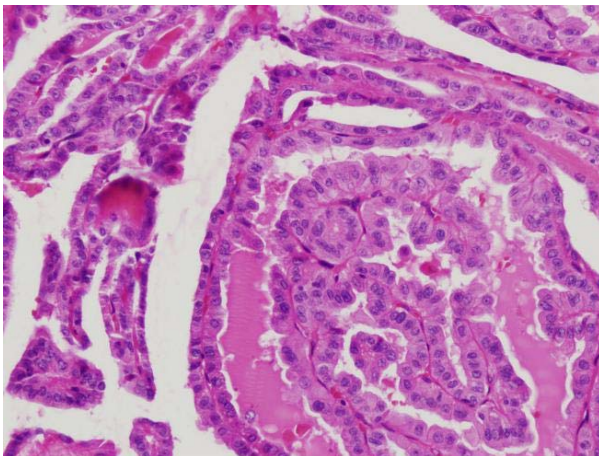


Figura 3: Carcinoma papilar de tiroides (HE x 100)

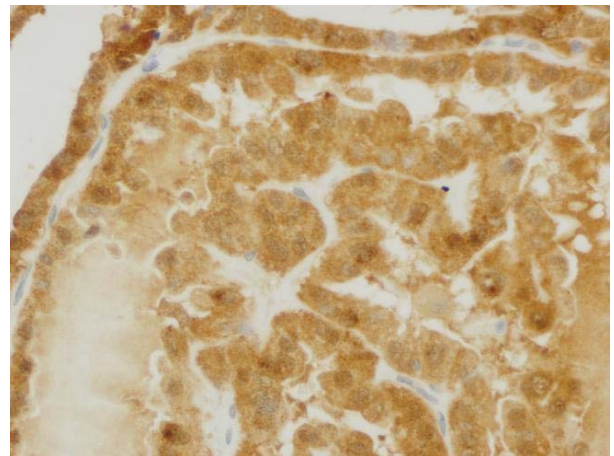


Figura 4: Carcinoma papilar de tiroides que expresa galectina-3 intensamente en células tumorales (IHQ anti-galectina-3 x 200)

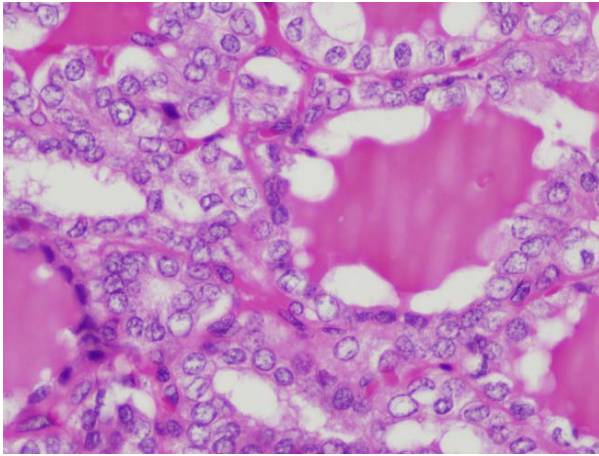


Figura 5: Carcinoma papilar variante folicular (HE x 400)

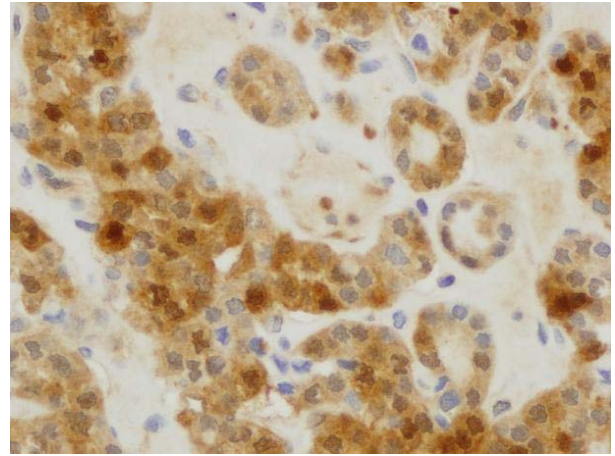


Figura 6: Intensa expresión de galectina-3 en células tumorales de carcinoma papilar de tiroides variante folicular (IHQ, anti-galectina-3 x 200)

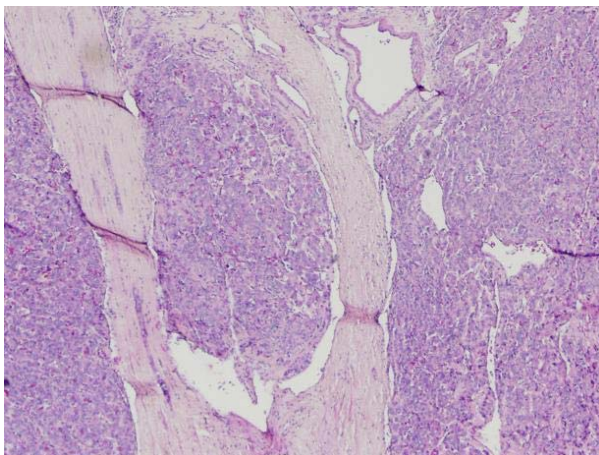


Figura 7: Carcinoma folicular extensamente invasivo (HE x 100)

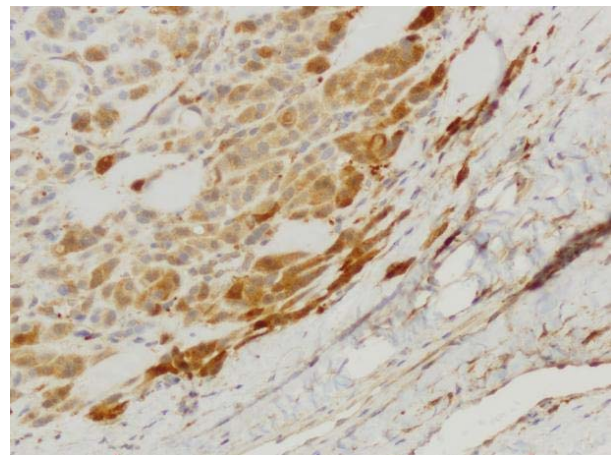


Figura 8: Carcinoma folicular extensamente invasivo positivo para galectina-3 (IHQ anti-galectina-3 x 100)

Para evaluar la utilidad de la galectina-3 como marcador tumoral de malignidad agrupamos todas las lesiones benignas y malignas (excluidos los carcinomas medulares, debido a que no son neoplasias derivadas del epitelio folicular) y calculamos los porcentajes correspondientes, que se muestran en la tabla 5; la correlación con el porcentaje de células teñidas se muestra en la tabla 6.

	Galectina-3 negativo	Galectina-3 positivo	Total
Lesiones benignas	87 91.6%	8 8.4%	95 100%
Lesiones malignas	2 2.9%	67 97.1%	69 100%
Total	89	75	164

Tabla 5: Expresión de galectina-3 en lesiones benignas y malignas (excluidos los carcinomas medulares)

	Gal-3 negativo	Gal-3 + <10%	Gal-3 + 11-49%	Gal-3 + >50%	Total
Lesiones benignas	87 91.6%	8 8.4%	- -	- -	95 100%
Lesiones malignas	2 2.9%	4 5.8%	16 23.2%	47 68.1%	69 100%
Total	89	12	16	47	164

Gal-3: galectina **Gal-3 +:** galectina-3 positivo

Tabla 6: Cuantificación de la tinción para galectina-3 en lesiones benignas y malignas (excluidos carcinomas medulares)

Si excluimos las lesiones benignas no neoplásicas y comparamos solamente los adenomas (foliculares y de células de Hürthle) con los carcinomas diferenciados (folicular mínimamente y extensamente invasivo, papilar y de células de Hürthle) observamos que tanto la positividad para la galectina-3 como el porcentaje de células teñidas presenta variaciones muy pequeñas como se muestra en las tablas 7 y 8.

Adenoma/Carcinoma	Galectina-3 negativo	Galectina-3 positivo	Total
Adenomas folicular y de células de Hürthle	47 88.7%	6 11.3%	53 100%
Carcinoma papilar, folicular, y de células de Hürthle	2 3.2%	61 96.8%	63 100%

Tabla 7: Expresión de galectina-3 en adenomas frente a carcinomas diferenciados

Adenoma/Carcinoma	Gal-3 negativo	Gal-3 + <10%	Gal-3 + 11-49%	Gal-3 + >50%	Total
Adenomas folicular y de células de Hürthle	47 88.7%	6 11.3%	- -	- -	53 100%
Carcinoma folicular, papilar y células de Hürthle	2 3.2%	3 4.8%	13 20.6%	45 71.4%	63 100%

Gal-3: galectina-3 **Gal-3 +:** galectina-3 positivo

Tabla 8: Cuantificación de la tinción de galectina-3 en adenomas frente a carcinomas diferenciados

Comparamos también los resultados de la expresión de galectina-3 exclusivamente entre los adenomas foliculares y los carcinomas foliculares (mínimamente invasivo y extensamente invasivo) que representan el grupo de lesiones con más dificultades en el diagnóstico (Tabla 9). El porcentaje de carcinomas foliculares que expresan galectina-3 es del 92.3%, solo ligeramente menor que cuando realizamos el cálculo del conjunto de todos los carcinomas diferenciados (96.8%).

	Galectina-3 negativo	Galectina-3 positivo	Total
Adenoma folicular	47 88.7%	6 11.3%	53 100%
Carcinoma folicular (mínimamente y extensamente invasivo)	2 7.7%	24 92.3%	26 100%

Tabla 9: Expresión de galectina-3 en adenomas foliculares frente a carcinomas foliculares

Calculamos la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, número de falsos positivos y de falsos negativos y la exactitud diagnóstica de la expresión de galectina-3 en la discriminación entre las lesiones histológicas benignas y malignas derivadas del epitelio folicular (carcinoma folicular mínimamente y extensamente invasivo, carcinoma papilar, carcinoma de células de Hürthle y carcinoma anaplásico). La sensibilidad obtenida es del 97 % y la especificidad del 94.5%. El número de falsos positivos es del 5.4% y el de falsos negativos del 2.8%.

El valor predictivo positivo es del 88 % y el valor predictivo negativo del 98%. La exactitud diagnóstica obtenida mediante el estudio de la expresión de galectina-3 en la discriminación entre lesiones malignas y benignas en muestras histológicas de lesiones tiroideas se calculó mediante el análisis de la curva ROC, obteniendo un área bajo la curva de 0.9581 (el valor 1 representa una discriminación perfecta de la prueba diagnóstica). En la figura 9 se muestra la curva ROC correspondiente a la expresión de la galectina-3 en muestras histológicas tiroideas.

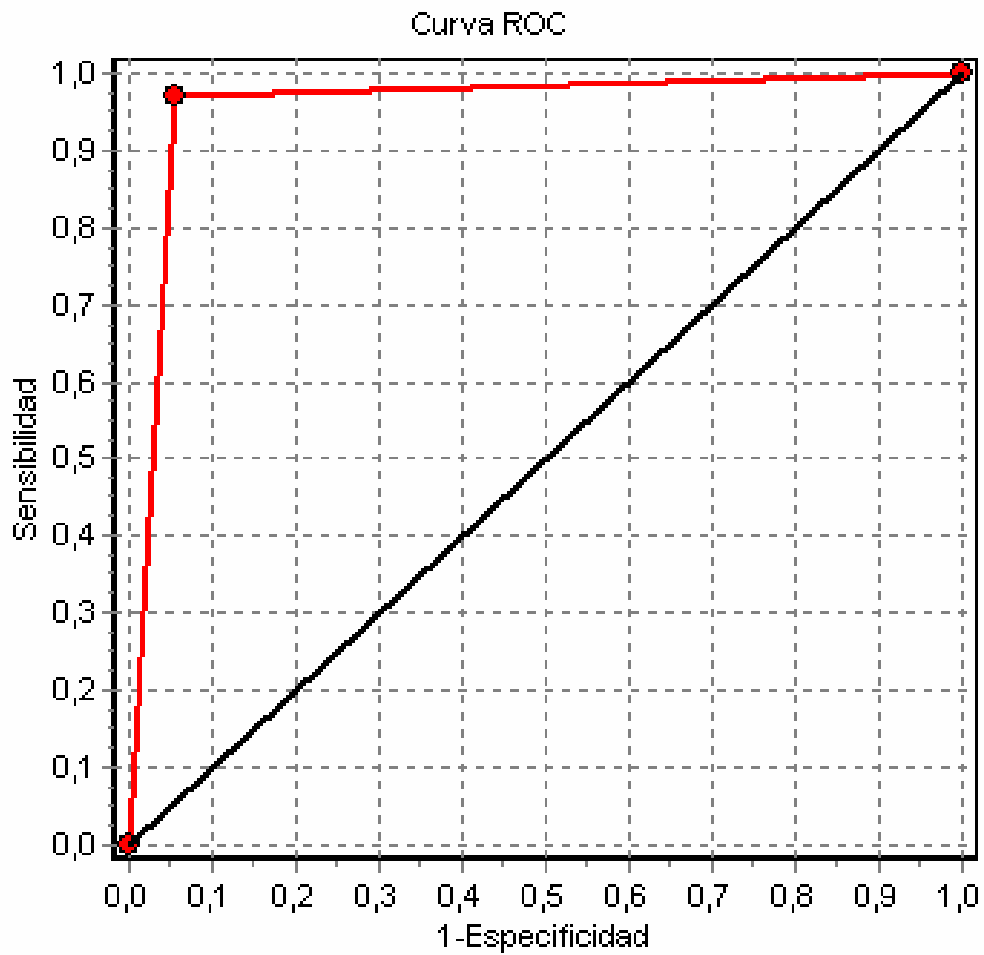


Figura 9: Curva ROC para muestras histológicas: discriminación entre la totalidad de las lesiones benignas y malignas (excluidos carcinomas medulares)

Si hacemos el cálculo de la curva ROC para la expresión de la galectina-3 exclusivamente en la discriminación de los adenomas foliculares frente a los carcinomas foliculares, observamos que el valor que obtenemos del área bajo la curva (0.9139) presenta pocas diferencias con el calculado para la totalidad de las lesiones benignas y malignas (figura 10).

