

29.255

1153137

S 7D C/174

T.O.  
C/174

Facultad de Medicina  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Departamento de Citología e Histología  
Normal y Patológica



**“VALOR PRONÓSTICO DE MARCADORES  
INMUNOHISTOQUÍMICOS EN EL  
FEOCROMOCITOMA ESPORÁDICO”**

**Tesis Doctoral**

**Francisco Jesús Caballero García.  
Noviembre, 1998**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Fco. Caballero", enclosed within a large, loopy scribble.



Avda. Sánchez Pizjuan, s/n  
 41009 - Sevilla  
 Tlfo. 954.55.17.96/7/8  
 Fax. 954.55.17.99

Departamento de Citología e Histología  
 Normal y Patológica

**DÑA. ANA FERNANDEZ RODRIGUEZ, y DÑA. ANA Mª MORENO FERNANDEZ PROFESORAS TITULARES DE LA UNIVERSIAD DE SEVILLA Y ADSCRITAS AL DPTO. DE CITOLOGIA E HISTOLOGIA NORMAL Y PATOLOGICA.**

**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 **"VALOR PRONOSTICO DE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS EN EL FEOCROMOCITOMA ESPORÁDICO"** por Don **FRANCISCO CABALLERO GARCIA** para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Sevilla a veintisiete de Noviembre de mil novecientos noventa y ocho.

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**  
**SECRETARIA GENERAL**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

Depositado en

de la

de esta Universidad desde el día **10-12-98**  
 hasta el día

Sevilla

de

de 19

**EL DIRECTOR DE**

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
 folio **15** número **336** del libro

correspondiente al día **2** de **1998**  
 Sevilla,

El Jefe del Negociado de Teles,

# **ÍNDICE.**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Morbi-mortalidad del cáncer.....	1
Glándulas Suprarenales.....	10
Anatomía.....	10
Desarrollo embriológico.....	10
Corteza suprarenal.....	13
Médula suprarenal.....	14
Vascularización e inervación renal.....	16
Paraganglios y tejidos cromafines extraadrenales.....	18
Lesiones proliferativas de la médula renal.....	21
Clasificación de los Feocromocitomas.....	25
Criterios de malignidad de los Feocromocitomas.....	31
Análisis Inmunohistoquímico.....	36
Oncogenes y antioncogenes.....	49
Teorías sobre la oncogénesis.....	49
Antecedentes históricos.....	51
Oncogenes y Protooncogenes.....	53
Genes Supresores o antioncogenes.....	56
Protooncogenes en el estudio de los feocromocitomas.....	57
Aplicación de la Inmunohistoquímica en el estudio de los protooncogenes.....	73
Genética tumoral del feocromocitoma.....	77
Criterios de valor pronóstico en el Feocromocitoma.....	79

<b>PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....</b>	<b>80</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
Material.....	84
Método.....	84
Valoración de los criterios clínicos y de seguimiento.....	84
Criterios Histopatológicos.....	86
Estudio Inmunohistoquímico.....	89
Marcadores hormonales y otros.....	89
Marcadores Génicos.....	92
Análisis Estadístico.....	96
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
Valoración clínica.....	98
Estudio Morfológico.....	106
Estudio Inmunohistoquímico.....	111
Marcadores Génicos.....	111
Marcadores Hormonales y otros.....	116
Análisis Estadístico.....	122
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>127</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>142.</b>

# **INTRODUCCIÓN**

# **MORBI-MORTALIDAD DEL CÁNCER.**

## **I.- A nivel Mundial.**

El término *cáncer*, incluye una amplia familia de enfermedades que pueden ser diferenciadas por su localización, morfología, comportamiento clínico y funcional y su respuesta al tratamiento. Engloba a un grupo muy heterogéneo de enfermedades, que se caracterizan por la desorganización de ciertas células, por su proliferación anárquica y por su capacidad de diseminarse a distancia, en muchos casos por causas aún no desveladas.<sup>1</sup>

### **A.- Morbilidad.**

El cáncer, en el mundo occidental, representa uno de los principales problemas de salud pública. En los países en vías de desarrollo, su importancia va en aumento, a medida que se van controlando los problemas de nutrición y las enfermedades transmisibles.

En 1.980 se produjeron 6,35 millones de casos de cáncer en el mundo, de los que 3.25 millones tuvieron lugar en hombres y 3.10 millones en mujeres. Se excluyeron los cánceres de piel (excepto el melanoma), que aunque muy frecuentes, presentan una baja letalidad, son pobremente registrados en las estadísticas de incidencia y no están reflejados en las de mortalidad.<sup>2</sup>

En los países desarrollados, el pulmón es la localización más frecuente en los hombres (22,3%) y la mama en las mujeres (22.9%).<sup>2</sup>

### **B.- Mortalidad.**

**Tabla 1.- Patrón de mortalidad por causas según regiones (año 1980).**

<b>Región</b>	<b>Infecciosas (%)</b>	<b>Cáncer (%)</b>	<b>Cardiovasculares (%)</b>	<b>Otras (%)</b>
<b>África</b>	48.7	3.1	12.3	3.8
<b>América Latina</b>	31.0	9.0	24.7	8.3
<b>América del Norte</b>	3.6	21.5	54.5	8.4
<b>Asia Oriental</b>	23.0	10.6	33.7	7.2
<b>Sur de Asia</b>	43.8	4.3	15.6	4.3
<b>Europa</b>	8.6	18.1	53.8	5.8
<b>Oceanía</b>	17.1	16.0	42.2	6.7
<b>Países desarrollados</b>	7.6	19.2	53.6	6.4
<b>Países en desarrollo</b>	39.9	5.5	19.0	4.9

Fuentes<sup>3</sup>

A nivel mundial, el cáncer ocupa el tercer lugar en cuanto a frecuencia como causa de muerte, tras las enfermedades infecciosas y las enfermedades del aparato circulatorio. El cáncer es más importante en los países desarrollados (19,2% de las muertes), que en los países en vías de desarrollo (5,5% de las muertes), en parte debido a la menor edad de su población y en parte debido a sus pobres registros.<sup>3</sup>

En 1.980 se produjeron 4,2 millones de muertes por cáncer en el mundo. Una de cada cinco muertes en los países occidentales es ocasionada por el cáncer (19.2%).<sup>3</sup>

Según estimaciones de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, para el año 2.000 el número de defunciones por tumores malignos aumentará en más del 50 %, hasta alcanzar unos ocho millones de defunciones anuales; uno de cada tres europeos estará afectado en el año 2.000 por un cáncer en un momento u otro de su existencia.<sup>4</sup>

En los países desarrollados, el cáncer ocupa la segunda posición como causa de muerte tras las enfermedades cardiovasculares.<sup>3</sup>

En EE UU, en los periodos de 1950-54 a 1986-91 la mortalidad a los 5 años de todas las formas de cáncer descendió una tercera parte, pasando del 70% al 50%; pudiendo deberse a múltiples factores entre ellos una mejora en los medios de diagnóstico precoz y una mayor eficacia en las pautas terapéuticas de algunas localizaciones tumorales.<sup>5</sup>

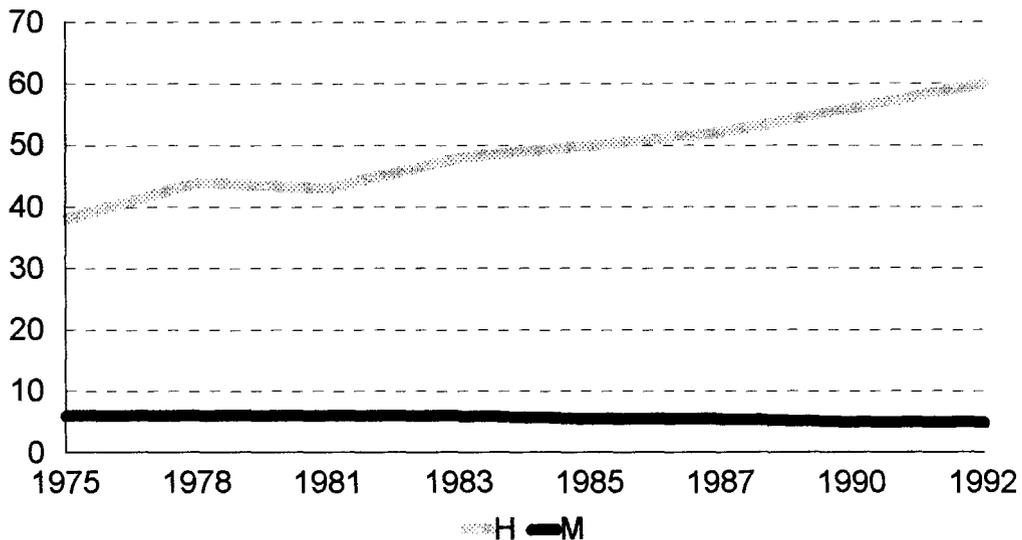
## **II.- En España.**

En España, entre 1900 y 1950 las enfermedades infecciosas todavía eran las causas de muerte más frecuentes.<sup>6</sup> A partir de 1950 comienza el ascenso vertiginoso de la mortalidad por cáncer y el mantenimiento de las enfermedades del aparato circulatorio,<sup>7</sup> convirtiéndose los tumores malignos en la segunda causa de muerte después de las enfermedades del corazón y por encima de las enfermedades cerebrovasculares.<sup>8</sup>

En los años 80, junto al incremento continuado de la mortalidad por cáncer, las características más destacadas han sido el descenso en la mortalidad por la mayoría de las principales enfermedades crónicas,<sup>9</sup> el aumento de las muertes por algunas causas de tipo agudo no infeccioso como los accidentes de tráfico<sup>10</sup> y el suicidio<sup>11</sup> y el aumento espectacular de la mortalidad prematura causada por el sida.<sup>12</sup>

En 1.992, los tumores malignos fueron la principal causa de muerte en España, con una tasa de mortalidad de 205,6 por 100.000 habitantes, y el 24,3% de todas las muertes; las enfermedades del corazón figuraron en segundo lugar con una tasa de 191,8 por 100.000 y el 22,6% de los fallecimientos.<sup>13</sup> Los tumores malignos constituyen la primera causa de años potenciales de vida perdidos.<sup>14</sup>

En España, las localizaciones más frecuentes, excluyendo los tumores de la piel, son: pulmón, mama, colon-recto, estómago y vejiga. La incidencia anual de cáncer se sitúa en torno a los 300 por 100.000 habitantes.<sup>15</sup>



Ministerio de Sanidad y Consumo. 1995

**Figura 1.- Tumores malignos. Tasa de mortalidad ajustada por edad por 100.000 habitantes, según sexo. España, 1.975-1.992.<sup>1</sup>**

En los varones, el cáncer ocasiona el 25% de las muertes. Las localizaciones tumorales que ocasionan una mayor mortalidad en hombres son: pulmón, estómago, próstata y colon-recto.<sup>15</sup>

En las mujeres, la mortalidad por cáncer es del 18% del total de las muertes. La mayoría de las defunciones se deberán al cáncer de mama y al de colon-recto; si bien, en los últimos años está aumentando la incidencia de cáncer de pulmón en mujeres, lo cual conllevará a un aumento de las defunciones debidas a esta localización tumoral en las próximas décadas.<sup>15</sup>

En España, el incremento observado en la tasa de mortalidad por cáncer en varones, se debe al aumento de la mortalidad por cáncer de pulmón.

