

R 29397

1204360

STD 6/197



T.D.  
6/197



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y  
PATOLÓGICA

TESIS DOCTORAL

**CONTRIBUCIÓN DE LA CITOMETRÍA  
DE FLUJO AL ESTUDIO DE LOS  
PARAGANGLIOMAS  
SIMPATOADRENALES**

38

68

12 JUN. 1998

*Antonio García Escudero*

**ANTONIO GARCÍA ESCUDERO  
SEVILLA, 1.998**

*Antonio García Escudero*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA  
Dpto. de Citología e Histología  
Normal y Patológica

Prof. Hugo Galera Davidson

Avda. Sánchez Pizjuán, s/nº  
41009 Sevilla

Tfs. (34) 95 4371284  
(34) 95 4557451  
Fax. (34) 95 4371284

**DON HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA GENERAL Y ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y DOÑA ANA Mª MORENO FERNÁNDEZ, PROFESORA TITULAR DE HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

**CERTIFICAN:** Que bajo su dirección y en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de esta Facultad de Medicina, ha sido realizado el trabajo titulado: **“CONTRIBUCIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO AL ESTUDIO DE LOS PARAGANGLIOMAS SIMPATOADRENALES”** por **Don ANTONIO GARCÍA ESCUDERO** para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla, a dos de Junio de mil novecientos noventa y ocho.



FACULTAD DE MEDICINA  
DPTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA  
NORMAL Y PATOLOGICA

41009 SEVILLA

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

|            |  |
|------------|--|
| A:         | Adrenalina.  |
| ACTH:      | Hormona adrenocorticotropa.  |
| ADN:       | Ácido desoxirribonucleico.   |
| AVM:       | Ácido vanilmandélico.  |
| CMT:       | Carcinoma medular de tiroides.                                       |
| Coc. 4c/S: | Cociente entre el porcentaje de células en la región 4c y en fase S. |
| CV:        | Coefficiente de variación.   |
| DI:        | Índice de ADN.   |
| ENA:       | Enolasa neuronal específica.   |
| FE:        | Feocromocitoma extra-adrenal.  |
| FS:        | Feocromocitoma suprarrenal.  |
| H.M.S.:    | Hiperplasia medular suprarrenal .                                    |
| HTA:       | Hipertensión arterial.   |
| HV:        | Ácido homovanílico.  |
| IP:        | Índice de proliferación.   |
| M.E.N.:    | Síndromes de neoplasias endocrinas múltiples.                        |
| NA:        | Noradrenalina.   |
| NCI:       | National Cancer Institute.   |
| PAE:       | Paragangliomas aortosimpáticos extra-adrenales.                      |
| PCC:       | Paragangliomas del cuerpo carotídeo.                                 |
| PEA:       | Paraganglios extra-adrenales aortosimpáticos.                        |
| PSA:       | Paragangliomas simpatoadrenales                                      |
| PY:        | Paraganglioma yúgulo-timpánico.                                      |
| SNSA:      | Sistema neuroendocrino simpatoadrenal.                               |
| TAP:       | Tejido adiposo pardo.  |
| VIP:       | Péptido intestinal vasoactivo.                                       |

## **ÍNDICE**

---

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1  |
| <b>I) SISTEMA PARAGANGLIONAR: CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA</b> .....           | 2  |
| <b>II) SISTEMA SIMPATOADRENAL: RECUERDO ANATÓMICO E HISTOFISIOLÓGICO</b> ..... | 3  |
| <b>A) Médula suprarrenal</b> .....   | 3  |
| <b>B) Paraganglios aortosimpáticos extraadrenales</b> .....                    | 5  |
| 1) Distribución .....  | 5  |
| 2) Histología .....  | 5  |
| 3) Caracteres ultraestructurales e inmunohistoquímicos .....                   | 5  |
| 4) Fisiología .....  | 6  |
| <b>III) HIPERPLASIA MEDULAR SUPRARRENAL</b> .....                              | 6  |
| <b>A) Forma esporádica</b> .....   | 6  |
| <b>B) Forma familiar</b> .....   | 8  |
| <b>C) Patología</b> .....  | 9  |
| <b>IV) CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PSA</b> .....                          | 11 |
| <b>A) Feocromocitomas suprarrenales</b> .....                                  | 11 |
| 1) Contexto histórico. La reacción cromafín .....                              | 13 |
| 2) Incidencia, lateralidad y otras características .....                       | 15 |
| 3) Patrones de secreción de catecolaminas .....                                | 15 |
| 4) Patología del feocromocitoma esporádico .....                               | 15 |
| a) Patología macroscópica .....  | 15 |
| b) Patología microscópica .....  | 17 |
| -Patrones arquitecturales .....  | 17 |
| -Alteraciones estromales .....   | 18 |
| -Morfología celular .....  | 20 |
| -Tejido adiposo pardo periadrenal .....  | 22 |
| 5) Anomalías asociadas .....   | 23 |
| 6) Feocromocitoma familiar .....   | 23 |
| a) Síndromes de neoplasias endocrinas múltiples(MEN) .....                     | 24 |
| -Síndrome MEN tipo 2a (síndrome de Sipple) .....                               | 26 |
| -Síndrome MEN tipo 2b .....  | 29 |
| -Otras supuestas formas de MEN .....   | 33 |
| b) Asociación con otras enfermedades hereditarias .....                        | 33 |
| 7) Feocromocitomas compuestos .....  | 35 |
| 8) Los feocromocitomas en la infancia .....                                    | 38 |
| 9) "Pseudofeocromocitomas" .....   | 39 |
| 10) Comportamiento biológico de los feocromocitomas .....                      | 40 |
| a) Incidencia de malignidad .....  | 40 |
| b) Morfología de los feocromocitomas malignos .....                            | 41 |
| c) Pronóstico y patrones de diseminación .....                                 | 42 |
| <b>B) Feocromocitomas extraadrenales</b> .....                                 | 42 |
| 1) Distribución anatómica .....  | 42 |
| 2) Características clínicas .....  | 43 |
| 3) Aspecto macroscópico .....  | 43 |
| 4) Aspecto microscópico .....  | 43 |
| 5) Incidencia de malignidad .....  | 43 |
| 6) FEA de otras localizaciones .....   | 44 |

|  |     |
|--|-----|
| V) CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES E IHQ DE LOS PSA                 | 44  |
| A) Hallazgos ultraestructurales  | 44  |
| B) Hallazgos inmunohistoquímicos                                       | 45  |
| 1) Marcadores neuroendocrinos y S-100                                  | 45  |
| 2) Síndromes endocrinos asociados y otras características              | 45  |
| 3) Otras sustancias inmunorreactivas                                   | 45  |
| 4) Filamentos intermedios  | 46  |
| 5) Significación pronóstica de la inmunohistoquímica                   | 46  |
| VI) CITOMETRÍA DE ADN  | 46  |
| A) Principios Técnicos   | 46  |
| B) Principios Biológicos   | 49  |
| 1) Cinética del ciclo celular  | 50  |
| 2) Interpretación de los histogramas de ADN                            | 51  |
| 3) Significado biológico de la aneuploidía                             | 54  |
| VII) ESTUDIO DEL ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO APLICADO A LOS PSA        | 56  |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL TEMA</b>  | 62  |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | 64  |
| I) VARIABLES CLÍNICAS  | 65  |
| II) VARIABLES ANATOMOPATOLÓGICAS                                       | 66  |
| A) Macroscópicas   | 66  |
| B) Histopatológicas  | 66  |
| III) ESTUDIO DEL ADN POR CITOMETRÍA DE FLUJO                           | 67  |
| IV) ESTUDIO ESTADÍSTICO  | 70  |
| <b>RESULTADOS</b>  | 72  |
| <b>DISCUSIÓN</b>   | 93  |
| I) PROBLEMAS TÉCNICOS Y METODOLÓGICOS                                  | 94  |
| A) Coeficiente de variación  | 94  |
| B) Estudio del ciclo celular   | 96  |
| C) Criterios para la clasificación e interpretación de los histogramas | 97  |
| D) Criterios de malignidad. Concepto de progresión                     | 98  |
| II) ESTUDIO CITOMÉTRICO: SIGNIFICADO PRONÓSTICO                        | 98  |
| A) Patrones citométricos de distribución del ADN                       | 98  |
| B) Índice de ADN (DI)  | 103 |
| C) Índice de proliferación global                                      | 104 |
| D) Cociente 4c/S   | 104 |
| E) Relación con otras variables clínicas                               | 105 |
| III) ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO   | 106 |
| A) Relación con la ploidía de ADN                                      | 106 |
| B) Relación con el carácter familiar o esporádico de la neoplasia      | 106 |
| C) Relación con el pronóstico  | 109 |
| <b>CONCLUSIONES</b>  | 113 |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>  | 116 |

## **INTRODUCCIÓN**

---

## I. SISTEMA PARAGANGLIONAR: CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

El sistema paraganglionar es un componente importante del sistema neuroendocrino difuso, que incluye elementos del sistema nervioso central y periférico. Dicho sistema deriva de una célula progenitora de la cresta neural con capacidad para originar también otros tipos celulares como células parafoliculares del tiroides y melanocitos. El sistema paraganglionar puede ser dividido en: 1- La médula suprarrenal, órgano neuroendocrino inervado por el sistema ortosimpático, y 2- El sistema paraganglionar extraadrenal. Este segundo sistema, más disperso, puede a su vez ser dividido en dos componentes: 2a- El asociado al sistema ortosimpático de las regiones torácica, paraaórtica y abdominal, funcionalmente relacionado con la médula suprarrenal y 2b- El relacionado con el sistema parasimpático de funciones receptoras aferentes (1).

Anatómicamente, y de acuerdo con Glenner y Grimley (2), el sistema paraganglionar puede ser dividido en: 1- Branquiomérico que incluye los paraganglios carotídeo, yugulotimpánico, subclavio, laríngeo, coronario, aórtico-pulmonar y orbitario; 2- Intravagal; y 3- Aortosimpático asociado al sistema ortosimpático, fundamentalmente axial y que se extiende desde el arco aórtico a la vejiga urinaria, incluyendo los órganos de Zuckerkandl. Los tumores originados de los paraganglios branquiomérico e intravagal se consideran generalmente cromafín-negativos, mientras que los derivados de los paraganglios aortosimpáticos con frecuencia son positivos para la reacción cromafín y secretan catecolaminas, de forma similar a los tumores homólogos de la médula.

El ácido crómico, presente en algunos fijadores como el de Zenker, oxida las catecolaminas e indolaminas, adquiriendo los tumores que la contienen una coloración más oscura (reacción cromafín). Sin embargo, dicha reacción no siempre es fiable y no expresa la actividad funcional puesto que algunos tumores que almacenan

catecolaminas (aunque no la segregan) son positivos. Por tales motivos la clasificación de los tumores del sistema paraganglionar en función de la reacción cromafín tiene escaso valor práctico y no es utilizada de forma rutinaria.

El sistema neuroendocrino simpatoadrenal es un complejo integrado por el sistema nervioso simpático, con neuronas postganglionares que median respuestas efectoras a través de la noradrenalina y la médula suprarrenal que sintetiza y segrega catecolaminas (3).

La **nomenclatura** aplicada a los tumores del sistema paraganglionar (incluyendo médula suprarrenal) ha sido con frecuencia confusa. En sentido estricto, el término feocromocitoma queda restringido a los tumores derivados de la médula suprarrenal, recibiendo el nombre genérico de paraganglioma los tumores que se originan de los paraganglios, si bien se suele completar con la localización. No obstante, existen evidencias embriológicas, clínicas, morfológicas y biológicas que asemejan los feocromocitomas (adrenales) con los tumores derivados de los paraganglios aortosimpáticos, por lo que ambos tumores se pueden englobar bajo la denominación de feocromocitomas simpatoadrenales. Igualmente, los tumores originados de los paraganglios parasimpáticos, dada la función quimiorreceptora del órgano en que asientan, se han denominado quemodectomas.

En el presente estudio utilizaremos la denominación de paragangliomas simpatoadrenales (PSA) para referirnos a los tumores objeto de este estudio (feocromocitomas suprarrenales y paragangliomas aortosimpáticos, es decir, del sistema neuroendocrino simpatoadrenal).

## **II. SISTEMA SIMPATOADRENAL: RECUERDO ANATOMICO E HISTOFISIOLOGICO**

### **A) Médula suprarrenal**

Las glándulas suprarrenales en el hombre son 2 (derecha e izquierda), de forma

vagamente triangular y algo aplanadas y están englobadas en el tejido adiposo retroperitoneal sobre el polo superior de cada riñón. Miden aproximadamente 5x3x menos de 1 cm y ambas en conjunto pesan unos 15 gr. Tanto el peso como el tamaño pueden variar mucho según la edad y estado fisiológico de cada persona. (4)

Aunque la corteza es de origen mesodérmico, la médula deriva de la cresta neural. En el adulto, la médula ocupa del 8 al 10% del volumen de la glándula con un peso medio de 0,44 gr. La mayor parte de la médula suprarrenal se sitúa en la cabeza de la glándula. El cuerpo de la misma contiene células medulares dentro de su cresta y habitualmente dentro de una de las regiones alares. La cola de la glándula no contiene tejido medular, excepto en casos de hiperplasia. Las células cromafines se hallan típicamente dispuestas en pequeños nidos y cordones separados por una rica red capilar. Algunas de las células, especialmente las situadas en áreas yuxtacorticales, pueden presentar núcleos agrandados e hipercromáticos. La frecuencia de estos núcleos bizarros parece aumentar con la edad. Además las células medulares pueden contener glóbulos hialinos intracitoplásmicos PAS-positivos.

A nivel ultraestructural, la característica más significativa es la presencia de gránulos secretores provistos de membrana donde se almacenan catecolaminas y otros productos. Los gránulos de noradrenalina contienen un centro muy denso separado de la membrana limitante por un espacio lúcido irregular. Los gránulos de adrenalina tienen un centro menos denso y más próximo a la membrana. Ocasionalmente se observan pseudoinclusiones intranucleares que representan invaginaciones del citoplasma en el núcleo.

Un pequeño número de células ganglionares también se hallan presentes en la médula. Además, en la médula de la mayoría de los mamíferos puede observarse un tipo celular denominado pequeña célula intesamente fluorescente (SIF cell) que pudieran actuar de interneuronas.

El contenido de catecolaminas puede demostrarse por diferentes técnicas, siendo

la más conocida la reacción cromafin. Además, las catecolaminas y los enzimas que intervienen en su síntesis pueden ser visualizados por técnicas inmunohistoquímicas. Las células medulares también contienen otras sustancias como enolasa neuronal específica, cromogranina, cromomembrina, sinaptofisina y péptidos reguladores.

El precursor de las catecolaminas es la tirosina, transformada secuencialmente en DOPA, dopamina, noradrenalina y adrenalina. La más abundante en la médula es la adrenalina, que regula la actividad de muchas células y tejidos provistos de receptores específicos (5).

### **B) Paraganglios aortosimpáticos extraadrenales. (PEA) (3)**

1) Distribución: los PEA son habitualmente estructuras diminutas sólo reconocibles con el uso del microscopio. Una excepción son algunos de los paraganglios descritos por Zuckerkandl en 1901 en fetos y recién nacidos y situados a ambos lados de la aorta entre la mesentérica superior y la bifurcación aórtica. Los PEA se distribuyen a todo lo largo del eje paraaórtico y paravertebral, de forma paralela a la distribución del sistema nervioso simpático, así como en proximidad a determinadas vísceras como la vejiga urinaria o el corazón. En la experiencia de Zuckerkandl la longitud media del cuerpo aórtico derecho fue de 11,6 mm y del izquierdo 8,8mm.

2) Histología:(1) Los PEA constan de células principales (tipo I) dispuestas en nidos compactos ("Zellballen") junto a un 2º tipo celular (tipo II sustentaculares). Estas últimas son homólogas a las células satélites de los ganglios autonómicos y de difícil identificación con HE. Se localizan en la periferia de los nidos de células principales y constan de un núcleo pequeño, ovalado o lenticular. Las células principales son poliédricas y con citoplasma pálido con frecuente vacuolización. El núcleo es esférico u oval normocromático y con nucléolo único y pequeño. Pueden hallarse en relación con células ganglionares o pequeños nervios.

3) Caracteres ultraestructurales (1) e inmunohistoquímicos (3): Las células principales contienen gránulos de neurosecreción de 100 a 200 nm. Carecen de

desmosomas aunque pueden observarse pequeñas uniones primitivas. Las células sustentaculares son fusiformes y con abundantes procesos citoplásmicos que rodean a las células tipo I. Las células principales son positivas para cromogranina A y B, sinaptofisina, ENE. Las células sustentaculares son positivas con S-100.

4) Fisiología:(3) La noradrenalina es la catecolamina predominante, agente presor más potente que la adrenalina. Se postula que los órganos de Zuckerkandl en el recién nacido y en el feto pueden ayudar a mantener el tono vascular. Posteriormente, esta función es gradualmente asumida por la médula suprarrenal y un sistema nervioso simpático más maduro.

### **III. HIPERPLASIA MEDULAR SUPRARRENAL (H.M.S.)**

#### **A) Forma esporádica**

La hiperplasia medular suprarrenal H.M.S. ha sido descrita normalmente en humanos pero, a diferencia de la hiperplasia que se produce en pacientes con síndromes de neoplasias endocrinas múltiples (M.E.N.) tipos 2a y 2b, no ha sido universalmente aceptada como una entidad clínico patológica distintiva (6).

Hay sin embargo una evidencia creciente acerca de que la H.M.S. existe como una entidad distintiva particularmente cuando los rígidos criterios morfológicos son considerados en estrecha correlación con parámetros bioquímicos así como signos y síntomas clínicos. Utilizando los criterios histofisiológicos bosquejados por Dlaut(7), los cuatro siguientes signos fueron utilizados para caracterizar una hiperfunción de la médula adrenal: (1) dilatación de los sinusoides con hinchazón del endotelio (2), dilatación de los canales de secreción intratrabeculares e intercelulares (3) la presencia de vacuolas dentro de las células medulares y de glóbulos de secreción en los canales y (4) agrandamiento de células y núcleos con formación de células gigantes. Utilizando estos criterios, una "alta actividad" de la médula adrenal fue detectada en autopsias de pacientes con patología cerebral, diabetes, obesidad, y tirotoxicosis, y existen resultados que apoyaron la idea de que la hiperfunción de la médula desempeña un

papel primario en la hipertensión(8)

La H.M.S. ha sido descrita en pacientes con signos y síntomas de feocromocitoma, como hipertensión paroxística (o mantenida), cefalea, palpitaciones, y diaforesis pero en los que tras la cirugía no existe evidencia de un tumor funcionando adrenal (o extra adrenal)(9). Esta condición entra por tanto en el diagnóstico diferencial del "pseudofeocromocitoma" (ver más adelante). La mayoría de estos casos (o todos) de H.M.S. carecen de una historia familiar para MEN tipos 2a y 2b. La elevación urinaria de catecolaminas o sus metabolitos ha sido usualmente documentada en los casos esporádicos de H.M.S. descritos hasta la fecha, y algunos piensan que la existencia de un aumento en la excreción urinaria de catecolaminas o metanefrinas es un prerrequisito para un diagnóstico que conlleva un procedimiento quirúrgico de la magnitud de una suprarrenalectomía unilateral(11). Muchos de estos pacientes con H.M.S. esporádica han sido curados o han visto disminuidos sus síntomas tras la resección quirúrgica de una o ambas glándulas suprarrenales.

La H.M.S. ha sido descrita en pacientes con fibrosis quística. En un estudio sobre cuarenta y nueve casos de autopsias realizado por Bongiovanni (12) los seis pacientes con fibrosis quística presentaron HMS. Estas glándulas suprarrenales también presentaron unos niveles de catecolaminas muy elevados (principalmente epinefrina) tras ser analizadas cuantitativamente. Un aumento en la "masa" de células cromafines de la médula suprarrenal ha sido descrito en víctimas del síndrome de la muerte súbita del lactante y se ha asociado con un engrosamiento de la masa muscular de pequeñas arterias pulmonares, retención anómala de grasa parda y hematopoyesis extra medular, hechos que han sido utilizados para sustentar una hipoventilación alveolar crónica(12). Algunos estudios han sugerido que las células cromafines adultas (órganos de Zuckerkandl) en humanos podrían secretar catecolaminas en respuesta a la hipoxemia y la hiperplasia córticomédular suprarrenal ha sido descrita en ratas expuestas a hipobarismos equivalentes a una altitud de cinco mil quinientos metros(14). La

hiperplasia medular en la hipoxemia crónica presumiblemente refleja unas necesidades de catecolaminas incrementadas de forma continua, y no implica necesariamente una función quimiorreceptora directa.

La H.M.S. también ha sido descrita en el síndrome de Beckwith-Wiedemann (S.B.W.) que se caracteriza por exónfalos, macroglosia, gigantismo ("Emg síndrome"), visceromegalia, hipoglucemia neonatal y citomegalia de la zona fetal o provisional de la corteza suprarrenal(15). El S.B.W. ocurre aproximadamente en uno de cada trece mil nacimientos y la mayoría de los casos citados en la literatura (alrededor del 85%) son esporádicos. En esta enfermedad las glándulas suprarrenales se hayan aumentadas de tamaño, con un peso conjunto superior a los dieciséis gramos. En un estudio realizado por Beckwith, cinco de seis niños con S.B.W. tenían H.M.S., y en un caso de autopsia se refiere "hiperplasia definida" de los paraganglios yuxtagonadales, periadrenales y preaórticos. Existe una asociación entre S.B.W. y el desarrollo de diversos tumores malignos, usualmente tumor de Wylms o carcinoma cortical suprarrenal, pero al menos un ejemplo de feocromocitoma clínicamente maligno ha sido descrito(16).

### **B) Forma familiar**

La hiperplasia medular suprarrenal (H.M.S.) ha sido descrita de forma más convincente como una entidad patológica en síndromes de neoplasias endocrinas múltiples (M.E.N.) tipo 2a y 2b, donde ha sido considerado como un precursor de feocromocitomas(17-19). Como ya ha sido señalado la H.M.S. puede asociarse con el síndrome de Beckwith-Wiedemann el cual también puede producirse en un contexto familiar, sugiriendo un patrón de herencia mendeliana. El síndrome M.E.N. tipo 2a presenta un modo de transmisión autosómico dominante con expresividad variable, y el síndrome M.E.N. 2b también puede tener un patrón de transmisión similar, aunque una proporción de casos parecen ser esporádicos. Los pacientes con M.E.N. 2 pueden presentar patología medular suprarrenal moderadamente avanzada pero sin evidencia

clínica de enfermedad y resultados de laboratorio variables(19). Una de las manifestaciones más precoces de la hiperfunción medular suprarrenal en este síndrome es una elevación en el cociente de epinefrina/nor epinefrina en orina(18). El contenido suprarrenal de catecolaminas en H.M.S. también se halla elevado, particularmente la epinefrina(17). Una vez realizado el diagnóstico de enfermedad medular suprarrenal en un paciente con M.E.N. 2, algunos autores han recomendado la suprarrenalectomía total bilateral(19). Existen otros contextos familiares en los que aparecen feocromocitomas como la enfermedad de von Recklinghausen, pero la lesión o lesiones precursoras no han sido tan bien caracterizadas como en el síndrome M.E.N. 2 .

### **C) PATOLOGIA DE LA H.M.S.**

La correcta identificación de la H.M.S. depende de la rigurosa aplicación de criterios morfométricos, particularmente en aquellos casos donde las alteraciones morfológicas son sutiles. Particularmente en los casos poco acusados es necesario la bisección del tejido conectivo y grasa periadrenal, la orientación de las glándulas, la sección a estrechos intervalos en planos transversales, y la evaluación cuantitativa o semi cuantitativa de la cantidad de tejido medular en las diferentes regiones de la glándula. La hiperplasia medular nodular y difusa es considerada como un precursor de los feocromocitomas en síndromes M.E.N.2 , y la afectación de las glándulas suprarrenales puede ser simétrica o asimétrica .En una pequeña minoría de pacientes las glándulas pueden ser normales(19). En un estudio de las glándulas suprarrenales de 19 pacientes con M.E.N. 2 (6 seis tenían M.E.N. 2b), catorce tenían afectación simétrica (feocromocitoma multinodular, hiperplasia medular nodular y/o difusa ,o normal), cuatro tenían afectación asimétrica, y en un paciente los cambios fueron unilaterales(20). La distinción de la H.M.S. nodular o difusa del feocromocitoma es arbitraria,y la diferenciación de un pequeño feocromocitoma de una hiperplasia nodular puede ser muy difícil. Sherwin (20) había reclasificado varios feocromocitomas como

hiperplasia nodular basándose en la ausencia de una clara delimitación y la falta de una compresión clara de la glándula circundante. Datos procedentes del estudio realizado por De Lellis(18) sugieren que los feocromocitomas nodulares y multicéntricos son en realidad un grado extremo de hiperplasia nodular de la médula suprarrenal. Carney (19) adoptó el límite de 1cm para distinguir entre H.M.S. y feocromocitoma (es decir, nódulos mayores de 1cm eran designados como feocromocitoma y nódulos menores de 1cm eran designados como H.M.S.). Esta arbitraria designación fue elegida basándose en el extremo inferior del rango de tamaño de los feocromocitomas recogido por Karsner en el fascículo del Instituto de Patología de las fuerzas armadas de 1950 (21). Los nódulos de la H.M.S. pueden variar en coloración y textura siendo unos pálidos carnosos y otros marrones. En ocasiones puede existir un gran nódulo dominante, o el nódulo puede estar aparentemente formado por la coalescencia de otros nódulos más pequeños.

En el examen con bajos aumentos de la H.M.S. en síndromes M.E.N.2, a menudo se observa un patrón combinado, nodular y difuso, de expansión del compartimento medular con compresión de la corteza o médula adyacente. Puede existir un crecimiento nodular expansivo con distorsión y adelgazamiento de la corteza, u observarse un cuadro más complicado con nódulos emergiendo en un contexto de H.M.S. difusa o nódulos que se desarrollan dentro de otros nódulos, sugiriendo la existencia de múltiples clones diferentes de células cromafines proliferantes. Este hecho culmina en feocromocitomas de gran tamaño bilaterales (más del 50%), y multilobulados que son tan característicos de los síndromes M.E.N.2. La hiperplasia difusa puede representar la contrapartida morfológica más precoz de la hipersecreción de catecolaminas seguida por la hiperplasia nodular. La presencia de glóbulos hialinos parece ser bastante frecuente en H.M.S. en síndromes M.E.N. 2 y algunos parecen encontrarse en el espacio extracelular. También pueden existir gran número de células granulares o extensamente vacuoladas (18). En ambos casos parecen representar una

actividad secretora aumentada. Puede existir igualmente una gran variación en el tamaño y forma nucleares. En uno de los estudios se encontraron núcleos con diámetros superiores a las 50 micras junto con hipercromasia; núcleos gigantes a menudo eran evidentes en el área yuxtacortical (18). También pueden identificarse figuras mitóticas aunque estas no son frecuentes. Puede observarse un espectro de patrones arquitecturales dentro de la misma glándula o de la glándula contralateral y que reflejan los diferentes patrones del feocromocitoma, como trabecular, alveolar o sólido, e incluso una configuración fusocelular.

#### **IV) CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PSA:**

##### **A) Feocromocitomas suprarrenales.**

Los feocromocitomas son neoplasias relativamente raras que se originan en las células cromafines de la médula suprarrenal y pueden afectar a individuos de todas las edades, aunque típicamente lo hacen en la edad adulta. Estas neoplasias pueden ocasionar una serie de síntomas y signos derivados de la cantidad y patrón de secreción de catecolaminas y pueden suponer una seria amenaza para el paciente; en el otro extremo estos tumores pueden ser clínicamente silentes y ser descubiertos en el curso de una intervención quirúrgica por otra causa o ser detectados durante la autopsia.

##### **1) FEOCROMOCITOMAS. CONTEXTO HISTÓRICO (6)**

En 1886 Félix Fränkel describió el caso de una mujer de 18 años que sufría de paroxismos de palpitaciones, ansiedad, vértigo y dolor de cabeza que posteriormente se acompañaron de vómitos y alteraciones en la temperatura, pulso y respiración; la paciente murió al décimo día de hospitalización, y la autopsia realizada demostró un tumor suprarrenal bilateral, del tamaño de un puño en el lado izquierdo y del tamaño de una avellana en el lado derecho. El tumor fue clasificado como un angiosarcoma debido a su gran vascularización, aunque fue asumido que el tumor se originaba en la médula de la glándula. Esta es la primera descripción clara de los signos y síntomas atribuibles a un feocromocitoma clínicamente funcionante. Labbé refirió el caso de un

paciente con paroxismos de hipertensión asociados a un feocromocitoma encontrado durante la autopsia, pero en esta época no se sabía mucho acerca de la médula suprarrenal y la epinefrina. El término "feocromocitoma" (*phaios*: "de color pardo u oscuro") fue propuesto en 1912 por Ludwig Pick (*phaochromocytom*) para designar los paragangliomas de la médula suprarrenal (y extraadrenales) que daban la característica reacción cromafin. Charles Mayo fue el primero en extirpar con éxito un feocromocitoma en los E.E.U.U. Clínica Mayo el 11 de octubre de 1926; la paciente, madre Joachim, una monja catòlica murió seis años después de que muriera Mayo en 1938. El tumor midió 4'6 cm y estaba situado en el lado medial del riñón izquierdo. De acuerdo con van Heerden, fue diagnosticado como "neoplasia retroperitoneal encapsulada fibrosa celular, maligna". En una revisión del material, fue considerado como un feocromocitoma típico con tejido cortical suprarrenal adherido(22). El veinticinco de febrero de 1926 siete meses antes de la intervención en la Clínica Mayo, César Roux de Lausanne, resecó con éxito un feocromocitoma (22).

## LA REACCIÓN CROMAFIN

La reacción cromafin depende de la oxidación de las catecolaminas en presencia de fijadores que tienen dicromato formándose pigmentos adrenocromos. Esta reacción fue descrita en 1865 (23) y ha sido a veces descrita como la "cromorreacción de Henle"; Sherwin y Rosen (24) atribuyen a Joesteu una descripción previa de la cromoreacción en 1864. Basándose en trabajos previos de otros autores, Sherwin (25) refiere que la responsable de la coloración marrón oscura de la reacción es la epinefrina mientras que la norepinefrina oxidada es amarillento marrón y puede no ser de valor diagnóstico. Aproximadamente un tercio de todos los feocromocitomas estudiados por Sherwin (25) dieron una aceptable reacción cromafin en los cinco a quince primeros minutos, siendo la solución de Zenker la más efectiva para producir un color más oscuro. La cromorreacción macroscópica fue considerada como la prueba única de

mayor valor para el diagnóstico patológico de feocromocitoma (24), y de hecho Karsner (21) sostenía que un diagnóstico de feocromocitoma no era válido sin una reacción cromafín positiva. En los casos estudiados en el National Cancer Institute (NCI) la reacción cromafín fue positiva para casi todos los paragangliomas simpatoadrenales en los que se habría realizado una correcta fijación del tejido ; la reacción cromafín también puede observarse microscópicamente pero puede resultar más débil o desaparecer en su totalidad debido a la extracción del agua después de fijación prolongada y el procesado de rutina (26). Las reacciones cromafines sustitutivas son relativamente inespecíficas. Mientras que la reacción cromafín pudo ser de utilidad diagnóstica en el pasado actualmente tiene un interés principalmente histórico con la aparición de tecnologías más modernas y sofisticadas.

## 2) INCIDENCIA, LATERALIDAD Y OTRAS CARACTERÍSTICAS

los feocromocitomas son tumores muy infrecuentes en la patología quirúrgica general. La tasa de incidencia para feocromocitomas en E.E.U.U. en 1983 fue de 8 por 1 millón de personas-año (27); con la inclusión de dos casos familiares adicionales, la tasa de incidencia fue de 9.5 por un millón de personas-año. Algunos autores han sugerido que por cada feocromocitoma diagnosticado en vida, dos serán encontrados incidentalmente en la autopsia, En el hospital Henry Ford antes de 1962, el 53% de los feocromocitomas no fueron diagnosticados antes de la intervención quirúrgica o la autopsia, mientras que sólo el 18% de los tumores permanecieron clínicamente insospechados desde 1962 (28). En una revisión de 54 casos de autopsia de feocromocitomas en la Clínica Mayo, sólo el 24% de los tumores habían sido diagnosticados correctamente en vida mientras que el 76% no habían sido sospechados clínicamente; los resultados de este estudio arrojan serias dudas sobre la tesis de que la mayoría de los tumores no eran funcionantes dado que el 75% de los pacientes en este último grupo habían muerto súbitamente ya sea de infarto de miocardio o de

accidente cerebrovascular, produciéndose un tercio de las muertes súbitas durante o inmediatamente después de un procedimiento quirúrgico no relacionado (29) . En otro estudio al menos un tercio de los feocromocitomas, no fueron diagnosticados en vida (30). En Suecia la tasa de incidencia anual media fue de 2'1 caso por millón de habitantes por año (31) , mientras que en Dinamarca fue de 1'9 por millón (32). Los feocromocitomas son incluso menos frecuentes en la infancia tal y como ha sido puesto de manifiesto por dos revisiones diferentes de la literatura (1960 y 1963) que detectaron menos de 100 casos en el grupo de edad pediátrica. Los feocromocitomas han sido descritos como el "tumor del 10%" (10% bilateral, 10% extraadrenal, 10% maligno, 10% en la infancia ) pero esto es sólo una aproximación y debe ser atemperado con factores tales como, la localización del tumor, edad del grupo y la presencia o ausencia de casos familiares. En un contexto esporádico en adultos aproximadamente el 95% de los feocromocitomas son solitarios, el 5% bilaterales y el 5-10% extraadrenales . Tres de los seis pacientes con feocromocitomas bilaterales descritos por ReMine(33) tenían una historia familiar (probablemente MEN 2a), y si estos casos son excluidos, solamente el 2'2% de los tumores son bilaterales. En la serie de Modlin (30) el 8% de los tumores suprarrenales fueron bilaterales y el 8% fueron de localización extraadrenal. Ninguno de los pacientes tenían historia familiar de feocromocitoma. En una serie de 138 pacientes de feocromocitoma de la Clínica Mayo, el 10% de los tumores fueron extraadrenales (33), en contraste con posteriores series ( van Heerden) (34) en las que el 19% fueron extradrenales. Scott (35) también refirió que el 6'8% de los feocromocitomas fueron bilaterales y que había un aumento de la incidencia de tumores extraadrenales (16%). En un contexto familiar más del 50% de los tumores fueron bilaterales. En la infancia hay un aumento en la incidencia de bilateralidad así como de multicentricidad y localización extraadrenal. En una revisión de Hume (61), el 24% de los tumores fueron bilaterales, el 15% múltiples, y el 15% extradrenales. Stackbole(137) refirió que el 20% de los feocromocitomas suprarrenales fueron

bilaterales.