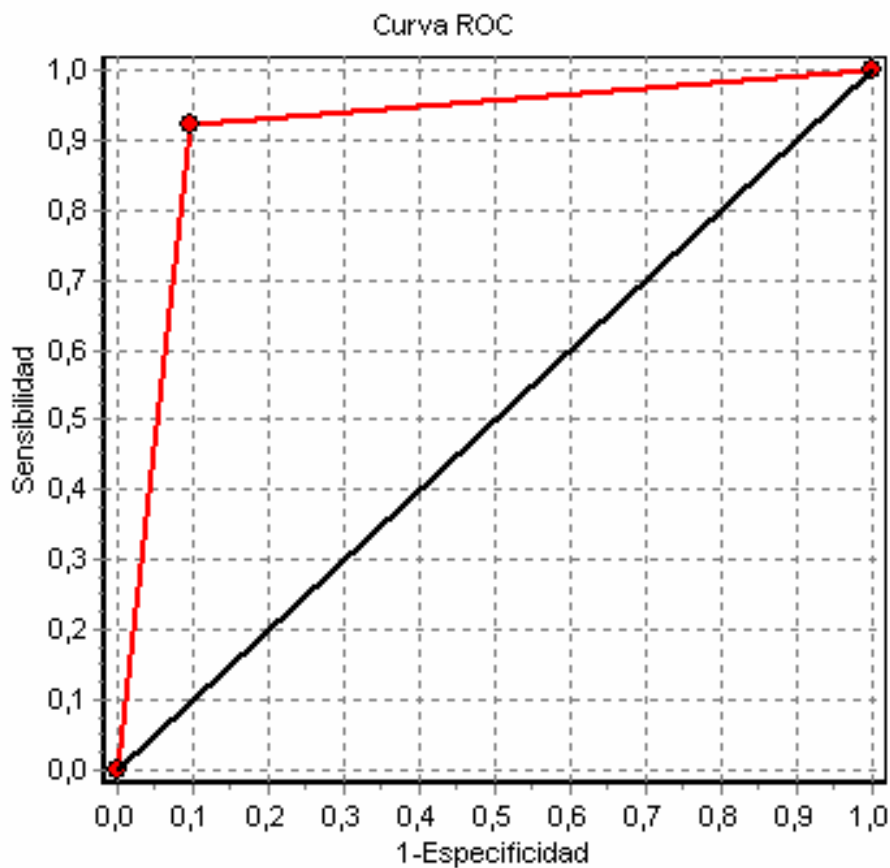


Figura 10: Curva ROC para muestras histológicas: discriminación entre adenomas foliculares y carcinomas foliculares

2.- PATRONES DE EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN MUESTRAS CITOLÓGICAS (PAAF)

2.1.- DATOS EPIDEMIOLÓGICOS

Realizamos el estudio citológico en 92 pacientes, 29 hombres y 63 mujeres (68% del total), con una media de edad de 53 años (rango: 26 a 84). El diagnóstico histológico definitivo de los casos estudiados y su distribución según el sexo se resume en la Tabla 10. Igual que en las muestras procedentes de estudios histológicos, la mayor frecuencia corresponde al adenoma folicular (21.7%), seguido de las hiperplasias nodulares (20.7%). La neoplasia maligna de mayor incidencia es el carcinoma papilar (18.5% del total).

Diagnóstico histológico	Hombre	Mujer	Total	%
Tiroides normal	3	7	10	10.9%
Nódulo coloide/Hiperplasia nodular	8	11	19	20.7%
Enfermedad de Graves-Basedow	-	3	3	3.3%
Tiroiditis de Hashimoto	2	4	6	6.5%
Adenoma folicular	7	13	20	21.7%
Carcinoma folicular	5	6	11	12%
Carcinoma papilar	3	14	17	18.5%
Carcinoma anaplásico	-	1	1	1.1%
No intervenidos quirúrgicamente	1	4	5	5.4%
Total	29	63	92	100%

Tabla 10: Distribución de los casos de PAAF según el diagnóstico histológico definitivo y el sexo

2.2.- EXPRESION DE GALECTINA-3 EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL

Se disponía de 10 muestras citológicas que correspondían a tejido tiroideo normal, y en ninguna de ellas se observó tinción positiva para la galectina-3.

2.3.- EXPRESION DE GALECTINA-3 EN LESIONES BENIGNAS

Se estudiaron 50 muestras citológicas correspondientes a patología tiroidea benigna, encontrando inmunorreactividad para la galectina-3 únicamente en 5 casos, que representan el 10 % del total.

De los 21 casos de hiperplasia nodular, solamente uno expresó galectina-3, observándose tinción solamente en menos del 10% de las células de la muestra. En las figuras 11 y 12 se aprecia la ausencia de tinción con galectina-3 en un bloque tisular y en una extensión citológica de un nódulo coloide (página 69). El único caso de tiroiditis que era reactivo para la proteína mostró tinción entre el 11-49% de las células.

El 15% de los adenomas foliculares (3/20) fueron positivos para la galectina-3, siempre con tinción en menos del 50% de las células (un caso tinción débil y otros dos tinción moderada). Las figuras 13 y 14 (página 69) muestran un bloque citológico de un adenoma folicular en las que se observa ausencia de tinción para la galectina-3.

El 100% de los casos de enfermedad de Graves-Basedow fueron negativos.

Los resultados del análisis de la expresión de galectina-3 en muestras citológicas procedentes de PAAF de lesiones benignas se muestran en la tabla 11.

Diagnóstico histológico	Nº de casos	Galectina-3 +
Hiperplasia nodular/nódulo coloide	21*	1
Graves-Basedow	3	0
Tiroiditis de Hashimoto	6	1
Adenoma folicular	20	3
Total	50	5

* 2 casos no fueron intervenidos quirúrgicamente

Tabla 11: Expresión de galectina-3 en muestras citológicas de lesiones benignas

2.4.- EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CARCINOMAS

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de galectina-3 en las 32 muestras citológicas procedentes de PAAF cuyo diagnóstico definitivo correspondió a carcinomas tiroideos mostró inmunorreactividad positiva en el 96.8 % de los casos, encontrando solamente un caso negativo.

De los 11 casos de carcinoma folicular, presentaron tinción positiva para la galectina-3 el 90.9%, siendo solamente una muestra negativa. Además, el 90% de las muestras que expresaron galectina-3 lo hicieron de forma moderada o fuerte, y solo un caso presentó tinción débil (figura 15 y 16, pág. 70).

Los carcinomas papilares expresaron galectina-3 en las muestras citológicas en el 100% de los casos, estando presente en la mayoría de ellos (11 casos) en más del 50% de las células (figura 17 y 18, pág. 70). Igualmente, todos los carcinomas anaplásicos (4 casos) fueron inmunorreactivos para la galectina-3 (figuras 19 y 20, pág. 71)

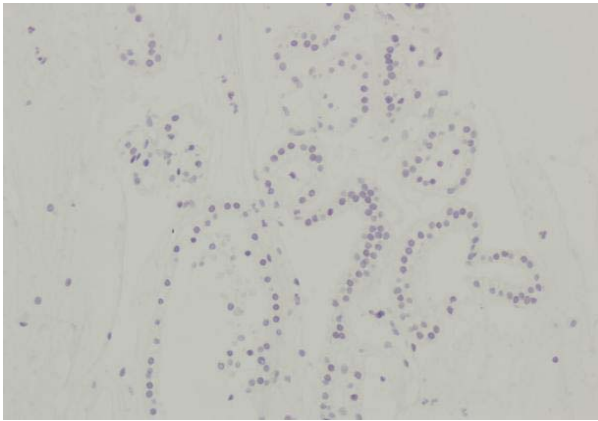


Figura 11: Ausencia total de expresión de galectina-3 en un bloque citológico de PAAF correspondiente a un nódulo adenomatoide poco celular (bocio) (IHQ anti-galectina-3 x 200)

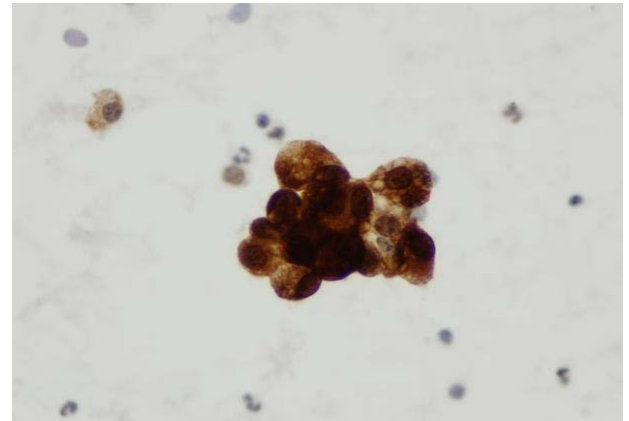


Figura 12: Tinción de galectina-3 en macrófagos de una extensión de tiroides correspondientes a un nódulo coloide. Se observa el citoplasma vacuolado y la agrupación típica de macrófagos (IHQ sobre extensión teñida con PAP con anti-galectina-3 x 400)

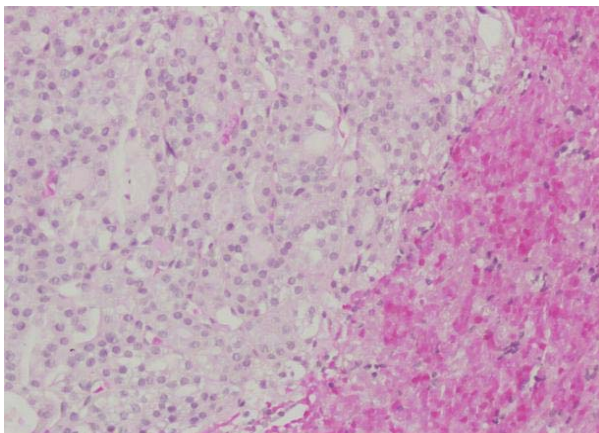


Figura 13: Bloque citológico realizado a partir de PAAF correspondiente a un patrón proliferativo folicular (HE x 20)

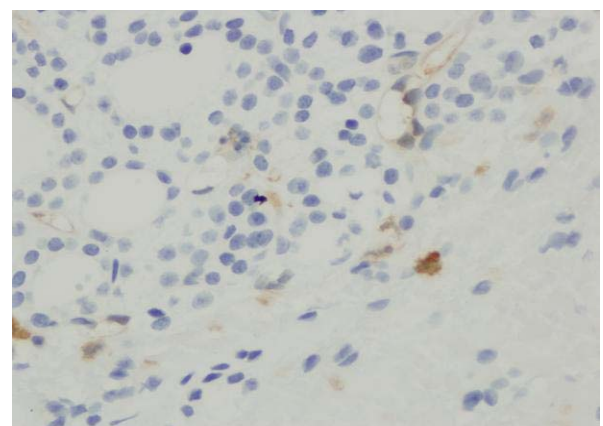


Figura 14: Tinción negativa para galectina-3 en un caso de patrón proliferativo folicular (mismo caso que Fig. 13) con diagnóstico histopatológico final de adenoma folicular. Se observa tinción de macrófagos aislados y ausencia de tinción en células foliculares (IHQ sobre bloque citológico anti-galectina-3 x 400)

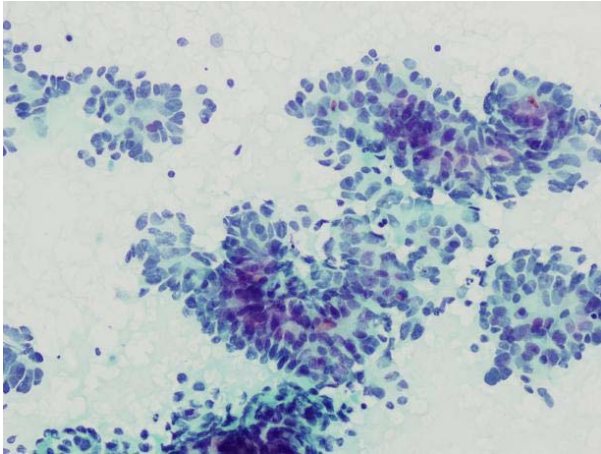


Figura 15: Extensión citológica procedente de PAAF correspondiente a un carcinoma folicular de tiroides. Se aprecia celularidad tumoral muy prominente, agrupación irregular y atipia citológica (tinción de Papanicolaou x 200)

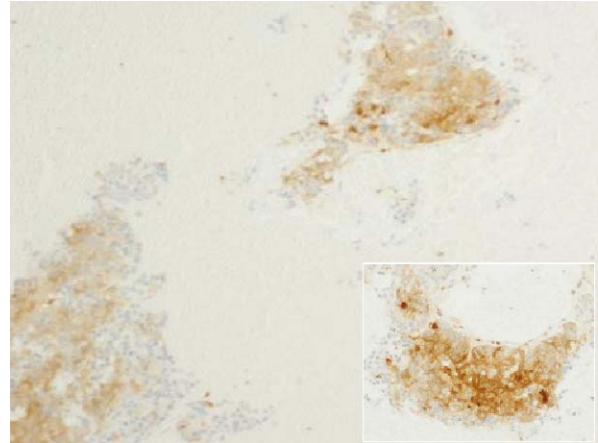


Figura 16: Tinción positiva para galectina-3 de una extensión citológica de PAAF correspondiente a un carcinoma folicular de tiroides (IHQ anti-galectina-3 x 100; recuadro x 200)

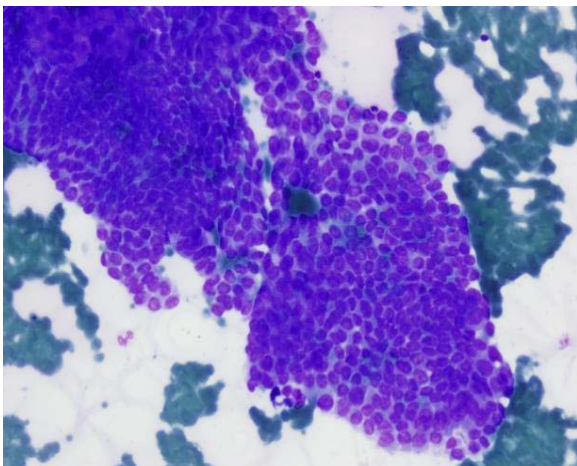


Figura 17: Extensión citológica procedente de PAAF, que corresponde a un caso de carcinoma papilar de tiroides (MGG x 200)

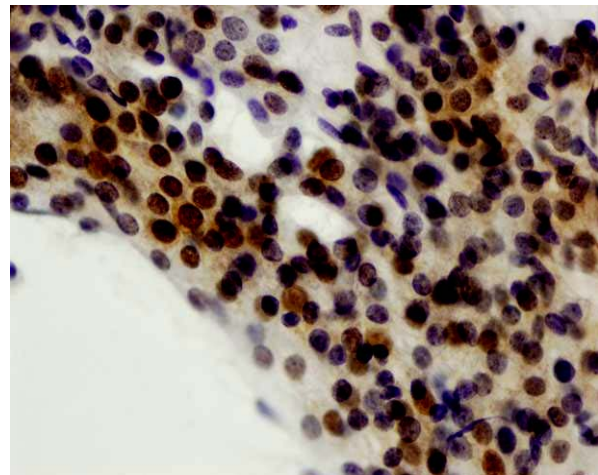


Figura 18: Intensa expresión de galectina -3 en una extensión citológica de carcinoma papilar (mismo caso que Fig. 17) (IHQ anti-galectina-3 x 400)