En cambio, la tasa de mortalidad por cáncer en mujeres se ha mantenido estable en este periodo, a pesar del incremento observado en la mortalidad por el tumor maligno de mama.<sup>1</sup>

Aunque debido a su magnitud y a la gran relevancia que tiene, el cáncer representa un problema socio-sanitario de primer orden; en España no existen indicadores a nivel estatal. La información que poseemos, procede de sistemas de información sanitarios específicos de cada lugar, aunque sin duda, muy similares en cuanto a su diseño; tal es el caso de los Registros de Cáncer de algunas provincias y comunidades autónomas. En España existen seis registros de tumores homologados internacionalmente.<sup>1</sup>

Por **Comunidades Autónomas**, Asturias y Baleares presentan las tasas de mortalidad ajustadas por edad de tumores malignos más altas y Castilla La Mancha y Aragón las más bajas.

### **III.- En Andalucía.**

En las últimas décadas, los indicadores básicos de mortalidad han experimentado una mejoría importante en Andalucía. Se ha producido un descenso considerable de la mortalidad infantil, la mortalidad general, la mortalidad prematura medida por los años potenciales de vida perdidos y un incremento sustancial de la esperanza de vida.<sup>16</sup>

En nuestra Comunidad Autónoma, el cáncer es la segunda causa de muerte para todos los grupos de edad tras las enfermedades cardiovasculares, pero ocupa el primer lugar cuando se analiza la mortalidad en la población comprendida entre 35 y 64 años, siendo uno de los problemas de salud más importantes.<sup>16</sup>

El 27% de las muertes en varones y el 17% de las muertes en mujeres se atribuyen al cáncer. Los años de vida perdidos por el cáncer son superiores a los años de vida perdidos por enfermedades cardiovasculares.

El 38% de todos los años de vida perdidos en mujeres y el 29% en varones se deben al cáncer. El cáncer ocasiona la mortalidad prematura más elevada en relación al resto de las agrupaciones de causas.<sup>16</sup>

A pesar de ser el cáncer una de las causas más importantes de muerte en Andalucía, las tasa de mortalidad por esta causa son inferiores a las que se observan en otras regiones de la C.E.E.

Según la **edad**, en la mayoría de los tumores, con excepción de los típicamente infantiles, la mortalidad por cáncer aumenta con la edad. El 59% de las muertes por cáncer en varones y el 65% en mujeres se producen por encima de los 65 años. En ambos sexos el 90% de las muertes se ocasionan por encima de los 50 años. Por debajo de los 15 años, se producen el 1,2% de las muertes en niñas y el 0,9% en niños.<sup>16</sup>

Según el **sexo**, en varones las tasas de mortalidad más elevadas son para el cáncer de pulmón, estómago, próstata, colon y recto, hígado y vejiga. En mujeres las tasas más elevadas de mortalidad las presentan el cáncer de mama, colon y recto, estómago, hígado, cérvix y pulmón.

La tasa mortalidad por todos los cánceres ha aumentado en varones un 1,7% anual y ha permanecido estable en mujeres.

Las tasas de mortalidad por grupos de edad, han aumentado en varones, de manera significativa, a partir de los 45 años y descienden en los menores de 15 años. En mujeres, la mayoría de los grupos de edad han permanecido estables, con excepción de los menores de 15 años y el comprendido entre 45 y 54 años, que han disminuido la mortalidad por cáncer de manera significativa.<sup>16</sup>

Por **provincias**, los indicadores básicos de mortalidad a nivel provincial han seguido una tendencia semejante a la observada en el conjunto de Andalucía.

Las tasas de mortalidad, han descendido en ambos sexos y en todas las provincias andaluzas.

En varones, Cádiz y Sevilla, con una tasa de mortalidad por cáncer de 321,9 y de 296,9 por 1000.000 habitantes, presentan las tasas más elevadas y Jaén y Córdoba con 195,3 y 223,8 las más bajas.<sup>16</sup>

En mujeres, Cádiz y Sevilla, con una tasa de mortalidad por cáncer de 129,8 y de 127,8 por 100.000 habitantes, muestran las tasas más elevadas y Jaén y Córdoba con 101,9 y con 106,3 las más bajas.<sup>16</sup>

La gran mortalidad y morbilidad del cáncer, junto con sus graves repercusiones tanto a nivel de Salud Pública como socio-económicas, han hecho que los Estados dediquen importantes recursos y la comunidad científica esfuerzos improbos en la investigación de la etiopatogenia del cáncer y en el desarrollo de modalidades terapéuticas para el control de esta enfermedad.

Se ha podido establecer que muchos de los tumores malignos tienen su origen en factores de riesgo exógenos, (tabaco, alcohol, malos hábitos alimentarios...) y en la exposición a agentes ambientales de tipo físico, químico o biológico.

En vista de ello, gran parte de la mortalidad por cáncer es, en principio, evitable, si se ponen en marcha sistemas de prevención primaria con énfasis en la lucha contra el consumo de tabaco y alcohol, en la promoción de hábitos alimentarios adecuados y en la modificación o supresión de los agentes nocivos presentes en el medio ambiente laboral y comunitario.<sup>3</sup>

No obstante, no todas las modalidades, ni variedades histopatológicas de enfermedad cancerosa, son explicables por factores exógenos ó ambientales. Estudiando su etiopatogenia hoy sabemos que el cáncer es una enfermedad genética.

Los genes controlan el crecimiento, la maduración, la división y la muerte de todas las células de nuestro organismo. Una alteración en el material genético conllevará mutaciones en los genes que serían responsables de la transformación maligna de una célula.

Los tumores se originarían de divisiones anómalas de una célula común que habría sufrido una transformación maligna.

En recientes estudios de investigación, se han identificado algunas alteraciones génicas implicadas en el desarrollo tumoral. Los **protooncogenes**, son genes relacionados con la formación de los tumores. Los **oncógenes**, son formas mutadas de los anteriores, que originan proteínas con función alterada y estimulan el crecimiento y la invasividad celular.

El estudio de los oncógenes, permitirá conocer los mecanismos que originan el cáncer y abrirá nuevos campos para investigar modalidades terapéuticas distintas en el tratamiento de esta enfermedad.

# GLÁNDULAS SUPRARRENALES.

## I.- ANATOMÍA

Las glándulas suprarrenales, constituyen órganos pares situados sobre el polo superior de cada riñón, poseen una cápsula relativamente gruesa de tejido conectivo. Cada una de ellas esta compuesta de dos órganos endocrinos distintos, tanto por su origen embriológico, como por su estructura histológica y por su tipo de secreción y función: la *corteza*, de origen mesodérmico y formada por tres capas (glomerulosa, fasciculada y reticular) y la *médula*, de origen neuroectodérmico y formada por células cromafines y ganglionares.

Las glándulas suprarrenales, varían considerablemente de forma de uno a otro lado, y de uno a otro sujeto. Habitualmente son de forma triangular, con su superficie externa con tendencia a adoptar una disposición cóncava. Su tamaño habitual es de 3 cm de longitud, 2 cm de anchura, y un 1 cm de altura. El peso de cada una de ellas, en un sujeto adulto es de unos cuatro gramos.<sup>17</sup>

## II.- DESARROLLO EMBRIOLÓGICO.

Comienzan a formarse alrededor de la quinta semana de vida embrionaria; a partir de dos formaciones celulares de orígenes diferentes, que constituirán la corteza y la médula.

En el embrión de 10 mm, la corteza suprarrenal se origina de células mesoblásticas de la pared de la cavidad celómica, situada entre la raíz del mesenterio y el esbozo genital.

Estas células se dirigen hacia atrás y se van incorporando al mesénquima vecino; constituyendo la **corteza provisional o fetal**, gruesa, compuesta por grandes células acidófilas, de núcleos voluminosos dispuestas en cordones, separados por vasos sanguíneos.<sup>18</sup>

En el embrión de 14 mm, una nueva emigración de células de menor tamaño van a rodear la corteza acidófila, formando la **corteza definitiva o permanente**, menos gruesa y constituida por pequeñas células basófilas con núcleo pequeño e hiper cromático.<sup>18</sup>

En la semana 6ª y 7ª del desarrollo embrionario, los precursores de las células simpáticas primitivas denominados *simpatogonias*, aparecen en la cresta y el tubo neural, posteriormente estas células se diferencian en: **neuroblastos**, que darán lugar a las células ganglionares simpáticas, y **feocromoblastos**, que se convierten en feocromocitos o células cromafines maduras.

Antes de diferenciarse las células simpáticas migran en dirección ventral, desde la cresta neural; las destinadas a convertirse en neuroblasto, forman los ganglios simpáticos paravertebrales y preaórticos, a partir de los cuales se desarrollan las neuronas simpáticas postganglionares.

Algunas células simpáticas, destinadas a convertirse en feocromoblastos, permanecen asociadas al sistema nervioso simpático en vías de desarrollo y originan las células cromafines extraadrenales y los cuerpos celulares cromafines.

Otros feocromoblastos invaden la corteza suprarrenal en vías de desarrollo para formar la **médula suprarrenal primordial**.

En la 8ª semana de gestación, las glándulas suprarrenales alcanzan un peso aproximado entre 4 y 6 mgr, desarrollándose rápidamente, de modo que en el 2º trimestre el tamaño relativo de la glándula es 35 veces superior al del adulto.

En el 3º trimestre, el crecimiento se enlentece, alcanzando en el momento del nacimiento un peso de 4 gr, reduciéndose en un 50% durante las primeras semanas de vida.

El tamaño que alcanza la glándula adrenal en el periodo fetal se debe fundamentalmente al desarrollo de la corteza provisional. En esta etapa, las células de la corteza permanente, se desarrollan lentamente, y solo después del nacimiento, comienza a diferenciarse, las tres zonas características de la corteza adulta, no estando totalmente diferenciadas hasta los 20 o 24 meses después del nacimiento.<sup>18</sup>

Las células cromafines extrasuprarrenales maduran entre la 9ª y 11 semanas de gestación en el ser humano. Después del nacimiento la mayoría de células cromafines extrasuprarrenales empiezan a degenerar, y las de la médula suprarrenal completan su maduración.