El pico de incidencia se halla en la quinta década de la vida (33,34,36) , pero el rango de edad es muy amplio y va desde pocos meses de vida hasta la novena década. Los casos familiares tienden a ser diagnosticados en edades más precoces (37). La mayoría de las series indican una igual incidencia en ambos sexos pero existen estudios que favorecen ligeramente a los pacientes del sexo femenino (31,33,34,38), mientras que otros favorecen al sexo masculino (30) . En algunas de las series más amplias la glándula suprarrenal derecha se halla afectada con una frecuencia superior a la de la izquierda y quizás esto refleje la mayor cantidad de tejido cromoafín presente en este lado.

### 3) PATRONES DE SECRECIÓN DE CATECOLAMINAS

Los tumores secretores de norepinefrina normalmente se asocian con hipertensión mantenida mientras que los tumores que secretan cantidades relativamente elevadas de epinefrina junto con norepinefrina se asocian con hipertensión episódica (39). Los tumores productores puros de epinefrina pueden causar hipotensión más que hipertensión (39) y pueden requerir una medición precisa de la excreción de epinefrina, especialmente pacientes con MEN tipo 2 (40). En algunos pacientes normotensivos y con feocromocitoma, el tumor ( con frecuencia extraadrenal), ha secretado principalmente dopamina, presumiblemente debido a una menor actividad de la dopamina beta hidroxilasa, y algunos autores han sugerido que este perfil puede ser un marcador de malignidad (41).

### 4) PATOLOGÍA DEL FEOCROMOCITOMA ESPORÁDICO(6)

**Macroscopía:** los feocromocitomas esporádicos usualmente se presentan como una masa unicéntrica esférica u oval con distorsión macroscópica de la morfología de la glándula la cual es a menudo identificable como un remanente. El tumor con frecuencia se halla muy bien circunscrito y puede mostrar una

pseudocápsula fibrosa a cuya formación en ocasiones contribuye la propia cápsula suprarrenal así como los tejidos conectivos comprimidos. Aunque la mayoría de los feocromocitomas tienen un diámetro de 3 a 5cm (2), existe un rango bastante amplio en tamaño oscilando de 1 a 10cm e incluso más (21). El peso medio del tumor también varía refiriéndose en las grandes series pesos de 73, 85, 90, 113 y 156 gr (25,33,36,42). El peso medio de los tumores clínicamente malignos tiende a ser mayor que el de aquellos feocromocitomas benignos (176, 383 y 759 gr ) (33,36,42).

El origen exacto del tumor dentro de la glándula suprarrenal es difícil de determinar en piezas quirúrgicas de resección. Dada la concentración de tejido cromafín en el cuerpo y cabeza de la glándula sería esperable una mayor frecuencia en este área, pero en la mayoría de los casos es imposible establecerlo con certeza. Al corte, el tumor habitualmente se halla muy bien delimitado, es de consistencia elástica firme y presenta una superficie brillante, gris-blanquecina que puede mostrar escasas áreas moteadas (congestión o hemorragia). Habitualmente puede ser identificado un remanente de la glándula suprarrenal en la periferia, pero esta puede quedar reducida a un estrecho ribete amarillento sobre parte de la superficie de los tumores más grandes.

Una de las características más notables de los feocromocitomas es la variabilidad en los patrones de congestión o hemorragia confluyente. En uno de sus extremos puede dar lugar a un patrón moteado o punteado y en el otro puede dar lugar a una apariencia difusamente hemorrágica. A veces pueden ser atribuidas a congestión pasiva, manipulación mecánica durante la intervención quirúrgica. En algunos tumores la superficie de corte puede oscurecerse ligeramente después de su exposición al aire debido a la oxidación de las catecolaminas, y las soluciones de formalina pueden adoptar un color opalescente debido a las catecolaminas disueltas (26). En algunos de los tumores pueden observarse alteraciones degenerativas secundarias como hemorragia y necrosis, y algunos tumores sufren cambios quísticos. Los cambios

degenerativos son mas intensos en las areas centrales del tumor, lo cual es consistente con una etiología isquemica. El contenido de las zonas quísticas puede ser escaso y pardo-rojizo o semejar un hematoma. En el grado mas extremo de quistificación puede resultar difícil la identificación de remanentes del tumor. Algunos feocromocitomas pueden presentar calcificaciones.

Los feocromocitomas también pueden hallarse adheridos a estructuras adyacentes como el riñón e hígado, dificultando su extirpación quirúrgica. La invasión franca de los tejidos adyacentes puede ser un indicador de malignidad. El feocromocitoma rara vez puede extenderse al interior de la vena cava inferior (43,44) e incluso a la aurícula derecha (45). En varios de los casos descritos, el curso fue favorable ,a pesar de la extensión intracaval. En algunos casos la afectación de grandes vasos tales como la vena cava puede asociarse con recidiva local (43).

### **Patología microscópica**

#### *a) Patrones arquitecturales*

De forma no infrecuente puede hallarse una mezcla de varios patrones dentro del mismo tumor. En un estudio de 98 paragangliomas simpatoadrenales, en su mayor parte feocromocitomas, 35 mostraban mezcla de patrones trabecular y alveolar(36%),34 presentaban un patrón alveolar (35%) y 26 tenían una disposición trabecular de sus células; tan solo 2 tumores exhibían un patrón predominantemente sólido o difuso (42). En una pequeña minoría de tumores puede verse un patrón fusocelular usualmente en distribución focal y no como un componente predominante del tumor. En estos focos de configuración fusocelular el núcleo también puede hallarse algo elongado en el mismo eje que la célula. ReMine refirió un patrón fusocelular en el 2% de los casos (33).En el estudio realizado por Medeiros (36). el patrón trabecular fue el más frecuente(59%), seguido por el alveolar y el difuso (36).Otros autores describen patrones "epitelial" y "pleomórfico" (33).El patrón trabecular se halla constituido por cortos cordones celulares anastomosados, disposición arquitectural que

resulta más evidente en preparaciones teñidas con técnicas para reticulina. El patrón alveolar puede simular en ocasiones a los tumores del cuerpo carotídeo, pero en general las características citoarquitecturales suelen permitir la distinción entre ambos tipos de tumores. Los nidos de células tumorales pueden variar considerablemente en tamaño y aunque raramente, se puede observar degeneración central. En ocasiones se puede observar una disposición más sólida o difusa de las células ya sea de forma focal o difusa.

La unión o interfase entre el feocromocitoma y la corteza adyacente puede ser irregular con una pseudocápsula fibrosa comprimida o bien presentar un contorno redondeado u ondulado sin la existencia de tejido conectivo fibroso interpuesto. El examen cuidadoso de dichas zonas puede revelar un entremezclamiento de células corticales con células tumorales del feocromocitoma. En muchos casos esta configuración habla en contra de una encapsulación fibrosa completa del tumor. En algunos casos las características citoarquitecturales son muy similares a las de la corteza adyacente. Esta semejanza citoarquitectural entre algunos feocromocitomas y neoplasias corticales suprarrenales puede ocasionar confusión e incluso errores diagnósticos; para realizar el diagnóstico diferencial pueden ser necesarias técnicas especiales.

*b) Alteraciones estromales.* En los feocromocitomas pueden observarse alteraciones en el tejido conectivo de sostén y en la trama vascular pero estas son característicamente focales y restringidas en cuanto a su distribución anatómica. Con frecuencia las alteraciones se sitúan más centralmente y pueden asociarse con degeneración quística. La esclerosis puede asociarse con proliferación vascular, determinando un patrón angiomaso con prominencia de las células endoteliales. Las neoplasias vasculares pueden asentar primariamente en la glándula suprarrenal (hemangiomas e incluso angiosarcomas) (46). Han sido descritos feocromocitomas con características angiomasas (47). El edema junto con la dilatación de los espacios

perivasculares y sinusoidales puede originar cierta atenuación y distorsión de los cordones celulares anastomosados, pero el muestreo en áreas sólidas mejor conservadas del tumor debería disipar cualquier duda diagnóstica. Un hecho que puede ser observado en algunos feocromocitomas es la presencia de material proteináceo eosinófilo similar al coloide. Esto generalmente se observa en pequeños lugares separados por finos septos fibrovasculares que a veces contienen escasas células tumorales reconocibles. A menudo en el borde de estos lagos proteináceos existen vacuolas claras. La presencia de espacios sinusoidales muy abiertos puede dar lugar a un patrón de gruesas trabéculas, el cual no es infrecuente en los carcinomas corticales suprarrenales y puede originar confusión diagnóstica. Este hecho junto con la presencia de pleomorfismo nuclear puede provocar un diagnóstico erróneo. Como ya fue señalado previamente en casos aislados puede ser muy difícil distinguir un feocromocitoma de una neoplasia cortical suprarrenal (48). La presencia de congestión o hemorragia puede originar una distorsión de la arquitectura determinando un patrón pseudopapilar.

En algunos de los feocromocitomas la esclerosis estromal puede resultar bastante intensa y parecerse al amiloide. En un estudio reciente la presencia de amiloide ha sido identificada en 14 de 20 feocromocitomas (70%) y en 2/3 de los casos fue considerado abundante (49). En otro estudio 2 de 5 feocromocitomas fueron considerados positivos para amiloide con la tinción de rojo congo (36). En un caso familiar de feocromocitoma asociado a carcinoma medular de tiroides, Palollan (50) refiere la presencia de amiloide en un feocromocitoma metastásico y señalan la gran semejanza morfológica entre este tumor y el carcinoma medular de tiroides. Este caso subraya un hecho importante: que el carcinoma medular de tiroides metastásico puede semejar un paraganglioma y que este tumor puede incluso metastatizar dentro de un feocromocitoma. Las metástasis intratumorales de este tipo son raras pero han sido descritas en pacientes con síndromes MEN tipo 2 (30).

c) *Morfología celular*. El citoplasma de las células tumorales a menudo es eosinófilo y finamente granular pero puede ser basófilo, a veces con diminutos gránulos puntiformes que apenas entran en la capacidad de resolución de los objetivos de inmersión. Los bordes celulares pueden ser poligonales y nítidos en algunos tumores. A veces el citoplasma de las células se halla groseramente vacuolado y en algunos casos semejan "pseudoacinos", tal y como puede observarse en paragangliomas del tipo de los del cuerpo carotídeo. En microscopía óptica puede existir cierta variabilidad en la intensidad de tinción del citoplasma de las células lo cual sugiere la existencia de una población dimorfa con tipos celulares "claros" y "oscuros", pero el significado de este hallazgo es desconocido. La presencia de "pseudoinclusiones" nucleares ha sido descrita en aproximadamente un tercio de los feocromocitomas estudiados por Medeiros et al (36) y típicamente se muestran como estructuras redondeadas u ovals muy bien delimitadas que habitualmente contienen citoplasma de similares características tintoriales a las del resto de la célula. Mediante estudios ultraestructurales se demostró que estas corresponden a invaginaciones del citoplasma celular(51) y reflejan irregularidades en el contorno de la membrana nuclear que no pueden ser apreciadas cuando son vistas de frente.

En algunos tumores puede existir un grado bastante intenso de pleomorfismo nuclear e hipercromasia y a veces puede resultar un hecho espectacular. En varios estudios recientes la atipia nuclear o el pleomorfismo resultó ser de poco o ningún valor para predecir el comportamiento biológico.

En algunos feocromocitomas pueden encontrarse glóbulos hialinos intracitoplásmicos que típicamente son PAS positivos y resistentes a la predigestión con diastasa. Estos glóbulos pueden ser ligeramente refráctiles, pero no son birrefringentes y resultan idénticos a aquellos que pueden ser vistos en células cromafines normales de la médula suprarrenal (52). A veces parecen hallarse en una situación extracelular pero este hecho se corresponde probablemente con un artefacto. Estos glóbulos fueron

encontrados en aproximadamente un tercio de los casos estudiados por Medeiros (36). En el estudio realizado por Linnoila (42) sobre paragangliomas simpatoadrenales estos glóbulos fueron encontrados en 38 de 64 tumores benignos y sólo en 8 de 34 tumores malignos, una diferencia que fue estadísticamente significativa. Los glóbulos hialinos pueden ser numerosos pero usualmente son relativamente infrecuentes, y en algunos casos es necesaria una búsqueda prolongada para encontrarlos.

Se ha pensado que se hallan relacionados de alguna manera con la actividad secretora, pero su significado funcional no está claro. (53) Aunque los glóbulos hialinos se asocian característicamente con los feocromocitomas, también pueden ser encontrados en una pequeña proporción de neoplasias corticales suprarrenales, lo cual supone otro punto de confusión en el diagnóstico diferencial de estos tumores. En un estudio sobre 30 neoplasias corticales suprarrenales en el grupo de edad adolescente y pediátrico, la presencia de glóbulos hialinos intracitoplásmicos fue identificada en 3 tumores (dos carcinomas y un adenoma, 10%)(54). Los glóbulos hialinos han sido inducidos experimentalmente en la corteza suprarrenal de las ratas mediante la administración de metilandrostenodiol y se ha demostrado que contienen una mezcla de proteínas plasmáticas, incluyendo albúmina (55). Cuando estos glóbulos se hallan presentes en un tumor cortical suprarrenal de patrón alveolar y con depleción del contenido lipídico de sus células, pueden existir problemas para llegar al diagnóstico corecto.

Para algunos autores el citoplasma celular puede llegar a ser tan intensamente eosinófilo y abundante, que el tumor puede adoptar características oncocíticas, lo cual también puede remedar una neoplasia cortical suprarrenal (56, 57). La acumulación de lípidos se considera como un fenómeno degenerativo, y la inmunotinción para marcadores neurales, tales como la enolasa neuronal específica y cromogranina ayuda en el diagnóstico diferencial. Los feocromocitomas (y paragangliomas extraadrenales) pueden contener elementos que semejen células ganglionares o neuronales con polaridad nuclear, con prolongaciones celulares, e incluso un material basofílico

finamente granular en la periferia del citoplasma que semeja a la sustancia de Nissl. Células con esta morfología fueron detectadas en 2 de 34 paragangliomas simpatoadrenales malignos y en 14 de 64 tumores benignos (42). Como apunte final, los paragangliomas simpatoadrenales típicamente contienen abundantes células de citoplasma argirófilo, lo cual puede acentuar la disposición trabecular o alveolar de las células. La especificidad de las tinciones de argirofilia para gránulos de neurosecreción ha sido demostrada ultraestructuralmente para la tinción de Grimelius. Una característica más infrecuente de los feocromocitomas, es la presencia de un pigmento similar a la melanina.

*d) Tejido adiposo pardo periadrenal.* Un aumento en la prevalencia de grasa parda periadrenal fue descrita por Melicow (58) en asociación con los feocromocitomas (16 de 18 casos desde 1953). Una revisión de feocromocitomas previamente extirpados mostró grasa parda solamente en un caso, pero la grasa periadrenal no había sido incluida para el estudio (58). Una cantidad significativa de tejido adiposo pardo periadrenal (TAP) fue visto por Sherwin (25) en aproximadamente el 50% de todos los feocromocitomas estudiados. Medeiros et al (36) observaron TAP en 44 de 60 feocromocitomas (73%), y solamente en el 30% de los casos de una población control sin feocromocitoma se observó grasa parda. La transformación de la grasa periadrenal en tejido adiposo pardo, así como en otras localizaciones más generalizadas, ha sido descrito y se ha sugerido que las catecolaminas pueden representar un papel significativo en este proceso (59). En presencia de altos niveles circulantes de norepinefrina se asume que la grasa intra abdominal de los humanos (incluyendo la grasa del omento) se reactiva y esto puede dar lugar a la pérdida de peso que se aprecia en pacientes con feocromocitoma (59). Las alteraciones histológicas del tejido adiposo periadrenal también han sido señaladas en animales de experimentación con feocromocitoma (50) así como en animales expuestos a epinefrina y norepinefrina a dosis crecientes.

La producción de calor debida al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa ha sido propuesta como el mecanismo causante de la fiebre que algunos pacientes con feocromocitoma experimentan. Tras la extirpación del feocromocitoma la fiebre puede desaparecer debido un descenso de la hiperactividad adrenérgica(61). En un estudio en el que se utilizó como grupo control las autopsias medicolegales ,se comparó la presencia de TAP periadrenal con pacientes portadores de feocromocitoma. La prevalencia de TAP fue de aproximadamente el 51% en el grupo control y del 53% en los feocromocitomas (62).Se necesita una evaluación cuantitativa más crítica para resolver definitivamente este hallazgo .

### 5)ANOMALÍAS ASOCIADAS

Los feocromocitomas han sido descritos en asociación con displasia arterial fibromuscular afectando a vasos renales(63) o con una distribución multifocal más amplia (64). Estos tumores han sido descritos en asociación con estenosis de la arteria renal,lo cual en la mayoría de los casos ha sido atribuido a vasoespasmo inducido por las catecolaminas, compresión de la arteria por el tumor,o arrioesclerosis (63) . Algunos autores especulan con que el aumento en los niveles de catecolaminas podría causar alteraciones morfológicas comparables a las de la displasia fibromuscular debido vaespasmo de los vasa vasorum,pero la baja frecuencia global de esta afección vascular en los pacientes con feocromocitoma parece contradecir esta interpretación (63). También se ha observado hemorragia espontánea del feocromocitoma al interior del retroperitoneo(65) así como su asociación con múltiples aneurismas intracraneales (66). Algunos pacientes con feocromocitoma presentan cardiomiopatía asociada a catecolaminas con arritmias,fallo cardiaco,e incluso muerte súbita (67).Van Vliet (67) encontró lesiones miocárdicas focales diseminadas en 15 de 26 pacientes con feocromocitoma en el examen postmortem .Las lesiones descritas como "miocarditis activa por catecolaminas" consistenen degeneración y necrosis focal de fibras con

inflamación hallándose con mayor frecuencia en los 2/3 internos del miocardio ventricular izquierdo (67). La excesiva estimulación de receptores beta parece ser de importancia en la patogénesis de la cardiomiopatía por catecolaminas en ratas, mientras que los receptores alfa parecen desempeñar un papel de menor importancia (68). La patología de la enfermedad cardíaca inducida por cocaína es muy similar a la que se ve en pacientes con feocromocitomas (69). Otras alteraciones asociadas con el feocromocitoma incluyen colelitiasis (23% de los pacientes descritos por ReMine (33), displasia fibrosa, (70) y una serie de anormalidades constitucionales y metabólicas. Recientemente han sido descritos dos pacientes con feocromocitoma y timoma concurrente (71).

#### 6) FEOCROMOCITOMA FAMILIAR (6)

Los feocromocitomas familiares suponen aproximadamente el 10% de los casos (72), pero la incidencia varía dependiendo de las series examinadas, el patrón de referencia y otros factores. Un muestreo de las series publicadas revela la siguiente incidencia de feocromocitomas familiares: 5% (cuatro pacientes con síndrome MEN tipo 2a, 3 con enfermedad de Von Recklinghausen) (33), 7% (tres con enfermedad de Von Recklinghausen, 1 con enfermedad de Von Hippel-Lindau) (36), 11% (nueve con síndrome MEN tipo 2a, 3 con síndromes MEN tipo 2b) (34), en comparación con la incidencia muy alta de feocromocitoma familiar descrita en otra serie: 46% (37). Es importante recordar que los feocromocitomas pueden producirse en un contexto familiar sin que existan asociadas otras alteraciones (72). Como regla general la edad media en el momento del diagnóstico es menor en los casos familiares comparado con los feocromocitomas esporádicos (37).

#### a) Síndromes de neoplasias endocrinas múltiples (MEN) (6)

Sipple en 1961 refirió un aumento significativo de la incidencia de carcinoma de tiroides en pacientes con feocromocitomas. En una revisión de 537 casos de feocromocitomas descritos en la literatura, el 5% presentaban tumores malignos de

otros órganos, suponiendo el carcinoma de tiroides el 22%, una incidencia muy superior a la esperable.). Simultáneamente, en el mismo año, Williams en Gales, y Schimke y Hartmann en los Estados Unidos refirieron que el tumor tiroideo era el carcinoma medular de tiroides (CMT). También fue señalado que el hipertiroidismo era un trastorno endocrino asociado y que el complejo era hereditario. La hiperplasia de células C fue presentada como la lesión precursora del CMT en este contexto familiar (73). Williams y Pollock describieron los característicos "neuomas" de la mucosa oral en 2 pacientes con feocromocitoma y ganglioneuromatosis del tracto gastrointestinal y consideraron esta asociación como una entidad clinicopatológica. Ljungberg ha considerado esta asociación de CMT y feocromocitoma como una cromafinomatosis familiar.

En 1953 fueron descritos adenomas endocrinos múltiples con afectación de glándulas paratiroides, hipófisis, e islotes pancreáticos y en los años siguientes los aspectos genéticos para el síndrome MEN tipo 1 fueron descritos por Wermer tomando este síndrome su nombre (Síndrome de Wermer). El síndrome MEN tipo 1 se transmite de forma dominante con penetrancia incompleta y se halla constituido por tumores o hiperplasia que afectan a las glándulas paratiroides: 87% (74) a 95% (75)), islotes pancreáticos: 70% (75) a 81% (74), e hipófisis 40% (75) a 54%(74), corteza suprarrenal (nódulos y/o adenomas) (36%) (74), tiroides y otros tumores endocrinos tales como tumores carcinoides del timo. La úlcera péptica es frecuente en estos pacientes, como fue señalado por Wermer. El gen asociado con el síndrome MEN tipo I ha sido ubicado en el cromosoma 11 (11q13) (76) y estudios recientes muestran que el desarrollo monoclonal de tumores de paratiroides y páncreas incluye delecciones alélicas similares del cromosoma 11 (77,78). Se ha sugerido que el adenoma monoclonal puede desarrollarse después de una fase de hiperplasia policlonal debido a la inactivación de gen del MEN I en la banda q13 del cromosoma 11 de la célula precursora. (78) Se ha demostrado actividad mitogénica sobre las paratiroides en el

suero de pacientes con MEN I, lo cual sugiere que el hiperparatiroidismo primario en este contexto puede deberse a una causa humoral(79). Aparentemente existen otros factores aparte de la herencia que pueden desempeñar un papel en la expresión de los MEN I, porque se ha observado expresión no idéntica del síndrome en gemelos idénticos. (80) Steiner et al (81) sugiere que la combinación de CMT, feocromocitoma y alteraciones de las paratiroides puede ser descrito como "MEN tipo II", y que el complejo con múltiples neuromas mucosos debe ser designado como "MEN II-B" o "MEN III" (81).

### **Síndrome MEN tipo 2a (Síndrome de Sipple)**

El síndrome MEN tipo II se transmite de forma autosómica dominante con una alta penetrancia, e incluye feocromocitoma, CMT, e hiperplasia de paratiroides en diferentes combinaciones. Se ha estimado que aproximadamente el 25% de estos pacientes eventualmente presentan evidencia de hiperparatiroidismo ya sea de forma clínica o bioquímica. La enfermedad de las paratiroides puede ser diagnosticada durante la cirugía para el cáncer de tiroides. El factor mitogénico para las paratiroides no fue detectado por Brandi et al;(79) lo cual puede indicar que existen diferentes factores promotores de la hiperplasia de paratiroides (82). El CMT normalmente es el componente más marcado del síndrome, y resulta interesante que en 1952 algunos autores ya habían señalado la existencia de un porcentaje significativamente alto de pacientes con feocromocitoma que presentaban bocio nodular o difuso o carcinoma de tiroides coexistente. Curiosamente en algunos pacientes con MEN tipo 2a, también se ha descrito la existencia de enfermedad de Hirschprung; en un estudio se observó una incidencia inusualmente alta, estando afecta el 9% de una familia (83). Se encuentran feocromocitomas en aproximadamente el 50% de los pacientes afectados de MEN tipo 2a (84) y los tumores son bilaterales o multifocales en aproximadamente el 60% (85) al 70% de los casos (84,86) e incluso más (87). El CMT casi invariablemente precede al desarrollo de los feocromocitomas y, si la hiperplasia de células C se considera

como un criterio diagnóstico mínimo, la enfermedad consigue su completa penetrancia a los 30 años de edad (84). Los pacientes con feocromocitoma pueden ser asintomáticos (19) y los tumores pueden no responder a los test de provocación habituales. Los tumores tienden a producir mas epinefrina en contraste con los feocromocitomas esporádicos donde predomina la norepinefrina (18,88). La realización de estudios prospectivos regulares, el tratamiento precoz de las manifestaciones de los síndromes MEN tipo 2a pueden prevenir las metástasis de los CMT y la morbimortalidad de los feocromocitomas; la monitorización de los niveles de epinefrina en orina de 24 horas y el cociente urinario epinefrina a norepinefrina ha sido utilizado (89). Ha sido descrito un caso de síndrome de Cushing debido a la secreción ectópica de ACTH por un feocromocitoma bilateral en un MEN tipo 2a, pero esto es extremadamente raro.

Los feocromocitomas en los síndromes tipos 2a y 2b, frecuentemente son multicéntricos y bilaterales y con frecuencia existe HMS extratumoral en los casos de afectación precoz (90). La patología de los HMS y los feocromocitomas en estos síndromes se considera indistinguible. Cuando los tumores son grandes, puede ser imposible evaluar la médula no neoplásica. En un estudio comparativo de 69 casos de feocromocitomas esporádicos, el 93% fue unicéntrico y el 100% unilateral y en todos los casos la médula suprarrenal extratumoral fue normal (90). La HMS también ha sido descrita en glándulas suprarrenales accesorias o heterotópicas en los MEN tipo 2a, y también han sido descritos paragangliomas extraadrenales (189,190) aunque parece ser relativamente infrecuente. Las alteraciones macroscópicas son de por sí suficientemente significativas como para alertar al patólogo quirúrgico de la posibilidad de un síndrome MEN tipo 2a o 2b. (90) La morfología microscópica de los feocromocitomas versus HMS (nodular o difusa), y las características histológicas son por otra parte similares a la de los feocromocitomas esporádicos.

Una serie de estudios citogenéticos en pacientes con MEN tipo 2a y 2b indican

una unión genética a un locus próximo al centrómero del cromosoma 10, (91,193) y la disponibilidad de sondas de ADN para la región permite estudios genéticos para identificar a individuos de riesgo a cualquier edad y con un alto nivel de certeza (194). La delección de una región hipervariable del ADN del brazo corto del cromosoma 1 también ha sido identificada, pero la delección no refleja el lugar de la mutación transmitida en el síndrome MEN tipo 2 (94). Los hallazgos en el síndrome MEN tipo 2 son compatibles con la teoría de los "dos eventos mutacionales" de Knudsol para la iniciación de la neoplasia, representando la HMS una manifestación del primer evento mutacional (197). Aunque el consenso general indica que los MEN tipo 1 y 2a son entidades separadas pueden existir raras excepciones. Por ejemplo, en el NCI fue visto un paciente que presentaba CMT y feocromocitomas bilaterales, pero que también tenía un tumor de células insulares productor de gastrina con un síndrome de Zollinger-Ellison. De forma similar con frecuencia no se observa una expresión sincrónica de las diferentes alteraciones fenotípicas que caracterizan a los MEN tipo 2a o 2b. Talpos (96) refiere la existencia de una familia con características de ambos síndromes. El proto-oncogen RET también parece expresarse en el feocromocitoma y en el CMT y ha sido localizado en humanos en el cromosoma 10q11.2 próximo al locus de predisposición del síndrome tipo 2a (97).

El comportamiento biológico de los feocromocitomas en los síndromes MEN tipos 2a y 2b varía de unas series a otras. Como ya ha sido señalado, algunos investigadores han sugerido que estos tumores representan un grado extremo de HMS nodular (18). Otros indican que los feocromocitomas clínicamente malignos en el contexto del MEN tipo 2 son relativamente raros, (86,98) mientras que otros piensan que el potencial maligno puede ser algo superior que el de los feocromocitomas esporádicos (84). En el estudio realizado por Carney, (19) 5 de 19 pacientes (6 con MEN 2b, 13 con MEN 2a) murieron a consecuencia directa del feocromocitoma (17%), 1 debido a hemorragia intracerebral, 2 debido a crisis hipertensivas y 2 por metástasis

pulmonares; un total de 4 pacientes desarrollaron feocromocitoma metastásico al pulmón, hígado o hueso (21%) (19). La incidencia de malignidad clínica es probablemente similar a la del feocromocitoma esporádico. También uno debería estar alerta de la existencia de raros casos de CMT metastásico ya sea en un feocromocitoma (18) o en otros lugares que pudiera ser confundido con un feocromocitoma (50).

### **Síndrome MEN tipo 2b**

El síndrome MEN tipo 2b también presenta un modo de herencia autosómica dominante, pero muchos casos han sido descritos como formas aisladas o esporádicas; sin embargo, en algunos de los casos no indica que se halla recogido una cuidadosa historia familiar o que otros miembros de la familia hallan sido estudiados. Khairi et al tienen la fuerte sospecha de que en algunos de los casos descritos como esporádicos, en realidad existían otros miembros de la familia afectados; otros pueden ser auténticamente esporádicos y debidos a una nueva mutación génica, muriendo el paciente a una edad temprana y sin haber transmitido el síndrome a futuras generaciones. Los MEN tipo 2b han sido descritos en gemelos (99) y como una complicación del embarazo (100). La expresión fenotípica del MEN tipo 2b es muy distintiva, y dependiendo de la forma de presentación puede sospecharse clínicamente basándose en las manifestaciones gastrointestinales, los hallazgos oftalmológicos o la característica afectación de los labios, lengua y otras mucosas (101). La proliferación neuromatosa en las superficies mucosas, se produce a una edad temprana y puede permitir una detección precoz de la enfermedad. Los "neuromas" mucosos de la mucosa oral y labial son el primer componente en aparecer y se hallan casi invariablemente presentes a los 8 años de edad. (101) Las superficies mucosas nasal, laríngea, faríngea y conjuntival también pueden verse afectas. También pueden existir hallazgos cutáneos sugestivos de enfermedad de Von Recklinghausen. Los labios se hallan engrosados y nodulares con una apariencia "aframbuesada". La lengua habitualmente presenta numerosas protusiones carnosas nodulares o hemisféricas que

característicamente salpican la parte anterior y se extienden posteriormente a lo largo de la región lateral. Histológicamente, se trata de lesiones nodulares no encapsuladas constituídas por nervios hipertróficos y elongados con algo de edema. La morfología ha sido relacionada con los neuromas traumáticos o de amputación, aunque la configuración es algo diferente. El término "ganglioneuromatosis mucosa" ha sido utilizado porque estas lesiones pueden representar la punta del iceberg en términos de afectación gastrointestinal, pero debería señalarse que raramente se identifican células ganglionares en estas lesiones mucosas superficiales.

Las manifestaciones oculares de los MEN tipo 2b son suficientemente características. Los párpados pueden encontrarse engrosados o evertidos con nódulos neuromatosos en la conjuntiva y párpados. Ocasionalmente un paciente puede presentar ojos secos o queratoconjuntivitis sicca (102,103). Una de las características clave es la presencia de nervios corneales engrosados dentro de un estroma corneal claro. Los nervios corneales pueden verse engrosados después de manipulación mecánica, inflamación corneal local, y otros trastornos; por tanto la transparencia del estroma puede proporcionar mayor especificidad. Los cambios no son visibles a simple vista, pero el examen con la lámpara de hendidura proporciona una buena visualización. Han sido descritos "neuromas engrosados" alrededor del limbo. Se han observado numerosas células ganglionares en el cuerpo ciliar, en la raíz de iris y en la uvea (102).

El paciente puede presentar un hábito marfanoide con elongación de la cara y un cráneo estrecho (dolicocefalia) y micrognatia (101,105). De la afectación de nervios somáticos o sensitivos o del sistema nervioso autónomo pueden derivarse signos y síntomas neurológicos con denervación y agotamiento muscular, alteraciones pupilares, alteraciones de la sudoración y alteraciones de la motilidad intestinal (104). Han sido descritas multitud de anormalidades esqueléticas incluyendo laxitud de articulaciones, luxación congénita de la cadera, lordosis, cifosis, necrosis asépticas de la espina

lumbar, genu valgo, deslizamiento de la epífisis capital del fémur, coxa valga, pies cabos y dedos del pie en garra (104,105).

La historia natural de la alteración paratiroidea en el MEN tipo 2b no se haya bien definida. En la experiencia de la Clínica Mayo ninguno de los pacientes tuvo evidencia bioquímica de hiperparatiroidismo, y de 73 pacientes revisados en la literatura solamente 3 refieren alteraciones paratiroideas (4%). (105) La mayoría de las descripciones de hiperplasia probablemente representan variantes anatómicas, y no deberían ser consideradas hiperplasia con hiperfunción (106).

Es importante reconocer las manifestaciones gastrointestinales en el MEN tipo 2b, dado que suponen un componente prominente del síndrome y a menudo preceden a las neoplasias endocrinas (107). Los niños en ocasiones pueden ser diagnosticados en el primer mes de vida, incluso en ausencia de antecedente familiar de la enfermedad (108). Los pacientes afectados pueden presentarse precozmente en la vida con anomalías intestinales significativas de la motilidad colónica, incluyendo estreñimiento, pseudoobstrucción intestinal recurrente y borborismos, vómitos proyectivos y una presentación clínica que semeja el megacolon o la diverticulitis. La ganglioneuromatosis afecta a gran parte del tracto gastrointestinal y puede hallarse implicado en los trastornos de la motilidad. También ha sido descrita la presencia de diarrea, pero los productos hormonales segregados por el CMT pueden desempeñar un papel de importancia. La ganglioneuromatosis también ha sido descrita en la vesícula biliar(26) donde puede asociarse con litiasis o con colecistitis alitiásica, y también ha sido descrita en páncreas, glándulas salivares y ganglios simpáticos (105). La proliferación de células ganglionares maduras y de nervios ha sido incluso descrita en la médula suprarrenal y en las proximidades de la cápsula suprarrenal (105). La ganglioneuromatosis consiste en una proliferación hamartomatosa de células de Schwann y células ganglionares dentro de los plexos submucoso y mientérico, la lámina propia, y la serosa. Se ha sugerido que un factor de crecimiento neural puede

desempeñar un papel en la patogénesis, estimulando la proliferación neural. Raramente se ha observado la presencia de poliposis adenomatosa del colon en el contexto de un MEN tipo 2b(109). Resulta interesante señalar que el feocromocitoma también ha sido descrito en asociación con megacolon (110).