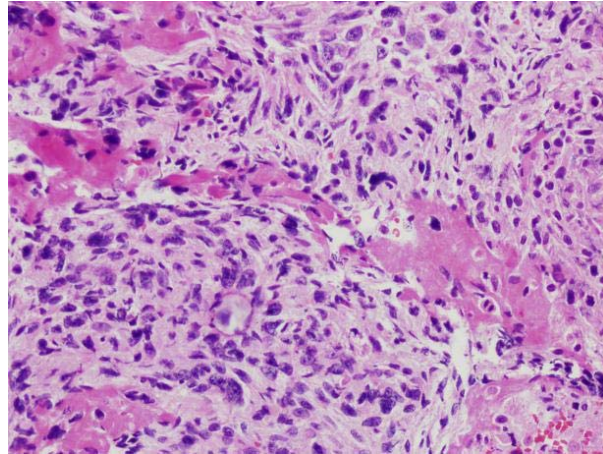


Figura 19: Bloque citológico realizado a partir de material de PAAF correspondiente a un carcinoma anaplásico de tiroides (HE x 200)

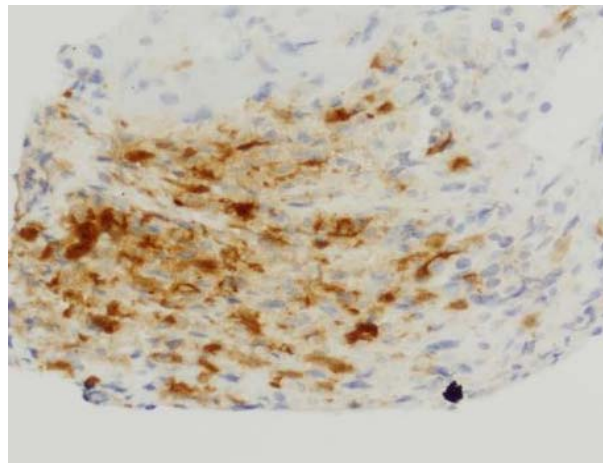


Figura 20: Expresión de galectina-3 en un carcinoma anaplásico de tiroides (mismo caso que Fig. 19)

En la tabla 12 se resumen los patrones de expresión de la galectina-3 en muestras citológicas de carcinomas tiroideos

Diagnóstico histológico	Nº de casos	Galectina-3 positivo	Cuantificación		
			<10%	11-49%	>50%
Carcinoma folicular	11	10	1	3	6
Carcinoma papilar	17	17	2	4	11
Carcinoma anaplásico	4*	4	0	3	1
Total	32	31	3	10	18

* 3 casos no fueron intervenidos quirúrgicamente

Tabla 12: Patrones de expresión de galectina-3 en muestras citológicas de carcinomas

En la tabla 13 se resumen los resultados de la cuantificación de la tinción de galectina-3 en la totalidad de las muestras citológicas estudiadas, incluyendo tejido tiroideo normal, lesiones benignas y malignas.

Diagnóstico histológico	Gal-3 negativo	Gal-3 + <10%	Gal-3 + 11-49%	Gal-3 + >50%	Total
Tiroides normal	10	-	-	-	10
Hiperplasia nodular	20	1	-	-	21*
Graves-Basedow	3	-	-	-	3
Tiroiditis de Hashimoto	5	-	1	-	6
Adenoma folicular	17	1	2	-	20
Carcinoma folicular	1	1	3	6	11
Carcinoma papilar	-	2	4	11	17
Carcinoma anaplásico	-	-	3	1	4**
Total	56	5	13	18	92

Gal-3: galectina-3; **Gal-3 +:** galectina-3 positivo

* 2 casos no intervenidos; ** 3 casos no intervenidos

Tabla 13: Cuantificación de la expresión de galectina-3 en la totalidad de las muestras citológicas estudiadas

En la tabla 14 se exponen los porcentajes correspondientes a la cuantificación de la tinción de las muestras de PAAF agrupadas como patología maligna frente a patología benigna/tejido tiroideo normal. El 91.7% de las lesiones benignas fueron negativas, y de los cinco casos positivos en ninguno se observó tinción en más del 50% de las células. Solamente el 3.1% de las neoplasias malignas fueron negativas para la galectina-3.

	Gal-3 negativo	Gal-3 + <10%	Gal-3 + 11-49%	Gal-3 + >50%	Total
Lesiones benignas y tejido normal	55 91.7%	2 3.3%	3 5%	-	60 100%
Lesiones malignas	1 3.1%	3 9.3%	10 31.3%	18 56.3%	32 100%

Gal-3: galectina-3; **Gal-3 +:** galectina-3 positivo

Tabla 14: Comparación de la cuantificación de la tinción de galectina-3 en las muestras citológicas entre las lesiones malignas y las benignas (incluye tejido normal)

5.- EXPRESIÓN DE GALECTINA-3 EN CITOLOGÍA SOSPECHOSA DE MALIGNIDAD

En nuestro estudio, el diagnóstico citológico realizado mediante la técnica convencional fue en 8 casos de “punción sospechosa de malignidad”. El diagnóstico histológico después de la resección quirúrgica confirmó en 6 casos la existencia de una neoplasia maligna (3 carcinomas foliculares y 3 carcinomas papilares), mientras que en 2 casos el diagnóstico definitivo fue de adenoma folicular. El análisis de la expresión de galectina-3 en las muestras citológicas obtenidas mediante PAAF había sido positivo en los 6 casos que histológicamente fueron confirmados como carcinomas y negativo en los 2 casos que correspondieron en el estudio histológico postquirúrgico a adenomas foliculares. La intensidad de la tinción se observó en 3 casos en más del 50% de las células, y solo en una muestra se tiñeron menos del 10%.

2.6.- CORRELACIÓN ENTRE EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO (PAAF) Y EL DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO

Si comparamos los diagnósticos que se realizaron sobre muestras citológicas (tinción convencional) con los diagnósticos definitivos histológicos tras la extirpación quirúrgica, observamos discrepancias importantes en nueve casos.

De 12 muestras con diagnóstico “negativo para malignidad” en PAAF, 2 casos correspondieron histológicamente a carcinomas, un carcinoma papilar y un carcinoma folicular. En ambos casos las extensiones citológicas mostraron escasa celularidad, pero que teñía positivamente para la galectina-3.

En los 19 casos con diagnóstico de PAAF de “nódulo adenomatoide celular- patrón proliferativo folicular”, 6 casos fueron lesiones malignas en el diagnóstico histológico definitivo (4 carcinomas foliculares y 2 carcinomas papilares). De estos 6 carcinomas, 5 eran galectina-3 positiva, y solo un caso, que corresponde a un carcinoma folicular fue negativo. La tinción observada era intensa en tres casos y moderada en dos.

Como nódulo adenomatoide poco celular/nódulo coloide se diagnosticaron por citología 10 casos, y en uno de ellos el diagnóstico histológico definitivo fue un carcinoma papilar, también con tinción positiva para la galectina-3.

La correlación entre los diagnósticos obtenidos mediante la PAAF y su correspondiente diagnóstico histológico se muestran en la Tabla 15 (en color rojo se encuentran los casos que en la PAAF fueron diagnosticados benignos, pero histológicamente correspondieron a carcinomas).

	Nódulo coloide	Graves-Basedow	Tiroiditis Hashim.	Adenoma folicular	Carcinoma folicular	Carcinoma papilar	Carcinoma anaplásico
Negativo	4	1	2	3	1(+)	1(+)	
Nódulo coloide	7			2		1(+)	
Graves-Basedow		1					
Tiroiditis Hashimoto			2				
Patrón folicular				13	4	2	
Carcinoma folicular					2		
Carcinoma papilar						10	
Carcinoma anaplásico							1
Sospecha malignidad				2	3	3	

(+): galectina-3 positivo

Tabla 15: Correlación diagnóstico citológico/diagnóstico histológico

Del mismo modo que en las muestras histológicas, se realizó el cálculo de la sensibilidad y especificidad del test de la expresión de galectina-3 en el diagnóstico diferencial prequirúrgico de lesiones benignas y malignas. También calculamos el valor predictivo positivo y negativo, el número de falsos positivos y falsos negativos y la exactitud diagnóstica mediante el valor de la curva ROC. La sensibilidad obtenida fue del 96.8%, y la especificidad del 91.7%. El valor predictivo positivo es del 86% y el valor predictivo negativo del 98%. La tasa de falsos positivos calculada es del 8% y los falsos negativos del 3%.

La exactitud diagnóstica del análisis de la galectina-3 en la diferenciación prequirúrgica de lesiones tiroideas malignas y benignas se realizó mediante el cálculo de la curva ROC. El valor obtenido del área bajo la curva es de 0.9427 (máxima exactitud diagnóstica 1) (Figura 21).

Para poder comparar los resultados del análisis de la expresión de galectina-3 en las muestras citológicas con los resultados de la citología convencional se calculó la sensibilidad y especificidad de la PAAF convencional, así como el valor de su curva ROC. Se consideraron casos positivos aquellos diagnósticos citológicos que en la práctica clínica habitual son derivados a cirugía, e incluyen el carcinoma folicular, el carcinoma papilar, el carcinoma anaplásico, la punción sospechosa de malignidad y el patrón proliferativo folicular. La sensibilidad obtenida fue del 88% (96.8% con el test de galectina-3) y la especificidad del 72% (91.7% con galectina-3). El valor predictivo positivo fue del 80% y el valor predictivo negativo del 84%. La curva ROC correspondiente se muestra en la figura 22, con un área bajo la curva de 0.8055.

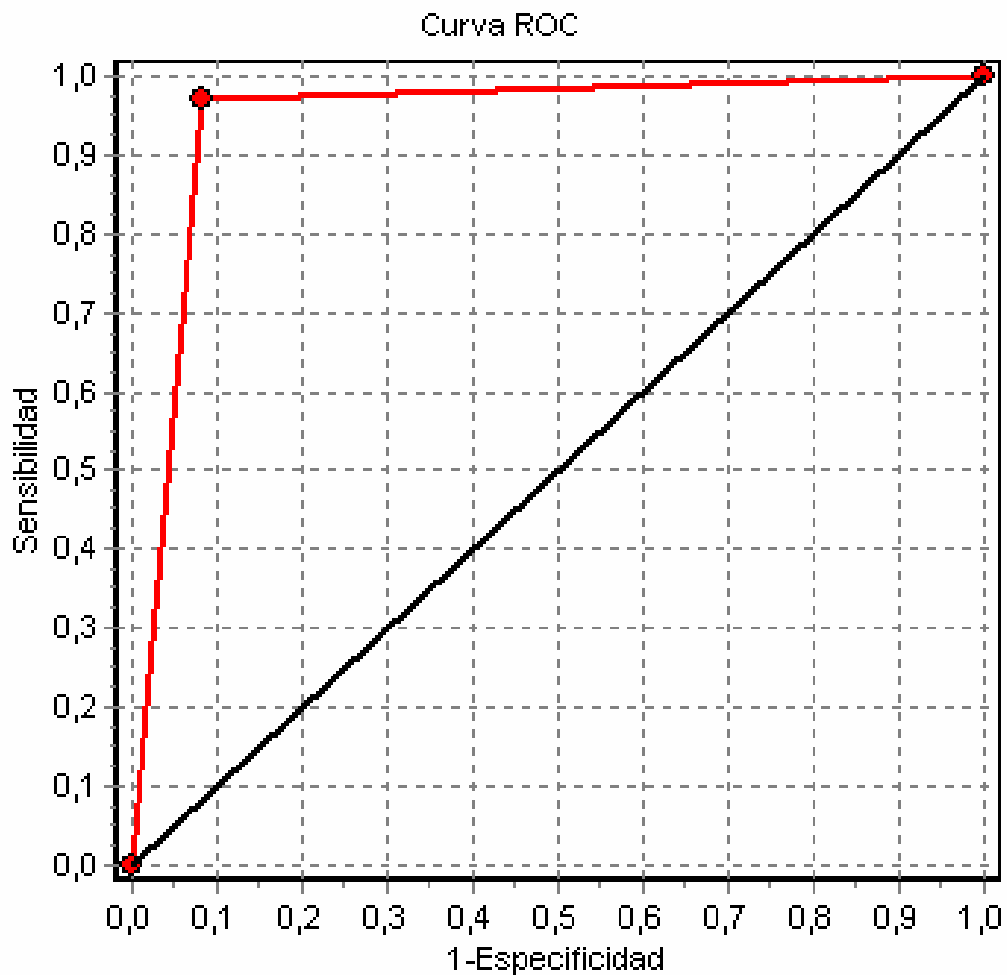


Figura 21: Curva ROC para el valor diagnóstico de la **galectina-3** en la diferenciación prequirúrgica de lesiones benignas y malignas (muestras de PAAF).

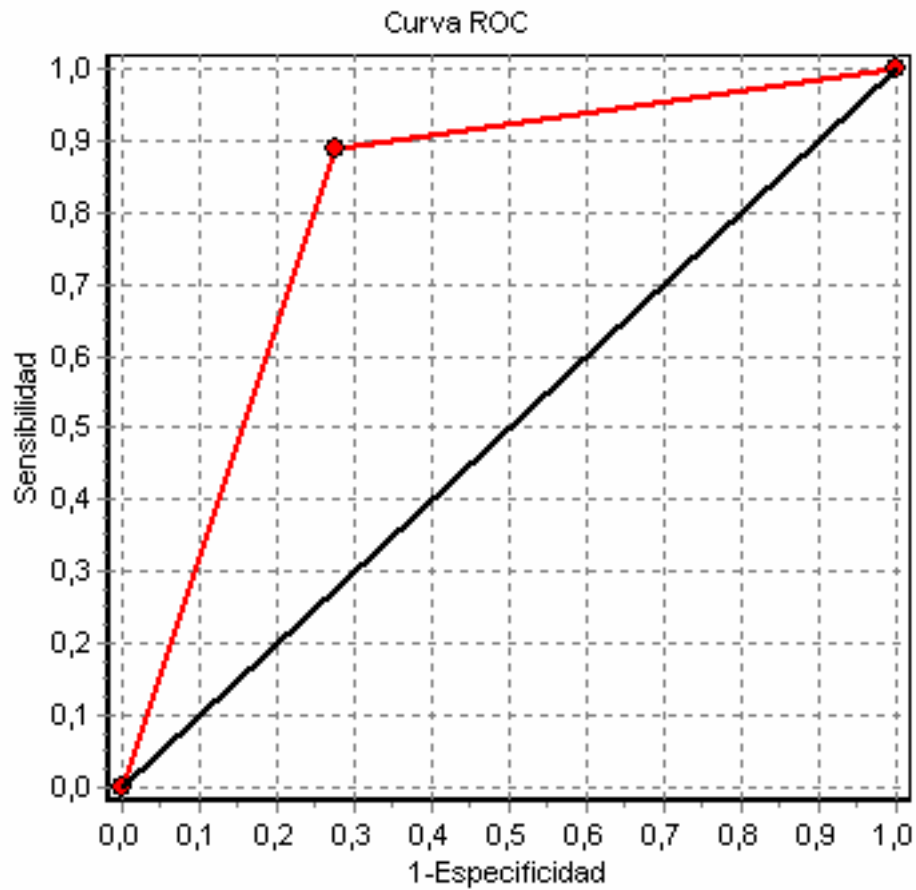


Figura 22: Curva ROC para el valor diagnóstico de la **PAAF convencional** en la diferenciación prequirúrgica de lesiones benignas y malignas.