El desarrollo embriológico, nos ayuda a comprender la relación existente, entre tumores cromafines y otras neoplasias endocrinas; según una hipótesis, el neuroblastoma y el feocromocitoma representan diferentes estadios de diferenciación desde la cresta anular. El neuroblastoma estaría menos diferenciado, mientras que el feocromocitoma lo estaría más.<sup>19</sup>

Desde una perspectiva embriológica, se sabe que la distribución de las células paraganglionares es más extensa en el recién nacido que en el adulto.<sup>20</sup> Esta hipótesis, explicaría la aparición de paragangliomas en niños, así como la presencia de paragangliomatosis con mas de 20 tumores en un mismo paciente.<sup>21</sup>

El común origen embriológico de la médula adrenal y del sistema nervioso simpático explicaría el hallazgo de feocromocitomas compuestos, donde el tumor contiene ganglioneuomas, ganglioneuroblastomas y/o neuroblastomas.<sup>22</sup>

### III.- CORTEZA SUPRARRENAL.

Desde el punto de vista macroscópico, constituye la zona periférica dura y amarillenta de algo más de medio centímetro de grosor, de la glándula suprarrenal. En la corteza suprarrenal del recién nacido, sólo se pueden distinguir dos zonas corticales, la tercera, la más interna, se formará a lo largo del primer año de vida. En la pubertad culminará el desarrollo de la capa reticular.<sup>23</sup>

Las células parenquimatosas de la corteza entre la cápsula y la médula, muestran tres disposiciones denominadas zonas. Inmediatamente debajo de la cápsula se encuentra la zona glomerular, sus células están agrupadas en acúmulos pequeños e irregulares, separados por capilares, debajo de ésta zona y de forma radial y perpendicular a la superficie encontramos la capa fasciculada, entre ésta última y la médula nos encontramos con la zona reticular.

- **Zona Glomerular:** Supone alrededor del 10 al 15% de la corteza, está constituida por grupos y acúmulos de células cúbicas o cilíndricas con núcleos que se tiñen de oscuro y citoplasma escaso y eosinófilo, observándose pocas gotas lipídicas en él.

En el microscopio electrónico destaca, la abundancia de retículo endoplásmico liso, esta capa segrega diversas hormonas con actividad mineralocorticoide, como la desoxicorticosterona, teniendo como producto final a la aldosterona, que se encarga de mantener el equilibrio de agua e hidrosalino. El factor principal que regula la concentración de aldosterona es la angiotensina II, dependiente del sistema renina-angiotensina del riñón.

- **Zona Fasciculada:** Conformada alrededor del 80% de la corteza. Sus células son poliédricas, con núcleos voluminosos, hipercromáticos, vacuoladas y con gran cantidad de gotas de lípidos, que no son más que colesterol, precursor de las

hormonas esteroideas acompañados de una importante cantidad de ácido ascórbico, “vitamina C”, recibiendo el nombre de espongocitos. En esta capa se sintetizan, glucocorticoides fundamentalmente el cortisol.

La transición desde la zona fasciculada a la reticular, es gradual, aunque a veces se describe entre ambas capas una zona intermedia, formada por células con escasas gotas lipídicas y características sudanóforas.

- **Zona Reticular:** Representa el 5-10% de volumen total. Es la más interna de las tres, las células que la componen son más pequeñas que las de la zona fasciculada y tienen pocas inclusiones lipídicas. El citoplasma es compacto, y destacan grandes acumulaciones de pigmentos lipofuscínicos. Es característico de esta zona la presencia en el espacio cercano a la médula de dos tipos celulares denominados células “claras” y “oscuras”.

Las células claras, presentan un núcleo poco teñido y un citoplasma pálido, mientras que las oscuras, poseen grandes acúmulos de pigmentos lipocrómicos. En esta zona, predomina la secreción de andrógenos, fundamentalmente las de dehidroepiandrosterona (DHEA)<sup>24</sup>, cuya regulación depende principalmente de la LH y FSH.

#### **IV.- MÉDULA SUPRARRENAL**

Macroscópicamente, constituye la zona central blanda y delgada de color gris de la glándula suprarrenal. Ocupa el 10% del total de la glándula suprarrenal, con un peso medio de 0,54 gr.

Microscópicamente, la médula suprarrenal está compuesta de células epitelioides grandes, dispuestas en grupos redondeados, sostenidos por numerosas fibras reticulares y en relación con capilares sanguíneos y fibras nerviosas.

Se disponen siempre entre un capilar y una vénula, estando polarizadas en dirección a esta última, de forma que las fibras nerviosas preganglionares que la inervan contactan en el lado del capilar, mientras que la secreción se acumula en el polo celular orientado hacia las vénulas, donde es vertida.

La microscopía electrónica de las células cromafines de la médula suprarrenal, demuestra la presencia de gránulos intracitoplasmáticos densos y osmiófilos, envueltos en membrana de 100-300 nm de diámetro.

Se identifican diversos tipos celulares:

■ **Células claras:** constituidas por células globulosas de núcleo central y citoplasma claro, tienen tendencia a formar grupos y se denominan células *ragiocromas* o productoras de noradrenalina. Al fijarlas con glutaraldehído descubrimos gránulos que poseen un núcleo muy denso a los electrones y que a menudo ocupan una posición excéntrica, adherido a la membrana limitante, conservando la forma esférica o adoptando disposición de semiluna.

■ **Células oscuras:** comprende células de mayor tamaño, su citoplasma tiene afinidad por los colorantes habituales, se denominan células *hialocromas* o productoras de adrenalina. Al fijarlas con glutaraldehído se observan gránulos homogéneos menos densos a los electrones y que presentan una subestructura, conteniendo numerosas partículas de 50-100 Å de diámetro.<sup>25</sup>

En el hombre las células *ragiocromas* e *hialocromas* se hallan mezcladas, sin que se observen una distribución predominante. El 85% del depósito de catecolaminas en la médula adrenal es adrenalina.<sup>17</sup>

También se describen diversos tipos celulares con características intermedias entre las dos anteriores. También se observan, células ganglionares simpáticas, aisladas o en pequeños grupos dentro de la médula suprarrenal.<sup>18</sup>

Henle demostró en 1865, que cuando el tejido se fija en una solución que contiene bicromato potásico, estas células aparecen llenas de gránulos pardos. Esta coloración con sales de cromo se denominó reacción feocroma o cromafin, y es el resultado de la oxidación y polimeración de las catecolaminas, noradrenalinas y adrenalinas, contenidas dentro de los granos de las células ragiocromas e hialocromas.

El sistema cromafin se compone de las células cromafines de la médula y de los paraganglios y comparte la característica de formar compuestos coloreados o feocromas.

Las técnicas clásicas de reacción cromafin han sido sustituidas por otras como el uso del formaldehído, o del ácido glicoxílico o por métodos inmunohistoquímicos, más adecuados para la detección de catecolaminas.<sup>26</sup>

Los gránulos secretorios no solo almacenan catecolaminas, sino también otras proteínas solubles como la sinaptofisina, la cromogranina, ATP, y enzimas como la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa.<sup>26</sup>

## V.- VASCULARIZACIÓN E INERVACIÓN ARENAL.

Las glándulas suprarrenales están regadas por tres arterias de distinto origen y se ramifican al aproximarse a las glándulas, se distinguen tres grupos principales:

- Las **arterias suprarrenales superiores**, se originan de la arteria frénica inferior y son el grupo principal.
- Las **arterias suprarrenales medias**, que provienen de la aorta.
- Las **arterias suprarrenales inferiores**, ramas de la arteria renal.

Desde estas procedencias, las arterias forman un plexo en la cápsula, desde el cual parten las arterias corticales, que se distribuyen en una red de sinusoides, rodeada por los cordones celulares de la corteza, hasta terminar en el límite cortico-medular.

Las arterias perforantes o medulares, penetran desde la cápsula por las trabéculas y cruzan la corteza, sin emitir ramas hasta llegar a la médula, en esta se ramifica y forma una red capilar en torno a los grupos y cordones de células cromafines. Por consiguiente, la médula presenta un doble aporte sanguíneo; a través de los sinusoides corticales, que se anastomosan con su lecho capilar y a través de las arterias perforantes o medulares, que pasan directamente de la cápsula a la médula.

Esta vascularización conlleva consecuencias fisiológicas importantes, hay pruebas experimentales que demuestran que es necesaria una alta concentración de glucocorticoides procedentes de la corteza, para inducir y mantener la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa, imprescindible para la síntesis de adrenalina.

El que una célula medular segregue noradrenalina o adrenalina, queda determinado por el lugar en que esta situada con respecto a la sangre rica en esteroides de la corteza.<sup>18</sup>

Los capilares de la médula, drenan en el mismo sistema venoso que la corteza. Las vénulas se reúnen y forman las grandes venas centrales de la médula que salen de las glándulas a través del hilio, reunidas en la vena suprarrenal.<sup>20</sup>

La **inervación** de la glándula se compone de fibras simpáticas preganglionares que llegan por los nervios esplácnicos mayor y menor, forma un plexo en la cápsula desde el cual parten atravesando la corteza y terminando en la médula, mediante sinapsis en torno a las células cromafines.<sup>27</sup>

La estimulación nerviosa es fundamental en la respuesta funcional de la médula; no solo activando la elaboración de la adrenalina, sino estimulando los primeros pasos de la biosíntesis de esta hormona.

## **VI.- SUPRARRENALES ECTÓPICAS.**

Pueden encontrarse en cualquier localización, desde el diafragma hasta la pelvis. Algunas de ellas poseen corteza y médula. Se localizan restos de tejidos suprarrenal en regiones subcapsulares de riñón, testículo y corteza ovárica.<sup>27</sup>

## **VII.-PARAGANGLIOS Y TEJIDOS CROMAFINES EXTRAADRENALES.**

El paraganglio y la médula adrenal, presentan células neuroendocrinas originadas en la cresta neural, y comparten un origen embriológico común. Reciben la denominación de paraganglios por su relación con los ganglios celíacos.<sup>28</sup>

Anatómicamente se localizan en los ganglios simpáticos paravertebrales, hígado, riñón, testículo, ovario, corazón y en todo el retroperitoneo.<sup>29</sup> Del mismo modo se puede asociar con ciertos pares craneales y algunas estructuras por ellos inervadas, como: cuerpo aórtico, cuerpo carotídeo, glomus yugular, y grupos celulares de ganglios del vago entre otros.

Exceptuando la médula adrenal, el órgano de Zuckerkandl, localizado delante de la aorta y debajo de la arteria mesentérica inferior, y los cuerpos carotídeos; los paraganglios son menores de un milímetro en su eje mayor, y presentan una forma redondeada, oval o irregular. Estructuralmente presentan dos tipos de células: las células endocrinas y las células gliales.

Las **células endocrinas**, se denominan de forma diferente según su localización; células paragangliónicas o cromafines cuando se asocian al sistema simpático, o células tipo I cuando se asocian al sistema parasimpático, presentan un núcleo pequeño asociado a un citoplasma abundante lleno de gránulos secretorios; se disponen formando grupos o cordones.

Las **células gliales** se denominan sustentaculares, satélites o células tipo II, son de menor número y de localización periférica, presentan un citoplasma mas alargado y un núcleo de forma lenticular.