Es importante recordar que la ganglioneuromatosis mucosa puede presentarse en pacientes sin MEN tipo 2b. Ha sido descrita en un contexto familiar con poliposis juvenil (111), en asociación con pólipos colónicos múltiples y en poliposis juvenil esporádica. Han sido reconocidos dos patrones morfológicos: transmural que es el patrón que se observa en el MEN tipo 2b y mucoso, que se ha asociado con la enfermedad de Von Recklinghausen, adenocarcinoma de colon, y múltiples adenomas colónicos con megacolon (1 caso) (112). Las manifestaciones gastrointestinales de la enfermedad de Von Recklinghausen han sido descritas en muchas ocasiones, pero solo con rareza la afectación neural semeja una ganglioneuromatosis mucosa (112). Como apunte final los "neuromas" del apéndice (113) y los neuromas traumáticos de la faringe(114) no deberían ser confundida con la ganglioneuromatosis mucosa de los MEN tipo 2b. Las manifestaciones endocrinas de los MEN tipo 2b son también características. El componente mas perniciosos del MEN tipo 2b es el CMT, que a menudo sigue un curso agresivo con metástasis y desenlace fatal (105). En una revisión realizada por Carney (105), el 22% de 69 pacientes murieron del tumor a la edad media de 21 años y se sugirió que la mayoría de los pacientes con CMT morirán a menos que se realice una tiroidectomía total en la infancia. Se ha descrito que la recurrencia del CMT es tres veces más frecuente en MEN tipo 2b que en MEN tipo 2a. La enfermedad de la médula suprarrenal fue evidente en el 34% de los pacientes con MEN tipo 2b con una edad media de 25 años, y el 68% de los feocromocitomas fueron bilaterales (105). Una vez que se ha realizado el diagnóstico de la enfermedad medular suprarrenal (sintomática o asintomática), se recomienda la suprarrenalectomía total bilateral con excisión de cualquier paraganglioma extraadrenal (105).

## Otras supuestas formas de MEN

Han sido descritos una serie de casos habitualmente en forma esporádica, pero ocasionalmente en un contexto familiar, en los cuales se han asociado otros tumores endocrinos, o hiperplasias con feocromocitoma (u otros paragangliomas) (115,116,117) y algunos autores han propuesto que representan síndromes MEN distintivos o variantes de los MEN (115-116). El caso descrito por Gould puede representar una variante de MEN tipo 1 en el que la manifestación inicial fue un hiperaldosteronismo. Un síndrome multiendocrino ha sido atribuído a la secreción plurihormonal de un feocromocitoma que producía no solamente catecolaminas, sino también hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) lo que ocasionó una hiperplasia de células somatotrofas y acromegalia (118). Esta compleja asociación de diferentes tumores endocrinos e hiperplasias plantea la cuestión de si los síndromes MEN tipos 1, 2a, 2b son en realidad entidades monolíticas, inmutables (96). Hay evidencia de que los feocromocitomas familiares existen fuera de los confines genéticos de los MEN tipos 2a y 2b. Si un paciente padece dos o más tumores endocrinos o hiperplasias, este hecho puede arrojar ciertas dudas sobre la especificidad de los síndromes MEN, pero es importante recordar que la superposición de características no implica invariablemente identidad de fundamentos (84). En el caso descrito por Yoshida et al (119) el paciente tenía una enfermedad de Von Recklinghausen, tumor carcinoide duodenal, CMT, y evidencias morfométricas de hiperplasia medular suprarrenal difusa, pero no existían anomalías funcionales de células C del tiroides y no existía patología en paratiroides (119).

### b) Asociación con otras enfermedades hereditarias

Se ha descrito que aproximadamente el 5% de los casos de feocromocitomas se asocian con la enfermedad de Von Recklinghausen (101). De acuerdo con Riccardi (120) la frecuencia de esta asociación es probablemente del 1% o menos, y los feocromocitomas en niños con enfermedad de Von Recklinghausen son virtualmente desconocidos. Se ha estimado que existen 60 millones de personas con hipertensión en

los EEUU, de los cuales el 95% se trata de hipertensión esencial, y existen artículos con un apreciable número de pacientes con feocromocitomas, enfermedad de Von Recklinghausen e hipertensión concurrente. En un estudio 10 de 19 pacientes con neurofibromatosis e hipertensión tenían feocromocitoma(121). También han sido descritos paragangliomas retroperitoneales extraadrenales en pacientes con enfermedad de Von Recklinghausen(121).

Los feocromocitomas también pueden asociarse con la enfermedad de Von Hippel- Lindau, (122,123,124) y el tumor parece ser relativamente frecuente en algunas familias. Horton (122) identificó la presencia de feocromocitomas en el 10% de todos los individuos con la enfermedad, pero existía agrupación en una de las 9 familias estudiadas. Se ha descrito una incidencia del 21% en un estudio de una gran familia con enfermedad de Von Hippel-Lindau (123). Existe un aumento de la incidencia de feocromocitomas bilaterales (123) y rara vez el paraganglioma es de localización abdominal. Los carcinomas de células renales también se producen con una mayor frecuencia en este síndrome y habitualmente se diagnostican en una edad más tardía. Se presume que la lesión precursora es la hiperplasia medular suprarrenal, (124) pero las alteraciones de la médula suprarrenal no se hallan bien caracterizadas en esta enfermedad.

Como ha sido señalado por Glushin no existe todavía evidencia en la literatura de relación entre el feocromocitoma y la esclerosis tuberosa o enfermedad de Sturge-Weber, y esta asociación solo es esperable en función de la existente entre feocromocitoma y enfermedad de Von Hippel-Lindau y enfermedad de Von Recklinghausen. Sherwin (25) refiere un caso de feocromocitoma en asociación con síndrome de Sturge-Weber, pero Neville (145) señala que no existe relación aparente con este síndrome o con la esclerosis tuberosa.

La triada de leiomioma epitelioide gástrico, condroma epitelial y paraganglioma funcionante

Esta es una interesante asociación de tres tumores infrecuentes, de etiología no establecida y de patrón de transmisión mendeliana desconocida(125). Existe una predilección por mujeres jóvenes. Cuando dos de los tres tumores se hayan presentes, se puede hacer un diagnóstico provisional de la "triada" con expresión incompleta, especialmente si los tumores son multicéntricos y existen factores clínicos de soporte(125). Los paragangliomas extraadrenales incluyen PCC, PYT, paraganglioma tiroideo, y PA, que parece ser el más frecuente en la revisión realizada por Carney (125). Ha sido documentada una asociación con mixoma cutáneo. Los feocromocitomas han sido descritos en al menos dos ocasiones, pero son muy infrecuentes. Aunque puede existir un origen adrenal primario, los paragangliomas secretores de catecolaminas son habitualmente periadrenales, y por tanto, una suprarrenalectomía total puede no ser necesaria.

Los tumores gástricos son interesantes en esta triada debido a su peculiar patrón de crecimiento, multiplicidad y apariencia epitelioides. En ocasiones el agrupamiento organoide de las células tumorales recuerda la apariencia de un paraganglioma (126) y esta semejanza podría ocasionar confusión y diagnósticos erróneos. En un estudio ultraestructural, se observó que los tumores presentaban características del músculo liso normal o de tumores del músculo liso con patrones clásicos, mientras que en otro estudio el tumor no mostró evidencia definida de diferenciación hacia músculo liso ni a nivel ultraestructural ni en el estudio inmunohistológico(126).

#### 7) FEOCROMOCITOMAS COMPUESTOS

El término "feocromocitoma compuesto" hace referencia a aquellos tumores en los que existe un componente que semeja neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, o ganglioneuroma(42,127,128). Raramente el tumor ha sido descrito en una localización intraabdominal extraadrenal (127). En la serie de Linnoila (42) 4 de 120 paragangliomas simpatoadrenales fueron clasificados como feocromocitomas compuestos (3%); los 4 tumores asentaban en glándula suprarrenal como una masa solitaria. Algunos casos de

supuestos feocromocitomas compuestos han sido difíciles de evaluar basándose en las microfotografías publicadas mientras que otros artículos esencialmente no incluyen ilustraciones para la documentación. Un caso de feocromocitoma compuesto con ganglioneuroblastoma fue descrito en un paciente con enfermedad de Von Recklinghausen que desarrolló amplias metástasis con una mezcla de ambos componentes(129). Otra forma distintiva de feocromocitoma compuesto pero aún más rara es aquella que contiene un tumor maligno de vaina nerviosa periférica (Schwannoma maligno) (130). En los dos casos descritos en asociación con feocromocitoma no existía historia de asociación con enfermedad de Von Recklinghausen. También han sido descritos Schwannomas malignos puros de la glándula suprarrenal, y esto no debería ser algo inesperado (aunque admitimos que es extremadamente raro), dado la innervación neural de la médula suprarrenal con células de Schwann acompañantes.

El término "feocromocitoma compuesto" incluye tumores que tienen un ancestro embriológico común de la cresta neural. Existen sin embargo raros casos en los que ha sido descrito un adenoma cortical suprarrenal-feocromocitoma mixto (adenoma corticomedular), y un adenoma cortical suprarrenal y feocromocitoma concurrente en la misma glándula (131). También ha sido descrito el desarrollo secuencial de un feocromocitoma y un neuroblastoma del abdomen superior (132) Otros tumores aparentemente mixtos incluyen casos exóticos de carcinosarcoma suprarrenal (133) y un ejemplo único de tumor histológicamente maligno descrito como blastoma adrenocortical(134). Estas raras asociaciones de tumores embriológicamente no relacionados no se incluyen bajo la designación de "feocromocitomas compuestos" aunque en algunas circunstancias la distinción puede ser algo arbitraria.

Los feocromocitomas compuestos pueden presentar una íntima mezcla de patrones histológicos típicos del feocromocitoma y un ingrediente histológico que se aparta significativamente de dichos patrones, oscilando desde una neoplasia de células

pequeñas similar a neuroblastoma y en el seno de una matriz fibrilar a uno con características de ganglioneuroblastoma y un patrón que se une más con el feocromocitoma. De forma infrecuente los feocromocitomas pueden mostrarse como una vaga caricatura morfológica de una célula ganglionar o neuronal. El componente de feocromocitoma es habitualmente el elemento predominante, y presenta las características morfológicas diagnósticas usuales, incluyendo la argirofilia citoplásmica y positividad para marcadores de diferenciación neuroendocrina. Un panel de inmunotinciones puede ayudar a aclarar los focos de elementos neuroblastomatosos.

Muchos de los feocromocitomas compuestos son tumores funcionalmente activos con liberación de un exceso de catecolaminas, pero hay un subgrupo de pacientes muy interesante, aunque raro, que padecen un síndrome de diarrea acuosa (Síndrome de Verner-Morrison), que se haya documentado con mayor frecuencia en ganglioneuroblastomas y ganglioneuromas de la infancia. La capacidad para la síntesis y secreción de péptido intestinal vasoactivo (VIP) ha sido íntimamente asociado con la adquisición de un fenotipo morfológico neuronal o ganglionar (135), pero esta no parece ser una asociación absoluta, dado que morfológicamente algunos feocromocitomas VIP-positivos o bien carecen de células ganglionares o bien estas son muy escasas en número. Bajo ciertas condiciones estudios *in vitro* de cultivos celulares de feocromocitomas humanos también han mostrado una disociación entre la producción de VIP y el sobrecrecimiento de prolongaciones neuronales. Las células cromafines neoplásicas en cultivos pueden exhibir excrecencias neuríticas o prolongaciones celulares, ya sea espontáneamente o en presencia de sustancias estimuladoras tales como el factor de crecimiento nervioso, y las células tipo neurona del feocromocitoma pueden manifestar potenciales de acción de corta duración todo o nada. La existencia de feocromocitomas con características compuestas neurales y endocrinas *in vivo* es un amplio testimonio de la íntima relación morfológica y funcional entre el sistema nervioso y el sistema endocrino. Estudios sobre transplantes seriados de

feocromocitomas en ratas también ha proporcionado evidencia de un tumor que exhibe diferenciación dual hacia feocromocitoma y neuroblastoma, lo cual sugiere un origen común a partir de una célula progenitora de la cresta neural(136).

El comportamiento biológico de los feocromocitomas compuestos no se haya del todo claro dada la relativa escasez de casos publicados y la publicación cuidadosa de casos con seguimiento a largo plazo puede proporcionar información de valor en cuanto al perfil pronóstico de estos raros tumores.

## 8) LOS FEOCROMOCITOMAS EN LA INFANCIA

Los feocromocitomas en la infancia son relativamente infrecuentes, suponiendo aproximadamente un 10% de todos los feocromocitomas. En una revisión de los 100 primeros casos descritos en niños de hasta 15 años, el promedio de edad en el momento del diagnóstico fue de 11 años, con 5 meses de edad en el paciente más joven. Los varones superaban a las mujeres en un cociente de casi 2 a 1 (137). La serie de Kaufman et al (138) incluye un recién nacido que murió a las 36 horas de vida, y en el que en la autopsia se demostró un feocromocitoma bilateral. De forma similar a lo que sucede en los feocromocitomas del adulto la glándula suprarrenal derecha se hallaba afectada con una frecuencia algo superior que la izquierda. El tumor fue solitario en el 68% de los casos y múltiple en el 32% (bilateral, multicéntrico o extraadrenal). Un interesante caso de paragangliomatosis multicéntrica (suprarrenal y extraadrenal) fue descrito en un adolescente en el que fueron extirpados quirúrgicamente 21 paragangliomas entre los 13 y 21 años de edad, existiendo todavía evidencia clínica de paragangliomas adicionales (139). Los paragangliomas en la infancia en este artículo se acompañaron de anomalías congénitas infrecuentes, incluyendo asimetría del lado derecho de la cabeza, tórax, y pelvis, grandes nevos vasculares, alopecia y pezones accesorios(139). En otra larga revisión realizada por Hume (61) el 24% de los feocromocitomas fue bilateral. Kaufman (138) en una revisión de la Clínica Mayo refirió que el 19% de los feocromocitomas fueron bilaterales.

Además de un aumento de la incidencia de bilateralidad, la incidencia de multicentricidad es también significativa en comparación con los adultos. Otro ejemplo infrecuente de feocromocitoma ha sido asociado con un paraganglioma cervical separado. La localización intratorácica paravertebral de los paragangliomas también ha sido descrita. Aproximadamente el 10% de los niños con feocromocitoma tienen antecedentes familiares de tumores, aunque algunas series la incidencia es considerablemente más alta: 30% (138) a 50% (140), lo cual puede ayudar a explicar la alta incidencia de bilateralidad en algunas series, aunque en algunos artículos no se haya claro el contexto familiar. La incidencia del comportamiento maligno es probablemente similar a la de los adultos, siendo la mayoría de los tumores clínicamente malignos de localización extraadrenal. Solamente 2 de los 85 niños con feocromocitoma revisados por Hume (61) tuvieron metástasis documentadas (2,4%) pero una proporción significativa eran de localización extraadrenal.

#### 9)"PSEUDOFEOCROMOCITOMAS"

El término "pseudofeocromocitoma" es utilizado en aquella inusual circunstancia en la que un paciente presenta signos y/o síntomas de feocromocitoma pero en la exploración quirúrgica no se observa ningún tumor. No se incluyen los casos donde el tumor funcionante es pequeño y asienta en un área anatómica de difícil investigación (e.g., paragangliomas funcionantes cardiacos). La HMS también debe ser considerada en esta situación. En ocasiones las manifestaciones clínicas pueden acompañarse de alteraciones bioquímicas en los niveles de catecolaminas o en sus metabolitos. Lesiones anatomopatológicas asociadas con signos y/o síntomas de feocromocitoma incluyen el mielolipoma suprarrenal, quistes renales, coartación de la aorta abdominal, fibrosarcoma de la arteria pulmonar, e incluso astrocitomas. Rara vez un paciente puede desarrollar síntomas que semejan los del feocromocitoma tras la ingestión de carne de cerdo, pero los mecanismos se hayan pobremente definidos. La intoxicación aguda con mercurio también puede semejar un feocromocitoma (142). La

administración subrepticia de epinefrina u otros agentes pueden producir manifestaciones clínicas similares. Los feocromocitomas que producen exclusivamente epinefrina se consideran raros.

## 10) COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE LOS FEOCROMOCITOMAS

### a) Incidencia de malignidad

La incidencia de feocromocitomas clínicamente malignos varía de unas series a otras, y hay que ser cauteloso en la evaluación de estudios que incluyen paragangliomas extraadrenales junto con feocromocitomas, dado que estos tumores tienden a presentar una incidencia de comportamiento maligno significativamente más alto. En una revisión de 283 feocromocitomas, Symington y Goodall (143) identificaron solamente 7 tumores malignos (2,5%). Una incidencia de malignidad prácticamente idéntica fue descrita por Melicow (38) (2,4%) en una serie que incluía 83 feocromocitomas. Hume (61) revisó 626 feocromocitomas descritos en la literatura mundial refiriendo que el 2,8% de los tumores fueron malignos en adultos y el 2,4% en niños. Algunas de estas revisiones precoces deben ser observadas con ciertos elementos de cautela dado que algunos tumores pueden demostrar su malignidad transcurrida una década incluso más desde el diagnóstico. Scott y Halter (144) en un estudio de 69 pacientes con feocromocitoma identificaron 9 pacientes con tumores clínicamente malignos tras "estrecho seguimiento" (13%), pero debería señalarse que 5 de los tumores malignos fueron de localización extraadrenal (45% de la malignidad) frente a 4 de 43 primarios de suprarrenales (9,3%). Neville et al (145) estimaron una incidencia de malignidad en los feocromocitomas próxima al 1%, dado que existía una tendencia a publicar casos de feocromocitomas malignos con mayor frecuencia que tumores benignos; esto es aplicable fundamentalmente a la publicación de casos individuales o de pequeñas series descritas en la literatura inicial, dado que la mayoría de los estudios muestra una incidencia de malignidad como sigue: 7% (30), 8% (66),

12% (34), 13% (33) y 14% (34). Así mismo no debe confundirse en las publicaciones más antiguas el índice de mortalidad intra o perioperatorio con la malignidad clínica, dado que algunos recogen un índice de mortalidad próximo al 25% (147). El manejo quirúrgico de estos tumores ha alcanzado un alto nivel basado en gran parte en la exactitud del diagnóstico preoperatorio y en la preparación farmacológica previa a la cirugía.

### **b) Morfología de los feocromocitomas malignos**

La morfología de los feocromocitomas clínicamente malignos es suficientemente similar a la de los tumores benignos, así que la distinción entre ambos basándose estrictamente en la evaluación macroscópica e histológica resulta notoriamente difícil y en casos individuales puede llegar a ser virtualmente imposible (26). Grandes tamaños tumorales han sido descritos en asociación con tumores clínicamente malignos (33,36,42) pero existe tal solapamiento con los feocromocitomas benignos que esta característica aisladamente ofrece poco como valor pronóstico. En el estudio realizado por Medeiros et al (36) un menor tamaño celular, una extensa necrosis confluyente junto con grandes pesos tumorales se asociaban con mayor frecuencia con tumores clínicamente malignos. Sherwin (25) refiere que un componente fusocelular parece ser una característica de muchos de los feocromocitomas invasivos. Algunos autores han establecido que los patrones histológicos de los feocromocitomas benignos y malignos se superponen hasta tal extremo que el único criterio aceptable de malignidad es la presencia de auténticas metástasis en lugares donde normalmente no existe tejido cromafín no neoplásico (145).

En un estudio de un elevado número de paragangliomas simpatoadrenales realizado en el NCI las características que se señaló que se asociaban con mayor frecuencia a tumores de malignidad clínica demostrada fueron las siguientes: 1) Grandes pesos tumorales (383 versus 73 gr para los paragangliomas benignos), 2) Contajes mitóticos altos (promedio de 3 por 30 campos de gran aumento versus 1 por

30 hpf en tumores clínicamente benignos), 3) Aumento de la incidencia de necrosis (32% versus 6% en tumores benignos) y 4) Extensa invasión local o invasión vascular (32% versus 11% de los tumores benignos)(42). Utilizando un modelo estadístico multivariable, solo 4 variables tuvieron correlación significativa con el comportamiento maligno: localización extraadrenal, nodularidad grosera del tumor primario, necrosis tumoral confluyente y la ausencia de glóbulos hialinos (42). Dos características señaladas con mayor frecuencia en tumores benignos fueron la presencia de células con características neuronales o ganglionares (22% versus 6 % de tumores malignos ) y un gran porcentaje de tumores con glóbulos hialinos (59% versus 32% de tumores malignos) (42). También existía una disminución de la expresión de neuropéptidos en los tumores clínicamente malignos mediante el uso de inmunohistoquímica; de 10 neuropéptidos examinados, los tumores malignos expresaron un promedio de 2 por tumor comparado con 5 para los tumores benignos(148).

### **c)Pronóstico y patrones de diseminacion**

La supervivencia a los 5 años en pacientes con feocromocitomas malignos es del 44% (33) al 53% (34) . En algunos casos la latencia hasta la documentación del comportamiento maligno y la muerte puede ser bastante larga y algunos autores han aconsejado un seguimiento preceptivo de por vida en aquellos pacientes con feocromocitoma(144). La malignidad puede manifestarse por extensa invasión locorregional con afectación de órganos y tejidos adyacentes. Los patrones metastásicos se reflejan en una diseminación tanto hematógena como linfática, con afectación del hígado, ganglios linfático ,pulmones y hueso. Rara vez una metástasis osteolítica aislada puede ser la manifestación inicial de un feocromocitoma maligno.

### **B)Paragangliomas aortosimpáticos extraadrenales (PAE) (3)**

1) Distribución anatómica: los FE suponen del 5 al 10% de todos los PSA. De ellos el 85%(146) son intraabdominales (45% paraaórtico superior, 30% paraaórtico inferior y 10% de vejiga urinaria). Sólo el 12% son intratorácicos y el 3% cervicales.

Lo expuesto a continuación hace referencia (salvo indicación expresa) a los FE intraabdominales.

2) Características clínicas: Pueden ocurrir a cualquier edad pero con mayor frecuencia lo hacen entre la 3ª y 5ª décadas. No existe predilección sexual clara, aunque se observa discreto predominio de varones en algunas series. La clínica relacionada con el exceso de secreción de catecolaminas se constata en el 25 al 86% de los pacientes. En algunos pacientes asintomáticos es un hallazgo de autopsia. Dependiendo del tamaño y localización del tumor puede presentarse por dolor, masa tumoral, obstrucción ureteral, hematuria, ictericia obstructiva o hemorragia retroperitoneal. Rara vez la presentación es por metástasis óseas.

3) Aspecto macroscópico: Suelen ser tumores únicos, especialmente en adultos, aunque ocasionalmente son múltiples. El tamaño medio oscila alrededor de los 10 cm (4 a 24 cm). El aspecto macroscópico es similar al de los FS.

4) Aspecto microscópico: (3). El patrón más característico es el trabecular con cordones anastomosados de células tumorales. Algunos pueden tener un patrón difuso o alveolar. En la mayoría de los casos no es posible, a partir de la arquitectura o citología del tumor, establecer el origen suprarrenal o extraadrenal del mismo. Puede existir un pleomorfismo nuclear marcado e incluso ocasionales figuras de mitosis, pero estos y otros hallazgos histológicos no permiten predecir el comportamiento maligno del tumor. La presencia de glóbulos hialinos intracitoplasmáticos es menos frecuente que en FS. La vasculatura es prominente y puede plantear el diagnóstico diferencial con procesos vasculares. Ocasionalmente, se advierten nervios dentro o adyacentes al tumor y no implica malignidad. Existen formas compuestas (paraganglioma-ganglioneuroma) y pigmentadas (neuromelanina) de estas neoplasias.

5) Incidencia de malignidad (3): Dentro del SNSA son tumores más agresivos con una incidencia de malignidad oscilante entre el 14 y el 50 %. La forma de diseminación y el patrón de metástasis es similar a la de los FS.

6)PAE de otras localizaciones: Muchos órganos pueden ser asiento de PAE, incluyendo vejiga (5% de malignidad), riñón, uretra, próstata y cordón espermático, aparato genital femenino, etc. Las características morfológicas son similares a las de los tumores homólogos de otras localizaciones.

los PAE torácicos son raros, funcionantes en el 50% de los casos y con predilección por varones con edad media de 29 años. Existen casos familiares. El aspecto morfológico es similar al de otras localizaciones y la incidencia de malignidad varía entre el 7 y e 13% de los casos. Los PSA cervicales son excepcionales.

## **V) CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUCTURALES E IHQ DE LOS PSA:**

**A) Hallazgos ultraestructurales (1):** Actualmente ha perdido valor para el diagnóstico rutinario de los paragangliomas. Los PSA se hallan compuestos por células principales, ovoides o poligonales, con núcleo central, formando nidos compactos. Aunque uniones celulares tipo desmosomas han sido descritas en numerosos casos, todas carecieron de tonofilamentos. Probablemente se trate de uniones estrechas modificadas. En algunos tumores han sido descritas filamentos intermedios y agregados filamentosos. Con menor frecuencia se ha observado glucógeno intracitoplásmico, cuerpos lamelares polisómicos e incluso inclusiones nucleares. Un hallazgo constante, necesario para el diagnóstico es la presencia de gránulos de neurosecreción. Estos gránulos son ligeramente más pleomórficos en tumores que en estructuras no neoplásicas, y de tamaño algo mayor, de 40 a 400 nm. Aunque existen ciertas diferencias morfológicas entre los gránulos que contienen adrenalina y noradrenalina, no siempre es posible una correlación entre la morfología del gránulo y su contenido (hormonal o neuropeptídico).

Análisis bioquímicos han mostrado que los paragangliomas extraadrenales contienen predominantemente NA, careciendo del enzima feniletanolamida N-metiltransferasa(3).

**B) Hallazgos inmunohistoquímicos (3):**

1) Marcadores neuroendocrinos y S-100: Una amplia variedad de péptidos y hormonas pueden ser localizados inmunohistoquímicamente. En un estudio del NCI (148) sobre 99 PSA, todos fueron positivos para enolasa neuronal específica. Otros marcadores neuroendocrinos frecuentemente positivos en PSA son: cromogranina A y B, secretogranina II, sinaptofisina (aunque algunos tumores corticales pueden ser positivos), Leu-7, PGP, citocromo B 561, y Leu-encefalina (positiva en 50 a 75% de PSA). El método más sensible para la identificación de células sustentaculares es la inmunotinción para la proteína S-100.

2) Síndromes endocrinos asociados y otras características: los PSA son capaces de expresar una amplia variedad de hormonas y neuropéptidos. Inmunotinción para Leu-encefalina y Met-encefalina fue observada en 3/4 partes de los casos del estudio del NCI(148). Sin embargo, no suelen existir manifestaciones clínicas relacionadas con hormonas o neuropéptidos, con excepción de las catecolaminas. En el estudio del NCI(148) el 28% de los PSA fueron positivos para ACTH, sin embargo raramente producen síndrome de Cushing. Tinción similar a la del ACTH también ha sido observada en médula suprarrenal normal.

El síndrome de Verner-Morrison ha sido observado en asociación con feocromocitomas y atribuido a la secreción de VIP. En el estudio del NCI(148) el 43% de los PSA fueron positivos para el VIP, a pesar de que ninguno de los pacientes presentó manifestaciones clínicas relacionadas con el VIP. También se ha observado hipercalcemia en relación con feocromocitomas, y en algunos casos ha sido atribuida a la producción de hormonas similares a la PTH o calcitonina. Otras características infrecuentes asociadas con feocromocitomas son policitemia debida a la producción de eritropoyetina, diarrea y esteatorrea secundarias a la producción de somatostatina e incluso la secreción de GhRF.

3) Otras sustancias inmunoreactivas: alanina, renina, polipéptido natriurético atrial,

factor de crecimiento similar a la insulina, MAP-2, N-cam y HMB-45.

4) Filamentos intermedios: se ha observado inmunotinción para neurofilamentos en una elevada proporción de PSA. También se ha comunicado positividad para vimentina en algunos PSA, al igual que citoqueratina.

5) Significación pronóstica de la inmunohistoquímica. Los PSA malignos tienden a tener un número de células S-100 positivas reducido, aunque su presencia o ausencia no constituye un criterio definitivo para predecir el comportamiento biológico (150). Los PSA clínicamente malignos expresan menos neuropéptidos que los benignos, aunque el espectro de inmunotinción es similar (148).

## VI) CITOMETRÍA DE ADN

La citofotometría es una técnica para la determinación de las proporciones relativas de ciertas sustancias en células y tejidos, y representa una aproximación independiente de la morfometría, que proporciona un análisis cuantitativo de las características estructurales y geométricas (151). La determinación citofotométrica de masas está basada en la correlación existente entre la absorción de ondas luminosas (fotometría de absorción) o la intensidad de fluorescencia (fotometría de fluorescencia) y el contenido de la sustancia respectiva. Para ellos, las sustancias deben ser teñidas específicamente con los productos químicos apropiados y para una cuantificación intracelular exacta es necesario que la reacción sea estequiométrica.

### 1. PRINCIPIOS TÉCNICOS

En la **citometría estática** (o *citometría de absorción*), la intensidad de luz proyectada a través del objeto investigado, es absorbida por ciertas sustancias presentes en la muestra. En patología tumoral, se utiliza para cuantificar sustancias en el rango espectral de su absorción específica (fotometría microscópica) y se realiza más factiblemente en el rango visible, donde la absorción irregular es fácilmente reconocible (152).

Un requisito decisivo de la fotometría de absorción es la validez de la ley de Ber-Lamber:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} c d$$

La absorbancia ( $E_{\lambda}$ ) es un parámetro adimensional que, en caso de permanecer constante la longitud de onda ( $\lambda$ ) y el espesor de la muestra ( $d$ ), es directamente proporcional a la concentración de la tinción ( $c$ ). El coeficiente de absorbancia molar ( $\epsilon_{\lambda}$ ) representa un factor de proporcionalidad (constante para una determinada longitud de onda) y permite calcular la concentración absoluta de la sustancia.

Los errores potenciales de medida pueden ser secundarios al objeto medido, especialmente una falta extrema de homogeneidad de la cromatina, o al aparato de medida.

En **citometría de flujo** (o *citometría de fluorescencia*), la estimulación es debida a la absorción de fotones. De acuerdo con la ley de Stokes, la longitud de onda de la luz emitida supera al de la excitación absorbida, ya que parte de la energía se transforma en calor. La intensidad de la luz emitida ( $F$ ) es directamente proporcional a la energía luminosa absorbida ( $I_0 - I$ ), por lo que mantiene conexión con el método de absorción:

$$F = (I_0 - I) Q$$

donde "Q" es el coeficiente de proporcionalidad entre los cuantos emitidos y absorbidos. De acuerdo con la ley de Ber-Lamber, la intensidad puede expresarse como

$$I = I_0 e^{-c d \epsilon_{\lambda}}$$

por lo que la intensidad de luz emitida puede reformularse como

$$F = I_0 - [I_0 e^{-c d \epsilon_{\lambda}}] Q = [1 - e^{-c d \epsilon_{\lambda}}] I_0 Q$$

Así pues, existe una correlación exponencial entre la intensidad de fluorescencia ( $F$ ) y la concentración ( $c$ ).

Las medidas de fluorescencia difieren principalmente de los de absorción en su mayor sensibilidad. A diferencia de la fotometría de fluorescencia, en la que con una única medida se determina la intensidad, la absorbancia se calcula en dos valores de intensidad  $I$  e  $I_0$ , ambas con su correspondiente error de medida.

Los citómetros de flujo son, fundamentalmente, aparatos contruidos para medir fluorescencia. Las medidas de fluorescencia son normalmente llevadas a cabo sobre partículas (células o núcleos), teñidas con un fluorocromo apropiado, que fluyen a través de una fuente de excitación. El nivel de fluorescencia de las células teñidas es capturado por un tubo fotomultiplicador y convertida digitalmente en un pulso electrónico. La precisión de las medidas de fluorescencia se basa en que las células o partículas pasan delante de una fuente de excitación dentro de un flujo laminar que las va alineando individualmente, teniendo todas la mismas posición al pasar por dicha fuente. La fuente de excitación puede ser tanto una lámpara de xenón-mercurio o un láser. El láser, normalmente de argón, emite una luz monocromática con una longitud de onda entre 450 y 514 nm, suficiente para excitar a la mayoría de los colorantes fluorescentes utilizados en el análisis de los componentes celulares. Para células teñidas con dos o más fluorocromos (citometría de flujo multiparamétrica), se usan unos espejos ópticos dicrómicos para separar los distintos colores de la luz en dos o más longitudes de ondas que se recogen en dos o más fotomultiplicadores. A parte de la fluorescencia, se pueden medir el tamaño y la complejidad interna de las células o partículas mediante las desviaciones de los fotones al incidir sobre ellas (153,154).

Una gran limitación de la citometría de flujo es la imposibilidad de identificar morfológicamente los objetos medidos; especialmente notable en poblaciones celulares heterogéneas. Así, por ejemplo, en el estudio de una población tumoral de un tumor sólido, se incluirán -a parte de las células tumorales- células del estroma e inflamatorias, entre otras. Una forma de solventar este problema de alguna manera, es

la separación (“sorting”) de las poblaciones celulares según sus características fluorescentes(153,154). Esto se consigue haciendo que el fluido forme gotitas con células de determinadas características que, posteriormente, serán cargadas electrostáticamente. Las gotas cargadas son deflectadas en vasos colectores por un campo electrostático. No obstante, esta es una técnica difícil y lenta que no se puede aplicar rutinariamente a muestras clínicas.

## 2. PRINCIPIOS BIOLÓGICOS

Los estudios citogenéticos sugieren que los cambios cromosómicos son factores determinantes en la oncogénesis. Casi todas las neoplasias malignas presentan aberraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales, primarias o secundarias (las últimas ocurridas en el curso de la progresión tumoral).

La inicial inestabilidad genética se sigue de un proceso selectivo que conduce a la formación de clones celulares, mejor dotados para la proliferación o la invasión y que muestran la misma -o escasamente diferente- aberración cromosómica.

El número modal es el número más común de cromosomas que se encuentran en una población celular neoplásica y se expresa como ploidía cromosómica. Las aberraciones numéricas que se manifiestan como múltiplos del set normal de cromosomas se conocen como *poliploidía*, y aquella con desviaciones irregulares como *aneuploidía*. Los tumores malignos que presentan un número de cromosomas que oscila alrededor del valor diploide se conocen como *peridiploides*, mientras que aquellos que muestran un cariotipo con un número normal de cromosomas y aberraciones estructurales se conocen como *pseudodiploides*.

Metodológicamente, la ploidía cromosómica debe distinguirse de la ploidía de ADN, cuyo estudio proporciona información de la cantidad de ADN nuclear global, sin

excluir la existencia de múltiples aberraciones cromosómicas diferentes, estructurales o numéricas. Normalmente, se expresa en forma de *índices de ADN* que se define como la relación entre el contenido de ADN de la población tumoral y el de la población diploide control. Por definición, las células no proliferantes con un contenido de ADN diploide (referido como  $2c$ ) tienen un índice de ADN de 1.0 (152,155).

### a) Cinética del ciclo celular

Las cuatro fases principales del ciclo celular se conocen como  $G_1$ , S,  $G_2$  y M. Las células diploides no replicativas se dice que están en fase  $G_0$  o  $G_{1Q}$  del ciclo celular, tienen el mismo contenido de ADN ( $2c$ ), ya que el ADN está contenido en pares de cromosomas ( $2n$ ). El intervalo entre el inicio del ciclo proliferativo y el inicio de la síntesis de ADN define la fase  $G_1$ ; en la fase S o de síntesis de ADN, el contenido de ADN se dobla a  $4c$ , permaneciendo en este valor durante las subsecuentes fases de  $G_2$  y mitosis (fase M) (156).