VI.-DISCUSIÓN

El diagnóstico preoperatorio del nódulo tiroideo continua siendo un reto a pesar de los avances técnicos que se han producido en los últimos años. Muchos de estos pacientes son intervenidos quirúrgicamente, no como una opción terapéutica, sino como la única forma de determinar la naturaleza del nódulo; esto conlleva en muchos casos una morbilidad innecesaria, además de la repercusión personal y socioeconómica.

Hasta este momento no existe un método totalmente efectivo y fiable en la detección de lesiones malignas en la fase prequirúrgica. Aunque la punción-aspiración con aguja fina es en la actualidad el método más útil en el diagnóstico preoperatorio, la identificación correcta de algunos nódulos mediante las técnicas morfológicas convencionales es difícil, fundamentalmente en el grupo de las lesiones foliculares.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de diagnóstico que han intentado optimizar las técnicas clásicas histológicas. Disponemos de diferentes métodos de estudio, según se trate de evaluar la expresión selectiva de proteínas o los ARNm de dichas proteínas. Las técnicas de inmunohistoquímica detectan la expresión de proteínas en las células, mientras que los ARNm de estas proteínas se estudian mediante transcripción inversa asociada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

Al elegir la técnica para el estudio de la expresión de galectina-3 en lesiones tiroideas, hemos considerado que el método inmunohistoquímico presenta ventajas respecto a la RT-PCR. Por un lado, es una técnica sencilla y de bajo coste, que además combina una evaluación morfológica

e inmunofenotípica de la célula tiroidea. La RT-PCR es una técnica más compleja y cara, que presenta más dificultades técnicas que la inmunohistoquímica. Además, la RT-PCR es incapaz de discriminar la tasa de galectina-3 citoplásmica de la nuclear, y dado que solamente la expresión citoplásmica de esta es sugestiva de malignidad tiroidea, plantea problemas en el diagnóstico, puesto que la inmunorreactividad nuclear es observada en algunas lesiones tiroideas benignas bajo ciertas condiciones fisiológicas¹¹³. Igualmente, esta técnica no es capaz de distinguir la tasa de ARNm de galectina-3 derivada de las células endoteliales, histiocitos y fibroblastos (habitualmente presentes en cantidades variables en el tejido tiroideo) del ARNm presente específicamente en las células foliculares, proporcionando así un gran número de resultados falsos positivos¹¹⁴.

Por las razones previamente expuestas, en nuestro estudio hemos utilizado métodos inmunohistoquímicos para el análisis de la expresión de galectina-3 en varios tipos de neoplasias tiroideas, en diferentes lesiones benignas y en tejido tiroideo normal, tanto en muestras histológicas como en muestras citológicas obtenidas mediante PAAF.

1.- EXPRESIÓN EN MUESTRAS HISTOLÓGICAS

1.1.- EXPRESIÓN EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL

Estudiamos la expresión de la galectina-3 en muestras histológicas de tejido tiroideo normal en 69 casos. Solamente encontramos un caso que presentó inmunotinción positiva para la galectina-3, mientras que los restantes 68 (98.5%) fueron claramente negativos. Los trabajos realizados por otros autores encuentran los mismos resultados^{115,116,117}.

1. 2.- EXPRESIÓN EN LESIONES BENIGNAS

En cuanto a las lesiones tiroideas benignas, existen discrepancias en la literatura publicada, ya que hay autores que encuentran casos con tinción positiva para galectina-3 en estas muestras. Nosotros no encontramos ningún caso de hiperplasia nodular ni de enfermedad de Graves-Basedow que presentara inmunorreactividad para la proteína. De los 10 casos estudiados de tiroiditis de Hashimoto, dos expresaron galectina-3, con menos del 10% de las células teñidas; mientras que las tres tiroiditis De Quervain fueron negativas.

Cuando comparamos nuestros resultados con la bibliografía existente al respecto en este tipo de lesiones benignas encontramos que la mayoría de autores presentan datos semejantes, con ningún caso positivo¹¹⁸ o muy pocos casos con positivos débiles. En contraste con estos resultados hay algunos investigadores que señalan inmunotinción positiva hasta en el 55%

de los bocios' aunque siempre asociado a áreas de inflamación y fibrosis. Está demostrada la expresión de galectina-3 en células no tiroideas como fibroblastos o macrófagos, a menudo asociadas a áreas con hemorragia, fibrosis, degeneración quística e inflamación". En las tiroiditis también se ha descrito que son ricas en células de Hürthle, las cuales son probablemente blancos para la expresión de galectina-3. Nosotros también hemos encontrado tinción positiva para la galectina-3 en macrófagos presentes en lesiones benignas, pero con ausencia de expresión en las células foliculares.

Para los adenomas foliculares se han publicado datos con más variabilidad en la expresión de esta lectina. Hay autores como Inohara et al, Saggiorato et al y Kawachi et al que no encuentran inmunorreactividad para la galectina-3 en ninguno de los 39, 69 y 25 adenomas foliculares analizados respectivamente. Fernandez et al también encontraron que todos los adenomas eran negativos, pero solo analizaron 8 casos. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones señalan tinción positiva en algunos de los adenomas que incluyeron en el estudio^{118,119,120} con porcentajes que varían del 2% al 45%, llegando algunos autores hasta cifras del 71% (23/32 casos). Aquellos investigadores que publican de manera independiente los adenomas de células de Hürthle^{100,116,121,122} encontraron en general que estos presentaban porcentajes más elevados de tinción positiva para la proteína que el resto de los adenomas (entre el 7-83%), excepto Saggiorato et al que no encontró tinción en ninguno de los seis casos analizados.

En nuestro estudio analizamos 42 muestras histológicas de adenomas foliculares y 11 casos de adenomas de células de Hürthle. Nuestros resultados están en la línea de la mayoría de las publicaciones, ya que solo apreciamos galectina-3 en cuatro de los 42 adenomas (9%) y en dos de los 11 adenomas de células de Hürthle (18.8%). Queremos resaltar que todos los adenomas de nuestra serie que mostraron inmunorreactividad para la galectina-3 sólo presentaban tinción en menos del 10% de las células y que ésta era focal, localizada en la proximidad de la cápsula del nódulo, coincidiendo con lo señalado por otros autores^{100,114,118}.

El hallazgo de adenomas foliculares inmunorreactivos para la galectina-3 es un hecho actualmente aún poco entendido; pudiendo tratarse de verdaderos falsos positivos para la inmunohistoquímica, o bien representar lesiones que tengan un potencial biológico maligno en ausencia de signos morfológicos de crecimiento invasivo, pero con la evidencia molecular de transformación maligna. Por todo ello, varios autores han señalado como hipótesis la posibilidad de que la expresión de galectina-3 en algunos adenomas que muestran rasgos típicos de malignidad pueda indicar una incipiente transformación maligna y por tanto una potencial conversión a carcinomas, por lo que estas lesiones deberían ser susceptibles de un seguimiento clínico más estricto^{117, 118,119,120}.

Orlandi et al apreciaron en los adenomas que expresaron galectina-3 rasgos típicos de malignidad, como el incremento de la relación núcleo-citoplasma, hiper celularidad y un aumento de las mitosis, aunque no pudieron demostrar invasión de la cápsula ni de los vasos sanguíneos, por lo que fueron diagnosticados de adenomas. Posteriormente, otras publicaciones también refirieron cambios como penetración capsular mínima en los adenomas que muestran inmunorreactividad para la

galectina-3¹⁰⁶. Además, Weber et al observaron que en aquellas lesiones benignas que expresaban galectina-3 la tinción estaba restringida a las células foliculares que mostraban alguno de los rasgos citológicos típicos del carcinoma papilar, los cuales a causa de su poco desarrollo y distribución focal no fueron suficientes para dar lugar a un diagnóstico de carcinoma. Recientemente, Nucera et al publicaron que el porcentaje de adenomas foliculares con atipias nucleares que expresaban galectina-3 era mucho más alto que en aquellos que no las presentaban (83% versus 31%), siendo similares a las del carcinoma papilar. Por otro lado, Jarubiak-Wielganowicz et al no señalan ningún rasgo sugestivo de malignidad en los adenomas con expresión de galectina-3. En nuestro estudio, en ninguno de los cuatro casos de adenoma folicular ni de los dos casos de adenoma de células de Hürthle que fueron galectina-3 positivos se apreciaron signos de malignidad.

Estos datos sugieren que esta proteína podría estar relacionada con la activación de oncogenes implicados en la tumorigénesis tiroidea, contribuyendo activamente a la adquisición y mantenimiento de un fenotipo maligno. Este concepto está apoyado por la inmunolocalización de la galectina-3 a nivel perinuclear encontrada tanto en las neoplasias diferenciadas como en los adenomas con atipias, y que recientemente se describió en líneas celulares del carcinoma de mama humano¹²³. También se describe expresión de galectina-3 en las células foliculares que están en áreas focales de inflamación, tanto en células sin atipia citológica como en células de Hürthle.

La explicación más probable que dan algunos autores para esta expresión en células foliculares no neoplásicas en un área de inflamación es la neosíntesis bajo la influencia de citoquinas secretadas por las células inflamatorias o la simple permeabilidad de galectina-3 (secretada abundantemente por los linfocitos) hacia las células foliculares cercanas. Debido a los rasgos de benignidad que presentan estas células foliculares, la positividad de la lectina en lesiones inflamatorias no deberá de crear ningún problema diagnóstico. Prasad et al¹²⁴ han encontrado que en las tiroiditis de Hashimoto, aquellas células foliculares que presentan alteraciones nucleares semejantes a las de los carcinomas papilares expresaban galectina-3, pero no las células foliculares normales, siendo otro dato que también sugiere que esta lectina puede ser un marcador sensible y precoz de transformación maligna.

Como consecuencia de estas observaciones es importante señalar que el tipo de técnica utilizada en la detección de la galectina-3 tiene una crucial importancia, ya que la inmunohistoquímica, a diferencia de la RT-PCR nos informa de la localización de la tinción, puesto que nos permite ver específicamente que tipos celulares se tiñen. Esto es muy relevante cuando evaluamos las neoplasias tiroideas benignas ya que las células epiteliales se encuentran rodeadas por células del estroma tiroideo (fibroblastos, células endoteliales y células musculares lisas) que pueden expresar galectina-3, o bien estar dentro de un área con células inflamatorias como histiocitos o polimorfonucleares que también son reactivos para la lectina. Por tanto, si estamos utilizando una técnica que no nos permita distinguir los diferentes tipos celulares que muestran la tinción obtendríamos resultados falsos positivos.

1.3. - EXPRESIÓN EN CARCINOMAS PAPILARES

Los carcinomas papilares presentan habitualmente menos problemas diagnósticos que otros carcinomas tiroideos diferenciados ya que su distinción es relativamente sencilla atendiendo a sus rasgos nucleares típicos. El principal problema está en la identificación de la variante folicular del carcinoma papilar.

En nuestro estudio, las 30 muestras histológicas correspondientes a carcinomas papilares fueron todas positivas para la galectina-3. Estos datos coinciden con los publicados por otros autores, que refieren que todos¹²⁵o casi todos¹²⁶ los carcinomas papilares expresan galectina-3. Bartolazzi et al, en el mayor análisis realizado hasta la fecha con galectina-3 en tiroides humano estudiaron un total de 1009 lesiones tiroideas tanto en muestras histológicas (618) como en citológicas (165 bloques celulares y 226 en fresco) obtenidas preoperatoriamente por PAAF. Encontró que de los 201 carcinomas papilares, solamente seis fueron negativos y mostraron inmunotinción positiva 195 muestras (97%).

En contraste con estos resultados, De León-Mazariegos et al comunica porcentajes de tinción positiva para esta proteína solamente del 66%. Cvejic et al¹²⁵ analizaron la expresión de galectina-3 en 202 casos de carcinoma papilar, relacionándolo con el patrón de crecimiento histomorfológico (carcinoma papilar clásico, variante folicular de carcinoma papilar y variante folicular de carcinoma papilar con áreas de patrón de crecimiento sólido), con la invasión extratiroidea, el tamaño del tumor y la presencia de metástasis linfáticas. Señalan que la expresión de la galectina-3 está relacionada con el patrón de crecimiento, estando presente en el 98% de los carcinomas papilares clásicos, en el 85% de la variante

folicular del carcinoma papilar y solamente en el 50% de la variante folicular con áreas de crecimiento sólido. No encontraron relación con el tamaño del tumor, con la invasión extratiroidea ni con la presencia de metástasis ganglionares. Otros autores también señalan que en el subtipo variante folicular del carcinoma papilar, encuentran más casos negativos que en el resto de los carcinomas papilares y con una tinción más débil. En nuestro estudio no encontramos diferencias en la expresión de galectina-3 entre los diferentes subtipos de carcinoma papilar, presentando todos un comportamiento semejante.

Gaffney et al¹²⁶ en un trabajo realizado sobre tumores papilares, encontraron que los tumores trabeculares hialinizantes (considerados por sus rasgos morfológicos como una variante de carcinoma papilar), tenían un patrón de expresión de la galectina-3 intermedio entre los tumores tiroideos benignos y malignos, ya que aunque se tiñeron positivamente el 86% de ellos, esta tinción era claramente menos intensa que en los carcinomas papilares típicos. Otra rara variante de carcinoma papilar es la variante macrofolicular, de la que se han publicado poco más de 40 casos en la literatura. Debido a su patrón histológico, puede ser difícil diferenciarlos de lesiones benignas (bocios, adenomas macrofoliculares, enfermedad de Graves-Basedow o nódulos hiperplásicos). Lugli et al¹²⁷ realizaron un estudio con galectina-3 en tres casos de estos tumores y encontraron que eran reactivos para la proteína, sin apreciar diferencias con el resto de los carcinomas papilares. En nuestro estudio no encontramos ningún caso de tumor trabecular hialinizante ni de carcinoma papilar variante macrofolicular.

Una variante de carcinoma papilar que merece una especial atención es el carcinoma micropapilar, que presenta controversias concernientes tanto a

su comportamiento biológico como a su manejo clínico. Aunque la mayoría de los microcarcinomas permanecen clínicamente silentes y son detectados accidentalmente en las necropsias, otros pueden corresponder a un carcinoma papilar en fase inicial, por lo que se han intentado identificar marcadores que puedan predecir un comportamiento agresivo en esta variante de tumores papilares. Cvejic et al¹²⁸ publicaron en un reciente estudio la expresión de galectina-3 en este grupo de tumores. Analizaron la inmunorreactividad para la lectina en 63 casos de pacientes que habían sido intervenidos de tiroidectomía por enfermedades benignas y cuyo estudio histopatológico mostró la presencia de un carcinoma micropapilar. Los tumores tenían un tamaño entre 2 y 10 mm y fueron multifocales en 24 casos. Fueron inmunorreactivos para la galectina el 80% de ellos (51 de 63). Señalan como un dato significativo que de los 12 casos negativos, 10 no tenían proyecciones papilares, siendo positivos prácticamente la totalidad de los que presentaban una arquitectura papilar. También sugieren que la expresión de galectina-3 en los microcarcinomas no está relacionada con la aparición de metástasis linfáticas, ya que aunque los tres casos que tenían metástasis eran galectina-3 positivos, los restantes 48 casos positivos no tenían afectación ganglionar. Ellos concluyen que la positividad para la lectina no parece estar relacionada con el crecimiento tumoral o la agresividad de los microcarcinomas papilares pero que refleja la inestabilidad del genoma de las células tiroideas con transformación maligna. En nuestro estudio no presentamos ningún caso de carcinoma micropapilar.