Tanto los paraganglios simpáticos como parasimpáticos, contienen una red vascular, existiendo una asociación íntima entre las células neuroendocrinas y los capilares. El prototipo de paraganglio simpático es la médula adrenal y del parasimpático, el cuerpo carotídeo. El papel de los mismos es liberar productos de secreción en respuesta a estímulos neurales y/o químicos, que pueden tener efectos endocrinos, paracrinós, de neurotransmisión o de neuromodulación, según el contexto anatómico.

## VIII.-PARAGANGLIOMAS

Los feocromocitomas, son tumores cromafines de la médula suprarrenal.<sup>30</sup>

Las neoplasias de los paraganglios parasimpáticos se denominan “quemodectomas“, “paragangliomas no cromafin” o “tumores glómicos”.

Los **paragangliomas**, son todas las lesiones tumorales extraadrenales de naturaleza cromafin.

Son neoplasias de los ganglios simpáticos extraadrenales, caracterizadas por una reacción cromafin positiva, o por la evidencia clínica de secreción de catecolaminas.

Son tumores raros, que afectan a 1/100.000 habitantes entre la cuarta y la quinta década de la vida. Entre los paragangliomas simpáticos la mitad se localizan en la vecindad de los órganos de Zuckerkandl. De los paragangliomas parasimpáticos los tumores yugolotimpánicos son los más frecuentes (57-81%), seguidos por los del cuerpo carotídeo (8-36%), vagales (4-13%), y los aórticos (4-10%).<sup>30</sup>

Los paragangliomas de cabeza y cuello son predominantemente parasimpáticos y comprenden el 0,01% de estos tumores.

Los paragangliomas suelen ser menores que los feocromocitomas, miden entre 3 ó 4 cm y precisan para reconocerlos de marcadores neuroendocrinos, como la cromogranina y la sinaptofisina, que revelan la presencia de gránulos de secreción con aminas biógenas.<sup>31</sup>

Los paragangliomas funcionantes suelen estar asociados con signos y síntomas dependientes de la liberación de catecolaminas, predominantemente norepinefrina. Hay mayor contenido de adrenalina en los paragangliomas simpáticos torácicos y en los parasimpáticos.

Además de las catecolaminas, los paragangliomas simpáticos extradrenales segregan ACTH, somatostatina, encefalina, gastrina, calcitonina, VIP y glucagón; los parasimpáticos, segregan somatostatina, calcitonina, encefalina, VIP, vasopresina y bombesina.

## **IX.- LESIONES PROLIFERATIVAS DE LA MÉDULA ADRENAL.**

### **IX 1.- Hiperplasia medular adrenal.**

En un principio, se describió asociada a los síndromes MEN (Múltiple Neoplasia Endocrina).<sup>32</sup> Recientemente, se reconoce como una entidad diferente, que puede manifestarse con similares síntomas a los del feocromocitoma. Se definen como un incremento de la masa celular medular. Puede ser nodular o difusa, y siempre es bilateral. Es una lesión predisponente, al desarrollo de feocromocitomas benignos y malignos.

En muchos casos, la hiperplasia medular, es un componente de la adenomatosis endocrina múltiple tipo II, junto con el carcinoma medular de tiroides y la hiperplasia de células principales de paratiroides, e incluso se ha asociado al síndrome de la muerte súbita infantil.<sup>33</sup>

### **IX 2.- Neuroblastoma.**

Es el tumor sólido extracraneal más frecuente en la infancia y adolescencia. Se detecta en más del 70% en niños menores de cuatro años; el 35% se presenta antes de los dos años de edad y menos frecuentemente después de los quince. Cuando aparece después del primer año se presenta de manera muy agresiva, sin embargo, cuando aparece al nacer o en los primeros meses de vida, hay una tendencia a la regresión espontánea.

Su localización, es diversa, se puede presentar tanto en la médula como en el retroperitoneo. Se desarrollan fundamentalmente en el abdomen, aunque también están descritos en cabeza, cuello o área pélvica.

Las metástasis se desarrollan con rapidez; en los tumores originados en la suprarrenal izquierda son más frecuentes las óseas, fundamentalmente en cráneo y órbitas; en los tumores que se originan en la suprarrenal derecha predominan las metástasis hepáticas.

Histológicamente, las células tumorales (neuroblastos), se disponen formando rosetas, rodeando fibrillas nerviosas inmaduras, con frecuentes áreas de formaciones quísticas y cambios degenerativos. El 90% de los neuroblastomas elaboran noradrenalina.<sup>26</sup>

### **IX 3.- Ganglioneuromas.**

Los neuroblastomas se diferencian en grado variable, pudiendo transformarse de manera completa en un ganglioneuroma. Es un tumor benigno, constituido por un estroma fibroso en el cual se esparcen células ganglionares.

Se pueden presentar cuadros intermedios de diferenciación entre el neuroblastoma puro y el ganglioneuroma puro, recibiendo el nombre de ganglioneuroblastoma. Es el tumor más frecuente del sistema nervioso simpático del adulto.<sup>26</sup>

### **IX 4.- Pseudofeocromocitoma.**

Con este término, designamos la situación clínica de un paciente con signos y síntomas de feocromocitomas, pero que en la exploración quirúrgica revela que no existe tumor. Las entidades causantes de feocromocitomas, son: el mielolipoma adrenal, quistes renales, coartación abdominal de aorta, fibrosarcoma de la arteria pulmonar, astrocitoma, hiperplasia medular adrenal y el paraganglioma cardíaco o funcional.<sup>34</sup>

Otras causas que provocan síntomas similares a un feocromocitoma son: la intoxicación aguda por mercurio, la administración farmacológica de epinefrina y la sobreactividad de los receptores adrenérgicos.<sup>35</sup>

## **IX 5.- Feocromocitomas.**

Es un tumor productor de catecolaminas, derivado de las células cromafines que se localizan en las glándulas adrenales, aunque también fuera de ellas, constituyendo los feocromocitomas extradrenales o paragangliomas.

Macroscópicamente son tumores encapsulados de 3 a 5 cm de diámetro, y con un peso menor de 100 gr, tienen una forma ovoide o redondeada y de superficie es lisa. Presentan un color rosado grisáceo con áreas de hemorragias y formaciones quísticas, pueden existir áreas distróficas calcificadas, visibles en las radiografías de abdomen.<sup>35</sup>

Microscópicamente, se distingue distintos patrones: en el *patrón alveolar*, los feocromocitos se agrupan formando nidos, en el *trabecular*, se disponen en forma de red, y en el *patrón mixto* se conjugan los dos anteriores.

En un 36% de los casos, existe una mezcla de ambos patrones, en un 35% predomina el patrón alveolar, y en el 27% restante el trabecular.

Los **feocromocitos**, son células poligonales con un citoplasma eosinófilo, con gránulos finos. Su núcleo es redondo, con la cromatina agrupada y generalmente un sólo nucleolo. Las células del feocromocitoma presentan gránulos secretores de contenido denso, unidos a la membrana. Los gránulos de noradrenalina, son más densos y separados por un halo, los de adrenalina son más claros y sin halos.<sup>36</sup>

Felix Fränkel, lo describió clínicamente en una mujer de 18 años con crisis de palpitaciones, ansiedad, vértigo, cefalea, vómitos y alteraciones de temperatura y pulso. En la autopsia, se constató la existencia de un tumor adrenal bilateral.<sup>37</sup>

El término feocromocitoma lo introdujo Pick en 1912, definiendo un tumor medular adrenal que se oscurece por la fijación con dicromato potásico, y que produce gran cantidad de catecolaminas, predominando generalmente la noradrenalina.

Su incidencia es de 1-2/100.000 habitantes y año,<sup>38</sup> más del 90% son citológicamente benignos, aunque su comportamiento clínico puede ser agresivo. Habitualmente son tumores unilaterales, sin embargo, en un 10% de los casos son bilaterales, habitualmente relacionados con las formas familiares.

Pueden presentarse a cualquier edad, aunque predominan en la quinta década de la vida, en menos del 10% se presentan en la infancia, no existe predilección por sexo. Representa una causa rara de hipertensión arterial, encontrándose en menos de un 0,1% de los pacientes hipertensos.<sup>39</sup>

La triada característica es cefaleas, hipersudoración y palpitaciones, el 90% de los casos se localiza en las glándulas suprarrenales. También puede desarrollarse, en cualquier lugar donde se encuentre tejido cromafín extraadrenal, como a lo largo de las cadenas simpáticas abdominales o en el órgano de Zuckerkandl. Un 1% se presenta en la pared de la vejiga y menos de un 1% es de localización intratorácica.<sup>40</sup>

Los feocromocitomas, habitualmente son esporádicos pero pueden formar parte de los síndromes de adenomatosis endocrina múltiple, tipo II A (Hiperparatiroidismo primario, cáncer medular de tiroides y feocromocitoma) y II B (Carcinomas medular de tiroides, feocromocitomas, neuromas mucosos y hábito

marfanoide); de la enfermedad de Von-Hippel-Lindau (angiomas retinianos, hemangioblastomas cerebelosos, carcinomas de células renales, quistes testiculares y feocromocitomas) y de la neurofibromatosis (manchas café con leche, neurofibromas cutáneos, neurinomas bilaterales del nervio acústico y feocromocitomas).<sup>41</sup>

El diagnóstico clínico se basa en los síntomas y en la demostración de la presencia de niveles elevados de catecolaminas o de sus metabolitos en plasma y orina. Existe una correlación entre la catecolamina predominante y la semiología clínica. Los productores de noradrenalina se asocian a hipertensión mantenida, los secretores de adrenalina, pueden producir hipotensión, y los secretores de noradrenalina y adrenalina, se asocian a hipertensión paroxística.

En el diagnóstico histológico del feocromocitoma, se usan las técnicas del ácido glioxílico, o de la fluorescencia inducida por formaldehído; en los de difícil diagnóstico se utilizan la cromogranina y la sinaptofisina, anticuerpos monoclónicos frente a proteínas específicas marcadoras de su origen neuroectodérmico.<sup>26</sup>

## **X.- CLASIFICACIÓN DE LOS FEOCROMOCITOMAS.**

### **X 1.- FAMILIARES.**

### **X 2.- FEOCROMOCITOMAS DE LA INFANCIA.**

### **X 3.- FEOCROMOCITOMAS COMPUESTOS.**

### **X 4.- FEOCROMOCITOMAS ESPORÁDICOS.**

### **X 5.- FEOCROMOCITOMAS MALIGNOS.**

### **X 1.- FEOCROMOCITOMAS FAMILIARES.**

Su prevalencia es del 10% de todos los feocromocitomas, en muchos casos son hereditarios, con un patrón autosómico dominante con penetrancia alta.

Se agrupan en:

## **A.- Feocromocitomas familiares no asociados a síndrome MEN.**

Pertencen a este grupo, tumores cromafines con herencia conocida, que se asocia a facomatosis mucocutáneas, entre las que destacan la enfermedad de Von-Hippel-Lindau, la enfermedad de Von Recklinghausen, y el síndrome Stuger-Weber.