El estado quiescente, descrito como  $G_0$  o  $G_{1Q}$ , se caracteriza por un contenido de ADN de  $2c$  y un bajo contenido de ARN. El inicio del ciclo celular (fase  $G_1$ ) viene marcado por el incremento progresivo del contenido de ARN a través de las fases  $G_{1T}$  (de transición),  $G_{1A}$  y  $G_{1B}$ , aunque siempre menor que el que aparece en la fase S. El contenido de ARN se incrementa linealmente durante las fases S y  $G_2$  (156;157).

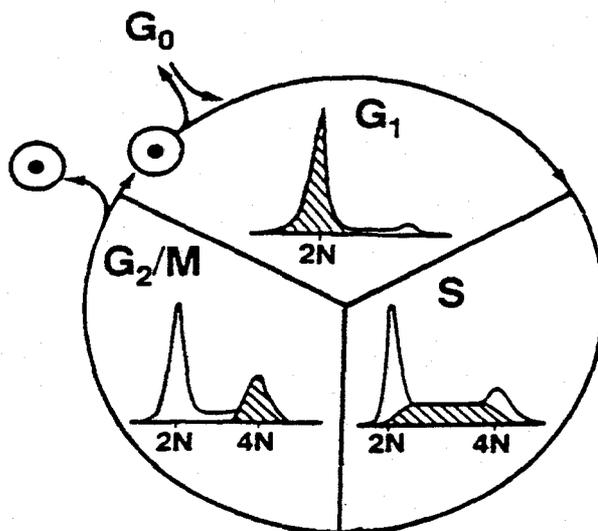
En las fases de crecimiento exponencial, las células pasan por las fases  $G_1$ , S,  $G_2$  y M, para entrar nuevamente en  $G_{1A}$ . Si las células no se replican durante un período largo de tiempo, éstas tienden a revertir a  $G_{1Q}$  y, si las células están privadas de nutrientes o están expuestas a bajas temperaturas o inhibidores de la síntesis de proteínas, entran transitoriamente en fases con bajo contenido de ARN, conocidas como " $S_Q$ " y " $G_{2Q}$ ", frecuentes en los crecimientos neoplásicos (156).

El porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular permite valorar el comportamiento proliferativo de una población celular, con lo cual podría estimarse la fracción de crecimiento de una neoplasia. Una forma fácil de expresarlo es la siguiente (155):

$$\text{Índice de proliferación(\%)} = [(S + G_2 + M) / (G_0/G_1 + S + G_2 + M)] \times 100$$

### b) Interpretación de los histogramas de ADN

Los histogramas uniparamétricos de ADN reflejan la distribución de frecuencia de contenido de ADN de los núcleos medidos. El análisis de ADN de los tejidos normales proporcionará un histograma, que muestra: a) un pico correspondiente a las células en fase  $G_0/G_1$  del ciclo mitótico, y que representa aproximadamente el 90% de las células de la población; b) un segundo pico, correspondiente a las células en fases  $G_2$  y  $M$ ; y, c) una meseta entre ambos picos, que representa a las células en fase  $S$ . Los dos últimos grupos, en general, no representan más del 10% de las células de la población (157,158). En el siguiente dibujo se puede apreciar la porción del histograma que representa a cada una de las distintas fases del ciclo celular en una población diploide :



Los picos  $G_0/G_1$  y  $G_2+M$  se distribuyen matemáticamente según distribuciones normales con medias en  $2c$  y  $4c$  (relación  $G_2+M / G_0/G_1$  en el rango 1.9-2.1), mientras que las células en fase S se distribuyen según una distribución mesonormal (158).

Según los criterios sugeridos por la Convención de la Nomenclatura para la Citometría de ADN, «el diagnóstico de aneuploidía de ADN debería ser comunicado cuando se demuestran al menos dos picos separados  $G_0/G_1$ » y «la presencia de más de un pico definido es el único criterio aceptable de la existencia de una población celular/nuclear aneuploide» (159). Sin embargo, para otros autores la presencia de un pico  $G_0/G_1$  que no corresponde con la referencia diploide es criterio suficiente para clasificar la proliferación como aneuploide (155).

La clasificación de una proliferación tumoral según su contenido de ADN exige la identificación de poblaciones clonales que, arbitrariamente, se identifican por un pico  $G_0/G_1$  -que constituye al menos el 10 % de las células medidas- y por la existencia de un pico  $G_2+M$  con doble contenido del anterior. A partir de los índices de ADN se pueden clasificar las poblaciones tumorales como se refleja en la tabla siguiente:

| INDICE DE ADN                              | POBLACIÓN SEGUN PLOIDÍA  |
|--|--------------------------|
| 0.95-1.10                                  | Diploide                 |
| $\neq$ (0.95-1.10)                         | Aneuploide               |
| < 0.95                                     | Hipodiploide             |
| 1.10-1.90                                  | Hiperdiploide            |
| 1.90-2.20                                  | Tetraploide (poliploide) |
| >2.20                                      | Hipertetraploide         |
| $\geq 2$ índices de ADN $\neq$ (0.95-1.10) | Multiploide              |

El término *poliploidización* de ADN se aplica a las circunstancias en las que el pico  $G_2+M$  de una población celular representa al menos el 15% de las células medidas y cumple los requisitos para constituir, por sí mismo, una subpoblación clonal (159).

Por otro lado, cada uno de los picos  $G_0/G_1$  posee un coeficiente de variación (CV) definido por el cociente entre la desviación típica y la media del pico correspondiente, o bien puede ser calculado gráficamente como la mitad de la amplitud del pico (en canales) cuando la altura es 0.6 veces la máxima (si la media y la moda de la población pueden ser asumidas como equivalentes), o como la anchura del pico a la mitad de su altura máxima dividido por 2.35. Ambos métodos están afectados por dos parámetros estadísticos de la distribución de la población: la curtosis y el sesgo (desviación de la moda respecto a la media).

Los CVs pueden ser tumor- y órgano-específicos; y tienden a ser significativamente mayores en los tumores sólidos que en las neoplasias hematopoyéticas (leucemias/linfomas) (160). La amplitud de los mismos también puede indicar heterogeneidad biológica e inestabilidad genética, que requiera medida de ADN en muestras tumorales de otras localizaciones (161). Además, histogramas de ADN con amplios CVs pueden enmascarar líneas celulares aneuploides situadas próximas al rango diploide. En general, CVs >5-8% en citometría de flujo y >8-10% en citometría estática tienden a clasificarse como “amplios” e ininterpretables, aunque valores tan altos como del 12 a 15% han sido considerados aceptables (157).

La resolución de un estudio de citometría de ADN queda, pues, determinada por la amplitud de los CVs y por el porcentaje de núcleos aneuploides (161).

Vindeløv y Christensen (162) han apuntado recientemente que «la interpretación de histogramas complicados depende fuertemente de la inspección visual y por ello del juicio subjetivo de los investigadores individuales». De difícil interpretación son :

- 1) Los histogramas con picos únicos  $G_0/G_1$  y CVs amplios, que se clasifican, en la mayoría de los casos, como “sospechosos”. Por el contrario, los

histogramas con picos  $G_0/G_1$  asimétricos o con picos extra pequeños son a menudo clasificados como aneuploides.

2) Los histogramas que presentan una fase S discontinua, que a veces se clasifican como aneuploides. Típicamente, la proporción de células en fase S disminuye a lo largo de la misma y es posible que sólo reflejen pérdida preferencia de células en fase S durante la preparación de la muestra.

3) Los picos bifásicos, con CVs amplios ( $>1.5-2$  CV del pico  $G_0/G_1$ ) o asimétricos en la región  $G_2+M$ , que son habitualmente interpretados como aneuploides, incluso en los casos con asimetría ligera y en ausencia de una población aneuploide  $G_2+M$  en el rango de  $8c$ .

4) Poblaciones en el rango  $G_2+M$  con una relación  $G_2+M / G_0/G_1$  fuera del rango 1.9-2.1, que pueden representar tinción no estequiométrica o que la detección no fue lineal. En estos casos, la utilización de controles (p.ej., eritrocitos de pollo) y una relación lineal en la detección de dobletes y tripletes permite la clasificación certera como aneuploides, incluso de picos pequeños.

5) Casos con múltiples subpoblaciones aneuploides, en los que la relación  $G_2+M / G_0/G_1$  puede ser utilizada para demostrar inequívocamente que poblaciones hipertetraploides representan la fracción  $G_2+M$  de los componentes aneuploides.

### c) Significado biológico de la aneuploidía

Ya que el contenido total de ADN nuclear en la fase  $G_0/G_1$  del ciclo celular es proporcional al número medio de cromosomas, con la citometría de ADN puede obtenerse una estimación de los cambios numéricos en los cromosomas de las células neoplásicas, si bien no proporciona información específica de la aberración estructural o numérica (163). La resolución de los citómetros actuales permite resolver dos poblaciones celulares en  $G_0/G_1$  sólo si existe, al menos, una diferencia en el contenido de ADN del 4%. Por tanto, la pérdida de un cromosoma no se detecta normalmente por esta técnica (157). A pesar de la naturaleza global de la información del contenido

de ADN, existe una creciente evidencia de una correlación entre la aneuploidía de ADN y la agresividad biológica de los tumores sólidos (164, 165, 160, 156). Los estudios del contenido de ADN han demostrado cantidades anormales en, al menos, las tres cuartas partes de los carcinomas humanos (Johnson y cols, 1988), con una amplia heterogeneidad en las características celulares, lo que ha permitido un incremento en la probabilidad de detectar células neoplásicas y de identificar subtipos celulares.

La asociación entre la ploidía de ADN y el comportamiento biológico de los tumores puede explicarse por una relación directa entre la ploidía de ADN y el grado de reordenamiento del genoma de la célula tumoral, que, en último término, interferiría con el funcionamiento apropiado de los programas normales de diferenciación celular y de control de la proliferación (166, 167, 163). Esta visión, sin embargo, no discrimina entre los acontecimientos genéticos específicos implicados en la iniciación y progresión tumorales y los cambios secundarios al incremento de inestabilidad genética sin efecto fenotípico (163). La aneuploidía de ADN y las anomalías cromosómicas -estructurales o numéricas- subyacentes pueden ser evidencia de la inestabilidad genética que se produce durante el desarrollo tumoral. Aunque a la inestabilidad genética se le atribuye un papel central en la evolución clonal de los tumores, los mecanismos implicados son poco conocidos (168) y no se sabe cómo esta inestabilidad da lugar a líneas celulares tumorales estables que mantienen el mismo nivel de ploidía de ADN en las metástasis, incluso después de años. Se ha propuesto que la condición esencial para el establecimiento de líneas aneuploides en una población celular genéticamente inestable es el desarrollo previo de anomalías cromosómicas estructurales promotoras de la proliferación (169).

La pérdida de material genético puede, además, intervenir en el desarrollo de neoplasias, por Delección de genes supresores de neoplasia que alterarían la regulación del crecimiento celular (170).

Indiscutiblemente, la citometría de ADN se está aplicando de forma creciente para el estudio y comprensión del comportamiento tumoral. La Academia Internacional de Citología junto con la Sociedad Americana de Citología organizó en Chicago una Reunión Internacional sobre “Computerized Cytology and Histopathology Laboratory” en marzo de 1990. Uno de los principales acuerdos de dicha reunión fue crear un “Task Force” para la estandarización de los *métodos de cuantificación en patología diagnóstica*. El “Task Force” diferencia la utilización de la citometría de ADN para “Diagnóstico de Neoplasia”, “Grado de Malignidad” y “Monitorización Terapéutica”. Así mismo, se estableció que, por el momento, la citometría de ADN es el método de cuantificación diagnóstica recomendable para la rutina clínica. Las razones para ello son las siguientes:

- 1.- La citometría de ADN se apoya en bases teórico-biológicas de citogenética tumoral.
- 2.- El método está suficientemente estandarizado y es reproducible.
- 3.- Se dispone en el mercado de una amplia gama de aparatos de citometría estática y de flujo, fácilmente utilizables.
- 4.- Se han desarrollado algoritmos de interpretación objetivos.
- 5.- Existen suficientes estudios que confirman la validez de la citometría de ADN como método diagnóstico y de estimación pronóstica para la mayoría de los tumores.

## VII) ESTUDIOS CITOMÉTRICOS DE PLOIDÍA DE ADN APLICADOS AL ESTUDIO DE FEOCROMOCITOMAS

El número de artículos con estudios citométricos para la determinación de la ploidía de ADN en feocromocitomas o paragangliomas es relativamente elevado. Sin embargo, los que utilizan citometría de flujo en paragangliomas simpatoadrenales son menos

numerosos. Y dicho número se reduce aún más si consideramos que con frecuencia un mismo grupo de estudio es responsable de varios artículos sobre el tema.

La mayor parte de los trabajos incluyen tanto feocromocitomas suprarrenales como extraadrenales (aortosimpáticos), dado que no existen diferencias significativas en el patrón de distribución de ADN entre unos tumores y otros (171, 172, 173, 174, 175), aunque algunos artículos señalan una menor frecuencia de patrones anómalos de ploidía en tumores adrenales que extraadrenales (64% versus 82%) (176). La situación es diferente respecto a los paragangliomas parasimpáticos (177).

Los parámetros citométricos más utilizados hacen referencia a la ploidía de ADN en función del índice de ADN, siendo escasos los artículos en los que se realiza un estudio detenido de las diferentes fases del ciclo celular (178, 179, 180, 181), aunque no se trata de parámetros del todo independientes.

Aunque la metodología y criterios empleados (citometría estática o de flujo, criterios de clasificación de los histogramas, criterios de malignidad, tiempo de seguimiento, etc) no son del todo uniformes, sí es posible en la mayoría de los casos realizar comparaciones entre los resultados obtenidos en los diferentes artículos.

Los patrones citométricos de distribución del ADN han sido correlacionados con múltiples variables clínicas y biológicas, destacando sobre todas ellas, por su trascendencia práctica, las dependientes del comportamiento biológico y del pronóstico de este tipo de neoplasias. Los resultados a este respecto han sido con frecuencia contradictorios y motivo de controversia.

Los patrones nucleares de ploidía de ADN han sido estudiados tanto en glándula suprarrenal normal (incluyendo médula) como en hiperplasias de médula suprarrenal y en neoplasias (feocromocitomas o paragangliomas). La mayoría de los autores señalan un patrón diploide de ADN tanto en médula suprarrenal normal (176, 179, 182, 183) como hiperplásica (10, 184). Tan solo en un artículo se observa un patrón aneuploide (DI: 1,6) en tejido adrenal normal (adyacente a carcinoma renal),

postulando los autores “una transformación tumoral no identificable morfológicamente en el momento del análisis” (178). Es importante el % medio de células en fase G2M en glándulas normales, ya que constituye la base para la posterior clarificación de los histogramas (diploide versus tetraploide). Dichos valores medios (+/- DS) han sido similares en dos estudios: 8,32 +/- 1,96 (173) y 8,22 +/- 1,94 (176) oscilando entre el 1 y 9 % en otro (183).

Los patrones citométricos aneuploides de distribución de ADN, considerados globalmente, en estudios que incluyeron feocromocitomas simpatoadrenales (FSA), han oscilado entre el 20% (185) y el 88% (184, 186). En la mayoría de los artículos las cifras de aneuploidía de ADN oscilan entre el 60% y el 70% (171, 172, 176, 178, 183, 187, 188, 189) siendo menos los trabajos con valores superiores al 70% (174, 184, 190, 191) o inferiores al 50% (173, 175, 182, 185).

De la Clínica Mayo, y a partir de un mismo grupo de pacientes, se originan cuatro publicaciones sobre el significado clínico del patrón de ploidía de ADN en feocromocitomas (176, 187, 188, 193). De ellos, el que recoge un mayor número de pacientes (n=184) es el artículo de Nativ en Cancer en 1992 (176) donde se señala que la ploidía de ADN es una variable pronóstica importante e independiente en pacientes con feocromocitoma. En dicho estudio ninguno de los pacientes con histogramas diploides (n=64) presentó metástasis ni murió de la enfermedad (p menor 0,01), y tan sólo 1 tuvo recidiva de la misma. Todos los pacientes con progresión de la enfermedad (n=22) menos 1 tuvieron un patrón anómalo de ploidía (p menor de 0,001) con un índice de fracaso (progresión o muerte por cancer) del 32% para tumores con histogramas aneuploides o tetraploides. Este mismo autor y en el mismo año confirma en otro artículo (193) sobre 88 pacientes con PSA, el buen pronóstico de los pacientes con histogramas diploides. Estos dos artículos fueron precedidos por otros dos del mismo grupo de la Clínica Mayo (188, 187). En 1987 Hosaka y cols (188), sobre 62 pacientes con un seguimiento mínimo de 10 años obtuvieron los mismos resultados:

todos los pacientes con histogramas normales tuvieron un curso clínico benigno, y el 31% de los pacientes clasificados como ADN tetraploides y el 39% de los que presentaban un pico aneuploide tuvieron evidencia de malignidad. Estas diferencias fueron significativas ( $p$  menor 0,05 y  $p$  menor 0,02 respectivamente). Este mismo autor, en 1991 (187), a partir de los mismos pacientes, hace algunas apreciaciones de índole práctica y metodológica sobre los criterios de clasificación e interpretación de los histogramas no aneuploides (superioridad del parámetro 4C sobre el índice de proliferación y utilidad del cociente 4 c/s y pico en 8c), y propone una clasificación pronóstica de los feocromocitomas en función de los patrones de ploidía de ADN.

El primer estudio citométrico sobre ploidía de ADN en feocromocitomas fue publicado en 1971. En él Lewis y cols (185), estudian, por citometría estática, el contenido de ADN de 15 tumores, observando un comportamiento benigno en los 12 casos con patrón diploide y maligno en los 3 casos con patrón aneuploide. Los comienzos eran alentadores.

Otros estudios igualmente favorecen la utilidad pronóstica de la ploidía de ADN. Sasagawa en un estudio sobre 19 pacientes obtiene resultado diploide en todos los PSA benignos y aneuploide en los 2 casos malignos (192). Cope realiza estudio citomorfométrico en 27 tumores observando igualmente un comportamiento benigno en todos los feocromocitomas con patrón diploide(194).

Sobre los pacientes con feocromocitoma atendidos en el Chang Gung Memorial Hospital se han realizado 3 publicaciones (171, 172, 173). Lai (171) estudia 58 casos apreciando benignidad en todos los tumores diploides y siendo los 4 tumores malignos tetraploides (otros 17 casos fueron benignos y tetraploides). Huang publica unos resultados casi idénticos aunque con un número inferior de casos ( $n=30$ )( $p$  menor 0,05) (172). La tercera publicación procedente del Chang Gung Memorial Hospital expone los resultados del estudio de 79 tumores. El 71% fue diploide (todos benignos) y el resto aneuploides o tetraploides (incluyendo los 7 casos malignos)( $p=0,0003$ )

(173). No obstante en esta publicación se incluyen 15 tumores extra-abdominales, uno de ellos maligno.

Por contra otros autores cuestionan o niegan la utilidad pronóstica de la ploidía de ADN; Heaney (195) incluye en su estudio 26 pacientes con seguimiento clínico superior a 5 años. De ellos tres murieron de la enfermedad de los cuales dos mostraron un patrón diploide, al igual que otro paciente con recidiva, pero todavía vivo. Concluye que la citometría de ADN no es capaz de discriminar entre tumores benignos y malignos. Pattarino (196), que no aporta experiencia propia, revisa globalmente los resultados de las, a su juicio, principales publicaciones realizadas sobre el tema. Aunque admite que las diferencias en el patrón de distribución de ploidía entre tumores benignos y malignos es claramente significativa ( $p$  menor de 0,0005), señala que la sensibilidad de los patrones anómalos de ploidía en la predicción de malignidad es sólo del 18%. Además manifiesta la heterogeneidad de los diferentes estudios y la necesidad de un seguimiento a más largo plazo para validar completamente las conclusiones al respecto.

Gonzalez-Cámpora (177) estudia 16 PSA (4 malignos) observando que el único caso con patrón diploide tuvo comportamiento maligno. Gosset (197) cita un patrón de ploidía similar en tumores benignos y malignos, y en un estudio previo realizado por el mismo grupo (190) sobre 18 PSA malignos. el 17% presentó un patrón diploide.

Palberg realiza un estudio citofotométrico sobre 43 feocromocitomas suprarrenales, y concluye que el patrón de ploidía de ADN no permite la discriminación entre tumores benignos y malignos y no ofrece información pronóstica (184). No obstante, ninguno de sus tumores diploides ( $n=5$ ) tuvo un comportamiento maligno. Esta misma autora, en ese mismo año y sobre el mismo número de casos expone en una segunda publicación unos resultados idénticos a los anteriores (186).

Van Dekken (174) estudia por citometría de flujo de ADN 23 feocromocitomas (18 "primarios" y 5 "metastásicos"), no observando correlación entre ploidía y progresión

tumoral (primario, metastásico). Jung(175) publica en su serie la existencia de un PSA maligno con contenido diploide de ADN, así como los frecuentes patrones aneuploides o tetraploides en tumores benignos (175); Grignon determina la ploidía de ADN de 3 feocromocitomas vesicales e indica que el patrón de ploidía de ADN no puede ser usado como criterio de malignidad (181) dado que uno de los casos inicialmente diploide recidivó y dio metástasis.

Existe por último, un grupo de artículos en los que sólo se incluyen tumores benignos (179, 182, 183, 191) o en los que no se recoge el comportamiento clínico(178). Itakura no aprecia correlación entre el patrón aneuploide (29% de sus casos) y el pronóstico en 14 feocromocitomas (182). Zhang publica 19 casos, la mayoría de los cuales presentaban patrones aneuploides(84%)(191). Amberson igualmente comunica una frecuencia de contenidos aneuploides de ADN del 68% en 19 feocromocitomas benignos (183). Klein en su serie de 7 neoplasias suprarrenales comunica un feocromocitoma benigno tetraploide (179).

Remmelink trata de correlacionar, en tumores suprarrenales, el contenido nuclear de ADN con el origen de la neoplasia (cortical, medular, metastásica) y señala una alta incidencia de tetraploidía en feocromocitomas (178).

Respecto a la relación entre ploidía de ADN y el carácter familiar (MEN, facomatosis) de los feocromocitomas, Nativ (176,193) encuentra una menor frecuencia de patrones diploides en los tumores de dichos pacientes. Sin embargo, Padberg (184) no encuentra diferencias en el contenido de ADN de los tumores en pacientes con/sin síndromes MEN.

Otros parámetros clínicos y analíticos han sido correlacionados con los patrones citométricos de distribución del ADN, no observándose relación con la edad (171,173), sexo (171, 173, 176), clínica (171, 173 ), tamaño del tumor (171, 176 ), histopatología (173) o niveles de catecolaminas (171, 172, 173, 176, 192). Nativ (176) encuentra una mayor incidencia de aneuploidía en pacientes menores de 30 años.

## **PLANTEAMIENTO DEL TEMA**

---

Los feocromocitomas son neoplasias no excepcionales derivadas del sistema paraganglionar simpatoadrenal que pueden asociarse a diferentes síndromes familiares. Aunque el curso biológico es habitualmente benigno, algunos casos presentan un comportamiento agresivo. Ciertos caracteres clínicos, biológicos, morfológicos e inmunohistoquímicos se observan con mayor frecuencia en el grupo de tumores malignos, aunque ninguno de ellos, aisladamente o combinados, es capaz de definir anticipadamente el potencial agresivo del tumor.

En consecuencia, el diagnóstico de feocromocitoma (salvo malignidad inicial evidente) va seguido de un periodo de incertidumbre muy prolongado que obliga a un seguimiento clínico y analítico periódico del paciente durante años.

La determinación de la ploidía del ADN mediante citometría de flujo ha sido aplicada al estudio de los feocromocitomas. Son varios los aspectos analizados en este sentido, aunque destacando los que hacen referencia al pronóstico. En esta vertiente los resultados han sido motivo de controversia. En el presente trabajo se pretende aplicar la citometría de flujo (ploidía y otros datos citométricos) al estudio de los feocromocitomas, intentando establecer la correlación oportuna con los datos anatomopatológicos más relevantes.

En consecuencia se pretende:

Estudiar la utilidad de la valoración paramétrica del ADN en los feocromocitomas, mediante citometría de flujo.

Establecer una posible correlación entre la valoración de los parámetros citométricos y la valoración de los parámetros morfológicos.

Todo ello con el objeto de incidir en la capacidad del diagnóstico anatomopatológico en la predicción del comportamiento biológico.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

Finalmente fueron seleccionados 36 casos correspondientes a otros tantos pacientes con PSA procedentes de los archivos de los departamentos de Anatomía Patológica de varios hospitales, en su mayor parte del H.U. Virgen del Rocío y H.U. Virgen Macarena.

### **I) Variables clínicas:**

Se revisaron las historias clínicas de todos los pacientes incluidos en el estudio, recogiendo los datos referentes a las siguientes variables clínicas:

- Edad (años).
- Sexo (hombre/mujer)
- Localización del tumor (1-suprarrenal derecha 2- izquierda 3-bilateral 4- extra-adrenal).
- Antecedentes (0- sin interés, 1- MEN 2a, 2- familiar no MEN, 3- otros tumores malignos no endocrinológicos, 4- otros, 5- TBC, 6- abortos, 7- diabetes, 8- displasia fibromuscular).
- Tiempo de evolución (meses)
- Sintomatología inicial (1-HTA, 2- crisis HTA, 3- incidental, 4- otros).
- Estado de seguimiento (1- muerto de la enfermedad, 2-libre, 3- muerte de otra causa, 4- vivo con evidencia de enfermedad)
- Criterios de malignidad (1- infiltración extensa de estructuras adyacentes incluyendo grandes vasos, 2- recidiva, 3- metástasis).
- Tiempo hasta la detección de la enfermedad.
- Localización de las metástasis (1- Gl, 2- hígado, 3- hueso, 4- otros, 5- varios).
- Niveles urinarios de adrenalina, noradrenalina (NA), AVM, HV y dopamina.
- Niveles plasmáticos de catecolaminas.
- Progresión de la enfermedad a sitios cromafines.
- Repercusión vascular de la HTA (1- retinopatía, 2- cardiopatía, 3- nefropatía, 4- varios, 5- no).

Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico con finalidad curativa no recibiendo otros tipos de terapia oncológica previa a la intervención.

## II) Variables anatomopatológicas:

**A) Macroscópicas:** fueron obtenidas a partir del informe anatomopatológico emitido en su día.

- Peso (gr).
- Diámetro máximo (cm).
- Quistificación: 1- sólido, 2- áreas quísticas.
- Nodularidad: 1- unicéntrico, 2- multinodular.

### **B) Histopatológicas:**

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%, se incluyeron en parafina de forma rutinaria y se tiñeron cortes de 5 micras con hematoxilina-eosina. En cada caso se estudiaron todas las preparaciones disponibles (entre 1 y 16) y se estudiaron las siguientes variables:

- Presencia de cápsula: 1- completa, 2- incompleta, 3- no.
- Infiltración capsular: 1- focal, 2- multifocal, 3- penetración capsular completa.
- Presencia de tejido adiposo pardo peritumoral o periadrenal: 1- no, 2- si.
- Patrón arquitectural predominante: 1- alveolar 2- trabecular, 3- sólido.
- Patrón arquitectural secundario: 1- no, 2- alveolar, 3- trabecular, 4- sólido.
- Presencia de necrosis: 0- no, 1- focal: pequeños grupos celulares, 3- confluyente: áreas más extensas.
- Hemorragia: 0- no, 1- extravasación eritrocitaria leve, 2- moderada, 3- franca.
- Invasión vascular: 0- no, 1- vasos intratumorales, 2- peritumorales, 3-

células aisladas en el interior de los vasos, sin fijación parietal.

- Cambios estromales: 1- cambio mixoide, 2- hialinización perivascular (capilares), 3- hialinización más extensa, 4- cambio mixoide y hialino.

- Tipo celular predominante: 1- células grandes poligonales, 2- células pequeñas poligonales, 3- células pequeñas redondas, 4- células fusiformes.

- Segundo tipo celular: 0- no, 1- poligonales grandes, 2- poligonales pequeñas, 3- redondas pequeñas, 4- células fusiformes.

- Pleomorfismo nuclear: variabilidad en el tamaño y forma de las células: 1- leve, 2- moderado, 3- severo.

- Presencia de glóbulos hialinos intracitoplásmicos: 0- no, 1- raros, 2- ocasionales, 3- frecuentes.

- Presencia de pseudoinclusiones intranucleares: 0- no, 1- raras, 2- ocasionales, 3- frecuentes.

- Presencia de material similar al coloide tiroideo con frecuencia con “vacuolas de resorción” en periferia: 0- no, 1- ocasional y escaso, 2- frecuente y amplio.

- Presencia de pigmento: 0-no, 1- en macrófagos, 2- en células tumorales, 3- en macrófagos y células tumorales.

- Diferenciación hacia células ganglionares: 0- no, 1- sí.

- Contaje de mitosis: se evaluaron al menos 40 campos de gran aumento (40x con un área de 0,105 mm<sup>2</sup>). Se expresó en mitosis / 40 CGA.

- Presencia de núcleos grandes: al menos 3-4 veces (con frecuencia más) el tamaño promedio de los núcleos tumorales. 0- no, 1- raros, 2- ocasionales, 3- frecuentes.

### III) Estudio del ADN por citometría de flujo.

Se seleccionaron , en la medida de lo posible, aquellos bloques que presentaban además del tumor, tejido normal como control interno (en la mayor parte de los casos

corteza suprarrenal adyacente al tumor) sin superar este último el 20% del total de la muestra. Se evitaron igualmente los bloques con focos de necrosis, hemorragia y fibrosis. Se realizaron dos cortes de 50 micras de espesor, para estudio citométrico y otros dos cortes de 5 micras inmediatamente antes y después de los anteriores para control del material empleado. En todos los casos se utilizó para estudio citométrico el tumor primario, estudiándose más de un bloque en algunos de los casos. En tumores bilaterales o múltiples se estudiaron muestras de varios de ellos o en su defecto, los de mayor tamaño.

La disgregación se realizó siguiendo el método de Hedley y cols. (1983) modificado(198). En síntesis, tras desparafinado (2 horas) e hidratación progresiva, se trituró la muestra y se digirió enzimáticamente con pepsina (5 mg/ml en suero fisiológico a pH 1.5, 35 minutos a 37°C). Se filtró la muestra por una malla de nylon de 50  $\mu$ m de poro y el filtrado se centrifugó a 2000 rpm (5 minutos) y se tiñó con yoduro de propidio (50  $\mu$ g/ml en PBS), tras digestión con RNasa A (100  $\mu$ g/ml) y resuspensión, durante 8 a 12 h, en oscuridad a 4°C. Tras filtración se analizaron con un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson), verificando el procedimiento con un microscopio de fluorescencia. Las células se estudiaron con el citómetro tras estimulación con luz de 515 nm, luz de emisión de 625 nm, en un número mínimo de 35.000 por caso.

La calibración del citómetro de flujo se realizó con núcleos de eritrocito de pollo (Becton Dickinson). En todos los casos se utilizaron controles diploides externos constituidos por linfocitos procedentes de bloques de parafina de ganglios linfáticos sin patología, que se procesaron de la misma forma que las lesiones. Además, la mayoría de las muestras llevaban un control interno de tejido normal adyacente a la lesión. El sistema de configuración ortogonal del citómetro permitió discriminar los dobletes y tripletes por comparación de la fluorescencia emitida y el área de los núcleos.

Los resultados de las diferentes mediciones fueron expresados en forma de histogramas de frecuencia, en el que el número de células teñidas es relacionado con la energía fluorescente expresada en número de canales.

#### **A) Clasificación de los histogramas.**

1) Diploide: presencia de un único pico G0-G1 con un índice de ADN de 1 por definición.

2) Aneuploide (hiperdiploide): presencia de un segundo pico G0-G1 (además del pico G0-G1 diploide) con un índice de ADN comprendido entre 1,15 y 1,89. Se asume que el primer pico corresponde a la fase G0-G1 del control interno.

3) Tetraploide: presencia de más de un 20% de los núcleos medidos con un contenido de ADN situado en la región 4c y con un índice de ADN comprendido entre 1,9 y 2,3.

**B) Índice de ADN:** Resultado del cociente entre el contenido de ADN del pico G0-G1 aneuploide y el contenido de ADN del pico G0-G1 de la población diploide.

**C) Coeficiente de variación de los diferentes picos:** Se calculó por el "método fórmula" como la amplitud del pico a la mitad de su altura dividido por 2,35 (161). Se descartaron los casos en los que el coeficiente de variación del pico G0-G1 de la población diploide fuera mayor de 10.

**D) Porcentaje de células en los distintos rangos de ADN:** Concretamente los rangos diploide, hiperdiploide, tetraploide e hipertetraploide. Se consideran diploides las células distribuidas en torno a la media del pico G0-G1, dentro de un rango no superior a dos desviaciones típicas, que en una distribución normal representa aproximadamente los 2/3 de la población; los demás rangos se establecieron en relación al número de canales que definían el rango 2c. También se analizaron las distintas fases del ciclo celular de las diferentes poblaciones. En el cálculo de los porcentajes de células en los distintos rangos, se excluyeron las células con contenido de ADN menor que el límite inferior del primer pico G0-G1 y mayor que el límite superior del último

pico G2M.

**E) Índice de proliferación global:** Definido como el porcentaje del cociente entre el número de células en fase S+G2+M y el total de células medidas (G0-G1+S+G2+M).

**F) Cociente entre el porcentaje de células en la región 4c y en fase S (Coc. 4c/S):** Aplicado exclusivamente a las poblaciones diploides y tetraploides.

#### IV) ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se realizaron los siguientes cruces de variables:

**A) Ploidía de ADN con:**

- 1- Pronóstico (malignidad y progresión).
- 2- Carácter familiar o esporádico.
- 3- Asociación o no a Síndrome MEN.
- 4 - Cada una de las variables anatomopatológicas.
- 5- Edad, sexo y localización del tumor.

**B) Índice de ADN ( $< 0$  o  $\geq 1,75$ ), índice de proliferación, cociente 4c/S y % de células en rango hipertetraploide con:**

- Pronóstico (malignidad y progresión).

**C) Variables anatomopatológicas con:**

- 1- Pronóstico (malignidad o progresión).
- 2- Carácter familiar o esporádico.
- 3- Asociación o no a Síndrome MEN.

Para las variables categóricas, cuando ha sido posible la elaboración de tablas de contingencia de 2x2, se han tomado los valores de p-value correspondientes a la prueba exacta de Fisher en distribución de 2 colas. Cuando no ha sido posible la elaboración de tablas de contingencia de 2x2, se han tomado los valores de p-value correspondientes al test de normalidad de Pearson aunque indicándose en cada caso si

las frecuencias esperadas son inferiores a 5 (en cuyo caso sólo se pueden extraer conclusiones de lo que pasa en la muestra, pero no pueden ser extrapoladas).