Como dato interesante mencionar que Inohara et al señalan un caso donde en la misma pieza quirúrgica se presentaba simultáneamente un adenoma

benigno y un carcinoma papilar. Sólo el carcinoma fué positivo para galectina-3, mientras que el adenoma no presentó tinción. En otro caso del mismo autor, con el diagnóstico en el mismo individuo de un carcinoma papilar y un carcinoma folicular ambos fueron positivos.

En términos generales podemos decir que casi la totalidad de las publicaciones revisadas están de acuerdo en que los carcinomas papilares muestran una intensa y constante expresión de galectina-3, encontrándose nuestros datos en concordancia con lo referido en la literatura.

1.4. - EXPRESIÓN EN CARCINOMAS FOLICULARES

Los carcinomas foliculares, como hemos señalado previamente, se diferencian de los adenomas por la existencia de invasión vascular y capsular. Según la extensión de esta afectación capsular se clasifican en carcinomas foliculares mínimamente invasivos (CFMI) que suponen aproximadamente el 50% del total y en carcinomas foliculares extensamente invasivos. Los CFMI aunque presentan de manera inequívoca infiltración de los vasos sanguíneos y/o invaden el espesor completo de la cápsula, son tumores groseramente encapsulados que muestran rasgos citológicos que se solapan con los adenomas foliculares, lo que hace que el diagnóstico diferencial sea en ocasiones difícil en muestras histopatológicas e imposible en muestras citológicas¹²⁹. En estos casos disponer de marcadores moleculares expresados de forma diferente en las lesiones benignas y malignas sería de una importancia capital, pues nos permitiría hacer un diagnóstico más seguro.

Sin embargo, no todos los autores están de acuerdo en que la galectina-3 sea un marcador fiable de malignidad en los carcinomas foliculares, ya que encuentran que su expresión no es tan constante como en los carcinomas papilares.

En nuestro trabajo de investigación estudiamos en muestras histológicas 12 casos de carcinoma folicular extensamente invasivo y 14 de CFMI. Todos los carcinomas foliculares extensamente invasivos mostraron tinción positiva para la galectina-3 y 12 de los 14 CFMI mostraron reacción positiva, siendo dos negativos. Por tanto, la positividad del total de los carcinomas foliculares de nuestro estudio fue del 92.4%.

Cuando comparamos nuestros datos con los publicados en la literatura, observamos que la galectina-3 en los carcinomas foliculares está inconstantemente expresada en los resultados obtenidos por los diferentes autores. Algunos como Gasbarri et al , Xu et al e Inohara et al encontraron positividad en el total de los 14, 7 y 8 casos respectivamente, mientras que otros como Fernandez et al, Weber et al y Cvejic et al sólo apreciaron tinción para la galectina-3 en 4/8, 4/9 y en 11/15 muestras respectivamente. Bartolazzi et al estudiaron un total de 70 carcinomas foliculares que incluían los subtipos ampliamente invasivo, y las variantes oncocítica o de células de Hürthle y el CFMI. Encontraron que 67 fueron inmunorreactivos para la galectina-3, lo que representa el 95% del total.

Saggiorato et al analizaron 17 CFMI tanto en muestras histológicas como en bloques celulares citológicos, encontrando tinción positiva para la

galectina en todas las muestras quirúrgicas. Además apreciaron diferentes patrones de expresión de la lectina para cada subtipo folicular histológico, comunicando un alto nivel de tinción para los carcinomas de células de Hürthle, un nivel medio para los bien diferenciados y un nivel de expresión bajo para el subtipo trabecular. Orlandi et al también consideran que los carcinomas foliculares pobremente diferenciados expresan galectina-3 menos intensamente o no la expresan cuando los comparamos con neoplasias bien diferenciadas. Ito et al¹³⁰ en un reciente estudio realizado en 260 tumores foliculares con diferentes grados de invasión vascular y capsular encontraron que el nivel de expresión de galectina-3 se incrementa significativamente cuando aumenta el grado de invasión capsular o vascular del tumor. Sin embargo, obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad tan solo del 68% y 57% respectivamente. Según estos autores, estos datos sugieren que la galectina-3 está implicada en la transformación maligna de los adenomas a carcinomas, (aunque se desconoce cómo esta molécula contribuye a la malignización), si bien parece que no todos los casos requieren la galectina-3 para esta transformación maligna. Otras publicaciones señalan también menos porcentajes de expresión de galectina-3 en los CFMI comparado con los carcinomas foliculares extensamente invasivos’.

De los 14 casos de CFMI de nuestro estudio, 12 fueron inmunorreactivos para la galectina-3, lo que representa el 85.7%. De ellos siete mostraban tinción difusa en más del 50% de las células, tres entre el 11-49%, y solamente dos en menos del 10%. Nuestros resultados son semejantes a los de Saggiorato et al, pero difieren de los que encuentran menos expresión de galectina-3 en estas neoplasias”.

La falta de expresión de galectina-3 de algunos de los carcinomas foliculares podría explicarse por el patrón de tinción que presenta este tipo histológico, que aunque es predominantemente difuso, en muchas ocasiones puede ser focal, dando lugar a situaciones en que las muestras analizadas correspondan a áreas negativas para la galectina, dando un resultado falso-negativo. Por ello, algunos autores recomiendan que el estudio de la expresión de galectina-3 en muestras histológicas de carcinomas foliculares se realice en secciones seriadas, lo que ayudaría a determinar si las muestras que son negativas corresponden realmente a carcinomas que expresan la lectina en otras áreas. Un ejemplo clínico de esta utilidad es el caso publicado por Rosahl et al¹³¹ de una paciente de 50 años, intervenida de una tiroidectomía subtotal con diagnóstico histológico de adenoma folicular. Seis meses después de la cirugía presentó una tumoración en la base del cráneo, en cuyo estudio se demostró una tinción positiva para la galectina-3. El diagnóstico definitivo después del estudio histopatológico de la metástasis fue de carcinoma folicular tiroideo.

Todos estos datos sugieren que la galectina-3 puede ser una herramienta muy útil en el estudio de las lesiones foliculares, especialmente cuando la evaluación morfológica completa de los vasos y de la cápsula tumoral no ofrece signos bien definidos de malignidad, lo que implica dificultades en el diagnóstico diferencial entre un adenoma folicular y un CFMI.

1.5.- EXPRESIÓN EN CARCINOMAS DE CÉLULAS DE HÜRTHLE

Los carcinomas de células de Hürthle (células oxifílicas, oncocíticas o de Askanazy) son tumores de origen folicular caracterizados por la presencia en más del 75% del área del tumor de una población celular con rasgos característicos, esencialmente un citoplasma granular rico en mitocondrias. Se ha señalado una mayor tasa de recidivas en estos tumores (debido probablemente a su mayor tasa de multicentricidad) y mayor incidencia de metástasis ganglionares y pulmonares. Este mismo patrón de células de Hürthle puede ser encontrado además en lesiones benignas como el adenoma de células de Hürthle, la tiroiditis de Hashimoto y los bocios adenomatosos con presencia de células de Hürthle, lo que hace que el diagnóstico sea en ocasiones difícil de realizar¹³². Hay autores como Niedziela et al que consideran que las células de Hürthle pueden ser el blanco de la expresión de galectina-3 incluso en patología benigna como las lesiones inflamatorias no neoplásicas de etiología autoinmune.

En nuestro estudio, hemos analizado la expresión de galectina-3 en siete casos de carcinomas de células de Hürthle, encontrando positividad para la proteína en todos ellos (100%). Cuando revisamos la literatura, encontramos menos referencias sobre este tipo de tumor tiroideo, casi todas con series mayores que la nuestra. Volante et al presentan la serie más amplia que hemos encontrado con 152 casos de neoplasias de células de Hürthle (50 adenomas, 70 carcinomas y 32 casos de variante oncocítica de carcinoma papilar), encontrando que la sensibilidad para detectar carcinomas es del 95% (5 casos negativos de 102 muestras analizadas) y la especificidad del 88 % (44 casos negativos de 50 adenomas). En contraste, Nascimento et al publican una serie con 17 carcinomas y 14 adenomas de células de Hürthle, señalando que encontraron positividad para la galectina-3 únicamente en 10/17 carcinomas (59%) mientras que solamente uno de los 14 adenomas mostró inmunorreactividad para la lectina. Nuestros

resultados con el 100% de los carcinomas de células de Hürthle expresando galectina-3 coinciden con los de Volante et al¹⁰⁴ y otros autores”.

Con respecto a la intensidad de la tinción, hay estudios que señalan que los carcinomas de células de Hürthle muestran una tinción más fuerte que el resto de los carcinomas foliculares. Nosotros no hemos encontrado diferencias en la intensidad de la tinción entre estos carcinomas.

1.6.- EXPRESIÓN EN METÁSTASIS GANGLIONARES DE CARCINOMAS TIROIDEOS DIFERENCIADOS

Nosotros no estudiamos la expresión de galectina-3 en metástasis de carcinomas tiroideos, pero algunos autores¹⁰⁵ realizaron estudios sobre adenopatías metastásicas fundamentalmente de carcinomas papilares. La primera mención a la expresión en metástasis de esta lectina la realizaron Xu et al que señalaron un caso de metástasis ganglionar de un carcinoma papilar que presentaba tinción positiva para la galectina-3. Posteriormente Kawachi et al publicaron el primer trabajo específico sobre la expresión de galectina-3 en metástasis ganglionares de carcinomas tiroideos. Analizaron 47 muestras de ganglios linfáticos metastásicos de carcinoma papilar. Todas las metástasis se tiñeron positivamente para la proteína, pero llamó la atención que la tinción era menos intensa en la metástasis que en el tumor primario. Además, cuando comparaban la intensidad de la tinción de las lesiones primarias que tenían metástasis con aquellas que no las tenían, encontraron una tinción significativamente más alta en las neoplasias que tenían metástasis linfáticas. Posteriormente, Cvejic et al en un estudio en el que analizaron la expresión de galectina-3 en carcinomas papilares con y sin metástasis linfáticas señalan que no encontraron diferencias en la

intensidad de la tinción entre ellos. Fernández et al comunican dos casos de metástasis ganglionar de carcinoma papilar que fueron inmunorreactivos para la galectina-3, pero no disponían del tumor primario para su valoración.

Otras publicaciones señalan en algunos tumores de la economía una expresión de galectina-3 significativamente más elevada en estadios avanzados, como en el carcinoma colorrectal estadio D de Dukes respecto a otros estadios más precoces, y en los astrocitomas de alto grado en comparación con los de bajo grado¹³³.

Estos resultados sugieren que la galectina-3 juega algún papel relacionado con la transformación maligna de células tumorales y su progresión hacia metástasis, en algunos tipos de células y tejidos, aunque esto aún no ha sido establecido totalmente en los tumores tiroideos. Takenaka et al¹³⁴ en un estudio realizado sobre líneas celulares fetales de estirpe folicular tiroidea, señalan que la sobreexpresión de galectina-3 confiere un fenotipo maligno en estas células, y que probablemente juegue un importante papel en la transformación maligna de las células foliculares tiroideas. El mecanismo por el cual esta proteína transforma las células foliculares tiroideas permanece aún desconocido, aunque podría ser debido a la acción antiapoptótica de la molécula. También parece probable que la galectina-3 ayude a la formación y a la supervivencia de embolismos tumorales en la circulación que conducen a la patogénesis de las metástasis.

Es bien conocido que los carcinomas papilares metastatizan preferentemente en los ganglios linfáticos, siendo clínicamente evidentes entre el 30-60% de los casos, mientras que los pacientes con un carcinoma folicular en una proporción entre el 5-33% presentan metástasis a distancia,

fundamentalmente en hueso y pulmón. Estas diferencias sugieren la presencia de diferentes mecanismos en la producción de las metástasis, por lo que en el futuro serán necesarios más estudios que nos permitirán avanzar en el conocimiento de la progresión tumoral de los carcinomas tiroideos.

1.7.- EXPRESIÓN EN CARCINOMAS ANAPLÁSICOS

Los carcinomas anaplásicos, aunque indiferenciados, derivan como el carcinoma folicular y papilar del epitelio folicular tiroideo, por lo que expresan igualmente galectina-3. Son neoplasias menos frecuentes que los carcinomas diferenciados y en nuestro estudio hemos dispuesto de menos muestras.

Analizamos la expresión de la galectina-3 en seis casos de carcinoma anaplásico, mostrando todos ellos tinción positiva. Estos resultados coinciden con los de la mayoría de las publicaciones que encuentran positividad en todos o casi todos los carcinomas anaplásicos^{10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100}. Aunque algunas de estas publicaciones señalan que los carcinomas anaplásicos expresan una intensidad de tinción más débil que los carcinomas tiroideos diferenciados, nosotros observamos solamente un caso con tinción débil, presentando los cinco restantes tinción moderada o fuerte.

1.8.- EXPRESIÓN EN CARCINOMAS MEDULARES

En lo que respecta a los carcinomas medulares, originados en las células C del tiroides, se han descrito diferentes niveles de expresión para la

galectina-3, aunque la mayoría de los autores presentan pocos casos. Cvejic et al¹³⁵ en un trabajo del año 2000 estudiaron 20 casos de carcinoma medular esporádico, y encontraron que 16 tumores presentaban tinción positiva que variaba de débil a moderada en la mayoría y en sólo dos casos se apreció tinción fuerte. Además, cuando la expresión de la proteína fue analizada en relación al estadio tumoral se observó que los estadios más avanzados, (con metástasis linfáticas) mostraban frecuentemente una tinción más intensa que aquellos sin metástasis. Posteriormente, Faggiano et al¹³⁶ estudiaron la expresión de la galectina-3 en 34 muestras de pacientes que procedían de familias con carcinoma medular y que habían sido intervenidos de una tiroidectomía profiláctica bien por una mutación del gen *RET* y/o por niveles incrementados de calcitonina en el plasma (25 carcinomas medulares y 9 casos de hiperplasia de células C). Apreciaron tinción positiva en casi todos los carcinomas medulares (23/25) y en ningún caso de hiperplasia de células C. Interpretan estos resultados como una progresión de la hiperplasia de células C (negativas para la proteína) a lesiones malignas con una expresión progresivamente incrementada de galectina-3. Esta hipótesis es consistente con los resultados de Cvejic et al que encuentra expresión más intensa en los estadios tumorales más avanzados.