### **A 1.- Neurofibromatosis o enfermedad de Von Recklinghausen:**

Es una enfermedad hereditaria autosómica dominante no ligada al sexo, que se presenta en un 5% de los pacientes con feocromocitomas.<sup>39</sup>

Se caracteriza por la asociación de manchas café con leche, neurofibromas cutáneos y viscerales, Schwannomas malignos o benignos, meningiomas, gliomas y feocromocitomas.

### **A 2.- Enfermedad de Von-Hippel-Lindau:**

También se denomina hemangioblastomatosis retino-cerebelosa. La incidencia de feocromocitomas, en pacientes con esta enfermedad es de un 10%.<sup>39</sup>

Se caracteriza, por la presencia de angiomatosis retiniana, hemangioblastomas del SNC, quistes pancreáticos, hepáticos y epididimarios, cáncer renal y feocromocitomas.

### **A 3.- Síndrome de Stuger-Weber:**

La frecuencia de feocromocitomas en pacientes con esta entidad, es del 5%. Se caracteriza por la asociación de hemangiomas cavernosos, envolviendo la primera o todas las ramas del V par craneal, y feocromocitomas.

También se han descrito asociaciones de feocromocitomas con tumores de islotes pancreáticos y con adenomas hipofisarios.

La **enfermedad de Hirschsprung**, que consiste en una alteración en la motilidad intestinal por ausencia de los plexos nerviosos mientéricos, presenta una génesis común con los feocromocitomas.<sup>42</sup>

## **B.- Feocromocitomas familiares asociados al síndrome MEN.**

En este grupo se engloban aquellos tumores cromafines con herencia conocida y asociados a Neoplasias Endocrinas Múltiples. Se transmite con herencia autosómica dominante con un alto grado de penetrancia. Los feocromocitomas, se desarrollan en el 30 al 50% de pacientes con síndrome MEN tipo II.<sup>32</sup>

Se ha relacionado el desarrollo del síndrome con la mutación de un gen, el *ret*, que codifica una proteína la tirosina-quinasa, que se localiza en el brazo corto del cromosoma 10, próximo a la región centromérica.<sup>43</sup>

### **B 1.- Neoplasia endocrina múltiple tipo II A o síndrome de Sipple.**

Este síndrome se compone de la asociación de hiperplasia de células C, carcinoma medular de tiroides, feocromocitomas (a menudo bilateral y ocasionalmente extrasuprarrenal), y adenoma o hiperplasia paratiroidea. Se relaciona más directamente con una anomalía del desarrollo de la cresta neural que el MEN I.

### **B 2.- Neoplasia endocrina múltiple tipo II B.**

Se caracteriza por la asociación de cáncer medular de tiroides, hiperplasia de célula C, hábito marfanoide, ganglioneuromatosis gastrointestinal,

mucocutáneas y corneal e hiperplasia medular adrenal-feocromocitomas. Se ha denominado a este trastorno síndrome de neuromas de la mucosa.

Clínicamente, los feocromocitomas asociados a síndrome MEN II, se caracterizan por presentarse en los sujetos en la tercera década de su vida, se producen ataques paroxísticos en más de 95% de los casos y encontramos hipertensión sostenida en menos de un 5% de los pacientes.

En cuanto a las características patológicas de estos feocromocitomas, destacan su multicentricidad, la bilateralidad presente en más del 65%, la presencia de metástasis en el 5% de los casos y el contenido hiperplásico de la médula residual.

Las catecolaminas que predominan en el contenido de estos tumores son la adrenalina o epinefrina.<sup>44</sup>

## **X 2.- FEOCROMOCITOMAS DE LA INFANCIA.**

El feocromocitoma es poco frecuente en la edad pediátrica, representa una causa inusual de hipertensión en la infancia y supone el 10% del total de feocromocitomas. La relación varón- mujer es de 2 a 1. La edad media en el momento del diagnóstico es de 10-11 años. Histológicamente son similares a los feocromocitomas de los adultos.

Los síntomas más comunes son: cefalea, sudoración, náuseas, vómitos, pérdida de peso y alteraciones visuales. La poliuria y polidipsia, se encuentra en el 25% de los casos.

En la infancia, tienen mayor tendencia a la bilateralidad, multicentricidad y se asocia en mayor medida con paragangliomas extraadrenales.<sup>45</sup>

El 10% de los feocromocitomas diagnosticados en niños tienen una incidencia familiar. Cuando la localización es extraadrenal, hay una mayor incidencia de comportamiento maligno.<sup>46</sup>

### **X 3.- FEOCROMOCITOMAS COMPUESTOS.**

Son aquellos tumores, en los que hay un componente de feocromocitoma y otro componente que se asemeja a un neuroblastoma, a un ganglioneuroblastoma, ó a un ganglioneuroma.<sup>22</sup>

Pueden desarrollarse como resultado de la transformación, de feocromocitomas maduros o bien a partir de células cromafines no neoplásica.

En estudios in vitro, se ha demostrado que tanto las células medulares normales como las células neoplásicas, pueden seguir una diferenciación gangliónica, bajo la influencia de ciertos factores de crecimiento, como por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso (NGF).<sup>47</sup>

Su etiopatogenia se explicaría, al ser tumores con un origen embriológico común a partir de la cresta neural. Estas células de origen neuroectodérmico, tendrían una doble potencialidad neural y endocrina que justificaría la doble composición de este tumor.<sup>48</sup>

Estos tumores siguen dos patrones de crecimiento: el primero formado por células ganglionares diferenciadas dispuestas entre fascículos entrelazados de células de Schwann; y el segundo formado por células anguladas de citoplasma basófilo y granular similar al del feocromocitoma.<sup>49</sup>

Se localizan preferentemente en las suprarrenales, siendo poco frecuentes las localizaciones intraabdominales extra-adrenales.<sup>22</sup>

Se han descrito asociaciones de este tumor compuesto con la enfermedad de Von Recklinghausen y con el Schwannoma maligno.<sup>50</sup>

#### **X 4.- FEOCROMOCITOMAS ESPORÁDICOS.**

La edad media de presentación de estos tumores es la 4<sup>a</sup>-5<sup>a</sup> década, se presenta en forma de ataques paroxísticos en el 50% de los casos, y en la mitad de los pacientes cursa con hipertensión sostenida.

Entre las características patológicas de los feocromocitomas esporádicos destacan su unilateralidad, la presencia de metástasis en el 10% de los casos y la anatomo-patología normal en la médula residual.

Las catecolaminas que predominan en estos tumores son la Noradrenalina y la Norepinefrina.<sup>44</sup>

#### **X 5.- FEOCROMOCITOMAS MALIGNOS.**

Representan entre el 2 y el 14% del total de los feocromocitomas.<sup>22</sup> Las metástasis son linfáticas o hematógenas, principalmente a hígado, pulmón, ganglios linfáticos o hueso.

El feocromocitoma maligno responde mal a las medidas terapéuticas, por lo que tiene muy mal pronóstico. La supervivencia a los 5 años, oscila entre el 44 y el 53% del total.<sup>51</sup>

El 10% de estos tumores recurren tras la cirugía, siendo el tiempo medio de recidiva de 5 a 6 años tras la cirugía. Dado el crecimiento lento de estos tumores se recomienda un seguimiento a largo plazo de los pacientes afectados de feocromocitomas y sometidos a cirugía.<sup>52</sup>

# XI.-CRITERIOS DE MALIGNIDAD DEL FEOCROMOCITOMA.

## XI 1.- CRITERIOS CLÍNICOS.

La principal característica clínica del paciente con feocromocitoma, es la hipertensión, que se produce por la brusca liberación de catecolaminas, ésta se presenta en el 50% de los casos como hipertensión paroxística, y en el resto como hipertensión mantenida.

Los aumentos paroxísticos de la presión arterial, son desencadenados por la tensión emocional, la actividad física y por la palpación de la región tumoral. Numerosas sustancias, pueden provocar estos aumentos de la tensión arterial: histamina, opiáceos, medios de contraste, glucagón, saralalina, hormonas adrenocorticotropas, y metoclopramidas.

La **tensión arterial** puede superar la cifra 250 mm de sistólica y 150 mm de diastólica. La liberación de catecolaminas puede desencadenar, edema agudo de pulmón, fibrilación ventricular, hemorragia cerebral, e incluso la muerte del individuo.<sup>53</sup>

Cuando no se presentan estos paroxismos, las manifestaciones mas corrientes son: cefalea, sudoración excesiva, palpitaciones, temblores y nerviosismo.

La asociación, hipertensión-cefalea-sudoración-palpitaciones, supone el 94% de probabilidad de tener feocromocitoma. La cefalea es intensa y pulsátil, acompañada de síntomas neurovegetativos. Las palpitaciones se asocian con una sensación de muerte inminente.

La mitad de los pacientes presentan intolerancia a los hidratos de carbono, debida a la supresión de la insulina o, a la estimulación de la producción hepática de glucosa.

Esta intolerancia a la glucosa, no exige tratamiento específico con insulina y desaparece al extirpar el tumor.<sup>54</sup>

La **localización** del feocromocitoma tiene una gran influencia en el carácter agresivo del tumor, siendo de comportamiento más maligno, aquellos desarrollados fuera de las glándulas suprarrenales.<sup>25</sup>

El feocromocitoma, cuando se sitúa en la pared de la vejiga urinaria, produce paroxismos típicos hipertensivos, durante la micción, presentando la mitad de ellos, hematuria.<sup>53</sup>

Se ha descrito, la asociación del síndrome de Cushing con este tumor; siendo el mecanismo responsable, la producción ectópica de ACTH. La secreción de ACTH, de los tumores cromafines, suprimen el eje normal hipotálamo-hipofisario-adrenal. Por técnicas inmuno histoquímicas, se demostró la existencia, en algunos feocromocitomas, de sustancias ACTH-Like.<sup>55</sup>

## **XI 2.- CRITERIOS BIOQUÍMICOS.**

La característica fundamental del feocromocitoma desde el punto de vista bioquímico, es el aumento en plasma y orina, de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) y sus derivados (ácido vanilmandélico y el ácido homovanílico). Esta elevación se hace más manifiesta en las crisis paroxísticas hipertensivas.

La médula adrenal normal contiene catecolaminas, de las cuales el 80 u 85% son epinefrina o adrenalina.

El feocromocitoma, segrega más noradrenalina que adrenalina. El 27% de estos tumores, segregan noradrenalina solamente. El tumor cromafin, presente en los pacientes con síndrome MEN tipo II, segrega mas adrenalina que noradrenalina. El incremento en la eliminación urinaria de adrenalina, representa la manifestación más temprana de la hiperfunción medular adrenal.

Se ha descrito la asociación entre la secreción de dopamina y la recidiva en pacientes con feocromocitomas extra adrenales. Sin embargo, también se ha demostrado niveles incrementados de dopamina en los tumores benignos. Por tanto, la secreción de dopamina no puede considerarse como un marcador bioquímico de malignidad para los feocromocitomas.<sup>54</sup>

Se ha propuesto, como marcador de malignidad la elevación de los niveles en sangre de enolasa neurón específica (NSE), proteína producida normalmente en pequeñas cantidades por el feocromocitoma.<sup>56</sup>

### **XI 3.- CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS.**

No existe un criterio histológico inequívoco de malignidad, salvo la evidencia de **metástasis**, sin embargo, encontramos datos que se han asociado a comportamiento maligno del feocromocitoma.