Para estudiar si existe relación entre variables continuas y categóricas, es necesario utilizar técnicas de análisis de la varianza. Debido a la falta de homocedasticidad se aplicaron técnicas no paramétricas (contraste de Kruskal-Wallis), aunque la posterior aplicación de técnicas paramétricas dieron resultados similares.

El estudio estadístico fue llevado a cabo a través de bases de datos en formato ACCESS 97 y los programas estadísticos STATGRAPHICS 6.0 y BMDP 7.0 en plataforma unix.

## **RESULTADOS**

---

El estudio se realizó finalmente sobre 36 tumores correspondientes a otros tantos pacientes. La muestra se distribuyó a partes iguales entre hombres y mujeres (18 casos cada uno), siendo la edad media de 37,6 años (rango: 10 a 64 años). El origen de la neoplasia fue suprarrenal en 32 casos (17 en lado derecho, 6 en lado izquierdo y 9 bilaterales) y extra-adrenal en 4 (todos malignos y 1 multicéntrico). Trece de los tumores ocurrieron en un contexto familiar (9 asociados a Síndrome MEN tipo II a, 3 asociados a enfermedad de von Recklinghausen y 1 a enfermedad de von Hippel-Lindau).

Ocho de los tumores cumplieron al menos 1 de 3 criterios de malignidad: 1- infiltración extensa de estructuras adyacentes, incluyendo grandes vasos (5 casos), 2- recidiva (3 casos) o 3- metástasis (4 casos). En un caso la enfermedad progresó posteriormente a la suprarrenal contralateral (aunque sin signos de malignidad). Cinco de los pacientes han fallecido (1 a consecuencia del tumor, 1 en el postoperatorio, 3 por carcinoma medular de tiroides). En todos los casos se obtuvo información clínica de seguimiento (revisando la historia clínica o por información verbal del médico que los atendió) excepto en 2 de los casos malignos (1 de ellos fallecido en el postoperatorio).

El tiempo de seguimiento medio ha sido de 51,25 meses (rango 0 a 192 m) para el total, 59,75 meses (rango 0 a 192m) para los malignos y 48,82 meses (rango 3 a 180) para los benignos. Entre los antecedentes personales constan tumores malignos no endocrinológicos (4 casos), diabetes mellitus (5 casos), tuberculosis, abortos, displasia fibromuscular y otros. La sintomatología inicial más frecuente fue la hipertensión arterial (27 casos, 21 de ellos con crisis) siendo un hallazgo incidental o con otra sintomatología en 8 casos. La malignidad fue evidente en el momento del diagnóstico en 6 casos, detectándose a los 24 y 108 meses en los otros 2. Consta repercusión de la hipertensión arterial a nivel retiniano, renal o cardiaco en 12 casos (6 en retina, 2 renal y 7 en corazón). Los datos clínicos más sobresalientes de cada caso se hallan reflejados

en la **tabla 1** (pág 84 ).

Respecto a los **datos citométricos**, los CVs de los picos 2c oscilaron entre 6,05 y 9,91 (media:8,15). Dicho valor medio para los tumores aneuploides fue de 7,49 y de 8,25 para los tetraploides. El índice de ADN fue de 1 para los casos diploides (por definición) y osciló entre 1,31 y 1,86 para los aneuploides , y entre 1,92 y 2,05 para los tetraploides. Considerados globalmente todos los casos, el 61% mostró un patrón anómalo de ploidía. Fueron observados contenidos aneuploides (hiperdiploides) de ADN en un tercio de los casos (33,3%). En nuestro estudio la frecuencia de tetraploidía de ADN ha sido del 28%. Todos los casos con patrón diploide (39%) han tenido un curso biológico benigno, mostrando patrones anómalos de ploidía todos los casos malignos o con progresión de la enfermedad a otros lugares cromafines. Estas diferencias en la distribución de los patrones citométricos de ploidía han resultado estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher con  $p = 0,013$  para casos malignos y  $p = 0,016$  si incluimos los casos malignos y con progresión a lugares cromafines.). Del total de casos ( $n = 36$ ), 12 (33%) mostraron un patrón aneuploide (de ellos 4 malignos) y 10 (28%) tetraploide (4 de ellos malignos). Estas diferencias de ploidía en cuanto al pronóstico, han sido estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher con  $p = 0.03311$  y  $0.01976$  para los tumores aneuploides y tetraploides respectivamente).

De nuestros resultados se deduce un índice de malignidad para aquellos tumores con patrones anómalos de ploidía del 36%. La frecuencia de malignidad para tumores aneuploides y tetraploides ha sido del 33% y del 40%. Respecto al índice de ADN (DI), observamos que el 39% de los casos presentan un valor mayor o igual a 1,75 (Rango tetraploide y aneuploide peritetraploide) incluyéndose en este grupo ( $DI \geq 1,75$ ) 7 de los 8 casos malignos (87,5%). Tan sólo 1 de los tumores malignos y otro benigno con progresión de la enfermedad (recidiva posterior en glándula suprarrenal

contralateral) presentaron  $DI < 1,75$  (rango diploide y aneuploide no peritetraploide). Las diferencias entre ambos grupos ( $DI \geq$  ó  $< 1,75$ ) han sido estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher con  $p = 0,0025$  para malignidad y  $p = 0,0144$  para progresión). Si consideramos sólo los casos con patrón aneuploide (12, de los cuales 4 son malignos y 1 con progresión) advertimos que 4 (33%) presentan  $DI \geq 1,75$  y de estos, 3 son malignos (75%). Entre los 8 casos aneuploides con  $DI < 1,75$  (67%) sólo 1 ha sido maligno (25% de la malignidad) y otro era benigno con progresión de la enfermedad. Dentro del grupo aneuploide estas diferencias en cuanto al índice de ADN han sido significativas para la malignidad (Fisher con  $p = 0,0666$ ) pero no para la progresión (Fisher con  $p = 0,2222$ ).

Respecto al índice de proliferación en general, hemos obtenido valores muy elevados que no se correlacionan de forma estadísticamente significativa con el pronóstico de los PSA. De los 10 tumores tetraploides, 6 presentan un cociente  $4c/S$  mayor o igual a 1,3, incluyéndose en este grupo todos los tumores malignos con patrón tetraploide. No hemos observado diferencias significativas en cuanto a la distribución de la ploidía entre tumores esporádicos y familiares (MEN, facomatosis). Tampoco hemos observado relación entre el % de células en el rango hipertetraploide y el pronóstico. Respecto a la localización y lateralidad hemos hallado, entre los tumores adrenales, un predominio del lado derecho y una alta incidencia de bilateralidad (25%). No hemos hallado diferencias significativas en la ploidía respecto a la localización y lateralidad ( $p > 0,1$  aunque con frecuencias esperadas menor a 5). Del total de la muestra el 50% son varones y el 50% son mujeres. Sin embargo, el 50% de los tumores en varones han adoptado un patrón tetraploide frente a un 5,5% de las mujeres. Por contra el 50% de las mujeres han mostrado un patrón aneuploide en PSA frente a un 17% de los varones. Estas diferencias han sido estadísticamente significativas (Pearson con  $p = 0,0078$  y frecuencias esperadas mayor o igual a 5 en el 100%). Las diferencias sexuales desaparecen cuando los patrones aneuploides y tetraploides son integrados en

el mismo grupo. Los datos citométricos correspondientes a cada caso se hallan reflejados en la **tabla 2** (pág. 85 ). **Las figuras 1-4** (pág.80-83) reproducen un histograma representativo de cada tipo.

Entre los **caracteres anatomopatológicos** se observaron áreas quísticas en 6 tumores (17%), siendo 7 (19%) multinodulares. Se observó la presencia de T.A.P. en 12 casos (33%) y en 4 esta variable no fue evaluable. La cápsula estaba completa en 24 casos (66,7%), estando incompleta en 11 (50%) y ausente en 1 (3%). Existió invasión focal de la cápsula en 6 tumores (17%) y penetración completa en 7 (19%). El patrón histológico predominante más frecuente fue el trabecular (64%) seguido del alveolar (25%) y el difuso (11%). No obstante, se observó la existencia de un segundo patrón, menos extenso, en 22 de los casos (61%). Se observó necrosis focal en 9 tumores (25%) y confluyente en 5 (14%). Se evidenciaron focos de extravasación eritrocitaria (de diferente cuantía) en el 75% de los casos. Se observó invasión vascular en 2 casos (5,6%; ambos malignos). Las alteraciones estromales fueron frecuentes y consistieron en cambio mixoide (11%), áreas de hialinización o fibrosis fina, pericapilar (12,8%) o más extensa (28%) o cambio mixoide y fibrosis (17%).El tipo celular predominante fue , célula poligonal grande (66%) y pequeña (25%), siendo célula pequeña redonda en 3 casos (8,3%). Las áreas fusocelulares se apreciaron en 7 casos (19%) y nunca de forma predominante. El pleomorfismo nuclear fue leve en el 28%, moderado en el 50% e intenso en el 22% de los casos. (Media 2 para los tumores benignos y 1,75 para los malignos). Se observaron glóbulos citoplásmicos hialinos en el 61% de los casos (raros 33%, ocasionales 8% y frecuentes 19%) y pseudoinclusiones intranucleares en el 44% (raros 38%, ocasionales 3% y frecuentes 3%). Se observó la presencia de material coloide en el 39% de los casos, aunque casi siempre de manera escasa y ocasional. Se apreció pigmento en el interior de los macrófagos en 14 casos (38%), en células tumorales en 2 (6%) y en ambos en 4 (11%). Fue evidente la

diferenciación hacia células ganglionares en 3 casos (8,3%) y se observaron núcleos muy grandes (al menos 3-4 veces el tamaño promedio de los restantes núcleos, con frecuencia mucho más) en el 67% de los casos.

No se ha observado correlación estadísticamente significativa entre la ploidía de ADN y dichos caracteres anatomopatológicos con excepción de la infiltración capsular ( $p=0,0441$ ) aunque con el test de Pearson y frecuencias esperadas menores de 5. De los tumores diploides el 85% no infiltra la cápsula frente a un 50% de los no diploides. Todos los tumores con penetración capsular ( $n=7$ ) presentaron un patrón no diploide.

La incidencia de bilateralidad fue en los casos asociados a S. MEN del 77% (frente a un 9% de los tumores adrenales no MEN). Igualmente, apreciamos una alta frecuencia de multinodularidad en tumores asociados a Síndrome MEN (50%) frente a un 7% de los esporádicos (test de Fisher con  $p=0,0055$ ). La frecuencia de tejido adiposo pardo periadrenal o peritumoral en los casos asociados a S. MEN ha sido, en nuestro estudio, del 67%, frente a un 22% de los casos no MEN (test de Fisher con  $p=0,0362$ ). La presencia de glóbulos hialinos fue detectada en el 89% de los casos MEN frente a un 52% de los casos no MEN ( $p=0,0619$  con test de Fisher). Además, el número de glóbulos hialinos fue bastante superior en los casos MEN (frecuentes en el 62%) que en los no MEN (frecuentes sólo en el 14%). Los tumores asociados a S. MEN presentaron una mayor frecuencia de cápsula tumoral incompleta o ausente: 67% frente a 22% (test de Fisher con  $p=0,0362$ ). Si analizamos por separado en 2 grupos los tumores esporádicos y los familiares (a los 9 casos MEN habría que añadir 4 asociados a facomatosis) se observa correlación con significación estadística para los mismos parámetros histológicos (grasa parda, glóbulos hialinos, cápsula).

En nuestro estudio el peso medio de los tumores benignos fue de 101 gr y el de los malignos 250 gr. (Contraste de Kruskal-Wallis con  $p=0,0284$ ). En nuestro estudio la quistificación ha sido más frecuente en tumores malignos (25% frente a 14%) aunque sin significación estadística ( $p>0,1$ ). En nuestra serie hemos observado diferencias

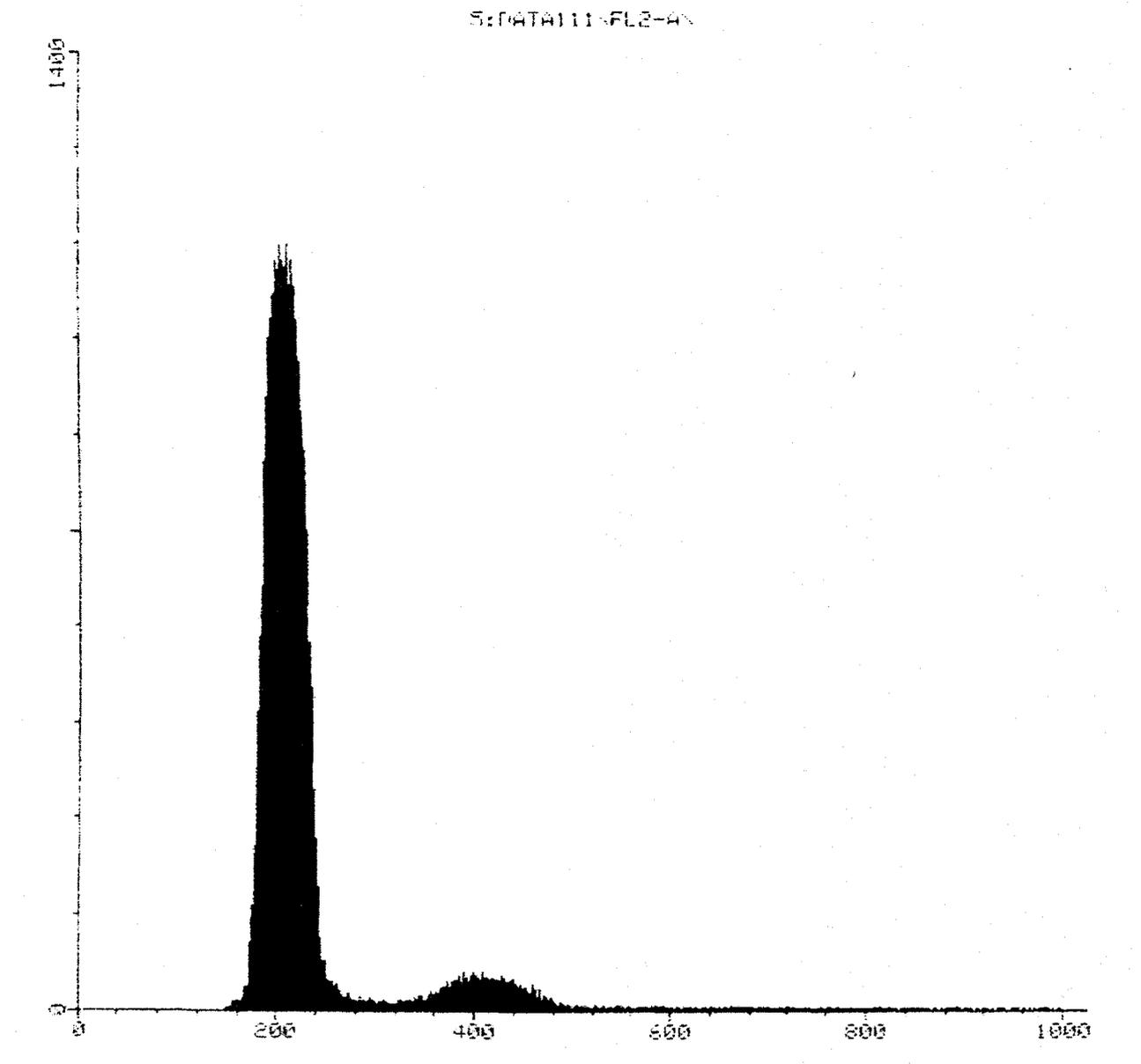
significativas en cuanto a mayor frecuencia de necrosis tanto para la malignidad como para la progresión (test de Fisher con  $p = 0,0360$  y  $p = 0,0144$  respectivamente) Así, hemos observado una frecuencia de necrosis del 75% en tumores malignos y del 29% en los benignos. Además la necrosis fue extensa o confluyente en el 50% de los tumores malignos que la presentaron frente a un 25% para los benignos.

En nuestro estudio, 6 de los 8 tumores malignos (75%) presentaron penetración capsular frente a 1 (3,5%) de los benignos, habiendo que añadir a los segundos un 21% de tumores con infiltración de la cápsula aunque sin sobrepasarla. Estas diferencias han sido muy significativas ( $p = 0,00004$ ) aunque no extrapolables a situaciones más generales (test de Pearson con frecuencias esperadas menores a 5). En nuestra serie hemos observado invasión vascular microscópica en 2 de 8 tumores malignos (25%) y en ninguno de los benignos (test de Fisher con  $p = 0,0444$ ). Si incluimos como criterio de invasión vascular la presencia de células sueltas en el interior de los vasos, las cifras para tumores benignos y malignos son 7% y 75%.

El tipo celular predominante en el 33% de los tumores malignos o con progresión fue célula pequeña redonda frente a ningún caso entre los tumores benignos o que no progresaron (test de Fisher con  $p = 0,0117$ ). En nuestra serie hemos observado células fusiformes, siempre de manera focal, en 7 casos (2 benignos esporádicos, 1 maligno y 4 MEN). El índice de mitosis en líneas generales fue bajo (en todos los casos menos en 3 fue menor o igual a 2). Se identificaron figuras de mitosis en 6 de 8 tumores malignos (75%) y en 11 de 28 benignos (39%) (3 esporádicos, 4 MEN y 4 con facomatosis). Hemos observado una mayor frecuencia no significativa de glóbulos hialinos intracitoplásmicos en tumores benignos que en malignos (64% Vs 50%). Estas diferencias resultan algo más evidentes cuando se cuantifica el nº de glóbulos: en los tumores malignos fueron raros u ocasionales en todos los casos, siendo frecuentes en el 38% de los tumores benignos que los presentaron. Los restantes parámetros anatomopatológicos no han mostrado diferencias significativas en cuanto

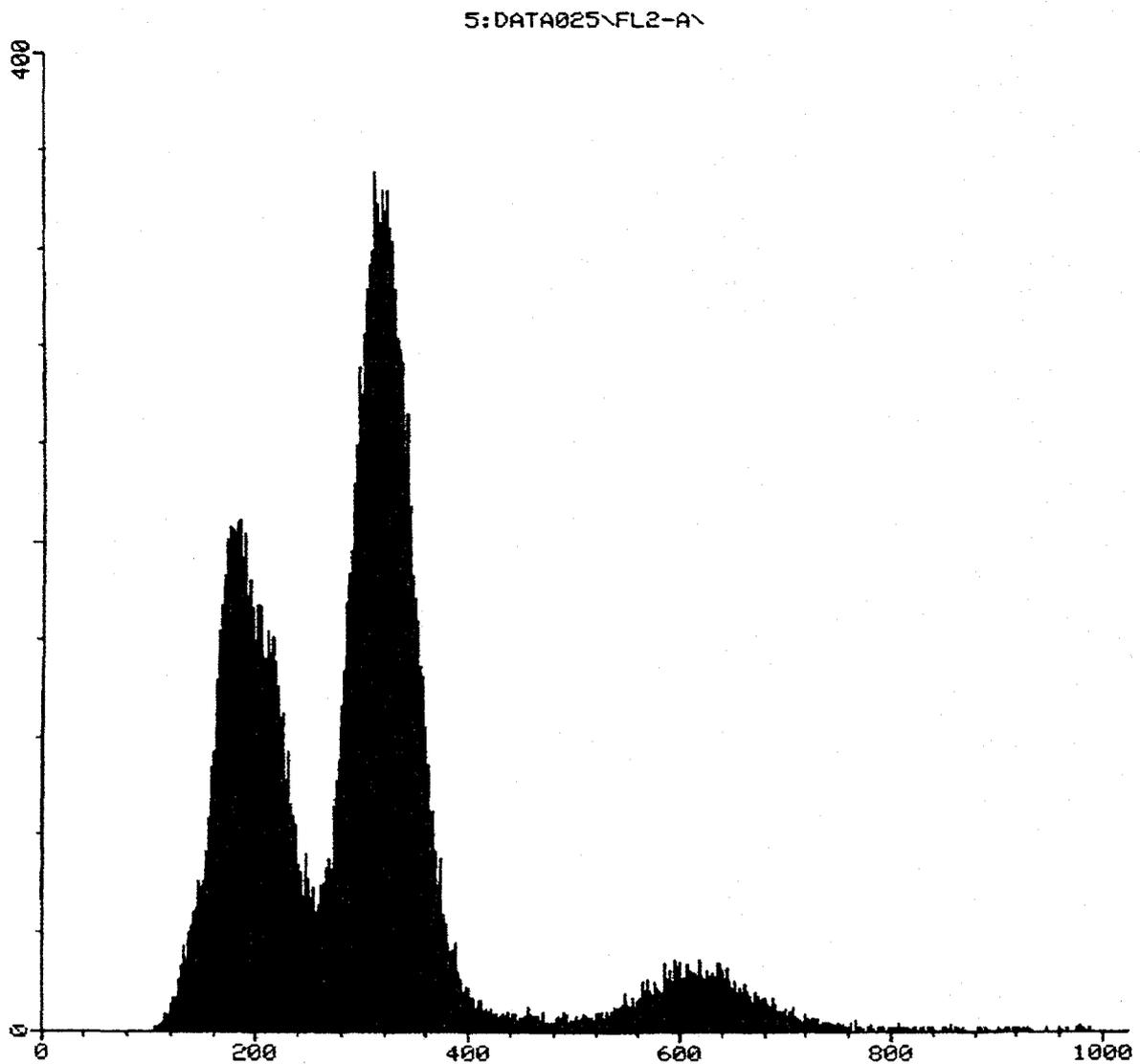
al pronóstico. En la **tabla 3** (pág. 86-88) se reflejan los hallazgos anatomopatológicos correspondientes a cada caso.

En la **tabla 4** (pág.89-90) se recogen los cruces estadísticos de variables para los que se observó relación con significación estadística y en las **tablas 5** (pág. 91) y **6** (pág.92) los datos correspondientes a dichos cruces(p menor a 0.05, salvo indicación expresa).



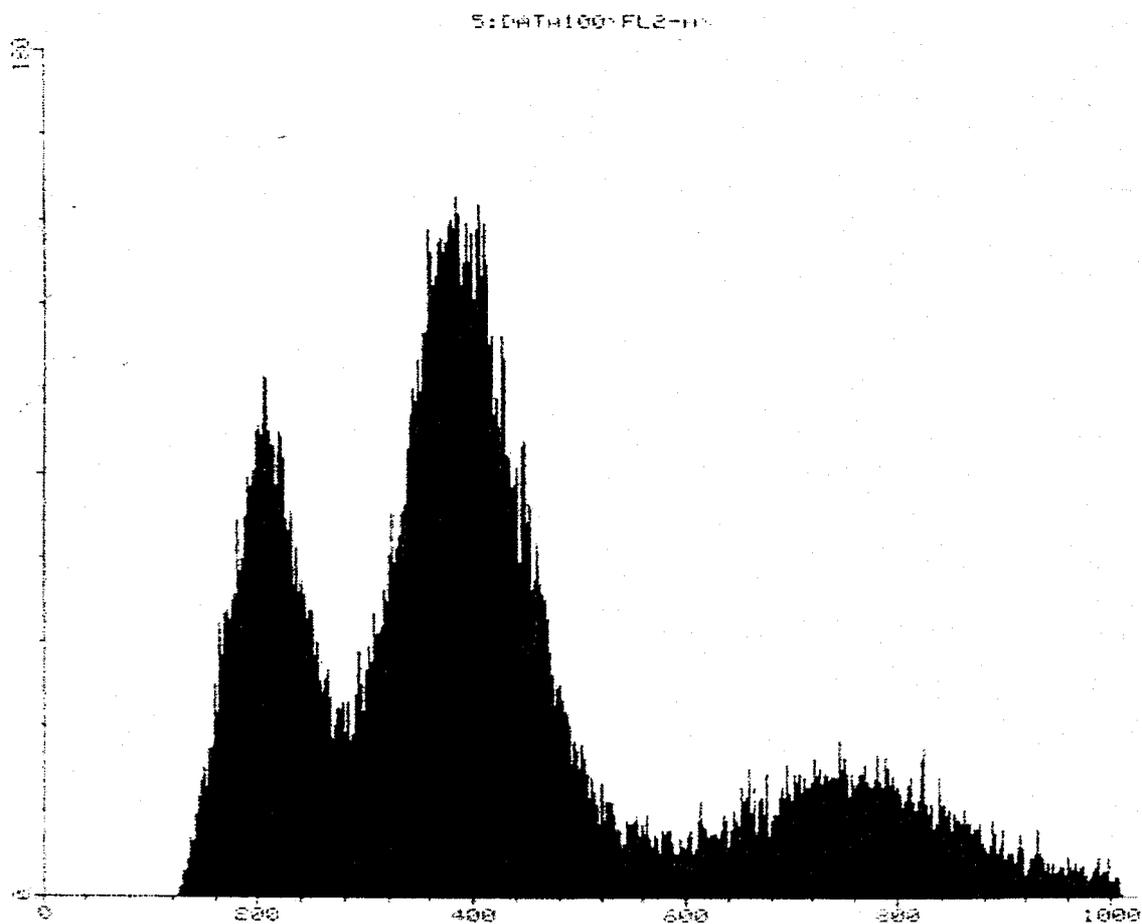
**FIGURA 1**

**Caso n°6:** Mujer de 55 años con feocromocitoma en suprarrenal derecha, confinado a la glándula. Tras 120 meses de seguimiento se encuentra libre de enfermedad. Se observa un histograma con una única población celular diploide, con un  $DI=1$  (por definición) y con un % de células en el rango 4c (fase G2M) inferior al 20%.



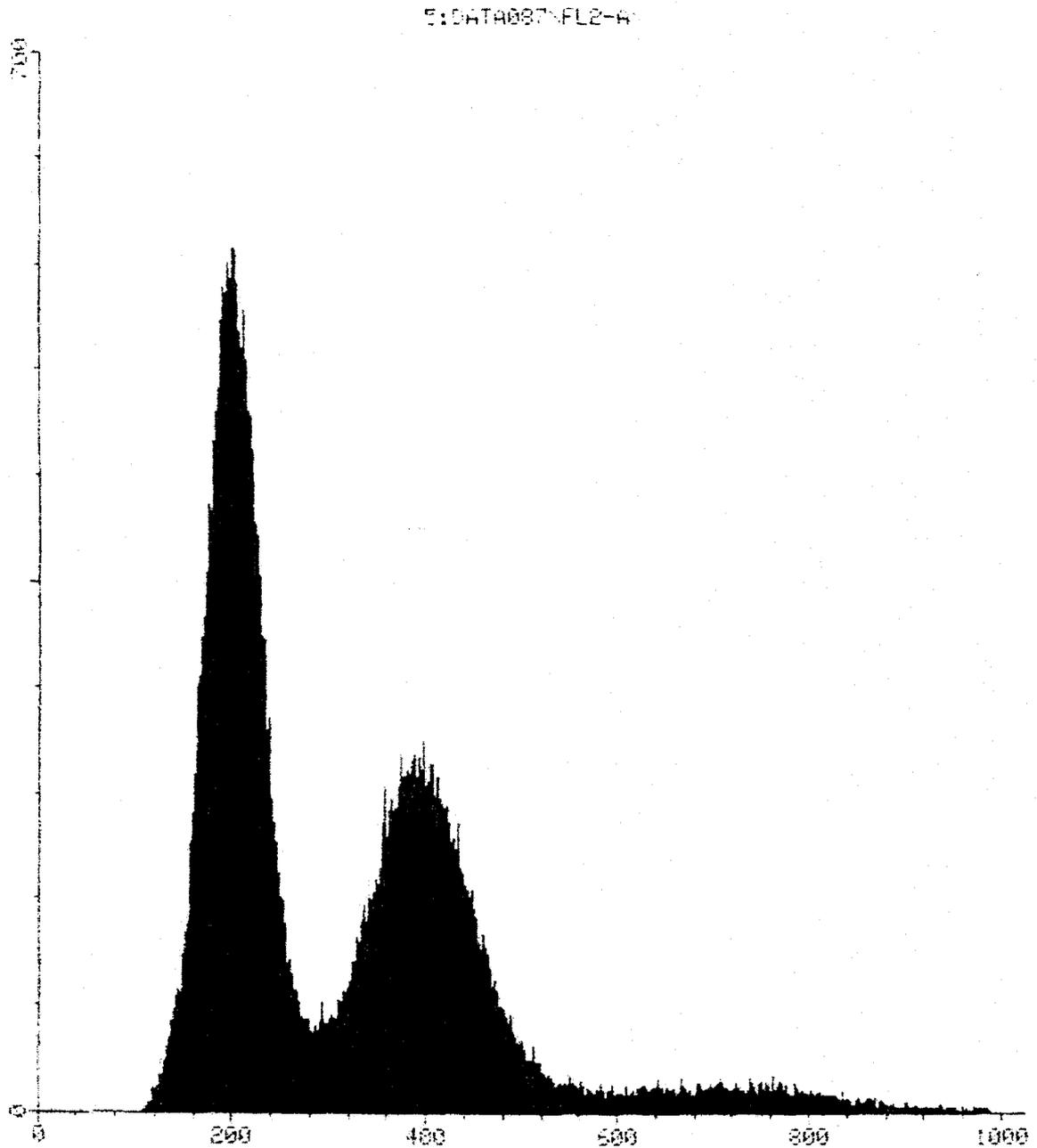
**FIGURA 2**

**Caso n° 17:** Varón de 10 años que es intervenido de feocromocitoma no infiltrativo en suprarrenal derecha. A los 14 años de edad se detecta un segundo feocromocitoma en la suprarrenal izquierda, no existiendo otros focos tumorales (tras 76 meses de seguimiento). Se observa un histograma con un primer pico situado en la región 4c (correspondiente a la fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> del control interno diploide). Existe una segunda población celular (con su correspondiente fase G<sub>2</sub>M) con un DI=1.71 y por tanto con contenido de ADN aneuploide (hiperdiploide).



**FIGURA 3**

**Caso n° 21:** Varón de 31 años intervenido de feocromocitoma retroperitoneal multifocal e invasivo. Seis meses después de la intervención se detecta recidiva abdominal y metástasis óseas (vértebras y tibia izquierda). Se observa un histograma donde además del primer pico (2c) correspondiente al control interno diploide, existe otra población celular (que concentra más del 20% del total de núcleos en la región 4c) con doble contenido de ADN (DI=1,97). Se trata por tanto de una población tetraploide, con su fase G2M correspondiente.



**FIGURA 4**

**Caso nº 34:** Varón de 14 años con enfermedad de von Hippel-Lindau que presenta feocromocitoma en suprarrenal derecha. El histograma obtenido a partir del tumor muestra un pico en 2c correspondiente a la fase G0G1 del control diploide y un segundo pico en 4c que supone más del 20% del total de núcleos. Los histogramas de este tipo (4c mayor del 20%) han sido clasificados como ADN tetraploides, aunque no sea patente una fase G2-M en 8c.

TABLA 1

| Nº | EDAD | SEXO | LADO    | ANTECEDENTE                          | SEG.T(m) | SEG.EST | CRIT.MAL                          |
|----|------|------|---------|--------------------------------------|----------|---------|-----------------------------------|
| 1  | 38   | V    | SR.bil  |                                      | 30       | ME      | Metástasis                        |
| 2  | 22   | V    | SR.izq  | T.B.C.                               | 192      | V.E.    | Metástasis                        |
| 3  | 41   | M    | SR.izq  | Ca.mama T.desmoide                   | 48       | S.E.E.  |                                   |
| 4  | 57   | M    | SR. der | Diabetes                             | 72       | S.E.E.  |                                   |
| 5  | 42   | M    | SR. izq | Abortos                              | 30       | S.E.E.  |                                   |
| 6  | 55   | M    | SR. der |                                      | 120      | S.E.E.  |                                   |
| 7  | 47   | M    | Retr.   | Ca.mama Diabetes                     | 28       | V.E.    | Recidiva e inf.ext.               |
| 8  | 40   | V    | SR. izq |                                      | 76       | S.E.E.  |                                   |
| 9  | 58   | M    | SR. der | Ca.mama,sigma,ileon y cervix.Abortos | 55       | S.E.E.  |                                   |
| 10 | 47   | V    | SR. der | Diabetes                             | 48       | S.E.E.  |                                   |
| 11 | 40   | V    | Retr.   |                                      |          | S.E.E.  | Inf.ext                           |
| 12 | 64   | M    | SR. der | Diabetes                             | 81       | S.E.E.  |                                   |
| 13 | 34   | V    | SR. der |                                      | 38       | S.E.E.  |                                   |
| 14 | 20   | V    | SR. der | Otros                                | 43       | S.E.E.  |                                   |
| 15 | 13   | V    | SR. der | Displas. fibromuscular               | 43       | S.E.E.  |                                   |
| 16 | 59   | V    | SR. der | Diabetes                             | 45       | S.E.E.  |                                   |
| 17 | 10   | V    | SR. bil | Recidiva S.R. contral.               | 76       | S.E.E.  |                                   |
| 18 | 57   | M    | SR. izq | Ca. Cervix                           | 24       | S.E.E.  |                                   |
| 19 | 54   | M    | SR. der |                                      | 30       | S.E.E.  | Inf.ext                           |
| 20 | 33   | M    | SR. izq |                                      | 156      | V.E.    | Recidiva. Metástasis.             |
| 21 | 31   | V    | Retr.   |                                      | 42       | V.E.    | Recidiva e inf.ext.<br>Metástasis |
| 22 | 53   | M    | SR. der |                                      | 14       | S.E.E.  |                                   |
| 23 | 26   | V    | Retr.   |                                      |          | M.O.C.  | Inf.ext                           |
| 24 | 28   | M    | SR. bil | MEN 2A                               | 60       | M.O.C.  |                                   |
| 25 | 26   | M    | SR. bil | MEN 2A                               | 19       | M.O.C.  |                                   |
| 26 | 19   | M    | SR. bil | MEN 2A                               | 180      | S.E.E.  |                                   |
| 27 | 29   | V    | SR. bil | MEN 2A                               | 52       | S.E.E.  |                                   |
| 28 | 28   | V    | SR. bil | MEN 2A                               | 39       | S.E.E.  |                                   |
| 29 | 62   | M    | SR. bil | MEN 2A                               | 32       | M.O.C.  |                                   |
| 30 | 31   | V    | SR. der | MEN 2A                               | 12       | S.E.E.  |                                   |
| 31 | 56   | V    | SR. bil | MEN 2A                               | 25       | S.E.E.  |                                   |
| 32 | 30   | M    | SR. der | MEN 2A                               | 20       | S.E.E.  |                                   |
| 33 | 26   | M    | SR. der | E.von Recklinghausen                 | 36       | S.E.E.  |                                   |
| 34 | 14   | V    | SR. der | E. von Hippel-Lindau                 | 15       | S.E.E.  |                                   |
| 35 | 39   | M    | SR. der | E.von Recklinghausen                 | 61       | S.E.E.  |                                   |
| 36 | 26   | V    | SR. der | E von Recklinghausen                 | 3        | S.E.E.  |                                   |

.Nº: Caso número; Edad: años; Sexo: V: varón, M: mujer; SEG.T(m): tiempo de seguimiento(meses).