Nosotros no hemos encontrado inmunorreactividad para la galectina-3 en ninguno de los seis carcinomas medulares estudiados, coincidiendo con otras publicaciones que tampoco señalan positividad en este tipo de tumor o solo la refieren en un pequeño porcentaje de casos". Esta ausencia de expresión de la galectina-3 podría explicarse según algunos autores por el

diferente origen de las células de las que deriva el carcinoma medular (cresta neural), aunque ello no está claramente establecido a tenor de los resultados obtenidos por los diferentes autores. Otras posibilidades para estas discrepancias en los resultados de la expresión de la galectina-3 en carcinomas medulares podrían ser debidos a problemas en la realización de la técnica o que se trate de verdaderos “falsos negativos”.

2.- EXPRESIÓN EN MUESTRAS CITOLÓGICAS OBTENIDAS MEDIANTE PAAF

A pesar de que el estudio citológico es fundamental en el diagnóstico preoperatorio de los nódulos tiroideos, en nuestra búsqueda bibliográfica hemos encontrado menos trabajos de investigación enfocados al estudio de la galectina-3 en muestras obtenidas mediante PAAF que sobre muestras histológicas. El primer estudio del que tenemos referencia en PAAF lo realizaron Orlandi et al en 1998, y en una revisión hasta la actualidad sólo hemos encontrado otras diez publicaciones sobre estudios inmunohistoquímicos en material obtenido de punción, siendo este uno de los motivos que impulsaron la realización de este trabajo.

En nuestro estudio analizamos prospectivamente la expresión de galectina-3 en 92 muestras de material citológico procedente de PAAF de nódulos tiroideos.

2.1.- EXPRESIÓN EN TEJIDO TIROIDEO NORMAL

Se realizó inmunotinción en 10 muestras de tejido tiroideo normal, sin que ninguna de ellas presentara positividad para la galectina. Coincidimos en los resultados con los de Orlandi et al, único autor que publicó datos sobre la expresión de esta proteína en citología de tejido tiroideo normal, ya que tampoco encontró ningún caso positivo.

2.2.- EXPRESIÓN EN LESIONES BENIGNAS

En las citologías correspondientes a los tres casos cuyo diagnóstico anatomopatológico definitivo fue de Enfermedad de Graves-Basedow no se observó tinción positiva para la galectina-3. No encontramos datos referentes a esta patología en los artículos publicados hasta la fecha.

De los 21 casos de hiperplasia nodular estudiados, solamente fue positiva una muestra (4% del total), con menos del 10% de las células teñidas. También en el caso de las tiroiditis de Hashimoto, sólo encontramos tinción positiva en una de las seis lesiones estudiadas. Bartolazzi et al presentan la serie más amplia de lesiones benignas no neoplásicas con 189 casos de hiperplasias nodulares y tiroiditis sin encontrar inmunoreactividad para la galectina-3 en ninguna muestra. Otros autores, con menos casos estudiados tampoco encuentran positividad en estas lesiones, o refieren como nosotros un resultado positivo débil en casos aislados”.

En lo que respecta a los adenomas foliculares, analizamos la expresión de galectina-3 en 20 muestras, y observamos tinción positiva en tres casos (15% del total de adenomas). En todos ellos la tinción solamente se observó en menos del 10% del tejido. Resultados semejantes son señalados por otros autores, que encuentran cifras de positividad del 0% al 21% en los adenomas estudiados”¹³⁷. Todas las publicaciones referidas a citologías procedentes de PAAF han estudiado casos de adenoma folicular, pero sólo dos autores mencionan como una entidad independiente los adenomas de células de Hürthle. Bartolazzi et al en 15 de estas lesiones, solamente encontraron dos positivas, y de 70 adenomas foliculares cinco reactivos para la lectina (8%). Saggiorato et al señalan positividad en tres

casos de nueve adenomas de células de Hürthle, todos ellos con atipias celulares, y solamente dos eran positivos (ambos con atipias celulares) de 43 adenomas foliculares. Collet et al¹³⁸ realizaron un estudio en 135 muestras citológicas obtenidas mediante PAAF señalando que el 94% de las lesiones benignas fueron negativas para galectina-3. No especifican que tipo de lesiones fueron analizadas, solo mencionan dos casos con diagnóstico por PAAF de “indeterminado grado de malignidad” que correspondieron en el estudio histológico a un adenoma folicular y un adenoma de células de Hürthle y que fueron positivas para la galectina-3.

2.3.- EXPRESIÓN EN CARCINOMAS

2.3.1- Carcinoma papilar

El diagnóstico histopatológico definitivo de carcinoma papilar después de la resección quirúrgica se realizó en 17 de los nódulos tiroideos que fueron estudiados mediante PAAF. El estudio inmunohistoquímico con galectina-3 de estas muestras citológicas reveló tinción positiva en todos los casos (100%), la mayoría con tinción en más del 50% de las células.

Cuando comparamos nuestros resultados con otras publicaciones, observamos que la mayoría de los autores señalan cifras idénticas a las nuestras, con el 100% de casos positivos¹³⁸ (incluyendo seis carcinomas papilares variante folicular publicados por Saggioratto et al), o porcentajes ligeramente menores, pero siempre superiores al 90%¹³⁸. Sólo Mills et al obtuvieron porcentajes sensiblemente inferiores (50%), para los cuatro casos de carcinoma papilar que analizaron en muestras procedentes de PAAF.

Pisani et al¹³⁹ publican un caso de carcinoma papilar tiroideo oculto en una paciente de 36 años que presentaba dos nódulos de 0.2 y 0.6 cm en un lóbulo tiroideo, con citología morfológicamente dudosa, pero con expresión positiva de galectina-3 en la extensión citológica obtenida mediante PAAF. Tras la tiroidectomía se confirmó la presencia de dos carcinomas papilares subcentimétricos dentro del lóbulo tiroideo, apoyando estos resultados la utilidad del análisis de la galectina-3 en la PAAF.

Al igual que en las muestras histológicas, parece confirmarse que la mayoría de los carcinomas papilares expresan galectina-3, y que ésta puede detectarse en muestras citológicas obtenidas por PAAF.

2.3.2.- Carcinoma folicular

Estudiamos mediante PAAF 11 casos diagnosticados definitivamente de carcinomas foliculares, 10 de los cuales presentaron tinción positiva para la galectina-3 (90.9%).

Los resultados comunicados por otros autores para la expresión de la galectina-3 en muestras citológicas de carcinomas foliculares coinciden en la mayoría de los casos con los obtenidos en nuestro trabajo, con cifras que oscilan entre el 82 y el 100%¹⁰⁰. Mills et al sólo obtienen cifras del 50% de positividad, y Collet et al señalan un solo caso positivo de tres carcinomas foliculares analizados. La mayoría de los trabajos presentan pocos casos de carcinomas foliculares estudiados en PAAF, excepto Bartolazzi et al y Saggioratto et al que analizaron 24 y 39 casos respectivamente.

Bartolazzi et al, incluso en los CFMI, que como señalamos previamente presentan una de las mayores dificultades diagnósticas, encontraron positividad para la galectina-3 en el 100% de las seis muestras citológicas analizadas. Saggioratto et al publican 22 CFMI con positividad de la galectina-3 en 20 casos. Nosotros no encontramos ningún caso de carcinoma folicular mínimamente invasivo en muestras citológicas.

Los casos negativos en las muestras citológicas de carcinomas foliculares, podrían explicarse, al igual que en las muestras histológicas, por la

expresión focal que en ocasiones presentan este tipo de neoplasias. Aunque la técnica de PAAF se presupone que aspira material de todo el nódulo, la limitada cantidad de células o fragmentos de tejido disponible para el examen citológico no puede ser representativo de la lesión entera. Por ello, el número de células epiteliales incluidas en la muestra citológica es importante en la evaluación inmunohistoquímica de la galectina-3 en este tipo de tumores. Por tanto, un resultado negativo para la expresión de galectina-3 en la PAAF en el caso de los carcinomas foliculares no debe ser considerado un resultado negativo por definición”¹⁴⁰.

2.3.3.- Carcinoma anaplásico

Solamente disponíamos de cuatro casos de carcinoma anaplásico en muestras citológicas y todos ellos expresaron galectina-3. Al revisar la literatura encontramos pocos autores que hayan incluido en su estudio de PAAF carcinomas anaplásicos y en un número muy reducido (uno y tres casos), resultando todos positivos para la proteína.

En este trabajo de investigación no analizamos en PAAF ningún carcinoma medular ni ningún carcinoma de células de Hürthle

2.4.- EXPRESIÓN EN LESIONES DIAGNOSTICADAS EN PAAF COMO “SOSPECHOSAS DE MALIGNIDAD”

En el estudio citológico preoperatorio convencional hay ocasiones en las que obtenemos un diagnóstico de “punción sospechosa de malignidad” o de “indeterminado grado de malignidad” existiendo en la práctica clínica diaria en estos casos una clara necesidad de identificar correctamente estas lesiones.

En nuestro estudio encontramos 8 casos con diagnóstico de PAAF “sospechosa de malignidad”, siendo la expresión de galectina-3 en estas citologías negativa en 2 muestras y positiva en 6. El diagnóstico histopatológico definitivo fue en los 2 casos negativos para la galectina-3 de adenoma folicular, mientras que los otros 6 pacientes que presentaron tinción positiva para la galectina-3 correspondieron en el diagnóstico histológico a carcinomas (3 carcinomas foliculares y 3 carcinomas papilares). En nuestra serie, la expresión de galectina-3 en las muestras citológicas sospechosas de malignidad se correlacionó de manera adecuada en todos los casos, ya que ninguna de las lesiones benignas expresó galectina-3 y sí lo hicieron todos los carcinomas.

Collet et al publicaron recientemente un trabajo sobre la expresión de galectina-3 en 34 lesiones con diagnóstico de “indeterminado grado de malignidad”. En el diagnóstico histológico 22 casos eran benignos y 12 casos malignos. Mostraron positividad para la galectina-3 once muestras; nueve malignas y dos benignas (un adenoma folicular y un adenoma de células de Hürthle). Además, tres casos de carcinoma fueron negativos. Gasbarri et al señala que de las 14 muestras de PAAF “sospechosa de malignidad” que analizaron once eran histológicamente benignas y tres eran carcinomas foliculares. Todas las lesiones benignas fueron en el estudio citológico galectina-3 negativas, y los tres carcinomas galectina-3

positivos, obteniendo como nosotros una correlación en el 100% de los casos entre y malignidad y expresión positiva de galectina-3.

Estos resultados nos hacen pensar, coincidiendo con otros autores, que aquellos pacientes con citologías en las que se aprecian células foliculares morfológicamente dudosas (citología “sospechosa de malignidad”) podrían ser programados para cirugía con más seguridad cuando se detecta la presencia de células foliculares positivas para la galectina-3. No obstante, cuando la sospecha clínica es refrendada por el estudio citológico, las lesiones deberán ser remitidas al cirujano aunque sean galectina-3 negativas. Sin embargo, en aquellos casos en los que no hay acuerdo, creemos que exámenes clínicos repetidos, junto a una citología convencional mediante PAAF y la evaluación de la galectina-3 podrán decidir mejor la actitud terapéutica a seguir.

3.- PERSPECTIVAS FUTURAS

De los datos obtenidos en nuestro estudio y de las observaciones señaladas por otros autores, podemos deducir que la galectina-3 es altamente sensible y específica en la diferenciación de lesiones benignas y malignas de la glándula tiroides. No obstante, no es un marcador infalible, pues existen algunos casos con limitaciones en el diagnóstico, por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas y marcadores que incrementen la exactitud diagnóstica.

No hemos encontrado en nuestra búsqueda bibliográfica ningún otro marcador que presente mejores, ni incluso iguales resultados, a los obtenidos con la galectina-3. En las publicaciones más recientes se ha sugerido la utilización de una combinación de marcadores que nos permita principalmente evitar los resultados falsos negativos y por tanto aumentar la eficacia fundamentalmente en el diagnóstico prequirúrgico de los nódulos tiroideos. Varios marcadores han sido utilizados asociados a la galectina-3 con este propósito, tanto en muestras histológicas como en citología procedente de PAAF, destacando la fibronectina-1, citoqueratina-19 y el HBME-1”.

Volante et al estudiaron la expresión de galectina-3 y HBME-1 en 152 muestras histológicas de tumores de células oncocíticas y señalan que la sensibilidad de la galectina en el diagnóstico de estos tumores es del 95.1%, incrementándose hasta el 99% con la combinación de galectina-3 y HBME-1. Un dato que llama la atención es la baja sensibilidad del HBME-1 utilizado de forma aislada (52.9%), que no obstante fué capaz de reconocer tres de los cuatro carcinomas galectina-3 negativos. Este hecho

según los autores podría sugerir la presencia de un fenotipo alternativo en la tumorigénesis de un pequeño grupo de estos tumores. La existencia de dos vías patogénicas alternativas y no solapadas en el origen tumoral de los carcinomas foliculares ya había sido postulado previamente por otros autores¹⁴¹, que observaron la presencia de la traslocación PAX8-PPARgamma más frecuentemente asociada al inmunofenotipo “galectina-3 positivo / HBME-1 negativo”, y la presencia de mutación *RAS* asociada al inmunofenotipo “galectina-3 negativo / HBME-1 positivo”. Posteriormente Prasad et al encontraron positividad en el 100% de los carcinomas derivados de células foliculares tiroideas en muestras histológicas (incluía carcinoma papilar, carcinoma folicular, carcinoma oncocítico y carcinoma anaplásico) utilizando un panel de marcadores compuesto por galectina-3, HBME-1 y fibronectina-1.

Entre los trabajos publicados sólo hemos encontrado uno en muestras de PAAF, realizado por Rossi et al, utilizando una combinación de marcadores que incluyen galectina-3, HBME-1 y RET, y consideran que la utilización de este panel de marcadores mejora la exactitud diagnóstica de la citología convencional. Estos datos parecen indicar que en el diagnóstico de los tumores foliculares un conjunto de marcadores, incluyendo al menos galectina-3 y HBME-1, incrementaría probablemente la sensibilidad de la técnica inmunohistoquímica hasta casi el 100%, obteniendo mayor garantía de un diagnóstico correcto especialmente en casos de difícil interpretación.

Consideramos que el estudio de la galectina-3 puede contribuir en el futuro a mejorar la exactitud diagnóstica de la citología convencional, así como a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en oncología humana. Sería interesante evaluar también el potencial diagnóstico de las concentraciones

de galectina-3 en el suero como un indicador específico de cáncer de tiroides.

Opinamos que son necesarios nuevos estudios para definir el papel exacto de la galectina-3 en la transformación maligna de las células tiroideas, y su expresión en las neoplasias malignas de la glándula tiroides, usando métodos tanto inmunohistoquímicos como de biología molecular (*microarrays* de expresión, *microarrays* CGH...). Sería también deseable diseñar estudios y ensayos clínicos prospectivos para poder aplicar y evaluar estos métodos en series clínicas.