#### **A.- Criterios macroscópicos.**

Se consideró la existencia de una correlación lineal entre el **tamaño** y el **peso**, y la malignidad del feocromocitoma. Los tumores malignos, suelen ser de mayor tamaño y peso, que los benignos. Sin embargo, ciertos tumores benignos alcanzan gran tamaño, por tanto estos criterios macroscópicos carecerían de valor pronóstico de malignidad por sí sólo, y deberían correlacionarse con criterios clínicos, microscópicos e inmunohistoquímicos.<sup>57</sup>

## **B.- Criterios microscópicos.**

Los feocromocitomas, son histológicamente muy parecidos a la médula adrenal normal. Las células tumorales, se disponen alineadas en cordones, y con un patrón bien alveolar o bien difuso. Algunos tumores presentan un estroma vascular, que le da un aspecto angiomaso.

Los feocromocitomas, se encuentran separados de la corteza por una capa delgada de tejido conectivo fibrovascular; además, es posible ver formaciones quísticas, áreas de hemorragia, necrosis o cambios mixomatosos.

Se ha demostrado depósito amiloide intersticial o vascular. Esta sustancia se ha encontrado en el 70% de los tumores.

El cáncer medular de tiroides, también presenta amiloide, y al ser este un tumor emparentado en casos familiares con el feocromocitoma, se intentaron estudiar ambos amiloides; observándose una estructura similar en el amiloide del feocromocitoma y el de tumores que pertenecían a MEN tipo II.<sup>48</sup>

Las células tumorales o feocromocitos, tienen una forma poligonal y son mayores que las células medulares adrenales normales. El citoplasma es vacuolado y contiene inclusiones PAS positivas, que corresponden a cuerpos lisosomales gigantes. Algunas neoplasias presentan feocromocitos, con un núcleo ovoide hipercromático y pequeñas cantidades de citoplasma eosinófilo, parecido a los feocromocitoblastos.

Mediante estudios ultraestructurales se han dividido a las células del feocromocitoma en dos grupos principales, según la presencia o ausencia de gránulos secretorios.<sup>58</sup>

- **Células Tipo I.**

Contienen gránulos secretorios. Se subdividen en tres grupos, según tamaño y número de gránulos y vesículas.

Células Tipo 1A: Contienen gran número de vesículas y relativamente pocos gránulos secretorios que miden aproximadamente  $180 \pm 75$  nm de diámetro.

Células Tipo 1B: Tienen numerosos gránulos que miden  $130 \pm 70$  nm.

Células Tipo 1C: Mayor número de gránulos que miden entre  $220 \pm 100$  nm de diámetro.

Se encontraron diferencias entre los que contenían adrenalina y los que contenían noradrenalina; observándose que los tumores productores de norepinefrina puros, tenían alta densidad electrónica en sus gránulos secretorios y una membrana limitante.<sup>36</sup>

Los tumores que contenían adrenalina, poseían gránulos secretorios con menor densidad y contenidos granulares densos en sus membranas limitantes. Estos gránulos tienden a ser mayores y de morfología indeterminada o atípica.<sup>36</sup>

En 1976, Watanabe descubrió una amplia variedad de anomalías mitocondriales. Las mitocondrias mayores se encontraron en paragangliomas extraadrenales; presentaron un tamaño de hasta 3 micras de longitud y cuerpos esferoidales intramitocondriales que se interpretaron como cristales atípicos. Se relacionaron estas anomalías morfológicas con niveles disminuidos de enzimas mitocondriales (monoaminoxidasa y succínico deshidrogenasa).

En una revisión de 120 casos, se encontraron que sólo tres datos histológicos se correlacionaban con comportamiento maligno del tumor<sup>59</sup>:

- Nodularidad tumoral grosera.
- Áreas de necrosis confluentes.
- Ausencia de glóbulos hialinos.

Se encontraron un mayor número de figuras mitóticas en los tumores malignos, un mayor índice mitótico y una mayor invasión tumoral local o vascular, pero no se encontraron diferencias significativas entre los tumores malignos y los benignos.

## **XII.-ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO.**

Clasificar a un tumor como adrenal o cromafin depende, en parte, del método utilizado para demostrar el contenido de catecolaminas de la lesión. Los métodos histoquímicos más empleados en el estudio de las catecolaminas, han sido la reacción cromafin clásica y sus variedades, así como las técnicas de fluorescencia. La reacción cromafin clásica se basa en la capacidad de este tumor para reaccionar con sales de dicromato o ácido crómico, formando pigmentos marrón-oscuro, que representan productos de oxidación de adrenalina y noradrenalina.

Múltiples técnicas, entre ellas el método del cianuro férrico, las técnicas de argentifinidad y argirofilia, y la técnica modificada de Giemsa; demuestran la presencia de epinefrina y norepinefrina en secciones de tejidos fijadas en formol. Estas técnicas son poco específicas y dan positivas para una gran variedad de sustancias, como la melanina, lipofucsina y componente tisulares que contienen una gran proporción de grupos sulfhidrilos.

El perfeccionamiento de la técnica de fluorescencia en formaldehído, supuso un avance en la demostración histoquímica de catecolaminas.<sup>60</sup>

La reacción química consiste en la formación de derivados fluorescentes, tras la condensación de gas formaldehído con catecolaminas e indoleaminas.

La explicación de este método consiste en la inmovilización rápida de las aminas procedentes de tejidos por secado y congelación; y la condensación de ellas con formaldehído gaseoso. Las catecolaminas forman derivados isoquinólicos, con emisión máxima de 470 microm, que es visible con fluorescencia verde, esta técnica es muy específica y sensible y produce una reacción positiva en tejidos en los que se conoce su contenido en catecolaminas, pero han dado negativo o falsas reacciones cromafines.<sup>60</sup>

El método del ácido glioxílico empleando cortes de tejido congelado, ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico rápido de feocromocitoma y tumores relacionados.<sup>61</sup>

Tras demostrar la presencia y los niveles de catecolaminas, en el feocromocitoma se pueden estudiar otras características: comparar perfiles inmunohistoquímicos del feocromocitoma productor de ACTH y por tanto generador de Cushing, con otros feocromocitomas; demostrar hormonas ectópicas en el tejido tumoral; demostrar si los métodos inmunohistoquímicos pueden permitir un claro diagnóstico entre feocromocitoma y otros tumores adrenales; determinar la inutilidad o utilidad de ciertos anticuerpos monoclonales en comparación con otros marcadores tumorales neuroendocrinos; comparar el valor de los anticuerpos aplicados en parafinas y el de tejidos congelados y determinar el posible valor pronóstico de la fracción de crecimiento en los tejidos tumorales.

Los neuropéptidos, contenidos en el feocromocitoma son numerosos e impredecibles; un comportamiento similar puede ser visto en los paragangliomas. Incluye un amplio espectro de aminas biogénas, particularmente catecolaminas y péptidos regulatorios.<sup>62</sup>

Las células presentes en hiperplasias medulares adrenales y en feocromocitomas, contienen gran concentración de cromogranina,<sup>63</sup> enolasa neuronal específica ENE,<sup>64</sup> leu-7 y sinaptofisina.<sup>65</sup> La única distribución heterogénea ha sido observada en el feocromocitoma familiar asociado con el síndrome MEN, que continen menos cromogranina<sup>63</sup>.

## **XII.1.- CROMOGRANINA**

Es un polipéptido ácido presente en los gránulos cromafines adrenales, presenta tres grupos inmunológicamente distintos: cromogranina A, B y C. La más abundante es la cromogranina A, que comprende el 40 al 50% del total de las proteínas granulares solubles de la médula adrenal.

Recientemente se ha determinado que la cromogranina B y C, son tan abundantes como la cromogranina A. La cromogranina C, también se denomina secretogranina II. Con estudios inmunoquímicos e inmunohistoquímicos se demuestra que está presente tanto en neuronas como en células del sistema neuroendocrino difuso.<sup>66</sup>

Se ha detectado cromogranina en múltiples tumores neuroendocrinos tales como: adenomas de hipófisis, tumores de células de islotes, feocromocitoma, carcinoma medular de tiroides, adenomas paratiroideos y tumores carcinoides. La cromogranina A, se detectó predominantemente en los feocromocitos, mientras que era débilmente expresada o ausente en las células ganglionares, por lo que se convierte en un buen marcador de dichas células.<sup>66</sup>

Los anticuerpos policlonales, contra una mezcla de cromogranina A y B, pueden ser unos marcadores más sensibles que la cromogranina A en el diagnóstico de tumores neuroendocrinos.<sup>67</sup>

**Tabla 2.- Subclases de cromogranina.**

<b>Subclase</b>	<b>Peso molecular</b>	<b>Hipófisis</b>	<b>Glándula paratiroidea</b>	<b>Páncreas endocrino</b>	<b>Médula adrenal</b>
<b>A</b>	67 a 68	+	+	+	+
<b>B</b>	100 a 120	+	-	+	+
<b>C</b>	84 a 86	+	-	-	-

Las funciones de la cromogranina son las siguientes:

1.- Participa en el empaquetamiento de gránulos, regulación de la concentración de calcio en los mismos y procesado de la hormona de los gránulos por sulfatación y fosforilación.<sup>68</sup>

2.- Interviene en la homeostasis de los cationes calcio. Más del 99% del calcio intravesicular, está unido a la cromogranina o al ATP. La concentración de calcio que excede del ATP, sugiere que la cromogranina une más calcio.<sup>69</sup>

3.- La homología con la pancreastatina sugiere una tercera posible función-señal de rotura proteolítica.

## **XII.2.-ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA.**

Es una forma isoenzimática, de la enzima enolasa presente en la vía glicolítica del SNC y SNP. Es muy útil en el diagnóstico de tumores neuronales y derivados de la cresta neural. Está presente en el sistema neuroendocrino difuso y del sistema APUD, y por tanto en los tumores que derivan de estas células.

También, ha sido encontrada en tumores no neurales, gliomas, meningiomas, Schwannomas, papilomas del plexo corotídeo, neurinomas, carcinoma y fibradenoma de mama, carcinomas de células renales, melanomas y tumores ecrinos.<sup>70</sup>

Por microscopía electrónica, se ha demostrado que la enolasa, es una proteína citoplasmática, difusamente distribuida y no localizada en ninguna organela en concreto.

Con técnicas de inmunoperoxidasa, la enolasa neuronal específica, exhibe una inmureactividad citoplasmática glanular, tanto en las células cromafines normales como en las neoplásicas.<sup>71</sup>

### **XII.3.- SINAPTOFISINA.**

Es una glicoproteína ácida de 40-90 nm de diámetro situada en la membrana de las vesículas presinápticas, de las neuronas bovinas, de las cuales fue originalmente extraída como anticuerpos monoclonales designados SY 38.<sup>72</sup>

La función que realiza la sinaptofisina, es participar en la liberación dependiente del calcio de los neurotransmisores.