EST.SEG.:estado de seguimiento:ME: muerto de la enfermedad, S.E.E.: sin evidencia de enfermedad, V.E: vivo con enfermedad. MOC: muerto por otras causas.CRIT.MAL: criterios de malignidad INF.EXT: infiltración extensa de estructuras adyacentes.

TABLA 2

| CASO Nº | CV   | DI   | %Cél.>4c | PLOIDÍA     | IP(%) | COC. 4C\5 |
|---------|------|------|----------|-------------|-------|-----------|
| 1       | 7,61 | 1,93 | 22,9     | Tetraploide | 46,41 | 1,33      |
| 2       | 7,18 | 1,78 | 15,68    | Aneuploide  | 39,64 |           |
| 3       | 7,5  | 1    |          | Diploide    |       | 0,4       |
| 4       | 8,52 | 1,51 | 12,49    | Aneuploide  | 29,72 |           |
| 5       | 8,31 | 1,72 | 19,96    | Aneuploide  | 47,43 |           |
| 6       | 6,6  | 1    |          | Diploide    |       | 0,32      |
| 7       | 6,97 | 1,86 | 8,13     | Aneuploide  | 41,13 |           |
| 8       | 7,18 | 1,98 | 2,61     | Tetraploide | 59,91 | 0,86      |
| 9       | 9,91 | 1    |          | Diploide    |       | 0,76      |
| 10      | 9,51 | 1    | 22,47    | Diploide    | 54,08 | 0,57      |
| 11      | 8,45 | 2,01 | 20       | Tetraploide | 40    | 1,68      |
| 12      | 9,61 | 1,77 | 15,4     | Aneuploide  | 49,12 |           |
| 13      | 8,55 | 1    | 139,64   | Diploide    |       | 0,43      |
| 14      | 8,47 | 1    |          | Diploide    |       | 0,4       |
| 15      | 7,59 | 1,47 | 7,96     | Aneuploide  | 32,12 |           |
| 16      | 8,52 | 1    |          | Diploide    |       | 0,36      |
| 17      | 6,83 | 1,71 | 6,93     | Aneuploide  | 27,44 |           |
| 18      | 8,09 | 1,39 | 15       | Aneuploide  | 51,2  |           |
| 19      | 6,06 | 1,86 | 7,78     | Aneuploide  | 48,6  |           |
| 20      | 6,05 | 1,31 | 4        | Aneuploide  | 26,87 |           |
| 21      | 8,04 | 1,97 | 28,52    | Tetraploide | 41,16 | 2,5       |
| 22      | 9,63 | 1    |          | Diploide    | 35,36 | 1,12      |
| 23      | 8,75 | 1,93 | 12,11    | Tetraploide | 43,23 | 1,3       |
| 24      | 9,76 | 1    |          | Diploide    |       | 0,22      |
| 25      | 9,13 | 1    |          | Diploide    |       | 0,34      |
| 26      | 8,48 | 1    |          | Diploide    |       | 0,45      |
| 27      | 7,62 | 1,92 | 8,33     | Tetraploide | 37,72 | 0,84      |
| 28      | 7,27 | 1    |          | Diploide    |       | 0,23      |
| 29      | 7,14 | 1,54 | 7,92     | Aneuploide  | 38,71 |           |
| 30      | 9,44 | 1,97 | 10       | Tetraploide | 38    | 2,7       |
| 31      | 7,85 | 2,05 | 13,74    | Tetraploide | 42,47 | 1,2       |
| 32      | 7,52 | 1,53 | 5,3      | Aneuploide  | 49,6  |           |
| 33      | 8,59 | 1    |          | Diploide    |       | 0,6       |
| 34      | 8,5  | 1,97 | 13,43    | Tetraploide | 34,14 | 2,21      |
| 35      | 9,04 | 1,95 | 12,24    | Tetraploide | 42    | 0,86      |
| 36      | 9,49 | 1    | 8,49     | Diploide    | 44,28 | 0,76      |

Claves de la tabla: **CV**: Coeficiente de variación del pico 2c.

**DI**: Índice de ADN

**%Cél>4c**: Porcentaje de células en el rango hipertetraploide (casos no diploides)

**IP**: índice de proliferación.

**COC. 4C\5**: cociente entre el % de células en el pico 4c y el % de células en fase S. (Sólo para tumores tetraploides y diploides)

TABLA 3

| CASO | MACRO1   | MACRO2       | TAP  | CAPSULA    | INFCAPS     | PATRÓN     | PATRÓN 2º  |
|------|----------|--------------|------|------------|-------------|------------|------------|
| 1    | Sólido   | Unicéntrico  | N.E. | Completa   | No          | Alveolar   | No         |
| 2    | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Completa   | Penetración | Trabecular | Alveolar   |
| 3    | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Incompleta | No          | Trabecular | No         |
| 4    | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | No         |
| 5    | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Incompleta | No          | Difuso     | No         |
| 6    | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Alveolar   | Trabecular |
| 7    | Quístico | Unicéntrico  | No   | Completa   | Penetración | Trabecular | No         |
| 8    | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Incompleta | No          | Trabecular | No         |
| 9    | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Alveolar   | Trabecular |
| 10   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | Difuso     |
| 11   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | Penetración | Difuso     | Trabecular |
| 12   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Incompleta | No          | Difuso     | No         |
| 13   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | No         |
| 14   | Quístico | Unicéntrico  | No   | Completa   | Focal       | Alveolar   | Trabecular |
| 15   | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Completa   | No          | Alveolar   | Trabecular |
| 16   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | No         |
| 17   | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Completa   | No          | Trabecular | Difuso     |
| 18   | Quístico | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | Difuso     |
| 19   | Quístico | Unicéntrico  | No   | Completa   | Penetración | Trabecular | Difuso     |
| 20   | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Completa   | No          | Alveolar   | Trabecular |
| 21   | Sólido   | Multinodular | No   | Incompleta | Penetración | Alveolar   | Trabecular |
| 22   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | No         |
| 23   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | Penetración | Alveolar   | Trabecular |
| 24   | Quístico | Multinodular | N.E. | Incompleta | No          | Trabecular | Difuso     |
| 25   | Sólido   | Multinodular | Sí   | Completa   | No          | Alveolar   | No         |
| 26   | Sólido   | Multinodular | Sí   | Incompleta | No          | Trabecular | Alveolar   |
| 27   | Sólido   | Multinodular | Sí   | Incompleta | Focal       | Trabecular | Alveolar   |
| 28   | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Ausente    | No          | Trabecular | Alveolar   |
| 29   | Sólido   | Multinodular | Sí   | Incompleta | Penetración | Trabecular | Difuso     |
| 30   | Sólido   | Unicéntrico  | N.E. | Completa   | No          | Trabecular | No         |
| 31   | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Incompleta | Focal       | Trabecular | No         |
| 32   | Sólido   | Unicéntrico  | No   | Completa   | No          | Trabecular | No         |
| 33   | Sólido   | Unicéntrico  | N.E. | Completa   | No          | Difuso     | Trabecular |
| 34   | Sólido   | Multinodular | Sí   | Completa   | Focal       | Trabecular | Alveolar   |
| 35   | Quístico | Unicéntrico  | No   | Completa   | Focal       | Trabecular | Difuso     |
| 36   | Sólido   | Unicéntrico  | Sí   | Incompleta | Focal       | Trabecular | Alveolar   |

**MACRO 1:** Tumor sólido o con áreas quísticas

**TAP:** Tejido adiposo pardo periadrenal o peritumoral. N.E.:no evaluable.

**INFCAPS:** infiltración capsular **PATRÓN 2º** :presencia de un segundo patron minoritario.

TABLA 3(cont.)

| CASO N° | NECROSIS   | HEMORR   | INV.VASC | CAMB. ESTR.    | TIP.CEL        | C. FUSIF | PLEOM    |
|---------|------------|----------|----------|----------------|----------------|----------|----------|
| 1       | Focal      | No       | No       | Fibrosis       | Polig. grande  | No       | Intenso  |
| 2       | No         | Leve     | No       | Fibrosis       | Polig. grande, | No       | Leve     |
| 3       | No         | Franca   | No       | No             | Polig. grande  | No       | Moderado |
| 4       | No         | Leve     | No       | Fibrosis       | Polig. grande  | Sí       | Moderado |
| 5       | No         | Leve     | No       | Cambio mixoide | Polig. grande  | No       | Intenso  |
| 6       | Focal      | Moderada | No       | Fibrosis       | Polig. pequeña | No       | Moderado |
| 7       | Focal      | Franca   | No       | Ambos          | Red. peq,      | No       | Leve     |
| 8       | No         | Leve     | No       | Fibrosis       | Polig. grande  | No       | Intenso  |
| 9       | No         | Franca   | No       | Ambos          | Polig. pequeña | No       | Moderado |
| 10      | Focal      | Moderada | No       | Cambio mixoide | Polig. grande  | No       | Intenso  |
| 11      | Focal      | No       | Sí       | Fibrosis       | Polig. pequeña | No       | Moderado |
| 12      | No         | Franca   | No       | No             | Polig. grande  | No       | Intenso  |
| 13      | No         | Leve     | No       | No             | Polig. grande  | No       | Moderado |
| 14      | No         | Leve     | No       | Cambio mixoide | Polig. grande  | Sí       | Intenso  |
| 15      | Confluente | Franca   | No       | Fibrosis       | Polig. pequeña | No       | Leve     |
| 16      | No         | No       | No       | Ambos          | Polig. pequeña | No       | Moderado |
| 17      | Focal      | No       | No       | No             | Red. peq,      | No       | Moderado |
| 18      | No         | Franca   | No       | Fibrosis       | Polig. grande  | No       | Moderado |
| 19      | Confluente | Franca   | Sí       | Ambos          | Polig. grande  | Sí       | Intenso  |
| 20      | No         | No       | No       | No             | Polig. grande  | No       | Leve     |
| 21      | Confluente | Moderada | No       | Ambos          | Polig. pequeña | No       | Leve     |
| 22      | No         | No       | No       | No             | Polig. grande  | No       | Leve     |
| 23      | Confluente | Moderada | No       | No             | Red. peq,      | No       | Moderado |
| 24      | Focal      | Moderada | No       | No             | Polig. grande  | No       | Leve     |
| 25      | No         | Moderada | No       | No             | Polig. grande  | Sí       | Leve     |
| 26      | No         | Leve     | No       | No             | Polig. grande  | Sí       | Moderado |
| 27      | Focal      | Leve     | No       | No             | Polig. grande  | No       | Moderado |
| 28      | No         | No       | No       | Fibrosis       | Polig. grande  | No       | Leve     |
| 29      | No         | Franca   | No       | No             | Polig. pequeña | Sí       | Moderado |
| 30      | No         | No       | No       | No             | Polig. grande  | No       | Leve     |
| 31      | Focal      | No       | No       | Cambio mixoide | Polig. grande  | Sí       | Moderado |
| 32      | No         | Leve     | No       | No             | Polig. grande  | No       | Moderado |
| 33      | No         | Moderada | No       | No             | Polig. grande  | No       | Intenso  |
| 34      | No         | Leve     | No       | Ambos          | Polig. pequeña | No       | Moderado |
| 35      | Confluente | Moderada | No       | Fibrosis       | Polig. pequeña | No       | Moderado |
| 36      | No         | Leve     | No       | Fibrosis       | Polig. grande  | No       | Moderado |

INV.VASC: invasión vascular. ALT. ESTR.: alteraciones estromales. TIP.CEL: tipo celular.

POLIG.: poligonal PEQ.: pequeña. C.FUSIF.: células fusiformes. PLEOM.: pleomorfismo celular.

TABLA 3(cont.)

| CASO N° | GLOB.CIT    | PSEUDINC.   | MAT.COL   | PIGMENTO      | C.GANG. | MITOSIS | NG          |
|---------|-------------|-------------|-----------|---------------|---------|---------|-------------|
| 1       | No          | Raras       | Escaso    | Macrófagos    | No      | 2       | Ocasionales |
| 2       | Ocasionales | Raras       | Escaso    | Macrófagos    | No      | 1       | Raras       |
| 3       | Frecuentes  | Ocasionales | Escaso    | Macrófagos    | No      | 0       | No          |
| 4       | No          | No          | No        | Cel.tumorales | No      | 0       | No          |
| 5       | No          | No          | No        | Cel.tumorales | No      | 0       | Frecuentes  |
| 6       | Raras       | Raras       | No        | Macrófagos    | No      | 0       | Raras       |
| 7       | No          | No          | No        | Macrófagos    | No      | 1       | Raras       |
| 8       | Frecuentes  | No          | Escaso    | No            | No      | 0       | Frecuentes  |
| 9       | No          | No          | Escaso    | No            | No      | 0       | Raras       |
| 10      | Raras       | Frecuentes  | No        | Cel.tumorales | No      | 2       | Frecuentes  |
| 11      | No          | No          | No        | No            | No      | 0       | No          |
| 12      | No          | No          | Escaso    | No            | No      | 1       | Frecuentes  |
| 13      | Raras       | No          | No        | Macrófagos    | Sí      | 0       | Ocasionales |
| 14      | No          | No          | Escaso    | Macrófagos    | No      | 0       | Frecuentes  |
| 15      | No          | No          | No        | No            | No      | 0       | No          |
| 16      | No          | No          | No        | Cel.tumorales | No      | 0       | No          |
| 17      | No          | Raras       | No        | No            | No      | 10      | Raras       |
| 18      | Raras       | Raras       | Escaso    | Cel.tumorales | Sí      | 0       | Ocasionales |
| 19      | Raras       | Raras       | Frecuente | Macrófagos    | No      | 4       | Frecuentes  |
| 20      | Raras       | No          | No        | No            | No      | 0       | Raras       |
| 21      | Raras       | No          | No        | Macrófagos    | No      | 1       | No          |
| 22      | Ocasionales | Raras       | No        | No            | No      | 0       | No          |
| 23      | No          | No          | No        | Macrófagos    | No      | 2       | No          |
| 24      | Raras       | Raras       | No        | No            | No      | 0       | Raras       |
| 25      | Frecuentes  | No          | No        | No            | Sí      | 0       | Raras       |
| 26      | Ocasionales | No          | No        | Macrófagos    | No      | 1       | No          |
| 27      | Frecuentes  | Raras       | Escaso    | No            | No      | 2       | Raras       |
| 28      | Frecuentes  | No          | Escaso    | No            | No      | 0       | No          |
| 29      | No          | No          | No        | Macrófagos    | No      | 0       | No          |
| 30      | Raras       | No          | No        | No            | No      | 1       | Raras       |
| 31      | Frecuentes  | No          | Escaso    | Macrófagos    | No      | 0       | Raras       |
| 32      | Frecuentes  | Raras       | Escaso    | No            | No      | 1       | No          |
| 33      | Raras       | Raras       | Escaso    | No            | No      | 1       | Frecuentes  |
| 34      | No          | Raras       | No        | No            | No      | 3       | Ocasionales |
| 35      | Raras       | Raras       | No        | Cel.tumorales | No      | 1       | Ocasionales |
| 36      | Raras       | Raras       | No        | Macrófagos    | No      | 1       | No          |

GLOB.CIT: glóbulos intracitoplásmicos. PSEUDINC.: pseudoinclusiones intranucleares.

MAT.COL.: material coloide. C.GANG.: células ganglionares. NG: núcleos grandes.

TABLA 4

| VARIABLE 1       | VARIABLE 2     | SIGNIFICACIÓN | FISHER     |
|------------------|----------------|---------------|------------|
| PLOIDÍA(3)       | BENvsMAL       | 0.03534       |            |
| PLOIDÍA(3)       | PROGRESION     | 0.02188       |            |
| PLOIDÍA(2)       | BENvsMAL       | 0.03177       | F: 0.01316 |
| PLOIDÍA(2)       | PROGRESION     | 0.01785       | F: 0.00601 |
| DIPLOIDvsANEUPLO | BENvsMAL       |               | F: 0.03311 |
| DIPLOIDvsTETRAPL | BENvsMAL       |               | F: 0.01976 |
| DI TOTAL         | BENvsMAL       | 0.00532       | F: 0.00259 |
| DI TOTAL         | PROGRESION     | 0.01785       | F: 0.01443 |
| DI ANEUP         | BENvsMAL       |               | F: 0.06667 |
| BENvsMAL         | INF.CAPSULA    | 0.00004       |            |
| BENvsMAL         | NECROSIS(A)    | 0.03071       |            |
| BENvsMAL         | ESTROMA        | 0.09028       |            |
| PROGRESION       | INF.CAPSULA    | 0.00016       |            |
| PROGRESION       | NECROSIS(A)    | 0.01785       |            |
| PROGRESION       | TIPO CELULAR 1 | 0.00699       |            |
| PLOIDÍA(3)       | INF.CAPSULA    | 0.01309       |            |
| PLOIDÍA(2)       | INF.CAPSULA    | 0.04415       | F: 0.00493 |
| FAMvsESPOR       | MACRO 2        | 0.00916       |            |
| FAMvsESPOR       | GRASA PARDA1   | 0.00124       |            |
| FAMvsESPOR       | CAPSULA(c,i,a) | 0.09663       |            |
| FAMvsESPOR       | GLOB.CITOP.1   | 0.07698       |            |
| MEN noMEN        | MACRO 2        | 0.00748       | F: 0.00557 |
| MEN noMEN        | GRASA PARDA1   | 0.00823       |            |
| MEN noMEN        | CAPSULA(c,i,a) | 0.02406       |            |
| MEN noMEN        | GLOB.CITOP.1   | 0.01181       |            |
| MEN noMEN        | NÚC.GRANDES    | 0.08263       |            |
| BENvsMAL         | INF.CÁPSULA    | 0.00004       |            |
| BENvsMAL         | NECROSIS(B)    | 0.04947       | F: 0.03609 |
| BENvsMAL         | INV.VASCULA    | 0.06469       | F: 0.04444 |
| PROGRESION       | NECROSIS(B)    | 0.01785       | F: 0.01433 |
| PROGRESION       | INV.VASCULA    | 0.09289       | F: 0.05714 |

TABLA 4 (cont.)

| VARIABLE 1   | VARIABLE 2     | SIGNIFICACIÓN | FISHER     |
|--------------|----------------|---------------|------------|
| PROGRESION   | TIPO CELULAR 2 | 0.01481       | F:0.01176  |
| PLOIDÍA(3)   | NECROSIS(B)    | 0.04918       |            |
| FAMvsESPOR   | GRASA PARDA2   | 0.01976       | F: 0.01126 |
| FAMvsESPOR   | CAPSULA 2      |               | F: 0.07143 |
| FAMvsESPOR   | GLOB.CITOP 2   | 0.02964       |            |
| MEN noMEN    | GRASA PARDA 2  | 0.04123       | F: 0.03620 |
| MEN noMEN    | CAPSULA 2      | 0.04123       | F: 0.03620 |
| MEN noMEN    | GLOB.CITOP 2   |               | F: 0.06198 |
| PLOIDÍA(3)   | SEXO           | 0.00788       |            |
| COC. 4cS     | BENvsMAL       |               | F: 0.07619 |
| PESO TUMORAL | BENvsMAL       | 0.0284        |            |

**Claves de la tabla:**

En el apartado de SIGNIFICACIÓN se hace constar el valor de p-value obtenido mediante el Test de Pearson (o el del contraste de Kruskal-wallis en la variable peso) y en el apartado de FISHER el correspondiente a la prueba exacta de Fisher en distribución de dos colas. Figuran en negrilla aquellas medidas de asociación obtenidas mediante pruebas que permiten extrapolar los resultados a situaciones más generales (Pearson con frecuencias esperadas mayores de 5, Fisher, Kruskal-wallis) y los valores restantes expresan el p-value del test de pearson con frecuencias esperadas menores de 5. El significado de las abreviaturas es el siguiente:

**PLOIDÍA(3)** :Ploidía de ADN tomada en tres categorías : diploide, hiperdiploide, tetraploide.

**PLOIDÍA(2)**:Ploidía de ADN tomada en dos categorías diploide, nodiploide. **DIPLOIDvsANEUPLO**:

diploide o hiperdiploide.**DIPLOIDvsTETRAPL**: diploide o tetraploide. **DI TOTAL**: índice de ADN del total de la muestra tomados en  $\langle \hat{o} \geq 1,75$ .

**DI ANEUP**: índice de ADN de los casos hiperdiploides tomados en  $\langle \hat{o} \geq 1,75$ . **BENvsMAL** : benigno o maligno.**PROGRESION**: tumores benignos y que no progresaron y tumores malignos o que progresaron a otros lugares cromafines.

**FAMvsESPOR**: tumores esporádicos o asociados a síndromes familiares. **MEN noMEN**: tumores asociados a síndromes MEN o no. **COC. 4cS**: cociente entre el % de células en el pico 4c y el % de células en fase S.(Sólo para tumores tetraploides ) tomados en  $\langle \hat{o} \geq 1,3$ .

**INF.CAPSULA**: infiltración de la cápsula: no, focal, penetración. **NECROSIS(A)**: no,focal, confluyente. **NECROSIS(B)**: sí, no. **TIPO CELULAR 1**:

pequeña redonda, polgonal grande, poligonal pequeña. **TIPO CELULAR 2**: pequeña redonda, restantes tipos celulares. **MACRO 2**:Multinodular, Unicéntrico. **GRASA PARDA 2**: no evaluable, sí, no.

**CAPSULA(c,i,a)**: completa, incompleta, ausente. **CAPSULA 2**: sí, no.

**GLOB.CITOP.1**: glóbulos hialinos intracitoplásmicos: no, raros, ocasionales, frecuentes.

**GLOB.CITOP.2**:glóbulos hialinos intracitoplásmicos: sí, no.**NÚC.GRANDES**: núcleos grandes: no, raros, ocasionales, frecuentes.

TABLA 5

|                            | PLOIDÍA         |                    | PLOIDÍA         |                   |                    | DI             | Coc. 4c/S  |
|----------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-------------------|--------------------|----------------|------------|
|                            | Diploide (n=14) | No diploide (n=22) | Diploide (n=14) | Aneuploide (n=12) | Tetraploide (n=10) | DI>1,75 (n=14) | >1,3 (n=6) |
| Benigno (n=28)             | 14(50)          | 14(50)             | 14(50)          | 8(29)             | 6(21)              | 7(25)          | 2(33)      |
| Maligno (n=8)              | 0(0)            | 8(100)             | 0(0)            | 4(50)             | 4(50)              | 7(87)          | 4(100)     |
| No Progresión (n=27)       | 14(52)          | 13(48)             | 14(52)          | 7(26)             | 6(22)              | 6(22)          |            |
| Progresión (n=9)           | 0(0)            | 9(100)             | 0(0)            | 5(55)             | 4(45)              | 7(78)          |            |
| Penetración capsular (n=7) | 0(0)            | 7(32)              | 0(0)            | 4(33)             | 3(33)              |                |            |
| Necrosis (n=14)            |                 |                    | 3(21)           | 4(33)             | 7(70)              |                |            |
| Varón (n=18)               | 6(33)           | 12(67)             | 6(33)           | 3(12)             | 9(50)              |                |            |
| Mujer (n=18)               | 8(44)           | 10(56)             | 8(44)           | 9(50)             | 1(6)               |                |            |

**Progresión:** tumores malignos o que recidivaron a otros lugares cromafines.

**DI:** índice de ADN

**COC 4c/S:** cociente entre el % de células en el pico 4c y el % de células en fase S. (Sólo para tumores tetraploides)

TABLA 6

|               | Cápsula incompleta o ausente | Penetración capsular | Necrosis | Invasión vascular | Células pequeñas redondas | Multinuclearidad | Grasa parda | Glóbulo hialinos |
|---------------|------------------------------|----------------------|----------|-------------------|---------------------------|------------------|-------------|------------------|
| Benigno       |                              | 1(3,5)               | 8(29)    | 0(0)              |                           |                  |             |                  |
| Maligno       |                              | 6(75)                | 6(75)    | 2(25)             |                           |                  |             |                  |
| No progresión |                              | 1(4)                 | 7(26)    | 0(0)+             | 0(0)                      |                  |             |                  |
| Progresión    |                              | 6(67)                | 7(78)    | 2(22)+            | 3(33)                     |                  |             |                  |
| Esporádico    |                              | 6(26)                |          |                   |                           | 1(4)             | 4(17)       | 11(48)           |
| Familiar      |                              | 1(8)                 |          |                   |                           | 6(46)            | 8(61)       | 11(85)           |
| No MEN        | 6(22)                        |                      |          |                   |                           | 2(7)             | 6(22)       | 14(52)*          |
| MEN           | 6(67)                        |                      |          |                   |                           | 5(55)            | 6(67)       | 8(89)*           |

n(%)

+p=0,0571(Fisher).

\*p= 0,0619(Fisher).

---

## **DISCUSIÓN**

---

En citometría de flujo, el coeficiente de variación de los diferentes picos es uno de los parámetros de mayor importancia en la evaluación de la calidad de los histogramas obtenidos, y por tanto de la exactitud de los contenidos de ADN medidos. De su valor depende el poder de resolución, esto es, de representar separadamente dos poblaciones celulares con contenido de ADN relativamente próximos (200). Expresa la dispersión absoluta de la distribución de los datos como un porcentaje de la media estadística (201). Puede ser calculado mediante diferentes métodos (estadístico, fórmula) (161). Cuanto mayor sea el coeficiente de variación, menor es la exactitud con que puede estimarse las diferentes fases del ciclo celular, en especial la fase S (155).

En la práctica los CV menores del 1% son excepcionales. Con mayor frecuencia CVs de 2 a 3 % pueden ser observados en linfocitos inactivos. Para poblaciones celulares menos homogéneas, como las de los tumores humanos, los CVs son con frecuencia mucho mayores. CVs del 10% o más, no se consideran aceptables y representan preferentemente heterogeneidad tumoral o deterioro del ADN, por error de muestreo o de técnica (157). Sin embargo, en la literatura se hallan presentes numerosos artículos con un amplio rango de CVs e incluso en los que no viene reseñado el CV.

Desde fases muy tempranas en la elaboración del presente estudio se hizo evidente un problema técnico que limitaba, hasta cierto punto, el alcance de los resultados: los coeficientes de variación de los picos G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> de las poblaciones diploides eran elevados, con frecuencia superiores al 8% (media:8,15). Cabían varias posibilidades que pudieran justificar la elevación de los coeficientes de variación: mala conservación del material empleado, defectos de selección de los bloques, escasa destreza del doctorando en la tecnificación de las muestras, defecto del citómetro o problemas inherentes al propio órgano o tejido. Estas posibilidades fueron descartadas sucesivamente.

Respecto a la selección de los bloques de parafina, se eligieron aquellos que no presentaban hemorragia, ni necrosis, ni signos de autólisis, y en la mayoría de los casos contenían un control interno (corteza suprarrenal por lo general) que no superaba el 20% del total del material. Fueron seguidas todas las recomendaciones sobre conservación, calibración y mantenimiento del aparato especificados por el fabricante, hallándose los diferentes parámetros dentro de rangos aceptables. En muchos de los casos el proceso completo (disgregación, tinción, lectura en el citómetro) fue repetido por el propio doctorando obteniendo siempre resultados superponibles. Además, algunos de los casos fueron repetidos en todo su proceso de análisis citométrico por otra persona habituada a la citometría de flujo y de reconocida solvencia en este campo (M.D.M.) obteniendo unos resultados casi idénticos, incluyendo el CV, a los del propio doctorando. Finalmente, este último realizó estudio citométrico de algunos tumores de corteza suprarrenal, previamente estudiados y con CV bajos (inferiores a 7) con resultado muy similares a los obtenidos en su día.

Las posibilidades, por tanto, se restringen al propio tejido. La autólisis es una causa conocida que afecta adversamente a la calidad del histograma obtenido (155). Es posible que un defecto de fijación pueda contribuir a la elevación de los CVs en algunos casos concretos (especialmente aquellos mayores de 10, que fueron descartados), aunque es improbable que una mala conservación del tejido sea una característica común a un número sustancial de casos estudiados.

Por último, el coeficiente de variación puede ser específico de órgano y tejido (160, 161, 202) y puede indicar heterogeneidad biológica e inestabilidad genética. Este es un tema citado con relativa frecuencia en la literatura, aunque no suficientemente esclarecido.

No existe un consenso claro acerca de la definición de un CV “ancho” y no existen criterios establecidos para la exclusión de histogramas de ADN, basándose en el valor del CV. Generalmente, los histogramas de ADN con CV mayor del 10% en el

pico G0/G1 tienden a clasificarse como amplios e ininterpretables, aunque valores tan bajos como 5 a 8 y tan altos como 12 a 15 han sido considerados aceptables (161). Koss(202) en su libro habla de CV muy grandes, no aceptables, a partir del 10%. Además, con bastante frecuencia los artículos sobre citometría, no hacen referencia a los valores de CV de los histogramas incluidos (161, 202). En concreto, de todos los artículos de citometría de flujo aplicada a la PSA tan sólo en 4 constan los valores de los CVs. En 3 de ellos consideran aceptables CVs de hasta 10 (171, 188, 195) y en 1 hasta 7 (173).

Nosotros, en función de los datos existentes en la literatura sobre citometría en general y sobre citometría aplicada a los PSA y en función de la viabilidad del presente estudio hemos adoptado como límite superior valores del CV de hasta 10.

Se trata de un coeficiente de variación relativamente elevado que plantea dos problemas fundamentales. En primer lugar es posible que pasen inadvertidas poblaciones celulares con contenido aneuploide de ADN pero muy próximas al rango diploide (DI bajos). (155, 161). Por tanto, y en sentido estricto, cuando los coeficientes de variación son elevados (los límites son arbitrarios y dependientes del criterio de los diferentes autores : 155,201) es más correcto hablar de histogramas peridiploides que diploides. Sin embargo, y como veremos posteriormente, los histogramas de ADN peridiploides son agrupables con los diploides sin que de ello se derive distorsión de los resultados en cuanto validez pronóstica o de otro tipo. Es decir, la presencia de supuestas poblaciones celulares con índices de ADN próximos a 1 y que pudieran haber quedado enmascaradas en el pico diploide de histogramas con CV elevados, carece de significación.

El segundo problema derivado de los altos CV es la imposibilidad de realizar un estudio más o menos detallado y exacto del ciclo celular y en especial de la fase S y del índice de proliferación global(155,201). De hecho, en la mayoría de los estudios citométricos aplicados a los PSA no se recogen resultados correspondientes a la fase

Si el valor pronóstico se centra más en la ploidía que en el estudio del ciclo celular.

Los criterios para la clasificación e interpretación de los histogramas son muy variables y en gran medida depende fuertemente, en histogramas complicados, de la inspección visual y por tanto del juicio subjetivo de cada investigador (162). Siguiendo las indicaciones de la convención para la nomenclatura en citometría de ADN (159): “El diagnóstico de aneuploidía de ADN sólo debería ser considerado si son demostrados al menos 2 picos G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> separados”. Además, algunos autores exigen la presencia de los correspondientes picos G<sub>2</sub>M y que el % de células en el pico G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> anómalo sea mayor al 10% del total (155). Una vez establecida la existencia de una población celular anómala, esta es clasificada en función del índice de ADN. No obstante, existe una gran variabilidad en los criterios utilizados en los diferentes estudios (161) y no son infrecuentes los artículos en los que no se especifican los criterios empleados.

Dentro de los estudios citométricos aplicados a los PSA, se observa cierta diversidad de criterios en cuanto a la clasificación de los histogramas. Los estudios de citometría imagen tienden a utilizar los criterios de Auer (203) (10,184), Dressler (155) (6), Bocking (204) (10, 184) u otros (178).

Los estudios de citometría de flujo, en su mayoría, siguen los criterios empleados por Hosaka en su primera publicación (188) donde se contemplan tres categorías: Diploide, aneuploide (hiperdiploide) y tetraploide. Esta última categoría incluye aquellos histogramas que concentran más del 15% de las células medidas en la región 4c. No obstante, el propio Hosaka en este artículo y en otro posterior (187) señala la superioridad del criterio del 20% en cuanto a predicción del comportamiento biológico, dado que ninguno de los tumores tetraploides con 4c entre el 15 y el 20% tuvo un comportamiento maligno. Otros artículos aplican este mismo esquema y difieren tan sólo en el criterio utilizado en la clasificación de los histogramas tetraploides: 4c (G<sub>2</sub>-M de la población diploide) mayor al 15% (176,188, 190), 18% (173), 20% (181,183,

187). Otras publicaciones utilizan este sistema de clasificación (D,A,T), aunque sin señalar expresamente los criterios (171,174,193) o indicándolos de forma parcial e insuficiente (180, 195).

En este estudio hemos aplicado el sistema clasificatorio usado por Hosaka(188), aunque definiendo las poblaciones tetraploides en función del 20%.

En sentido estricto, sólo pueden considerarse PSA malignos aquellos tumores que presenten metástasis a distancia en lugares no cromafines (145). Sin embargo, en muchos de los trabajos se incluyen además como criterios de malignidad la infiltración de estructuras adyacentes y/o la recidiva local(6, 25, 36, 42, 187, 189, 190, 195, 196, 197, 205, 206, 213). La aparición posterior de nuevos focos neoplásicos en lugares cromafines no constituye criterio de malignidad si bien, estos casos son agrupables junto a los que cumplen criterios de malignidad, bajo el concepto de progresión de la enfermedad (176). Ocho de nuestros casos cumplen al menos uno de los tres criterios de malignidad antes mencionados, y un caso presentó recidiva posterior de la enfermedad en la glándula suprarrenal contralateral que sumado a los 8 malignos hacen un total de 9 casos con progresión de la enfermedad (o criterios de malignidad).

Considerados globalmente todos los casos, el 61% mostró un patrón anómalo de ploidía. Estos datos son concordantes con los de la mayoría de los artículos, que señalan una incidencia de patrones anómalos de ploidía de ADN oscilantes entre el 60% y el 70% (171, 172, 176, 178, 183, 187, 188, 189 ), siendo menos los artículos con valores superiores al 70% (174, 184, 190, 191) o inferiores al 50%(173, 175, 182, 185, 192).

Fueron observados contenidos aneuploides (hiperdiplodes) de ADN en un tercio de los casos (33,3%), valor muy coincidente con el de la mayoría de las publicaciones, que sitúan la frecuencia de aneuploidía entre el 27 y el 33% de los casos (172, 176, 177, 187, 188, 189, 190, 195). En ningún trabajo se refieren valores por encima del 40% o por debajo del 10%. Menos homogéneos son, sin embargo, los resultados

obtenidos en los diferentes estudios, acerca de los patrones tetraploides. Las frecuencias oscilan entre el 15% (173) y el 62% (174). No obstante, la mayoría se sitúan entre el 21 y el 41% (172, 175, 176, 183, 187, 188, 189, 195). Es probable que esta mayor dispersión de los datos, tampoco excesiva, se halla influenciada, en parte, por las pequeñas diferencias existentes en los criterios empleados por la clasificación de los histogramas tetraploides. En nuestro estudio la frecuencia de tetraploidía de ADN ha sido del 28%..