VII.-CONCLUSIONES

1. La técnica inmunohistoquímica para la detección de la galectina-3 en lesiones tiroideas es sencilla, fiable y de fácil aplicación tanto en muestras histológicas como en muestras citológicas obtenidas mediante PAAF.
2. En las muestras histológicas tiroideas, los carcinomas derivados del epitelio folicular expresaron galectina-3 en el 97% de los casos, mientras que solamente la expresaron el 8.4% de las lesiones benignas.
3. En las muestras citológicas, la expresión de galectina-3 en los carcinomas derivados del epitelio folicular fue del 96.8%, encontrándose expresión en las lesiones benignas solamente en el 10% de los casos.
4. La sensibilidad de la galectina-3 en el diagnóstico histológico de los carcinomas diferenciados de tiroides es del 97%, y su especificidad del 94%.
5. La sensibilidad de la galectina-3 en el diagnóstico citológico preoperatorio de lesiones tiroideas malignas es del 96.8% y su especificidad del 91.7%.

6. La sensibilidad de la citología convencional en la distinción preoperatoria entre lesiones benignas y malignas obtenida en nuestro estudio es del 88% (96.8% con galectina-3), y la especificidad del 72% (91.7% con galectina-3), por lo que el análisis de la expresión de galectina-3 en muestras citológicas de lesiones tiroideas obtenidas mediante PAAF puede ser útil en el diagnóstico preoperatorio de los nódulos tiroideos.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado Thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000; 160:526-534.
 - ² Jensen MH, Davis RK, Derrick L. Thyroid cancer: a computer-assisted review of 5287 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102: 51-65.
 - ³ Lucas Martin AM, Alonso Pedrol N, Sanmartí Sala. Enfermedad nodular tiroidea. Diagnóstico y tratamiento. *Med Clin (Barc)* 2000; 114:181-184.
 - ⁴ Mazzaferri EL. Thyroid cancer in thyroid nodules: finding a needle in the haystack. *Am J Med* 1992; 93: 359-362.
 - ⁵ Nunez C, Mendelsohn G. Fine-needle aspiration and needle biopsy of the thyroid gland. *Pathol Annu* 1989; 24:161-198.
 - ⁶ Amrikachi M, Ramzy I, Rubinfeld S, Wheeler TM. Accuracy of fine-needle aspiration of thyroid. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125: 484-488.
 - ⁷ Vander JB, Gaston EA, Dawber TR. The significance of nontoxic thyroid nodules: final report of a 15 year study of the incidence of thyroid malignancy. *Ann Intern Med* 1968;68:537.
 - ⁸ Franschi S, Levi F, Negri E, Fassina A, La Vecchia C. Diet in thyroid cancer: a pooled analysis of four European case control studies. *Int J Cancer* 1991; 48: 395-398.
 - ⁹ Langsteger W, Ksltringen P, Wolf G, Dominik K. The impact of geographical, clinical, dietary and radiation-induced features in epidemiology of thyroid cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1547-1553.
 - ¹⁰ Duffy BJ, Fitzgerald P. Cancer of the thyroid in children. A report of twenty eighth cases. *J Clin Endocrinol* 1950; 10: 1296-1298.
 - ¹¹ Furmanchuk AW, Averkin JI, Egloff B, Ruckti C, Abelin T, Schappi W, Korotkevich FA. Pathomorphological findings in thyroid cancers of children from the Republic of Belarus: a study of 86 cases occurring between 1986 (post-Chernobyl) and 1991. *Histopathol* 1992; 21: 401-408.
 - ¹² Nikiforov Y, Gnepp DR. Pediatric thyroid cancer after the Chernobyl disaster. *Cancer* 1994; 74: 748-766.
 - ¹³ Baverstock KF. Thyroid cancer after Chernobyl (letter). *Nature* 1992; 359: 21-22.
 - ¹⁴ Willians ED. Fallout from Chernobyl: Thyroid cancer in children increased dramatically in Belarus (letter; comment). *B M J* 1994; 309: 1298-1300.
 - ¹⁵ Favid NR, Zou M, Shi Y. Genetics of follicular thyroid cancer. *Endocrinol Clin North Am* 1995; 24: 865-883.
 - ¹⁶ Karayan L, Hadjadj S, Larsen CJ, Marechaud R, Kraimps JL. Actualités sur les carcinomes thyroïdiens différenciés. *Bull Cancer* 2002; 89: 113-123.
 - ¹⁷ Zon M, Shi Y, Favid NR. Frequent inactivation of the retinoblastoma gene in human thyroid carcinoma. *Endocrine J* 1994; 2: 193-196.
 - ¹⁸ Fagin JA, Matsno K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutation of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1993; 91: 179-184.
 - ¹⁹ Herrero A. Tumores de tiroides. En Fariña J. (ed.). Barcelona: Salvat Editores 1990; 1001-1014.
 - ²⁰ Hedinger C, Willians ED, Sobin LH. Histological Typing of Thyroid Tumours. International Histological Classification of Tumours. World Health Organization. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1988.
 - ²¹ Hedinger C, Willians ED, Sobin LH. The WHO histological classification of thyroid tumors: a commentary on the second edition. *Cancer* 1989;63: 908-911.

- ²² Livolsi VA, Bennington JL. Surgical Pathology of the thyroid. Philadelphia: WB. Saunders company 1990.
- ²³ Rosai J, Caracangui M, DeLellis RA. Tumors of the thyroid gland. In: Rosai J, Sobin LH, eds. Atlas of tumor pathology, third series, fascicle 5. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1992, pp 49-62.
- ²⁴ Hedinger CE: Problems in the classification of thyroid tumors: their significance for prognosis and therapy. Schweiz Med Wochenschr 1993; 123: 1673-1681.
- ²⁵ Welker M, Orlov D. Thyroid nodules. Am Fam Physician 2003; 67:559-566.
- ²⁶ Mazzaferri EL, Young RL, Oertel JE, Kemmerer WT, Page CP. Papillary thyroid carcinoma: the impact of the therapy in 576 patients. Medicine 1997; 56: 171-196.
- ²⁷ Noguchi M, Kinami S, Kinoshita K, Kitagawa H, Thomas M, Miyazaki I, Michigishi T, Mizukami Y. Risk of bilateral cervical lymph node metastases in papillary thyroid cancer. J Surg Oncol 1993; 52: 155-159.
- ²⁸ Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. Am J Med 1994; 97: 418-428.
- ²⁹ Mizukami Y, Michigishi T, Nomomura A, Hashimoto T, Terehata S, Noguchi M, Hisada K, Matsubara F. Distant metastases in differentiated thyroid carcinomas : a clinical and pathological study. Hum Pathol 1990; 21: 283-290.
- ³⁰ Martin HE, Ellis EB. Biopsy made by needle puncture and aspiration. Ann Surg 1930; 92:169.
- ³¹ Boyd LA, Earnhardt RC, Dunn JT, Frierson HF, Hanks JB. Preoperative evaluation and predictive value of fine needle aspiration and frozen section thyroid nodules. J Am Coll Surg 1998; 187: 494-502.
- ³² Schmidt T, Riggs MW, Speights VO. Significance of non-diagnostic fine needle aspiration of the thyroid. South Med J 1997; 90:1183-1186.
- ³³ La Rosa GL, Belfiore A, Giuffrida D, Sicurella C, Ippolito O, Russo G, Vigneri R. Evaluation of the fine needle aspiration biopsy in the preoperative selection of cold thyroid nodules. Cancer 1991; 67:2137-2141.
- ³⁴ Guidelines of the Papanicolaou Society of Citopathology for the examination of fine-needle aspiration specimens from thyroid nodules. Mod Pathol 1996; 9: 710-715
- ³⁵ Beltiore A, La Rosa GL. Fine needle aspiration biopsy of the thyroid. Endocrinol Metab Clin North Am 2001;30:361-400.
- ³⁶ Raphael SJ. The meanings of markers: ancillary techniques in diagnosis of thyroid neoplasia. Endocr Pathol 2002; 13: 301-312.
- ³⁷ Aratake Y, Umeki K, Kiyoyama K, Hinoura Y, Sato S, Ohno A, Kuribayashi T, Hirai K, Nabeshima K, Kotani T. Diagnostic utility of galectin-3 and CD26/DPPIV as preoperative diagnostic markers for thyroid nodules. Diagn Cytopathol 2002; 26: 366-372.
- ³⁸ Casey MB, Lohse CM, Lloyd RV. Distinction between papillary thyroid hyperplasia and papillary thyroid carcinoma by immunohistochemical staining for cytokeratin 19, galectin-3 and HBME-1. Endocr Pathol 2003;14:55-60.
- ³⁹ Prasad ML, Pellegata NS, Huang Y, Nagaraja HN, de la Chapelle A, Kloos RT. Galectin-3, fibronectin-1, CITED-1, HBME1 and cytokeratin-19 immunohistochemistry is useful for the differential diagnosis of thyroid tumors. Modern Pathology 2005; 18: 48-57.
- ⁴⁰ Weber KB, Shroyer KR, Heinz DE, Nawaz S, Said MS, Haugen BR. The use of a combination of galectin-3 and thyroid peroxidase for the diagnosis and prognosis of thyroid cancer. Am J Clin Pathol 2004; 122: 524-531.

- ⁴¹ Gasbarri A, Martenagi MP, Del Prete F, Lucante T, Natali PG, Bartolazzi A. Galectin-3 and CD44v6 isoforms in the preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Oncol* 1999; 11: 3494-3502.
- ⁴² Giannini R, Faviana P, Cavinato T, Elisei R, Pacini F, Berti P, Fontanini G, Ugolini Cl, Camacci T, De Leso K, Miccoli P, Pinchera A, Basolo F. Galectin-3 and oncofetal-fibronectin expression in thyroid neoplasia as assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunochemistry in cytologic and pathologic specimens. *Thyroid* 2003; 13: 765-770.
- ⁴³ Xu XC, El-Naggar AK, Lotan R. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 in thyroid tumors. *Am J Pathol* 1995; 147: 815-822.
- ⁴⁴ Shaha AR. Controversies in the management of thyroid nodule. *Laryngoscope* 2000; 110: 183-193.
- ⁴⁵ Gharib H, Mazzaferri EL. Thyroxine suppressive therapy in patients with nodular thyroid disease. *Ann Intern Med* 1998; 128:386-394.
- ⁴⁶ Orell SR, Philips J. The thyroid: fine-needle biopsy and cytological diagnosis of thyroid lesions. *Monogr Clin Cytol* 1997; 14: I-IX, 1-205.
- ⁴⁷ Sidawy MK, Del Vecchio DM, Knoll SM. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: correlation between cytology and histology and evaluation of discrepant cases. *Cancer* 1997; 81:253-259.
- ⁴⁸ Bhattacharyya N, Fried MP. Assessment of the morbidity and complications of total thyroidectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 389-392.
- ⁴⁹ Byar DP, Green SB, Dor P, Williams ED, Colon G, van Gilse HA, Mayer M, Sylvester RJ, van Glabbeke M. A prognostic index for thyroid carcinoma. A study of the E.O.R.T.C. Thyroid Cancer Cooperative Group. *Eur J Cancer* 1979; 15: 1033-1041.
- ⁵⁰ Hay ID, Grant CS, Taylor WF, McConahey. Ipsilateral lobectomy versus bilateral lobar resection in papillary thyroid carcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome using a novel prognostic scoring system. *Surgery* 1987; 102: 1088-1095.
- ⁵¹ Hay ID, Bergstrahl EJ, Goellner JR, Ebersold JR, Grant CS. Predicting outcome in papillary thyroid carcinoma: Development of a reliable prognostic scoring system in a cohort of 1779 patients surgically treated at one institution during 1940 through 1989. *Surgery* 1993; 114:1050-1058.
- ⁵² Loh KC, Greenspan FS, Gee L, Miller TR, Yeo PP. Pathological tumor-node-metastasis (pTNM) staging for papillary and follicular thyroid carcinomas: A retrospective analysis of 700 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3553-3562.
- ⁵³ Sherman Si, Brierley JD, Sperling M, Aim KB, Bigos ST, Cooper DS, Hangen BR, Ho M, Klein I, Ladenson PW, Robbins J, Ross DS, Specker B, Taylor T, Maxon HB 3rd. Prospective multicenter study of thyroids carcinoma treatment: initial analysis of staging and outcome. National Thyroid Cancer Treatment Cooperative Study Registry Group. *Cancer* 1998; 83: 1012-1021.
- ⁵⁴ Zeiger MA, Dackiw APB. Follicular thyroid lesions, elements that affect both diagnosis and prognosis. *J Surg Oncol* 2005; 89: 108-113.
- ⁵⁵ Jensen Mh, Davis RK, Dervick L. Thyroid cancer: a computerassisted review of 5287 cases. *Otolaryngol Head Neck Surgery* 1990; 102: 51-65.
- ⁵⁶ Guiland FD, Hunt WC, Morris DM, Key CR. Prognostic factors for thyroid carcinoma. A population-based study of 15698 cases from Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER). Program 1973-1991. *Cancer* 1997; 79:564-573.
- ⁵⁷ Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med* 1994; 97:418-428.

- ⁵⁸ Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, Leffler H, Liu FT, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirer F, Raz A, Rigby PW, Rini JM, Wang JL. Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell* 1994; 76: 597-598.
- ⁵⁹ Dunphy JL, Barcham GJ, Bischof RJ, Young AR, Nash A, Meensen EN. Isolation and characterization of a novel eosinophil-specific galectin released into the lungs in response to allergen challenge. *J Biol Chem* 2002; 277: 14916-14924.
- ⁶⁰ Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20807-20810.
- ⁶¹ Wang L, Inohara H, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 is a nuclear matrix protein which binds RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 217: 292-303.
- ⁶² Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1473: 172-18.
- ⁶³ Krzeslak A, Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 305-328.
- ⁶⁴ Herrmann J, Turck CW, Atchison RE, Huflejt ME, Poulter L, Gitt MA, Burlingame AL, Barondes SH, Leffler H. Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline, glycine, tyrosine rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J Biol Chem* 1993; 268: 26704-26711.
- ⁶⁵ Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD, Clarke A, Mercurio AM. Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:3466-3470.
- ⁶⁶ Castronovo V, Liu FT, van den Brule FA. Decreased expression of galectin-3 in basal cell carcinoma of the skin. *Int J Oncol* 1999; 15:67-70.
- ⁶⁷ Lotan R, Ito H, Yasui W, Yokozaki H, Lotan D, Tahara E. Expression of a 31-kDa lactoside-binding lectin in normal human gastric mucosa and primary and metastatic gastric carcinomas. *Int J Cancer* 1994; 56:474-480.
- ⁶⁸ Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation and cell death. *J Mol Med* 1998; 76:402-412.
- ⁶⁹ Hsu DK, Dowling CA, Jeng K-CG, Chen JT, Yang RY, Liu FT. Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 81: 519-526.
- ⁷⁰ Idikio H. Galectin-3 expression in human breast carcinoma: correlation with cancer histologic grade. *Int J Oncol* 1998; 12: 1287-1290.
- ⁷¹ Yang R-Y, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:6737-6742.
- ⁷² Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Hill PN, Shenhar A, Kuwabara I, Chen SS. Modulation of functional properties of galectin-3 by monoclonal antibodies binding to the non-lectin domains. *Biochemistry* 1996; 35:6073-6079.
- ⁷³ Danguy A, Camby I and Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572:285-293.
- ⁷⁴ Raz A, Lotan R. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1987; 6: 433-452.
- ⁷⁵ Feizi T. Carbohydrate differentiation antigens: probable ligands for cell adhesion molecules. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 84-86.
- ⁷⁶ Dennis JW. N-linked oligosaccharide processing and tumor cell biology. *Semin Cancer Biol* 1991; 2: 411-420.