La localización inmunohistoquímica de la sinaptofisina, es similar a la de las cromograninas, pero es más característica de las células endocrinas. Se encuentran en las células de los islotes de Langerhans, feocromocitos, neuronas cerebrales, de la médula espinal, de la retina, placa neuromuscular, corteza cerebral, células de Purkinje, segmentos del nervio periférico de la dermis y células de los islotes pancreáticos de los adultos.<sup>73</sup>

La tinción, tiende a ser granular y en la periferia de las células neurales con una localización paralela a la distribución de los gránulos en estas células.<sup>73</sup>

La sinaptofisina es un marcador tumoral muy útil y una glucoproteína de membrana de las vesículas secretorias, por ello es lógico que esté presente de manera constante en las células tumorales del feocromocitoma.<sup>74</sup>

## **XII.4.- RENINA.**

Es una enzima proteolítica de origen renal, actúa sobre el angiotensinógeno para producir angiotensina I, formando parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona, el cual se localiza junto al aparato yuxtaglomerular, para desembocar en la formación intrarrenal de angiotensina II (AII). Este sistema, es indispensable para el mantenimiento de la presión arterial, debido a deplección de volumen. En condiciones de normovolemia, la angiotensina II, participa también en el mantenimiento de la presión arterial.<sup>75</sup>

Los tumores productores de renina, son raros y han sido descritos en el pulmón, páncreas, ovarios y región paraovárica. Bioquímica e inmunohistoquímicamente se han demostrado en el feocromocitoma, tanto en las células gangliónicas como cromafines. En la glándula adrenal normal algunas células de la corteza, (zona glomerulosa y zona reticular) presentan inmunoreactividad para la renina, habiéndose encontrado que el ARNm de la misma se expresa tanto en la cortical como en el tejido medular.<sup>53</sup>

La presencia de los dos componentes del sistema renina-angiotensina ha sido sistemáticamente investigada en los tejidos adrenales normales y patológicos con dos objetivos:

- 1.- La detección de renina y especialmente angiotensinógenos.
- 2.- El estudio de las posibles diferencias en la coexpresión de renina y angiotensinógenos en tejidos de origen cortical y medular.

La renina de las glándulas adrenales normales, representa el 56% del total detectable en el organismo y el 87% en el tejido neoplásico.<sup>69</sup>

Esta alta proporción de la misma indica una alta conversión de prorenina a renina, en el interior de estos tejidos. El angiotensinógeno y su ARNm fueron detectados tanto en las glándulas adrenales normales como en las patológicas, siendo la cantidad de angiotensinógeno ARNm mayor en el feocromocitoma.

La renina y el angiotensinógeno, se coexpresan tanto en el tejido normal como en el patológico. Los tejidos de diferentes orígenes celulares (zona glomerulosa, fasciculada y tejido medular) fueron capaces de expresar, almacenar y procesar renina y sintetizar angiotensinógenos. No existiendo relación clara entre la expresión de estas proteínas y la patofisiología de la glándula adrenal.

**Tabla 3.- Niveles de renina y prorenina en tejidos adrenales normales y patológicos.**

<b>Tejido</b>	<b>Nº De casos</b>	<b>Renina (pg/g tejido)</b>	<b>Renina total (prorenina pg/g tejido)</b>	<b>% de renina</b>
<b>Glándula adrenal normal</b>	5	92-2,392	144-6280	45-68
<b>Feocromocitoma</b>	10	48-948	60-1416	67-100
<b>Aldosteronismo primario</b>	11	20-1.292	20-2.544	32-100
<b>Carcinoma adrenocortical</b>	4	64-1984	72-2580	77-100
<b>Adenoma cortical no secr.</b>	7	248-1684	424-2664	5-92

## **XII.5.- ACTH.**

Se ha demostrado la presencia de ACTH en ciertos tipos de feocromocitomas. Es un polipéptido presente en la adenohipófisis en un 15% de sus células, que se distribuyen predominantemente en el lóbulo medio, aunque las células corticotropas son también, vistas en el lóbulo anterior.

Destaca la presencia de pequeños espacios esféricos vacíos en el citoplasma yuxtannuclear, denominados “*cuerpos enigmáticos*”. Estos pueden ser numerosos en condiciones fisiológicas y se piensa que representan lisosomas.<sup>76</sup>

Inmunohistoquímicamente, se ha demostrado CRH y ACTH en los feocromocitomas<sup>77</sup>

## **XII. 6.- POLIPÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO.**

Es un polipéptido de 28 aminoácidos perteneciente a una familia que incluye el péptido histidina isoleucina (PHI), el factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRF), glucagón, péptido inhibidor gástrico (GIP), y la secretina.<sup>78</sup>

El VIP es un neurotransmisor o neuromodulador peptidérgico, íntimamente asociado con la acetilcolina, en el sistema nervioso parasimpático. Su principal función incluye la vasodilatación, absorción de agua y secreción de electrolitos en el intestino y páncreas, así como la relajación del músculo liso, sobre todo alrededor de los esfínteres.<sup>78</sup>

Inmunohistoquímicamente, se ha localizado en estructuras neuronales del SNC y del SNP, incluido los nervios intrínsecos del tracto gastrointestinal. En el SNC se encuentran en neuronas y fibras nerviosas de varias áreas del cortex cerebral, hipotálamo, núcleo amigdalino, y cuerpo estriado. También se ha demostrado su presencia en neuronas del plexo de Meissner y del plexo de Auerbach del tubo digestivo.

En el aparato digestivo las fibras nerviosas VIP positivas son abundantes en la mucosa, submucosa, y musculo circular; y en menor numero han sido visualizadas, en el músculo longitudinal. El VIP contenido en las fibras nerviosas está sobre las paredes de los vasos y sobre los esfínteres musculares, tales como el cardias y el píloro; las estructuras nerviosas VIP + son abundantes en el páncreas.<sup>78</sup>

La producción excesiva de VIP, ha sido asociada con el síndrome de Verner-Morrison, también llamado cólera pancreático o WDHA (Diarrea acuosa, hipokaliemia, aclorhidria).<sup>79</sup> Estos pacientes presentan diarrea acuosa que puede exceder de 3 a 5 litros por día, acompañado por hipokaliemia e hipo o aclorhidria. La mayoría de los pacientes, con este síndrome tienen un tumor pancreático endocrino, pero también, ha sido asociado con tumores endocrinos intestinales, carcinoma “oat cell”, neuroblastoma o ganglioneuroma y feocromocitoma.

En los feocromocitomas que secretan VIP, solo unos pocos pacientes presentan hipertensión, lo que se atribuye a los efectos vasodilatadores del VIP y al incremento del volumen plasmático de estos pacientes.<sup>64</sup>

## **XII.7.- SOMATOSTATINA (SRIF).**

Es un tetradecapéptido cíclico con un puente disulfuro entre los residuos 3 y 14 de la cisteína, que inhibe tanto “in vivo” como “in vitro”, la liberación de la hormona de crecimiento; no inhibe ni su biosíntesis ni su almacenamiento. Inhibe también, la liberación de TSH, en respuesta a la TRH, pero no la liberación de prolactina ni de gonadotropinas. Disminuye la secreción de la insulina y glucagón por el páncreas endocrino, siendo su vida media de solo minutos.<sup>80</sup>

La somatostatina está presente en varias localizaciones, como elementos neuronales, órganos digestivos y recientemente se ha demostrado en la médula adrenal humana y en el feocromocitoma extraadrenal. Las SRIF y las catecolaminas coexisten en las mismas células. La coexistencia de SRIF y noradrenalina ha sido demostrada en los ganglios simpáticos, médula adrenal y feocromocitomas extraadrenales.<sup>81</sup>

## XII.8.- CALCITONINA.

Es un péptido de 32 aminoácidos, con una importante actividad homeostática con el calcio.

Sintetizada como un precursor peptídico de 17.5 kd es metabolizada a su forma bioactiva final en el retículo endoplásmico y es empaquetada en los gránulos secretorios. Este péptido se opone a la acción de la paratohormona al inhibir la resorción de hueso y promover la incorporación de fosfato en el mismo, con lo que se produce un descenso de los niveles de calcio sérico.

Se ha aislado un péptido homólogo a la calcitonina, relacionado con el gen de ésta (CGRP). Aunque las funciones “in vivo” de la CGRP son desconocidas, las funciones “in vitro” incluyen la inhibición de la secreción gástrica de clorhídrico y pepsina, junto a la inhibición de la secreción pituitaria de la hormona de crecimiento, con una potente acción vasodilatadora.<sup>82</sup>

La calcitonina se localizó en un principio en las células C del tiroides, pero también ha sido demostrada en lugares extratiroides, como la pituitaria anterior, las células neuroendocrinas bronquiales, la médula adrenal, la paratiroides y el timo.<sup>83</sup>

En estudios inmunoestructurales de las células C, se ha detectado la presencia de calcitonina en dos tipos de gránulos: *tipo I*, con tamaño de 280 nm de diámetro y una membrana moderadamente densa; y *tipo II*, con tamaño de 130 nm de diámetro y alta densidad electrónica.<sup>84</sup>

La CGRP está localizada en las células C y en un subtipo de las células paratiroides. Por inmunohistoquímica ultraestructural se ha demostrado que los gránulos contienen tanto calcitonina como CGRP.<sup>82</sup>

## **XII. 9.- HMB-45.**

Esta proteína se ha asociado con el nevus de la unión, con el melanoma maligno y lesiones relacionadas. La misión principal del anticuerpo HMB-45, ha sido establecer el diagnóstico de melanoma.

Este anticuerpo se estudió en los feocromocitomas malignos buscando un posible marcador de las células derivadas de la cresta neural.<sup>85</sup>

Otros tumores donde también se ha demostrado esta proteína ha sido el carcinoma de células claras de pulmón y el angiomiolipoma renal.<sup>85</sup>

## **10.- Ki-67.**

La proteína *Ki-67* no es, a diferencia de los anteriores, producto de un oncogén/antioncogén, sino que es un marcador de proliferación celular, con cierto valor pronóstico, motivo por lo cual hemos considerado valioso incluirlo en nuestro estudio.

El interés por valorar la capacidad proliferativa de un tumor data del siglo pasado. Actualmente se acepta que la cinética celular tumoral influye directamente en el curso clínico de la enfermedad, de ahí el creciente interés por encontrar marcadores de la proliferación celular.