Hemos tratado de correlacionar los patrones citométricos de distribución del ADN con diferentes variables clínicas y biológicas, destacando sobre todas ellas, por su trascendencia práctica, las dependientes del comportamiento biológico y evolutivo de los PSA.

En este sentido destaca el hecho de que todos los casos con patrón diploide (39%) han tenido un curso biológico benigno, mostrando patrones anómalos de ploidía todos los casos malignos o con progresión de la enfermedad a otros lugares cromafines. Estas diferencias en la distribución de los patrones citométricos de ploidía han resultado estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher con  $p = 0,013$  para casos malignos y  $p = 0,016$  si incluimos los casos malignos y con progresión a lugares cromafines.)

Del total de casos ( $n = 36$ ), 12 (33%) mostraron un patrón aneuploide (de ellos 4 malignos) y 10 (28%) tetraploide (4 de ellos malignos). Estas diferencias de ploidía en cuanto al pronóstico, han sido estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher con  $p = 0.03311$  y  $0.01976$  para los tumores aneuploides y tetraploides respectivamente). Coinciden nuestros resultados con los de otros autores que no detectan malignidad entre los tumores con patrones diploides de ADN (171, 172, 173, 184, 185, 188, 192, 193, 194).

Así, como ya ha sido indicado en la introducción, de la Clínica Mayo, y a partir de un mismo grupo de pacientes, se originan cuatro publicaciones sobre el significado

clínico del patrón de ploidía de ADN en feocromocitomas (176, 187, 188, 193). De ellos, el que recoge un mayor número de pacientes (n=184) es el artículo de Nativ en Cancer en 1992 (176) donde se señala que la ploidía de ADN es una variable pronóstica importante e independiente en pacientes con feocromocitoma. En dicho estudio ninguno de los pacientes con histogramas diploides (n=64) presentó metástasis ni murió de la enfermedad (p menor 0,01), y tan sólo 1 tuvo recidiva de la misma. Todos los pacientes con progresión de la enfermedad (n=22) menos 1 tuvieron un patrón anómalo de ploidía (p menor de 0,001) con un índice de fracaso (progresión o muerte por cancer) del 32% para tumores con histogramas aneuploides o tetraploides. Este mismo autor y en el mismo año confirma en otro artículo (193) sobre 88 pacientes con PSA, el buen pronóstico de los pacientes con histogramas diploides. Estos dos artículos fueron precedidos por otros dos del mismo grupo de la Clínica Mayo (187, 188). En 1987 Hosaka y cols (188), sobre 62 pacientes con un seguimiento mínimo de 10 años obtuvieron los mismos resultados: todos los pacientes con histogramas normales tuvieron un curso clínico benigno, y el 31% de los pacientes clasificados como ADN tetraploides y el 39% de los que presentaban un pico aneuploide tuvieron evidencia de malignidad. Estas diferencias fueron significativas (p menor 0,05 y p menor 0,02 respectivamente). Este mismo autor, en 1991 (187), a partir de los mismos pacientes, hace algunas apreciaciones de índole práctica y metodológica sobre los criterios de clasificación e interpretación de los histogramas no aneuploides (superioridad del parámetro 4C sobre el índice de proliferación y utilidad del cociente 4 c/s y pico en 8c), y propone una clasificación pronóstica de los feocromocitomas en función de los patrones de ploidía de ADN.

El primer estudio citométrico sobre ploidía de ADN en feocromocitomas fue publicado en 1971. En él Lewis y cols (185), estudian, por citometría estática, el contenido de ADN de 15 tumores, observando un comportamiento benigno en los 12 casos con patrón diploide y maligno en los 3 casos con patrón aneuploide. Los

comienzos eran alentadores.

Otros estudios igualmente favorecen la utilidad pronóstica de la ploidía de ADN. Sasagawa en un estudio sobre 19 pacientes obtiene resultado diploide en todos los PSA benignos y aneuploide en los 2 casos malignos (192). Cope realiza estudio citomorfométrico en 27 tumores observando igualmente un comportamiento benigno en todos los feocromocitomas con patrón diploide(194).

Sobre los pacientes con feocromocitoma atendidos en el Chang Gung Memorial Hospital (Taiwan) se han realizado 3 publicaciones (171, 172, 173). Lai (171) estudia 58 casos apreciando benignidad en todos los tumores diploides y siendo los 4 tumores malignos tetraploides (otros 17 casos fueron benignos y tetraploides). Huang publica unos resultados casi idénticos aunque con un número inferior de casos ( $n=30$ )( $p$  menor 0,05) (172). La tercera publicación procedente del Chang Gung Memorial Hospital expone los resultados del estudio de 79 tumores. El 71% fue diploide (todos benignos) y el resto aneuploides o tetraploides (incluyendo los 7 casos malignos)( $p=0,0003$ ) (173). No obstante en esta publicación se incluyen 15 tumores extra-abdominales, uno de ellos maligno.

Otros autores, al contrario, basándose en la existencia de tumores malignos con patrón diploide (174, 175, 177, 181, 190, 195) y en los frecuentes patrones anómalos de ploidía en PSA benignos, cuestionan o niegan la utilidad pronóstica de la ploidía de ADN; así Heaney (195) incluye en su estudio 26 pacientes con seguimiento clínico superior a 5 años. De ellos tres murieron de la enfermedad de los cuales dos mostraron un patrón diploide, al igual que otro paciente con recidiva. Concluye que la citometría de ADN no es capaz de discriminar entre tumores benignos y malignos. Pattarino(196), no aporta experiencia propia y revisa globalmente los resultados de las, a su juicio, principales publicaciones realizadas sobre el tema. Aunque admite que las diferencias en el patrón de distribución de ploidía entre tumores benignos y malignos es claramente significativa ( $p$  menor de 0,0005), señala que la sensibilidad de los patrones anómalos

de ploidía en la predicción de malignidad es sólo del 18%. Además manifiesta la heterogeneidad de los diferentes estudios y la necesidad de un seguimiento a más largo plazo para validar completamente las conclusiones al respecto.

Gonzalez-Cámpora (177) estudia 16 PSA (4 malignos) observando que el único caso con patrón diploide tuvo comportamiento maligno. Gosset (197) cita un patrón de ploidía similar en tumores benignos y malignos, y en un estudio previo realizado por el mismo grupo (190) sobre 18 PSA malignos el 17% presentó un patrón diploide.

Palberg realiza un estudio citofotométrico sobre 43 feocromocitomas suprarrenales, y concluye que el patrón de ploidía de ADN no permite la discriminación entre tumores benignos y malignos y no ofrece información pronóstica (184). No obstante, ninguno de sus tumores diploides (n=5) tuvo un comportamiento maligno. Esta misma autora, en ese mismo año y sobre el mismo número de casos expone en una segunda publicación unos resultados idénticos a los anteriores(186).

Van Dekken (174) estudia por citometría de flujo de ADN 23 feocromocitomas (18 "primarios" y 5 "metastásicos"), no observando correlación entre ploidía y progresión tumoral (primario, metastásico). Jung publica en su serie (175) la existencia de un PSA maligno con contenido diploide de ADN, así como los frecuentes patrones aneuploides o tetraploides en tumores benignos (175); Grignon determina la ploidía de ADN de 3 feocromocitomas vesicales e indica que el patrón de ploidía de ADN no puede ser usado como criterio de malignidad (181) dado que uno de los casos inicialmente diploide recidivó y dio metástasis.

Existe por último, un grupo de artículos en los que sólo se incluyen tumores benignos(182, 183, 179, 191) o en los que no se recoge el comportamiento clínico(178). Itakura no aprecia correlación entre el patrón aneuploide (29% de sus casos) y el pronóstico en 14 feocromocitomas (182). Zhang publica 19 casos, la mayoría de los cuales presentaban patrones aneuploides (84%) (191). Amberson igualmente comunica una frecuencia de contenidos aneuploides de ADN del 68% en

19 feocromocitomas benignos (183). Klein en su serie de 7 neoplasias suprarrenales comunica un feocromocitoma benigno tetraploide (179).

Remmelink trata de correlacionar, en tumores suprarrenales, el contenido nuclear de ADN con el origen de la neoplasia (cortical, medular, metastásica) y señala una alta incidencia de tetraploidía en feocromocitomas (178).

De nuestros resultados se deduce un índice de malignidad para aquellos tumores con patrones anómalos de ploidía del 36%, habiéndose obtenido en otros estudios los siguientes valores: 13% (171,184), 20% (172), 25% (192), 30% (173), 32% (176) y 34% (188). No obstante hay que tener en cuenta que dichas cifras (al igual que las globales) se hallan influenciadas por la proporción de tumores malignos, sobre el total de casos, incluidos en cada estudio, en el nuestro relativamente alta (8/36). La frecuencia de malignidad para tumores aneuploides y tetraploides ha sido del 33% y del 40% oscilando los valores de otros estudios entre el 0% (171,172) y el 39% (188) para casos aneuploides y entre el 15% (176) y el 41% (173) para casos tetraploides.

Si analizamos con mayor detenimiento los valores del índice de ADN (DI), observamos que el 39% de los casos presentan un valor mayor o igual a 1,75 (Rango tetraploide y aneuploide peritetraploide) incluyéndose en este grupo ( $DI \geq 1,75$ ) 7 de los 8 casos malignos (87,5%). Tan sólo 1 de los tumores malignos y otro benigno con progresión de la enfermedad (recidiva posterior en glándula suprarrenal contralateral) presentaron  $DI < 1,75$  (rango diploide y aneuploide no peritetraploide). Las diferencias entre ambos grupos ( $DI \geq$  ó  $< 1,75$ ) han sido estadísticamente significativas (prueba exacta de Fisher con  $p = 0,0025$  para malignidad y  $p = 0,0144$  para progresión). Si consideramos sólo los casos con patrón aneuploide (12, de los cuales 4 son malignos y 1 con progresión) advertimos que 4 (33%) presentan  $DI \geq 1,75$  y de éstos, 3 son malignos (75%). Entre los 8 casos aneuploides con  $DI < 1,75$  (67%) sólo 1 ha sido maligno (25% de la malignidad) y otro era benigno con progresión de la enfermedad. Dentro del grupo aneuploide estas diferencias en cuanto al índice de ADN han sido

significativas para la malignidad (Fisher con  $p = 0,0666$ ) pero no para la progresión (Fisher con  $p=0,2222$ ). Se observa por tanto que el DI es superior (menor  $p$ , mayor % de malignidad) a la ploidía de ADN en cuanto a la malignidad, pero no con respecto a la progresión y que las posibilidades de malignidad son significativamente mayores con  $DI \geq 1,75$ . Son muy escasos los artículos publicados en que se recoge un estudio detallado del DI respecto al pronóstico (188). No obstante nuestra observación sobre la concentración de la malignidad en torno a rango tetraploide y peritetraploide tiene cierto reflejo en algunos trabajos que sólo observan un comportamiento maligno en tumores tetraploides (171,172) o que señalan un predominio de la tetraploidía (53%) en los tumores malignos (196). Hosaka, sin embargo, en este sentido obtiene unos resultados opuestos a las nuestros: “cuanto menor es el DI de un pico aneuploide, se comprueba un curso clínico más maligno” (188).

Hemos realizado estudio del ciclo celular y en concreto de la fracción proliferativa, en función del índice de proliferación. En general, hemos obtenido valores muy elevados que no se correlacionan de forma estadísticamente significativa con el pronóstico de los PSA. El estudio de los % de células en los diferentes compartimientos del ciclo celular, se centra básicamente en las fases G0-G1 y en especial en la G2-M para la obtención de criterios para la clasificación de los histogramas. En realidad son pocos los artículos que exponen resultados en referencia a la fase S( y parámetros relacionados) del ciclo celular (178,176) y sin resultados significativos (178). Un estudio más o menos exacto de la fase S precisa de histogramas con bajos CV s ( Como ha sido señalado anteriormente) condición que no se cumple en nuestro caso, por lo que los resultados del PI no resultan valorables.

Uno de los problemas más frecuentes en la interpretación de histogramas se presenta cuando existen % elevados de células en el compartimento 4C. El problema estriba en determinar si se trata del pico G0-G1 de una segunda población tetraploide o de una fase G2M de la población diploide (con las consiguientes implicaciones

pronósticas). Uno de los factores de utilidad en estos casos es el cociente entre los % de células en el rango 4c y fase S (4c/S) (187). En este sentido hemos observado que de los 10 tumores tetraploides, 6 presentan un 4c/S mayor o igual a 1,3, incluyéndose en este grupo todos los tumores malignos con patrón tetraploide. No obstante, y aunque se ha observado cierta significación estadística a este respecto (Fisher con  $p = 0,0761$ ) mantenemos serias dudas sobre la validez de esta asociación por los mismos motivos por los que el PI no es valorable.

No hemos observado diferencias significativas en cuanto a la distribución de la ploidía entre tumores esporádicos y familiares (MEN, facomatosis), al igual que otros artículos. Nativ(176), no obstante observa una mayor frecuencia de patrones aneuploides en pacientes con síndrome MEN, facomatosis, o triada de Carney. Tampoco hemos observado relación entre el % de células en el rango hipertetraploide y el pronóstico. Algunos autores (176) encuentran una mayor incidencia de patrones anómalos de ploidía en pacientes menores de 30 años. Sin embargo nosotros, al igual que otros (5,9) no hemos hallado diferencias en este sentido. Respecto a la localización y lateralidad se observa, entre los tumores adrenales, un predominio del lado derecho y una alta incidencia de bilateralidad (25%) probablemente en relación al elevado número de casos MEN (25%) incluidos en el estudio. No hemos hallado diferencias significativas en la ploidía respecto a la localización y lateralidad ( $p > 0,1$  aunque con frecuencias esperadas menores a 5).

Del total de la muestra el 50% son varones y el 50% son mujeres. Sin embargo, el 50% de los tumores en varones han adoptado un patrón tetraploide frente a un 5,5% de las mujeres. Por contra el 50% de las mujeres han mostrado un patrón aneuploide en PSA frente a un 17% de los varones. Estas diferencias han sido estadísticamente significativas (Pearson con  $p = 0,0078$  y frecuencias esperadas mayor o igual a 5 en el 100%) Predomina por tanto la tetraploidía en varones y la aneuploidía en mujeres, con una distribución similar en cuanto a casos MEN (4:5), familiares (6:7) y malignidad

(5:3). Esta diferente distribución de la ploidía en función del sexo no ha sido descrita en ninguno de los artículos que comparan ambas variables (171,173,176) y carecemos de una explicación satisfactoria al respecto. No obstante las diferencias sexuales desaparecen cuando los patrones aneuploides y tetraploides son integrados en el mismo grupo.

Por tanto, de nuestros resultados, y con significación estadística se deduce que los patrones de ploidía de ADN son frecuentes en PSA (61%) sin que implique malignidad; que el patrón diploide es un factor de buen pronóstico en cuanto a malignidad ( $p = 0,02$ ) y progresión ( $p = 0,01$ ); que las posibilidades de malignidad ( $p < 0,01$ ) y progresión ( $p < 0,02$ ) son mayores en el rango tetraploide y peritetraploide ( $DI \geq 1,75$ ); que en varones predominan los patrones tetraploides y en mujeres aneuploides ( $p < 0,01$ ). No hemos hallado, sin embargo, diferencias de ploidía de ADN en cuanto a localización y lateralidad, edad y carácter familiar de los tumores.

Hemos correlacionado los diferentes parámetros histológicos y macroscópicos examinados con la ploidía, el pronóstico y el carácter familiar o esporádico de las neoplasias.

No se ha observado correlación estadísticamente significativa entre la ploidía de ADN y dichos caracteres anatomopatológicos con excepción de la infiltración capsular ( $p = 0,0441$ ) y la presencia de necrosis ( $p = 0,0491$ ) aunque con el test de Pearson y frecuencias esperadas menores de 5, por lo que los resultados no son extrapolables a situaciones más generales. Así, se observa que de los tumores diploides el 85% no infiltra la cápsula frente a un 50% de los no diploides. Todos los tumores con penetración capsular ( $n = 7$ ) presentaron un patrón no diploide, datos concordantes con los obtenidos por Nativ (176). Pang (173) no observa correlación entre ploidía de ADN y caracteres histológicos.

Los casos MEN incluidos en nuestra serie reflejan con exactitud los 2 caracteres

macroscópicos ampliamente descritos en la literatura: bilateralidad y multinodularidad. La incidencia de bilateralidad oscila entre el 60% (85) el 70% (84, 86) e incluso más (37, 87) siendo en nuestra serie del 77% (frente a un 9% de los tumores adrenales no MEN). Igualmente, apreciamos una alta frecuencia de multinodularidad en tumores asociados a Síndrome MEN (50%) frente a un 7% de los esporádicos (test de Fisher con  $p=0,0055$ ).

Tradicionalmente, se ha considerado que los caracteres histológicos (a diferencia de los macroscópicos) de los feocromocitomas asociados a S. MEN es similar a la de los tumores esporádicos (6). Sin embargo, nosotros hemos hallado diferencias con significación estadística en cuanto a tres de los parámetros histológicos. La frecuencia de tejido adiposo pardo periadrenal o peritumoral en los casos asociados a S. MEN ha sido, en nuestro estudio, del 67%, frente a un 22% de los casos no MEN (test de Fisher con  $p=0,0362$ ). Un aumento en la prevalencia de grasa parda periadrenal fue descrita por Melicow (58) en asociación con los feocromocitomas (16 de 18 casos desde 1953); una revisión de feocromocitomas previamente extirpados mostró grasa parda solamente en un caso, pero la grasa periadrenal no había sido incluida para el estudio (58). Una cantidad significativa de tejido adiposo pardo periadrenal (TAP) fue visto por Sherwin (25) en aproximadamente el 50% de todos los feocromocitomas estudiados. Medeiros (36) observó TAP en 44 de 60 feocromocitomas(73%),y solamente en el 30% de los casos de una población control sin feocromocitoma se observó grasa parda.La transformación de la grasa periadrenal en tejido adiposo pardo ,así como en otras localizaciones más generalizadas, ha sido descrita y se ha sugerido que las catecolaminas pueden representar un papel significativo en este proceso(59). En presencia de altos niveles circulantes de norepinefrina se asume que la grasa intraabdominal de los humanos(incluyendo la grasa del omento) se reactiva y esto puede dar lugar a la pérdida de peso que se aprecia en pacientes con feocromocitoma(59). Las alteraciones histológicas del tejido adiposo periadrenal también han sido señaladas en animales de

experimentación con feocromocitoma (60) así como en animales expuestos a epinefrina y norepinefrina a dosis crecientes.

Se ha propuesto que las catecolaminas procedentes de la médula suprarrenal podrían estimular la "termogénesis química" en respuesta a la exposición al frío, pero el papel fisiológico preciso del tejido adiposo pardo no está del todo claro (61, 208). En un estudio en el que se utilizaron como grupo control las autopsias medicolegales, se comparó la presencia de TAP periadrenal en pacientes portadores de feocromocitoma. La prevalencia de TAP fue de aproximadamente el 51% en el grupo control y del 53% en los feocromocitomas (62). Se necesita una evaluación cuantitativa más crítica para resolver definitivamente este hallazgo.

Mantenemos nuestras reservas sobre la veracidad de esta asociación (a pesar de la significación estadística) por dos motivos: en 4 casos no dispusimos de tejido adiposo periadrenal (2 en MEN y 2 en no MEN) y en algunos casos la cantidad de tejido adiposo disponible para estudio histológico fue limitada. No obstante, existen indicios racionales para sospechar una mayor frecuencia de TAP en casos asociados a MEN (actuación más prolongada de las catecolaminas, menor edad del paciente ?¿).

La presencia de glóbulos hialinos intracitoplásmicos es un hecho relativamente frecuente, pero no exclusivo, de los PSA. También pueden observarse en médula normal, hiperplásica (con relativa frecuencia en S. MEN)(3) y en tumores corticales. De significado incierto, ha sido relacionado por algunos investigadores con la actividad secretora dado que ultraestructuralmente contienen remanentes de gránulos de neurosecreción. (207). No hemos encontrado referencias que relacionen la presencia de estos glóbulos hialinos con el carácter familiar de los tumores; no obstante en nuestro estudio fue detectada su presencia en el 89% de los casos MEN frente a un 52% de los casos no MEN ( $p= 0,0619$  con test de Fisher). Además, el número de glóbulos hialinos fue bastante superior en los casos MEN (frecuentes en el 62%) que en los no MEN (frecuentes sólo en el 14%)(¿mayor actividad secretora? ¿predominio

de la NA? ¿tiempo?). Por último, los tumores asociados a MEN presentaron una mayor frecuencia de cápsula tumoral incompleta o ausente: 67% frente a 22% (test de Fisher con  $p=0,0362$ ) eventualidad que no hemos hallado descrita en la literatura. Si analizamos por separado en 2 grupos los tumores esporádicos y los familiares (a los 9 casos MEN habría que añadir 4 asociados a facomatosis) se observa correlación con significación estadística para los mismos parámetros histológicos (grasa parda, glóbulos hialinos, cápsula) que en la confrontación comentada anteriormente (MEN frente a no MEN). No obstante, con toda probabilidad la naturaleza de dichas asociaciones depende más del elevado % de síndromes MEN en los casos familiares (70%) que de las características propias de los tumores asociados a facomatosis.

Tres son los caracteres macroscópicos que en otros estudios han sido relacionados con la malignidad de PSA: tamaño, nodularidad grosera y quistificación. Los valores medios de peso de PSA malignos/benignos aportados por algunas series son los siguientes: 383/73 gr (42), 759/156 (36), 376/67 (190). Padberg expone sus resultados en 2 artículos citando en 1 pesos  $>200$ gr en PSA malignos e inferiores en los benignos (184), y en otro un peso  $>200$ gr en 6/6 malignos y en 1/58 benignos (186). Nativ (176) refiere un volumen medio de 68cc para PSA benignos y de 112 para tumores metastásicos ( $p>0,009$ ) y Schlumberger (213) cita un diámetro superior a los 8cm en 18/20 PSA malignos. En nuestro estudio el peso medio de los tumores benignos fue de 101 gr y el de los malignos 250 gr. (Contraste de Kruskal-Wallis con  $p=0,0284$ ). No obstante, tanto en nuestro estudio como en otros existe cierto solapamiento entre los pesos de tumores benignos y malignos, lo cual relativiza mucho el valor pronóstico del peso tumoral.

Linnoila (42) señala una mayor tendencia de los tumores malignos hacia la quistificación macroscópica (74% frente al 35%) ( $p=0,001$ ). En nuestro estudio la quistificación ha sido más frecuente en tumores malignos (25% frente a 14%) aunque sin significación estadística ( $p>0,1$ ). Este mismo autor cita textualmente: “Una

característica morfológica significativa de los tumores malignos fue la nodularidad grosera o múltiples nódulos que fueron observados al examen externo o más frecuentemente a la inspección de la superficie de corte. Esta nodularidad grosera fue diferente de la frecuente multicentricidad simétrica de los feocromocitomas que ocurre en el contexto de S. MEN tipo 2". Además indica que dicha característica es una de las 4 con mayor poder predictivo de malignidad. No obstante, consideramos que dicho parámetro no queda suficientemente definido y es escasamente reproducible, en especial en estudios retrospectivos. La única asociación significativa de la multinodularidad, como ya se ha comentado, en nuestro estudio, es con el carácter familiar de los PSA (S. MEN).

Son varios los artículos que ponen de manifiesto una mayor frecuencia de necrosis en paragangliomas malignos (208, 209, 210, 211, 213). Linnoila (42) observa necrosis confluyente en el 32% de los tumores malignos y en el 6% de los benignos ( $p = 0,0023$ ) y Proye advierte (190) necrosis en 17/24 tumores malignos. Medeiros (36) aprecia necrosis extensa en los 5 tumores malignos de su serie (100%) y necrosis focal en el 50% de los benignos. Kliever (212) cita que la necrosis puede observarse tanto en paragangliomas benignos como malignos. En nuestra serie hemos observado diferencias significativas en cuanto a mayor frecuencia de necrosis tanto para la malignidad como para la progresión (test de Fisher con  $p = 0,0360$  y  $p = 0,0144$  respectivamente) Así, hemos observado una frecuencia de necrosis del 75% en tumores malignos y del 29% en los benignos. Además la necrosis fue extensa o confluyente en el 50% de los tumores malignos que la presentaron frente a un 25% para los benignos.

En nuestro estudio, 6 de los 8 tumores malignos (75%) presentaron penetración capsular frente a 1 (3,5%) de los benignos, habiendo que añadir a los segundos un 21% de tumores con infiltración de la cápsula aunque sin sobrepasarla. Estas diferencias han sido muy significativas ( $p = 0,00004$ ) aunque no extrapolables a situaciones más

generales (test de Pearson con frecuencias esperadas menores a 5). Medeiros (36) manifiesta un mayor % de infiltración capsular en tumores malignos, al igual que Gosset (197). Proye (190) describe infiltración capsular en 9 de 26 feocromocitomas malignos, y Heaney(195) en 2 de 22 benignos y en 2 de 4 malignos. Sin embargo, estas cifras deben quedar matizadas por dos circunstancias. En primer lugar, dos de nuestros tumores malignos no presentaron infiltración capsular y uno de los benignos presentó penetración capsular completa (si bien era muy focal). En segundo lugar, en nuestro estudio (al igual que en muchos otros) la infiltración extensa de estructuras adyacentes (y por tanto con infiltración capsular ) constituye de por sí uno de los criterios de malignidad.

En la literatura se describe una mayor frecuencia de invasión vascular microscópica en paragangliomas malignos que en los benignos (42, 190, 195, 210, 211). Gosset (197) utiliza la invasión vascular junto a otros dos parámetros histológicos como criterio de clasificación tumoral (benigno, maligno) y Proye (190) observa invasión vascular en el 40% los tumores malignos. Medeiros(36) observa una frecuencia similar de invasión vascular en tumores malignos y benignos. En nuestra serie hemos observado invasión vascular microscópica en 2 de 8 tumores malignos (25%) y en ninguno de los benignos (test de Fisher con  $p = 0,0444$ ). Si incluimos como criterio de invasión vascular la presencia de células sueltas en el interior de los vasos, las cifras para tumores benignos y malignos son 7% y 75%. (aunque este último criterio nos parece de escasa validez). No obstante, hay que tener en cuenta que, como se demuestra en otras localizaciones , en ausencia de técnicas histoquímicas puede ser muy difícil diferenciar invasión vascular de artefactos de retracción tisular.

El tipo celular predominante en el 33% de los tumores malignos o con progresión fue célula pequeña redonda frente a ningún caso entre los tumores benignos o que no progresaron (test de Fisher con  $p = 0,0117$ ). Este hecho también ha sido reflejado en otros artículos (36, 213). En la literatura no existe consenso acerca del significado

pronóstico de la presencia de células fusiformes. Algunos autores lo relacionan con la capacidad invasiva del tumor (25) o el potencial maligno (214,215). Otros niegan su significado adverso (42, 36). En nuestra serie hemos observado células fusiformes, siempre de manera focal, en 7 casos (2 benignos esporádicos, 1 maligno y 4 MEN).

El índice de mitosis en líneas generales fue bajo (en todos los casos menos en 3 fue menor o igual a 2). Se identificaron figuras de mitosis en 6 de 8 tumores malignos (75%) y en 11 de 28 benignos (39%) (3 esporádicos, 4 MEN y 4 con facomatosis). En la literatura, aunque se describe una mayor frecuencia de mitosis en tumores malignos (42, 36,211, 210, 186) se advierte que dicho parámetro histológico no sirve para diferenciar tumores benignos de malignos (25, 36, 42, 145, 190, 212, 213).

Hemos observado una mayor frecuencia no significativa de glóbulos hialinos intracitoplásmicos en tumores benignos que en malignos (64% Vs 50%). Estas diferencias resultan algo más evidentes cuando se cuantifica el nº de glóbulos: en los tumores malignos fueron raros u ocasionales en todos los casos, siendo frecuentes en el 38% de los tumores benignos que los presentaron. Linnoila (42) sí observa diferencias significativas a este respecto.

Coincidimos con la práctica totalidad de los trabajos existentes en la literatura en afirmar que no existe ningún parámetro histológico capaz de definir el potencial agresivo de los PSA. Sin embargo, existen algunos caracteres histológicos y macroscópicos presentes con mayor frecuencia en tumores malignos que en benignos. Basándose en este hecho Linnoila (42) ha desarrollado un sistema en el que en función de 4 parámetros (localización extraadrenal, nodularidad grosera, necrosis confluyente y ausencia de glóbulos hialinos) es capaz de clasificar correctamente más del 70% de los tumores con una probabilidad de acierto superior al 95%. No hemos podido aplicar este sistema a nuestro estudio por dos motivos: sólo hemos incluido entre los extraadrenales tumores malignos y encontramos dificultades (ya comentadas) para reproducir el criterio de la nodularidad.

## **CONCLUSIONES**

## 1.-Estudio citométrico

-Los patrones anómalos de ploidía de ADN son frecuentes en los PSA(60%) sin que ello implique necesariamente un pronóstico adverso.

-Todos los tumores que mostraron un patrón diploide(40%) tuvieron un curso clínico benigno y sin progresión de la enfermedad. Por tanto, la cuantificación citométrica del ADN permite identificar un subgrupo de pacientes con buen pronóstico y susceptibles de un seguimiento menos costoso e intensivo.

-Las diferencias en la distribución del ADN entre los tumores benignos y malignos han sido estadísticamente significativas con una frecuencia de malignidad del 36% para los tumores con patrón anómalo, considerados globalmente ( $p=0,013$ ); y del 33% y del 40% para tumores con patrones hiperdiploide ( $p=0.0331$ ) y tetraploide ( $p=0,0197$ ) respectivamente.

-Las probabilidades de malignidad ( $p=0.0025$ ) son mayores en el rango tetraploide y peritetraploide ( $DI \geq 1,75$ ).

-En varones predominan los patrones tetraploides y en mujeres los hiperdiploides ( $p=0,0078$ ).

-No existen diferencias significativas en la distribución de patrones citométricos en cuanto a la localización y lateralidad, ni en cuanto a la edad y el carácter familiar de las neoplasias.

## 2.-Estudio anatomopatológico:

-Los PSA asociados a s. MEN presentan una alta frecuencia de bilateralidad (77%) y multicentricidad (50%). Histológicamente en dichos tumores se aprecia una mayor frecuencia de TAP, glóbulos hialinos intracitoplásmicos ( $p=0,0619$ ) y cápsula tumoral incompleta o ausente( $p=0,0362$ ). En los restantes parámetros macro y microscópicos no se han observado diferencias significativas respecto al carácter familiar de los tumores.

-Los tumores malignos presentan, respecto a los benignos, mayor peso tumoral ( $p=0,0284$ ) y mayor frecuencia de necrosis ( $p=0,0362$ ), penetración capsular, invasión vascular ( $p=0,0444$ ), predominio de células pequeñas redondas ( $p=0,0117$  para malignidad o progresión de la enfermedad) y presencia de figuras de mitosis. Sin embargo, no existe parámetro anatomopatológico alguno que permita predecir con seguridad la evolución clínica de los PSA.

**3.** No existe correlación estadísticamente significativa entre los patrones de ploidía y la valoración de los parámetros anatomopatológicos convencionales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Kliewer KE, Cochran AJ. A review of the histology Ultrastructure, immunohistology, and molecular biology of extra-adrenal paragangliomas. *Arch Pathol Lab Med.*;113:1209-1218, 1989.
2. Glenner GG, Grimley PM (1974) Tumor of the extradrenal paraganglion system. In: Atlas of Tumor Pathology. Second series, fascicle 9. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology.
3. Lack EE (1997) Tumors of the adrenal gland and extra-adrenal paraganglia . In: Atlas of Tumor Pathology. Third series, fascicle 19. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology.
4. Bloom W, Fawcett DW. Glándulas suprarrenales y paraganglios. En : Tratado de histología. 9ª edición. Barcelona. Labor
5. DeLellis RA. The adrenal glands. En: Sternberg SS(ed) Diagnostic surgical Pathology, 2ª Ed. Vol. 1 :pp 571-579. Nueva york. Raven Press.
6. Lack EE. Pathology of the adrenal and extra-adrenal paraganglia. Major problems in pathology, Vol 29. Philadelphia: WB Saunders, 1994.
7. Elaut L: Contribution a l'histophysiologie et l'histopathologic de la médullo-surrenale. *Arch Internat de Méd Exper* 6:69-153, 1929.
8. Drake RL, Hibbard JS, Hellwig CA: The adrenal medulla in various diseases: A histophysiologic study. *Arch Pathol* 37:351-358, 1944.
9. Rudy FR, Bates RD, Cimorelli AJ, et al: Adrenal medullary hyperplasia: A clinicopathologic study of four cases. *Hum Pathol* 11 :650-657, 1980.
10. Dralle H. Schröder S. Cratz KF, et al: Sporadic unilateral adrenomedullary hyperplasia with hypertension cured by adrenalectomy. *World J Surg* 14:308-316, 1990.
11. Harrison TS, Gann DS: Adrenal medullary hyperplasia: An opinion. *Surgery* 85:353-

354,1979.

12. Bongiovanni AM, Yakovac WC, Steiker DD: Study of adrenal glands in childhood: Hormonal content correlated with morphologic characteristics. *Lab Invest* 10:956-967, 1961.

13. Naeye RL: Brain-stem and adrenal abnormalities in the sudden infant death syndrome. *Am J Clin Pathol* 66:526-530, 1976.

14. Gosney JR: Adrenal corticomedullary hyperplasia in hypobaric hypoxia. *J Pathol* 146:59-64,1985.

15. Pettenati MJ, Haines JL, Higgins RR, et al: Wiedemann-Beckwith syndrome: Presentation of clinical and cytogenetic data on 22 new cases and review of the literature. *Hum Genet* 74: 143 - 154,1986.

16. Schnakenburg V, Müller M, Dürner K, et al: Congenital hemihypertrophy and malignant giant pheochromocytoma: A previously undescribed coincidence. *EurJ Pediatr* 122:263-273,1976.

17. Carney JA, Sizemore GW, Tyce GM: Bilateral adrenal medullary hyperplasia in multiple endocrine neoplasia, type 2: The precursor of bilateral pheochromocytoma. *May Clin Proc* 50:3-10,1975.

18. DeLellis RA, Wolfe HJ, Gagel RT, et al: Adrenal medullary hyperplasia: A morphometric analysis in patients with familial medullary thyroid carcinoma *Am J Pathol* 83:177-190, 1976.

19. Carney JA, Sizemore GW, Sheps SG: Adrenal medullary disease in multiple endocrine neoplasia, type 2. *Am J Clin Pathol* 66:279-290,1976.