- ⁷⁷ Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 1989; 52: 257-331.
- ⁷⁸ Allison RT. Lectins in diagnostic histopathology: a review. *Med Lab Sci* 1986; 43:369-376.
- ⁷⁹ Walker RA. The use of lectins in histopathology. *Pathol Res Pract* 1989; 185: 826-835.
- ⁸⁰ Gabius HJ, Brehler R, Schauer A, Cramer F. Localization of endogenous lectins in normal human breast, benign breast lesions and mammary carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1986; 52: 107-115.
- ⁸¹ Irimura T, Matsushita Y, Sutton RC, Carralero D, Ohannesian DW, Cleary KR, Ota DM, Nicolson GL, Lotan R. Increased content of an endogenous lactose-binding lectin in human colorectal carcinoma progressed to metastatic stages. *Cancer Res* 1991; 51: 387-393.
- ⁸² Lotan R, Matsushita Y, Ohannesian D, Carralero D, Ota DM, Cleary KR, Nicolson GL, Irimura T. Lactose-binding lectin expression in human colorectal carcinomas. Relation to tumor progression. *Carbohydr Res* 1991;213:47-57.
- ⁸³ Miyazaki J, Hokari R, Kato S, Tsuzuki Y, Kawaguchi A, Nagao S, Ito K, Miura S. Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. *Oncol Rep* 2002; 9: 1307-1312.
- ⁸⁴ Chung EJ, Sung YK, Farooq M, Kim Y, Im S, Tak WY, Hwang YI, Han HS, Kim JC, Kim MK. Gene expression profile analysis in human hepatocellular carcinoma by cDNA microarray. *Mol Cells* 2002; 14:382-387.
- ⁸⁵ Gillenwater A, Xu XC, el Naggar AK, Clayman GL, Lotan R. Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 1996; 18:422-432.
- ⁸⁶ Fernandez PL, Merino MJ, Gomez M, Campo E, Medina T, Castronovo V, Sanjuan X, Cardesa A, Liu FT, Sobel ME. Galectin-3 and laminin expression in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissue. *J Pathol* 1997; 181: 80-86.
- ⁸⁷ Orlandi F, Saggiorato E, Pivano G, Puligheddu B, Termine A, Cappia S, De Giuli P, Angeli A. Galectin-3 is a presurgical marker of human thyroid carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58: 3015-3020.
- ⁸⁸ Cvejic D, Savin S, Paunovic I, Tatic S, Havelka M, Sinadinovic J. Immunohistochemical localization of galectin-3 in malignant and benign human thyroid tissue. *Anticancer Res* 1998; 18: 2637-2641.
- ⁸⁹ Inohara H, Honjo Y, Yoshii T, Akahami S, Yoshida J, Hattori K, Okomoto S, Sawada T, Raz A, Kubo T. Expression of galectin-3 in fine-needle aspirates as a diagnostic marker differentiating benign from malignant thyroid neoplasms. *Cancer* 1999; 85: 2475-2484.
- ⁹⁰ Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1389-1393.
- ⁹¹ Gharib H. Changing concepts in the diagnosis and management of thyroid nodules. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997; 26: 777-800.
- ⁹² Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993; 118: 283-289.
- ⁹³ Willians ED. Guest editorial: two proposals regarding the terminology of thyroid tumors. *Int J Surg Pathol* 2000; 8: 181-183.
- ⁹⁴ The American Thyroid Association. In: Consensus Guidelines for Thyroid Testing in the New millennium. *Thyroid fine needle aspiration (FNA) and Cytology* 2003:80-86.

- ⁹⁵ Saxen E, Fransila K, Bjarnason O, Norman T, Ringertz N. Observer variation in histologic classification of thyroid cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1978; 86:483-486.
- ⁹⁶ Franc B. Observer variation of lesions of the thyroid. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1177-1178.
- ⁹⁷ Vitale M, Bassi V, Fenzi G, Macchia PE, Salzano S, Rossi G. Integrin expression in thyroid cells from normal glands and nodular goiters. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1575-1579.
- ⁹⁸ Bernet VJ, Anderson J, Vaishnav Y, Solomon B, Adair CF, Saji M, Burman KD, Burch HB, Ringel MD. Determination of Galectin-3 Messenger Ribonucleic Acid Overexpression in Papillary Thyroid Cancer by Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4792-4796.
- ⁹⁹ Finley DJ, Arora N, Zhu B, Gallagher L, Fahey III TJ. Molecular profiling distinguishes papillary carcinoma from benign thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3214-3223.
- ¹⁰⁰ Bartolazzi A, Gasbarri A, Papotti M, Bussolati G, Lucante T, Khan A, Inohara H, Marandino F, Orlandi F, Nardi F, Vecchione A, Tecce R, Larsson O. Application of an immunodiagnostic method for improving preoperative diagnosis of nodular thyroid lesions. *Lancet* 2001; 357: 1644-1650.
- ¹⁰¹ Saggiorato E, Cappia S, De Giuli P, Mussa A, Pancani G, Caraci P, Angeli A, Orlandi F. Galectin-3 as a presurgical immunocyodiagnostic marker of minimally invasive follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5152-5158.
- ¹⁰² Kawachi K, Matsushita Y, Yonezawa S, Nakano S, Shirao K, Natsugoe S, Sueyoshi K, Aiihou T, Sato E. Galectin-3 expression in various thyroid neoplasms and its possible role in metastasis formation. *Hum Pathol* 2000; 31: 428-433.
- ¹⁰³ Beesley MF, McLaren KM. Cytokeratin 19 and galectin-3 immunohistochemistry in the differential diagnosis of solitary thyroid nodules. *Histopathology* 2002; 41: 236-243.
- ¹⁰⁴ Volante M, Bozzalla-Cassione F, De Pompa R, Saggiorato E, Bartolazzi A, Orlandi F, Papotti M. Galectin-3 and HBME-1 expression in oncocytic cell tumors of the thyroid. *Virchows Arch* 2004; 445: 183-188.
- ¹⁰⁵ Niedziela M, Maceluch J, Korman E. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4411-4415.
- ¹⁰⁶ Jarubiak-Wielganowicz M, Kubiak R, Sygut J, Pomorski L, Kordek R. Usefulness of galectin-3 immunohistochemistry in differential diagnosis between thyroid follicular carcinoma and follicular adenoma. *Pol J Pathol* 2003; 54:111-115.
- ¹⁰⁷ Kovacs RB, Földes J, Winkler G, Bodó M, Sági Z. The investigation of galectin-3 in diseases of the thyroid gland. *Eur J Endocrinol* 2003; 149: 449-453.
- ¹⁰⁸ Mehrotra P, Okpokam A, Bouhaidar R, Johnson SJ, Wilson JA, Davies BR, Lennard TWJ. Galectin-3 does not reliably distinguish benign from malignant thyroid neoplasms. *Histopathology* 2004; 45: 493-500.
- ¹⁰⁹ Mills LJ, Poller DN, Yiangou C. Galectin-3 is not useful in thyroid FNA. *Cytopathology* 2005; 16:132-138.
- ¹¹⁰ Battifora H, Metha P. The checkerboard tissue block. An improved multitissue control block. *Lab Invest* 1990; 63: 722-724.
- ¹¹¹ Boyd JC. Mathematical tools for demonstrating the clinical usefulness of biochemical markers. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1997; 227: 46-63.
- ¹¹² Zweig MH, Campbell G. Receiver-Operating Characteristic (ROC) Plots. A fundamental evaluation tool in Clinical Medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561-567.

- ¹¹³ Bartolazzi A, Papotti M, Orlandi F. Methodological considerations regarding the use of galectin-3 expression analysis in preoperative evaluation of thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 950-951.
- ¹¹⁴ Saggiorato E, Aversa S, Deandreis D, Arecco F, Mussa A, Puligheddu B, Cappia S, Conticello S, Papotti M, Orlandi F. Galectin-3: presurgical marker of thyroid follicular epithelial cell-derived carcinomas. *J Endocrinol Invest* 2004; 27: 311-317.
- ¹¹⁵ De León-Mazariegos, Canedo-Patzi M, Pérez-Enriquez B, Candanedo-Gonzalez F, Saqui-Salces M, Gamboa-Dominguez A, Rull-Rodrigo JA. Baja capacidad de galectina-3 para discriminar lesiones tiroideas. *Rev Invest Clin* 2004; 56: 623-628.
- ¹¹⁶ Nascimento MC, Bisi H, Alves VAF, Longatto-Filho A, Kanamura CT, Medeiros-Neto G. Differential reactivity for galectin-3 in Hürthle cell adenomas and carcinomas. *Endocrin Pathol* 2001; 12: 275-279.
- ¹¹⁷ Nucera C, Mazzon E, Caillou B, Violi MA, Moleti M, Priolo C, Stumiolo G, Puzzolo D, Cavallari V, Trimarchi F, Vermiglio F. Human galectin-3 immunoexpression in thyroid follicular adenomas with cell atypia. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 106-112.
- ¹¹⁸ Martins L, Matsuo SA, Ebina KN, Kulcsar MA, Friguglietti CU, Kimura ET. Galectin-3 messenger ribonucleic acid and protein are expressed in benign thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4806-4810.
- ¹¹⁹ Gaffney RL, Carney JA, Sebo TJ, Erickson LA, Volante M, Papotti M, Lloyd R. Galectin-3 expression in hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 494-498.
- ¹²⁰ Coli A, Bigotti G, Zucchetti F, Negro F, Massi G. Galectin-3, a marker of well-differentiated thyroid carcinoma, is expressed in thyroid nodules with cytological atypia. *Histopathology* 2002; 40: 80-87.
- ¹²¹ Oestreicher-Kedem Y, Halpern M, Roizman P, Hardy B, Sulkes J, Feinmesser R, Stern Y. Diagnostic value of galectin-3 as a marker for malignancy in follicular patterned thyroid lesions. *Head Neck* 2004; 26: 960-966.
- ¹²² Herrmann M, LiVolsi V, Pasha TL, Roberts A, Wojcik EM, Baloch W. Immunohistochemical expression of galectin-3 in benign and malignant thyroid lesions. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 6: 710-713.
- ¹²³ Yu F, Finley RL, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem* 2002; 277: 15819-15827.
- ¹²⁴ Prasad MI, Huang Y, Pellegata NS, de la Chapelle A, Kloos RT. Hashimoto's thyroiditis with papillary thyroid carcinoma (PTC) – like nuclear alterations express molecular markers of PTC. *Histopathology* 2004; 45: 39-46.
- ¹²⁵ Cvejic D, Savin S, Petrovic I, Pauvonic I, Tatic S, Havelka M. Galectin-3 expression in papillary thyroid carcinoma: relation to histomorphologic growth pattern, lymph node metastasis, extrathyroid invasion, and tumor size. *Head Neck* 2005; 27: 1049-1055.
- ¹²⁶ Gaffney RL, Carney JA, Sebo TJ, Erickson LA, Volante M, Papotti M, Lloyd R. Galectin-3 expression in hyalinizing trabecular tumors of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 494-498.
- ¹²⁷ Lugli A, Terracciano LM, Oberholzer M, Bubendorf L, Tornillo L. Macrofollicular variant of papillary carcinoma of the thyroid. A histological, cytologic and immunohistochemical study of 3 cases and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 2004; 128: 54-58.

- ¹²⁸ Cvejic D, Savin S, Petrovic I, Paunovic I, Tatic S, Krgovic K, Havelka M. Galectin-3 expression in papillary microcarcinoma of the thyroid. *Histopathology* 2005; 47: 209-214.
- ¹²⁹ Schlumberger M, Pacini F. *Thyroid tumors*. Paris: Editions Nucléon. 1999: 33-81.
- ¹³⁰ Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Yasuoka H, Kakudo K, Inohara H, Kuma K, Miyauchi A. Galectin-3 expression in follicular tumours: an immunohistochemical study of its use as a marker of follicular carcinoma. *Pathology* 2005; 37: 296-298.
- ¹³¹ Rosahl SK, Erpenbeck V, Vorkapic P, Samii M. Solitary follicular thyroid carcinoma of the skull base and its differentiation from ectopic adenoma- review, use of galectin-3 and report of a new case. *Clin Neurol Neurosurg* 2000; 102: 149-155.
- ¹³² Maximo V, Sobrinho-Simoes M. Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch* 2000; 437:107-115.
- ¹³³ Bresalier RS, Yan PS, Byrd JC, Lotan R, Raz D. Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the nervous system. *Cancer* 1998; 80: 776-787.
- ¹³⁴ Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 2003; 195: 111-119.
- ¹³⁵ Cvejic D, Savin S, Golubovic S, Paunovic I, Tatic S, Havelka M. Galectin-3 and carcinoembryonic antigen expression in medullary thyroid carcinoma: possible relation to tumour progression. *Histopathology* 2000; 37: 530-535.
- ¹³⁶ Faggiano A, Talbot M, Lacroix L, Bidart JM, Baudin E, Schlumberger M, Caillou B. Differential expression of galectin-3 in medullary thyroid carcinoma and C-cell hyperplasia. *Clin Endocrinol* 2002; 57: 813-819.
- ¹³⁷ Rossi ED, Raffaelli M, Minimo C, Mule A, Lombardi CP, Vecchio FM, Fadda G. Immunocytochemical evaluation of thyroid neoplasms on thin-layer smears from fine-needle aspiration biopsies. *Cancer (Cancer Cytopathol)* 2005; 105: 87-95.
- ¹³⁸ Collet JF, Hurbain I, Prengel C, Utzmann O, Scetbon F, Bernaudin JF, Fajac A. Galectin-3 immunodetection in follicular thyroid neoplasms: a prospective study on fine-needle aspiration samples. *Br J Cancer* 2005; 93: 1175-1181.
- ¹³⁹ Pisani T, Vecchione A, Giovagnoli MR. Galectin-3 immunodetection may improve cytological diagnosis of occult papillary thyroid carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 1111-1112.
- ¹⁴⁰ Volante M, Bozzalla-Cassione F, Orlandi F, Papotti M. Diagnostic role of galectin-3 in follicular thyroid tumors. *Virchows Arch* 2004; 444: 309-312.
- ¹⁴¹ Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn II GW, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE. RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors : evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2318-2326.