20. Sherwin RP: Present status of pathology of the adrenal gland in hypertension. *Am J Surg* 107:136-143

21. Karsner HT: Tumors of the adrenal. In *Atlas of Tumor Pathology*. Fasc 29, sec VIII. Washington, Armed Forces Institute of Pathology, 1950.

22. Welbourn RB: Early surgical history of pheochromocytoma. *Br J Surg* 74:594-596,1987.
23. Henle J: Ueber das gewebe der nebenniere und de' hypophyse. *Z Rat Med* 24: 143-152, 1865.
24. Sherwin RP, Rosen VJ: New aspects of the chromoreactions for the diagnosis of pheochromocytoma. *Am J Clin Pathol* 43:200 - 206, 1965.
25. Sherwin RP: Histopathology of pheochromocytoma *Cancer* 12:861-877,1952.
26. Lack EE: Adrenal medullary hyperplasia and pheochromocytoma. In Lack EE (ed): *Pathology of the Adrenal Glands*. New York, Churchill Livingstone 1990,pp173- 235.
27. Beard CM, Sheps SG, Kurland LT, et al: Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* 58:802-804 1983.
28. Krane NK: Clinically unsuspected pheochromocytomas: Experience at Henry Ford Hospital and a review of the literature. *Arch Intern Med* 146:54-57 1986.
29. St. John Sutton MG, Sheps SG: Prevalence of clinically unsuspected pheochromocytoma: Review of a 50-year autopsy series. *Mayo Clin Proc* 56:354 - 360,1981.
30. Modlin IM, Farndon JR, Shepherd A, et al: Pheochromocytomas in 72 patients: Clinical and diagnostic features, treatment and long term results. *Br J Surg* 66:456-465,1979.
31. Stenstrom G, Svardsudd K: Pheochromocytoma in Sweden 1958-1981: An analysis of the National Cancer Registry data. *Acta Med Scand* 220:225-232, 1986
32. Anderson GT, Lund JO, Toftdahl D, et al: Pheochromocytoma and Conn's syndrome in Denmark, 1977-1981. *Acta Med Scand Suppl* 717-720, 1986-1987.
33. ReMine WH, Chong GC, van Heerden JA, et al: Current management of pheochromocytoma. *Ann Surg* 179:740 - 747,1974.
34. van Heerden JA, Sheps SG, Hamberger B, et al: Pheochromocytoma: Current status and changing trends. *Surgery*91:367-373, 1982.
35. Scott HW Jr, Oates JA, Nies AS, et al: Pheochromocytoma: Present diagnosis and

management. *Ann Surg* 183:587-593, 1976.

36. Medeiros LJ, Wolf BC, Balogh K, Federman M: Adrenal pheochromocytoma: A clinicopathologic review of 60 cases. *Hum Pathol* 16:580-589, 1985.

37. Samaan NA, Hickey RC, Shutts PE: Diagnosis, localization and management of pheochromocytoma: Pitfalls and follow-up in 41 patients. *Cancer* 62:2451-2460, 1988.

38. Melicow MM: One hundred cases of pheochromocytoma (107 tumors) at the Columbia-Presbyterian Medical Center, 1926-1976: A clinicopathologic analysis. *Cancer* 40: 1987-2004, 1977.

39. Bravo EL: Pheochromocytoma: New concepts and future trends. *Kidney Int* 40:544-556, 1991.

40. Bachmann AW, Hawkins PG, Gordon RD: Phaeochromocytomas secreting adrenaline but not noradrenaline do not cause hypertension and require precise adrenaline measurement for diagnosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16:275-279, 1989.

41. Florkowski CM, Fairlamb DJ, Freeth MG, et al: Raised dopamine metabolites in a case of malignant paraganglioma. *Postgrad Med J* 66:471-473, 1990.

42. Linnoila RI, Keiser HR, Steinberg SM, Lack EE: Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas: Clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features. *Hum Pathol* 21:1168-1180, 1990.

43. Smith EJ, McPherson GAD, Lynn J: Inferior vena cave involvement by a phaeochromocytoma. *Br J Surg* 74:597, 1987.

44. Dicke TE, Henry ML, Minton JP: Intracaval extension of pheochromocytoma simulating pulmonary embolism. *J Surg Oncol* 34: 160-164, 1987.

45. Rote AR, Flint LD, Ellis FH Jr: Intracaval recurrence of pheochromocytoma extending into right atrium: Surgical management using extracorporeal circulation. *N Engl J Med* 296: 1269 - 1271, 1977.

46. Travis WD, Oertel JE, Lack EE: Miscellaneous tumors and tumefactive lesions of the adrenal gland. In Lack EE (ed): *Pathology of the Adrenal Glands*. New York, Churchill Livingstone, 1990, pp 351-378.

47. Shin W-Y, Groman GS, Berkman JI: Pheochromocytoma with angiomatous features: A case report and ultrastructural study. *Cancer* 40:275-283, 1977.
48. LeCompte PM: Cushing's syndrome with possible pheochromocytoma: Report of a Case. *Am J Pathol* 20:689-705, 1944.
49. Steinhoff MM, Wells SA Jr, Deschryver-Kecskemeti K: Stromal amyloid in pheochromocytomas. *Hum Pathol* 23:33-36, 1992.
50. Paloyan EE, Scanu A, Straus RH, et al: Familial pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma and parathyroid adenomas. *JAMA* 214: 1443-1447, 1970.
51. DeLellis RA, Suchow E, Wolfe HJ: Ultrastructure of nuclear "inclusions" in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum Pathol* 11:205-207, 1980.
52. Dekker A, Oehrle JS: Hyaline globules of the adrenal medulla of man: A product of lipid peroxidation? *Arch Pathol* 91:353-364, 1971.
53. Mendelsohn C, Olson JL: Pheochromocytoma. Correspondence. *Hum Pathol* 9:607-608, 1978.
54. Lack EE, Mulvihill JJ, Travis WD, Kozakewich HPW: Adrenal cortical neoplasms in the pediatric and adolescent age group: Clinicopathologic study of 30 cases with emphasis on epidemiological and prognostic factors. *Pathol Annu* 27 (1): 1-53, 1992.
55. Motlik K, Krawczynski K, Nowoslawski A: Experimental hyaline droplets in the rat adrenal cortex: Immunohistochemical and enzyme histochemical studies. *Virchows Arch [A]* 344:331-345, 1968.
56. Ramsay JA, Asa SL, van Nostrand AWP, et al: Lipid degeneration in pheochromocytomas mimicking adrenal cortical tumors. *Am J Surg Pathol* 11 :480-486, 1987.
57. Unger PD, Cohen JM, Thung SN, et al: Lipid degeneration in a pheochromocytoma histologically mimicking an adrenal cortical tumor. *Arch Pathol Lab Med* 114:892-894, 1990.
58. Melicow MM: Hibernating fat and pheochromocytoma. *Arch Pathol Lab Med* 63:367-372, 1957.
59. Lean MEJ, James WPT, Jennings C, Trayhurn P: Brown adipose tissue in patients with phaeochromocytoma. *Int J Obesity* 10:219-227, 1986.

60. Warren S, Chute RN: Pheochromocytoma. *Cancer* 29:327-331, 1972.
61. Klausner JM, Nakash R, Inbar M, et al: Prolonged fever as a presenting symptom in adrenal tumors. *Oncology* 45: 15 - 17, 1988.
62. Medeiros LJ, Katsas GG, Balogh K: Brown fat and adrenal pheochromocytoma: Association or coincidence? *Hum Pathol* 16:970-972, 1985.
63. Lüscher TF, Lie JT, Stanson AW, et al: Arterial fibromuscular dysplasia. *Mayo Clin Proc* 62:931-952, 1987.
64. de Mendonca WC, Espat PA: Pheochromocytoma associated with arterial fibromuscular dysplasia. *Am J Clin Pathol* 75:749-754, 1981.
65. Lee PH, Blute RJ, Malhotra R: A clinically "silent" pheochromocytoma with spontaneous hemorrhage. *J Urol* 138: 1429-1432, 1987.
66. DeSouza TG, Berlad L, Shapiro K, et al: Pheochromocytoma and multiple intracerebral aneurysms. *J Pediatr* 108:947-949, 1986.
67. Van Vliet PD, Burchell HB, Titus JL: Focal myocarditis associated with pheochromocytoma. *N Engl J Med* 274:1102-1108, 1966.
68. Rosenbaum JS, Cinsburg R, Billingham ME, Hoffman BB: Effects of adrenergic receptor antagonists on cardiac morphological and functional alterations in rats harboring pheochromocytoma. *J Pharmacol Exp Ther* 241 :354-360, 1987.
69. Karch SB, Billingham ME: The pathology and etiology of cocaine-induced heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 112:225-230, 1988.
70. Case records of the Massachusetts General Hospital: Case 45-1989. *N Engl J Med* 321:1316-1329, 1989.
71. Rider MA: Pheochromocytoma associated with thymoma: Case report. *Br J Surg* 80:223, 1993.
72. Greene JP, Guay AT: New perspectives in pheochromocytomas. *Urol Clin North Am* 16:487-503, 1989.

73. Wolfe HJ, Melvin KE, Cervi-Skinner J, et al: C-cell Hyperplasia preceding medullary thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 289:437-441, 1973.
74. Ballard HS, Frame B, Hartsock RJ: Familial multiple endocrine adenoma-peptic ulcer complex. *Medicine* 43:481-516, 1964.
75. Samaan NA, Ouais S, Ordonez NC, et al: Multiple endocrine syndrome type 1: Clinical, laboratory findings, and management in five families. *Cancer* 64:741-752, 1989
76. Larsson C, Skogseid B, Oberg K, et al: Multiple endocrine neoplasia type I gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 332:8587, 1988.
77. Thakker RV, Bouloux P, Wooding C et al: Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type I with loss of alleles on chromosome 11. *N Engl J Med* 321:218-224, 1989.
78. Friedman E, Sakaguchi K, Bale AK, et al: Clonality of parathyroid tumors in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *N Engl J Med* 321:213-218, 1989.
79. Brandi ML, Aurbach CD, Fitzpatrick LA, et al: Parathyroid mitogenic activity in plasma from patients with familial multiple endocrine neoplasia type 1. *N Engl J Med* 314: 1287-1293, 1986.
80. Bahn RS, Scheithauer BW, van Heerden JA, et al: Nonidentical expressions of multiple endocrine neoplasia, type 1, in identical twins. *Mayo Clin Proc* 61:689-696, 1986.
81. Steiner AL, Coodman AD, Powers SR: Study of a kindred with pheochromocytoma, medullary thyroid carcinoma, hyperparathyroidism and Cushing's disease: Multiple endocrine neoplasia, type 2. *Medicine* 47:371-409, 1968.
82. Schimke RN: Multiple endocrine neoplasia: Search for the oncogenic trigger (letter). *N Engl J Med* 314:1315-1316, 1986.
83. Verdy M, Weber AM, Roy CC et al: Hirschsprung's disease in a family with MEN type 2. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1:603-607, 1982.
84. Schimke RN: The multiple endocrine neoplasia syndromes. In Humphrey CB, Crinley CB, Dehner LP, et al (eds): *Adrenal and Endocrine Tumors in Children*. Boston, Martinus Nijhoff 1983, pp 249-264.

85. Wilson RA, Ibanez ML: A comparative study of 14 cases of familial and nonfamilial pheochromocytomas. *Hum Pathol* 9:181-188, 1978.
86. Cance WC, Wells SA Jr: Multiple endocrine neoplasia type IIa. *Curr Probl Surg* 22:8-56, 1985.
87. Lips KJM, van der Sluys Veer J, Struyvenberg A, et al: Bilateral occurrence of pheochromocytoma in patients with the multiple endocrine neoplasia syndrome type 2a (Sipple's syndrome). *Am J Med* 70:1051-1060, 1981.
88. Hamilton BP, Landsberg L, Levine RJ: Measurement of urinary epinephrine in screening for pheochromocytomas in multiple endocrine neoplasm, type II. *Am J Med* 65: 1027-1032, 1978.
89. Gagel RF, Tashjian AH Jr, Cummings T, et al: The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2a: An 18-year experience. *N Engl J Med* 318:478-484, 1988.
90. Webb TA, Sheps SC, Carney JA: Differences between sporadic pheochromocytoma and pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia, type 2. *Am J Surg Pathol* 4:121-126, 1980.
91. Mathew CCP, Chiu KS, Easton DF, et al: A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature* 328:527-528, 1987.
92. Jackson CE, Norum RA, Boyd SB, et al: Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: A clinically and genetically distinct syndrome. *Surgery* 108:1006-1013, 1990.
93. Sobol H, Narod SA, Nakamura Y, et al: Screening for multiple endocrine neoplasia type 2a with DNA polymorphism analysis. *N Engl J Med* 321:996-1001, 1989.
94. Mathew COP, Smith BA, Thorpe K, et al: Deletion of genes on chromosome I in endocrine neoplasia. *Nature* 328:524-526, 1987.
95. Cerney JC, Jackson CE, Talpos GB, et al: Pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type II: An example of the two-hit theory of neoplasia. *Surgery* 92:849-852, 1982.
96. Talpos CB, Jackson CE, Yolt JB, Van Dyke DL: Phenotype mapping of the multiple endocrine neoplasia type II syndrome. *Surgery* 94:650-654, 1983.

97. Santoro M, Rosati R, Crieco M, et al: The ret proto-oncogene is consistently expressed in human pheochromocytomas and thyroid medullary carcinomas. *Oncogene* 5: 1595-1598, 1990.
98. Chevinsky AH, Minton JP, Falko JM: Metastatic pheochromocytoma associated with multiple endocrine neoplasia syndrome type 11. *Arch Surg* 125:935-938, 1990.
99. Galera H, Conzalez-Campora R, Matilla A, Martin I: Multiple endocrine neoplasia type 2b in twins. *Histopathology* 6:111-119, 1982.
100. Epstein H, Morehouse M, Cowles T, King CR: MEA 11 presenting as pheochromocytoma and complicating pregnancy and the puerperium: A case report. *J Reprod Med* 30:501-504, 1985.
101. Corlin RJ, Mirkin BL: Multiple mucosal neuromas, pheochromocytoma, medullary carcinoma of the thyroid and marfanoid body build with muscle wasting: Syndrome of hyperplasia and neoplasia of neural crest derivatives—A unitarian concept. *Z Kinderheilk* 113:313-325, 1972.
102. Riley FC Jr, Robertson DM: Ocular histopathology in multiple endocrine neoplasia type 2b. *Am J Ophthalmol* 91:57-64, 1981.
103. Spector B, Klintworth CK, Wells SA: Histologic study of the ocular lesions in multiple endocrine neoplasia syndrome type IIb. *Am J Ophthalmol* 91:204-215, 1981.
104. Dyck PJ, Carney JA, Sizemore CW, et al: Multiple endocrine neoplasia type 2b: Phenotype recognition: neurological features and their pathologic basis. *Ann Neurol* 6:302-314, 1979.
105. Carney JA, Sizemore CW, Hayles AB: Multiple endocrine neoplasia, type 2b. *Pathobiol Annu* 8:105-153, 1978.
106. Carney JA, Roth SI, Heath H III, et al: The parathyroid glands in multiple endocrine neoplasia, type 2b. *Am J Pathol* 99:397-400, 1980.
107. Khan AH, Desjardins JC, Youssef S, et al: Gastrointestinal manifestations of Sipple syndrome in children. *J Pediatr Surg* 22:719-723, 1987.
108. Samaan NA, Draznin MB, Halpin RE, et al: Multiple endocrine syndrome type IIb in early childhood. *Cancer* 68: 1832-1834, 1991.
109. Perkins JT, Blackstone MO, Riddell RH: Adenomatous polyposis coli and multiple endocrine neoplasia type 2b: A pathogenetic relationship. *Cancer* 55:375-381, 1985.

110. Shocket E, Teloh HA: Aganglionic megacolon, pheochromocytoma, megaloureter, and neurofibroma. *Am J Dis Child* 94:185-191, 1957.
111. Mendelsohn C, Diamond MP: Familial ganglioneuromatous polyposis of the large bowel: Report of a family with associated juvenile polyposis. *Am JSurg Pathol* 18:515-520, 1984.
112. d'Amore ESC, Manivel JC, Pettinato C, et al: Intestinal ganglioneuromatosis: Mucosal and transmural types. A clinicopathologic and immunohistochemical study of six cases. *Hum Pathol* 22:276-286, 1991.
113. Stanley, MW, Cherwitz D, Hagen K, Snover DC: Neuromas of the appendix: A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study of 20 cases. *Am J Surg Pathol* 10:801-815, 1986.
114. Daneshvar A: Pharyngeal traumatic neuromas and traumatic neuromas with mature ganglion cells (pseudoganglioneuromas). *Am J Surg Pathol* 14:565-570, 1990.
115. Carney JA, Co VLW, Gordon H. et al: Familial pheochromocytoma and islet cell tumor of the pancreas. *Am J Med* 68:515-521, 1980.
116. Larraza-Hernandez O. Albores-Saavedra J. Benavides G. et al: Multiple endocrine neoplasia: Pituitary adenoma, multicentric papillary thyroid carcinoma, bilateral carotid body paraganglioma, parathyroid hyperplasia, gastric leiomyoma, and systemic amyloidosis. *Am J Clin Pathol* 78:527 - 532, 1982.
117. Kido Y. Kuwano H. Yano K, et al: Concurrent adrenal pheochromocytoma and papillary adenocarcinoma of the thyroid in a 20-year-old man. *Tumor* 78:59 - 62, 1992.
118. Roth KA, Wilson DM, Eberwine J. et al: Acromegaly and pheochromocytoma: A multiple endocrine syndrome caused by a plurihormonal adrenal medullary tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 63:1421-1426, 1986
119. Yoshida A, Hatanaka S. Ohi Y. et al: von Recklinghausen's disease associated with somatostatin-rich duodenal carcinoid (somatostatinoma) medullary thyroid carcinoma and diffuse adrenal medullary hyperplasia. *Acta Pathol Jpn* 41:847-856, 1991.
120. Riccardi VM: von Recklinghausen neurofibromatosis. *N Engl J Med* 305: 1617-1627, 1981.
121. Kalff V, Shapiro B, Lloyd R, et al: The spectrum of pheochromocytoma in hypertensive

patients with neurofibromatosis. *Arch Intern Med* 142:2092-2098, 1982.

122. Horton WA, Wong V, Eldridge R: von Hippel-Lindau disease: Clinical and pathological manifestations in nine families with 50 affected members. *Arch Intern Med* 136:769-777, 1976.

123. Atuk NO, McDonald T, Wood T, et al: Familial pheochromocytoma, hypercalcemia, and von Hippel-Lindau disease: A ten-year study of a large family. *Medicine* 58:209-218, 1979.

124. Case records of the Massachusetts General Hospital: Case 16-1991. *N Engl J Med* 324:1119-1127 1991.

125. Carney JA: The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: A five-year review. *Medicine* 62:159-169, 1983.

126. Blei E, Gonzalez-Cruzi F: The intriguing nature of gastric tumors in Carney's triad. *Cancer* 69:292-300, 1992.

127. Sclafani LM, Woodruff JM, Brennan MF: Extraadrenal retroperitoneal paragangliomas: Natural history and response to treatment. *Surgery* 108:1124-1130, 1990.

128. Kimura N, Nakazato Y, Nagura H, Sasano N: Expression of intermediate filaments in neuroendocrine tumors. *Arch Pathol Lab Med* 114:506-510, 1990.

129. Nakagawara A, Ikeda K, Tsuneyoshi M, et al: Malignant pheochromocytoma with ganglioneuroblastomatous elements in a patient with von Recklinghausen's disease. *Cancer* 55:2794-2798, 1985.

130. Min K-W, Clemens A, Bell J, Dick H: Malignant peripheral nerve sheath tumor and pheochromocytoma: A composite tumor of the adrenal. *Arch Pathol Lab Med* 112:266-270, 1988.

131. Sparagana M, Feldman JM, Molnar Z: An unusual pheochromocytoma associated with an androgensecreting adrenocortical adenoma: Evaluation of its polypeptide hormone, catecholamine, and enzyme characteristics. *Cancer* 60:223-231, 1987.

132. Amodeo C, Perez J, Sturgill BC, et al: Disparate urinary catecholamine patterns in secondary hypertension due to unique sequential development of pheochromocytoma and neuroblastoma. *Arch Pathol Lab Med* 113:800-802, 1989.

133. Fischler DF, Nunez C, Levin HS, et al: Adrenal carcinosarcoma presenting in a woman with clinical signs of virilization: A case report with immunohistochemical and ultrastructural findings. *Am J Surg Pathol* 16:626-631, 1992.
134. Molberg K, Vuitch F, Stewart D, Albores-Saavedra J: Adrenocortical blastoma. *Hum Pathol* 23:1187-1190, 1992.
135. Coffin CM: Vasoactive intestinal peptide and other gastrointestinal peptides in ganglioneuroma, ganglioneuroblastoma, and neuroblastoma. *Mod Pathol* 6:2P(7), 1993.
136. Murphy GP, Abramovici A, Servadio C, Sufrin G: Further studies of a transplantable rat pheochromocytoma. *Oncology* 44:383-385, 1987.
137. Stackpole RH, Melicow MM, Uson AC: Pheochromocytoma in children: Report of 9 cases and review of the first 100 published cases with follow-up studies. *J Pediatr* 63:315-330, 1963
138. Kaufman BH, Telander RL, van Heerden JA, et al: Pheochromocytoma in the pediatric age group: Current status. *J Pediatr Surg* 18:879-884, 1983.
139. Karosov RS, Sheps SG, Carney JA, et al: Paragangliomatosis with numerous catecholamine-producing tumors. *Mayo Clin Proc* 57:590 - 595, 1982.
140. Stringel G, Ein SH, Creighton R, et al: Pheochromocytoma in children: An update. *J Pediatr Surg* 15:496-500, 1980.
141. Hume DM: Pheochromocytoma in the adult and in the child. *Am JSurg* 99:458-496, 1960.
142. Henningson C, Hoffmann S, Mcgonigle L, Winter JSD: Acute mercury poisoning (acrodynia) mimicking pheochromocytoma in an adolescent. *J Pediatr* 122:252-253, 1993.
143. Symington T, Goodall AL: Studies in phaeochromocytoma: I. Pathological aspects. *Glas Med J* 34:75-96, 1953.
144. Scott HWJr, Halter SA: Oncologic aspects of pheochromocytoma: The importance of follow-up. *Surgery* 96:1061-1066, 1984.
145. Neville AM: The adrenal medulla. In Symington T (ed): *Functional Pathology of the Human Adrenal Glands*. Baltimore, Williams & Wilkins, pp 219-324, 1969

146. Aguilo F, Tamayo N, Vazquez-Quintana E, et al: Pheochromocytoma: A twenty-year experience at the University Hospital. *PRHS* 10:135-142,1991.
147. Angermeier KW, Montie JE: Perioperative complications of adrenal surgery. *Urol Clin North Am* 16:597-606,1989.
148. Linnoila RI, Lack EE, Steinberg SM, Keiser HR: Decreased expression of neuropeptides in malignant paragangliomas: An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 19:41-50, 1988.
149. Fries JG, Chamberlin JA: Extra-adrenal pheochromocytoma: literature review and report of a cervical pheochromocytoma. *Surgery*; 63:268-79, 1968.
150. Linnoila RI, Becker RL Jr, Steinberg SM, Keiser HR, Lack EE. The of S-100 protein containing cells in the prognosis of sympathoadrenal paragangliomas. *Mod Pathol*; 6:39A(210), 1993.
151. Baak JPA. Quantitative pathology today. A technical view. *Path Res Pract*; 182: 396-400, 1987.
152. Mellin W. Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications, and some results of DNA analysis. *Path Res Pract*; 186: 37-62, 1990.
153. Melamed MR, Mullaney PR, Mendelsohn ML. Flow cytometry and sorting. New York, Wiley, 1979.
154. Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. New York, Liss, 1985.
155. Dressler LG, Barrow SA. DNA flow cytometry in solid tumors. Practical aspects and clinical applications. *Semin Diagn Pathol*; 6: 55-82, 1989.
156. Shapiro HM. Flow cytometry of DNA content and other indicators of proliferative activity. *Arch Pathol Lab Med*; 113: 591-597, 1989.
157. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol*; 20: 528-548, 1989.
158. Rippin JW, Wollgar JA. Analysis of cell cycle subpopulations from cytometric data. *Analyt Quant Cytol Histol*; 11: 232-237, 1989.

159. Hiddeman W, Schumann J, Andreef N, y cols. Convention on nomenclature for DNA cytometry. *Cytometry*; 5: 445-446, 1984.
160. Johnson TS, Katz RL, Pershouse M. Flow cytometric applications in cytopathology. *Analyt Quant Cytol Histol X*; 10: 423-458, 1984.
161. Wersto RP, Liblit RL, Koss. Flow cytometric analysis of human solid tumors: a review of the interpretation of DNA histograms. *Hum Pathol* ; 22: 1085-1098, 1991.
162. Vindeløv LL, Christensen IJ. A review on techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* ; 11: 753-770, 1990.
163. Cornelisse CJ, Tanke HJ. Flow cytometry. En: Bibbo M (ed). *Comprehensive Cytopathology*. Filadelfia, WB Saunders Co., 1991: 984-1010.
164. Friedlander ML, Hedley DW, Tailor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol*; 37:961-974, 1984.
165. Kute TE, Muss H. Flow cytometry in solid-tumor prognosis. *Lab Management*; 25: 21-32, 1987.
166. Barlogie B, Raber MN, Schumann J, y cols. Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* ; 43: 3982-3997, 1983.
167. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Biology of disease. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest*; 57: 453-479, 1987.
168. Volpe JPG. Genetic instability of cancer. *Cancer Genet Cytogenet*; 34:125-134, 1988.
169. Shackney SE, Smith CA, Miller BW, y cols. Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res*; 49: 3344-3354., 1989.
170. Stewart CC. Flow cytometric analysis of oncogene expression in human neoplasias. *Arch Pathol Lab Med*; 113: 634-640, 1989.
171. Lai MK, Sun CF, Chen CS, Huang CC, Chu SH, Chuang CK. Deoxyribonucleic acid flow cytometric study in pheochromocytomas and its correlation with clinical parameters. *Urology*; 44:185-8, 1994.

172. Huang ST, Lai MK, Sun CC, Chen CS, Chen WH. [Pheochromocytoma nuclear pattern analysis by flow cytometry]. *Chang Keng I Hsueh*; 16:188-92, 1993.
173. Pang LC, Tsao KC. Flow cytometric DNA analysis for the determination of malignant potential in adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas or paragangliomas. *Arch Pathol Lab Med*; 117:1142-7, 1993.
174. Van Dekken H, Bosman FT, Teijgeman R, et al. Identification of numerical chromosome aberrations in archival tumours by in situ hybridization to routine paraffin sections: evaluation of 23 pheochromocytomas. *J Pathol*; 171:161-71, 1993.
175. Jung WH, Yang WI, Park C, Choi IJ. DNA flow cytometry in pheochromocytoma and paraganglioma. *Yonsei Med J*; 33:249-57, 1992.
176. Nativ O, Grant CS, Sheps SG, et al. The clinical significance of nuclear DNA ploidy pattern in 184 patients with pheochromocytoma. *Cancer*; 69:2683-7, 1992.
177. Gonzalez-Campora R, Diaz-Cano S, Lerma-Puertas E, et al. Paragangliomas. Static cytometric studies of nuclear DNA patterns. *Cancer*; 71:820-4, 1993.
178. Remmelink M, Salmon I, Pasteels JL, Ardichvili D, Kiss R. Nuclear DNA content, proliferation index and nuclear size determination in normal and tumoral adrenal tissues, pheochromocytomas and metastases. *Acta Cytol*; 39:416-22, 1995.
179. Klein FA, Kay S, Ratliff JE, White FKH, Newsome HH. Flow cytometric determinations of ploidy and proliferation patterns of adrenal neoplasms: an adjunct to histological classification. *J Urol*; 134, 862-866, 1986.
180. Sauter RE, Hollier RH, Bolton JS et al. Prognostic value of DNA flow cytometry in paragangliomas of the carotid body. *J Surg Oncol* 46:151-153, 1991.
181. Grignon DJ, Ro JY, Mackay B. et al. Paraganglioma of the urinary bladder: immunohistochemical, ultrastructural and DNA flow cytometric studies. *Hum Pathol*; 22:1162-1169, 1991.
182. Itakura H, Kinoshita K, Munakata A, Takamoto S, Minowada S, Aso Y. Flow cytometric analysis of DNA aneuploidy in adrenal tumors. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*; 83:53-8, 1992.
183. Amberson JB, Vaughan ED, Gray GF, Naus GJ. Flow cytometric determination of nuclear

- DNA content in benign adrenal pheochromocytomas. *Urology*, 30, 102-104, 1987.
184. Padberg BC, Garbe E, Achilles E, Dralle H, Bressel M, Schroder S. Adrenomedullary hyperplasia and pheochromocytoma. DNA cytophotometric findings in 47 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*; 416:443-6, 1990.
185. Lewis PD (1971) A cytophotometric study of benign and malignant pheochromocytomas. *Virchows Arch [B]* 9:371-376, 1971.
186. Padberg BC, Achilles E, Garbe E, Dralle H, Kloppel G, Schroder S. Histology, immunocytochemistry and DNA cytophotometry of adrenal gland pheochromocytoma (PCC)--a morphologic clinical study of 64 tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol*; 74:289-94, 1990.
187. Hosaka Y, Aso Y, Rainwater LM, et al. Flow cytometric DNA histograms of paraffin-embedded pheochromocytomas. *Urol Int*; 47 Suppl 1:100-3, 1991.
188. Hosaka, Y., Rainwater, L.M., Grant, C.S., Farrow, G.M., van Heerden, J.A. & Lieber, M.M. Pheochromocytoma: nuclear deoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry. *Surgery*, 100,1003-1010, 1986.
189. Cope C, Rowe D, Delbridge L, Philips J, Friedlander M. Comparison of image analysis and flow cytometric determination of cellular DNA content. *J Clin Pathol*; 44:147-51, 1991.
190. Proye C, Vix M, Goropoulos A, Kerlo P, Lecomte-Houcke M. High incidence of malignant pheochromocytoma in a surgical unit. 26 cases out of 100 patients operated from 1971 to 1991. *J Endocrinol Invest*; 15:651-63, 1992.
191. Zhang XH, Wei SL, Wang FR, et al. Studies on pathological morphology, clinical features and nuclear DNA contents by flow cytometry in adrenal neoplasms. *Chin Med J Engl*; 105:139-43, 1992.
192. Sasagawa I, Nakada T, Kubota Y, Ishigooka M, Sawamura T, Suzuki Y. Nuclear DNA ploidy pattern and tissue levels of dihydroxyphenylalanine and catecholamines in pheochromocytoma. *Urol Int* ; 54:181-3. 1995.
193. Nativ O, Grant CS, Sheps SG, et al. Prognostic profile for patients with pheochromocytoma derived from clinical and pathological factors and DNA ploidy pattern. *J Surg Oncol*; 50:258-62, 1992.

194. Cope C, Delbridge L, Philips J, Friedlander M. Prognostic significance of nuclear DNA content in pheochromocytoma. *Aust N Z J Surg*; 61:695-8, 1991.
195. Heaney AP, O'Rourke D, Arthur K et al. Flow cytometric analysis does not reliably differentiate benign from malignant pheochromocytoma *Clinical Endocrinology*, 44, 233-238, 1996.
196. Pattarino F, Boloux P-M. The diagnosis of malignancy in pheochromocytoma. *Clin Endocrinol* 44:239-241, 1996.
197. Gosset P, Lecomte-Houcke M, Carnaille B, Proye C. Adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas. contribution of histology, immunochemistry and DNA flow cytometry in the diagnosis of malignancy [letter]. *Eur J Surg*; 162:77, 1996.
198. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg CA, Musgrove EA. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* ; 31: 1333-1335, 1983.
199. Vindelov LL, Chnstensen IJ, Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry*; 3:323-327, 1983.
200. Merkel EE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and prognosis. *Cancer* 65:1194-1205, 1990.
201. Cornelisse CJ, Tanke HJ. Flow cytometry. En: Bibbo M (ed). *Comprehensive Cytopathology*. Filadelfia, WB Saunders Co., 1991: 984-1010.
202. Koss LG. Flow cytometry. En: *Diagnostic Cytology*. 4ª edición(1992). Vol 2 pp: 1613-1641. Filadelfia. J.B. Lippincot.
203. Auer GC, Aspersion TO, Wallgren AS. DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2:161 165, 1980.
204. Bocking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W. Algorithm for a DNA-cytophotometric diagnosis and grading of malignancy. *Anal Quant Cytol Histol* 6:1-8, 1984.
205. Mornex R, Badet C, Peyrin L. Malignant pheochromocytoma: a series of 14 cases observed between 1966 and 1990. *J Endocrinol Invest* 15:643-9., 1992.

206. Loh KC, Shlossberg AH, Abbott EC, Salisbury SR, Tan MH. Pheochromocytoma: a ten-year survey. *QJM*; 90:51-60, 1997.
207. Mendelsohn C, Olson JL: Pheochromocytomas. *Hum Pathol* 9:607-608, 1978 (letter).
208. Lack EE, Cubilla AL, Woodruff JM: Paragangliomas of the head and neck region. A pathologic study of tumors from 71 patients. *Hum Pathol* 10:191-218, 1979.
209. Lack EE, Cubilla AL, Woodruff JM, et al: Extra-adrenal paragangliomas of the retroperitoneum. A clinicopathologic study of 12 tumors. *Am J Surg Pathol* 4:109-120, 1980.
210. Shapiro B, Sisson JG, Lloyd R. et al: Malignant pheochromocytoma: Clinical, biochemical and scintigraphic characterization. *Clin Endocrinol* 20:189-203, 1984
211. Sisson JC, Kalff V, Thompson NW, et al: Pheochromocytoma and intraabdominal paragangliomas: a histologic and immunohistochemical study (abstract). *Lab Invest* 48:52A, 1983.
212. Kliever KE, Wen DR, Cancilla PA, et al. Paragangliomas: assessment of prognosis by histologic, immunohistochemical and ultrastructural techniques. *Hum Pathol* ;20:29-39, 1989.
213. Schlumberger M, Gicquel C, Lumbroso J, et al. Malignant pheochromocytoma: clinical, biological, histologic and therapeutic data in a series of 20 patients with distant metastases. *J Endocrinol Invest* 15:631-42.1992.
214. Hosoda S, Suzuki H, Oguri T et al: Adrenal pheochromocytoma with both benign and malignant components. *Acta Pathol Jpn* 26:519, 1976.
215. King ESJ: Malignant pheochromocytoma of the adrenals. *J Pathol Bact* 34:447, 1931.

Antes que nada Escudo  
"Centenario de la Cisterna de Plu al  
estado de los peregrinos impudables"  
APTO "CVM LAVDE"

POR UNANIMIDAD  
15

~~Escudo~~  
LAVDE

Escudo

Leptobue  


98  
  
Escudo  