En 1983, Gerdes y sus colaboradores produjeron el anticuerpo frente a *Ki-67*. Es un anticuerpo monoclonal generado al inmunizar ratones con extracto nuclear de una línea celular originada a partir de pacientes con enfermedad de Hodgkin, la L428. Dicho anticuerpo va a reconocer el epítipo lábil de un antígeno nuclear expresado en las células proliferantes y ausente en las células quiescentes.<sup>86</sup>

El gen que codifica *Ki-67* ha sido localizado en el cromosoma 10, más concretamente en el segmento 25 del brazo largo, y va a producir una proteína nuclear no histona de gran tamaño formada por dos fragmentos de peso molecular 395 y 345 kD respectivamente, siendo el fragmento más pequeño una variante del de mayor tamaño con la delección del exón 7. Representa una proteína estructural con capacidad de unión al DNA, cuya principal misión es el mantenimiento de la estructura del DNA durante la mitosis, periodo en el que las proteínas estructurales hístonas se encuentran en estado de flujo.<sup>87</sup>

Existe una correlación entre la inmunoreactividad a *Ki67* y la fase del ciclo celular. La expresión de la proteína *Ki-67* aparece en la fase media a tardía de G1, localizándose en los nucleolos. Posteriormente va a incrementarse su expresión a lo largo de las fases S y G2, para alcanzar su máximo durante la mitosis. En las fases S y G2 el antígeno *Ki-67* va a tener una distribución nucleoplásmica asociada a la cromatina, y ya en la fase de mitosis va estar localizada en las cromátides. Después de la mitosis la proteína es rápidamente degradada, siendo su vida media menor a una hora, debido probablemente a la existencia de numerosos segmentos *PEST* (prolina-glutamina-serina-treonina) en la proteína lo cual facilita su catabolismo.<sup>88</sup>

Es evidente, por tanto, que usemos el antígeno *Ki-67* como marcador de proliferación celular, representando el número de células que lo expresan la población tumoral en fase proliferativa en un momento determinado.

Por otra parte, es importante señalar que existen ciertos problemas prácticos que pueden limitar la utilidad de *Ki-67*:

- La expresión de este antígeno parece estar influenciada por el aporte nutricional a las células.<sup>89</sup> Por lo que una muestra de tejido tomada del área central de un gran tumor puede proporcionar erróneamente valores muy bajos de su fracción de crecimiento.

- La mayoría de los tumores están formado por una población celular heterogénea dentro de la cual pueden existir diferentes velocidades de proliferación. Por lo que la tinción con *Ki-67* dentro de una biopsia pequeña puede no reflejar la velocidad de proliferación predominante de un tumor.

A ello se añade otra consideración teórica importante: la expresión del *Ki-67* solamente proporciona información acerca de si una célula se encuentra en fase proliferativa o no, pero no proporciona ningún dato sobre la duración del ciclo celular ni sobre su capacidad metastatizante.

No obstante, a pesar de estas consideraciones, por otra parte también aplicables a los restantes métodos índices de proliferación celular (p.ej. timidina marcada), la utilidad del antígeno *Ki-67* ha sido ampliamente demostrada en la valoración de la cinética celular y en determinados casos parece tener importancia pronóstica.

De manera que, en pacientes con carcinomas de mama, pulmón, próstata, colon, hígado y estómago, así como en linfomas y sarcomas, hay una clara evidencia de que una proliferación incrementada, valorada por inmunohistoquímica a través de la expresión del antígeno *Ki-67*, señala que tumores progresan más rápidamente, e identifica a aquellos pacientes que tienen un menor intervalo libre de enfermedad y una menor supervivencia.<sup>90</sup>

# ONCOGENES Y ANTIONCOGENES.

En todos los seres vivos existe un equilibrio entre los mecanismos de división y muerte celular que mantendría la estabilidad del organismo, el crecimiento celular es un proceso meticulosamente regulado. La velocidad de multiplicación variará según el tipo de célula: así, en el epitelio intestinal las células vivirán pocos días, los glóbulos rojos sanguíneos 120 días aproximadamente, mientras que las células cerebrales no se multiplicarán prácticamente nunca.

Existe un control genético estricto del equilibrio proliferación-muerte celular. Cuando esos genes fallan, una célula hasta entonces normal, (*célula fundadora*), sufre un cambio crítico en su material genético y se transforma en una célula que crece y prolifera sin responder al control que regula el crecimiento celular, generando millones de células que constituyen la masa tumoral.

## I. TEORIAS SOBRE LA ONCOGÉNESIS.

El primer punto a dilucidar, es intentar dar una explicación a la transformación de las células.

### A.- Teorías epidemiológicas:

En 1700 *Bernardino Ramazini*, observó que las monjas católicas presentaban un mayor riesgo de cáncer de mama. En 1775, el cirujano británico Sir Percival Pott comunicó que entre los limpiadores de chimeneas el riesgo de cáncer de escroto era mayor, y dedujo que el hollín retenido en los pliegues de la piel podría ser responsable del mismo.

## B.- Teorías celular-molecular:

En 1880, *David Von Hansemann* analizó las irregularidades mitóticas en tejidos malignos y los asoció con el origen y desarrollo de malignidad. Basándose en estos datos *Boveri*, propuso la teoría cromosómica del cáncer: el origen de la transformación maligna de la célula estaría en el interior de la célula misma y sería el resultado de un contenido cromosómico anormal.

Hoy sabemos, que la carcinogénesis es el resultado de la interacción del ambiente con el genoma.

Se han demostrado tres clases de *agentes cancerígenos*: QUÍMICOS, VÍRICOS Y RADIACIONES.<sup>91</sup>

**-QUÍMICOS:** Causan cáncer por su efecto mutagénico. Es el grupo mejor estudiado y más numeroso. Hay dos subgrupos: los de *acción directa*, que son los menos frecuentes, y los de *acción indirecta*, que son transformados por el metabolismo en los carcinógenos finales. Estos productos son metabolizados a compuestos intermediarios electrofilicos o a radicales libres, que reaccionan con el DNA cromosómico provocando daño directo del material génico, en ocasiones acontece un bloqueo de la metilación del DNA. Entre ellos destacan: **tabaco** (pulmón, cabeza-cuello, esófago, páncreas, mama, estómago), **asbesto** (pulmón, mesotelioma, ovario), **benceno** (leucemia) y **cloruro de vinilo** (angiosarcoma hepático).

**-VIRUS:** Son agentes carcinogénicos claramente establecidos. Actúan insertando su material genético en el DNA celular. La mayoría de ellos son *retrovirus* (virus RNA). El papel causal del virus de Eipstein-Barr en el Sarcoma de Kaposi ha sido ampliamente estudiado. Son la clave para el conocimiento de los mecanismos moleculares de oncogénesis.<sup>92</sup>

**-RADIACIONES:** Entre ellas incluimos las radiaciones ultravioleta e ionizantes (Rayos X y partículas atómicas). La radiación ionizante daña el DNA directamente (rotura de cromosomas dosis dependiente) y la radiación ultravioleta causa daños genéticos mediante la formación de dímeros de pirimidina que conducen a la mutación. La exposición a los rayos ultravioleta, particularmente los de onda más corta, de ultravioleta B (280 a 320 nm), se relacionan con el carcinoma basocelular de la piel.

## II. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

En 1911, *Peyton Rous* descubrió que los extractos celulares filtrados de tumores de pollos causaban nuevos tumores cuando se inoculaban a aves sanas, y concluyó que por sus propiedades sería un virus el responsable de dicha transformación. Este hallazgo fue ignorado por la comunidad científica durante años hasta que se aisló el virus descubierto por *Rous* (conocido desde entonces como *RSV* ó *virus del sarcoma de Rous*) y estudiado su genoma.

Existían dos tipos de virus RSV, los crónicos, que inducen infección pero no producen transformación celular, y los agudos, que no producen infección pero sí la transformación, desarrollando sarcoma o leucemia al ser inyectado a un animal. La diferencia entre ambos tipos se debe a la distinta composición de su genoma. Los virus crónicos tienen tres genes mientras que los agudos poseen cuatro.

El gen **env** que codifica la glucoproteína viral de la cubierta.

El gen **pol** que codifica la transcriptasa inversa.

El gen **gag** que codifica las múltiples proteínas virales.

Sin embargo, el virus agudo posee un cuarto gen, el gen **src**, que es el que codifica la proteína causante de la transformación.

Este cuarto gen no tenía ninguna función útil en el ciclo vital del virus, no era necesario para el virus porque este gen no era un gen viral, sino que era un gen que había sido capturado accidentalmente por el virus en alguna infección anterior a otra célula. Se demostró que esta secuencia **src**, se encuentra no sólo en el pollo, el huésped natural del *RSV* sino también en todos los vertebrados, incluyendo los seres humanos.

A este gen localizado en el virus que provocaba la transformación maligna se llamó **ONCOGEN**, y al gen celular normal que al ser capturado por el virus dio origen al oncogén se le denominó **PROTOONCOGEN**. Desde entonces se han aislado más de 25 oncogenes empleados por retrovirus que infectan pájaros, roedores, gatos y monos. Van a ser nombrados con un código de tres letras: fos, ras, jun, etcétera.

En otra línea de investigación se buscaron los oncogenes directamente en el ADN humano estudiando el ADN de las células cancerosas. Se encontró que la mayoría de los oncogenes humanos procedían de los mismos encontrados en los retrovirus.

Convencionalmente se decidió que la forma viral de tales oncogenes se identificaría con el prefijo “v” (v-rsc) mientras el gen celular se señalaría como “c” (c-src). Curiosamente el gen **src** aislado a raíz de los estudios de Rous no se halla implicado en la génesis del cáncer humano.

Funcionalmente, los oncogenes son formas alteradas de genes normales, los protooncogenes. El siguiente tema a dilucidar será discernir ¿para qué sirven esos protooncogenes en la célula normal?.

El hecho de que se encuentren en especies muy distintas entre sí, como el hombre y la mosca de la fruta, o que se conserven en el curso de la evolución sin apenas sufrir cambios (en más de 600 millones de años), subrayan la importancia biológica de dichos genes. Los protooncogenes son necesarios para el desarrollo y crecimiento normal, expresándose durante la embriogénesis y fases concretas del desarrollo postnatal. El protooncogén del c-fos se encuentra activado durante el desarrollo embrionario del ratón, inactivándose posteriormente. Si durante la vida del animal adulto es activado accidentalmente de nuevo, este gen induciría la formación de un osteosarcoma.<sup>31</sup>

### **III. ONCOGENES Y PROTOONCOGENES.**

Según la función de las proteínas que codifican, los oncogenes se clasifican en cuatro grupos:<sup>93</sup>

**GRUPO 1: RECEPTORES.** Son protooncogenes que codifican receptores de factores de crecimiento y se localizan en la membrana citoplasmática. La célula detecta si los receptores de los factores de crecimiento están activados y responde finalizando G1 y entrando posteriormente en mitosis. Incluyen los genes *fms*, *erbB* y *abl*.

**GRUPO 2: TRANSDUCTORES INTRACELULARES.** Actúan como segundos mensajeros, alterando la transcripción, permitiendo que se expresen nuevos genes o modificando el nivel de expresión de los ya activos. Pertenecen a este grupo los genes miembros de la familia *ras*, *yes*, *src*, *erbA* y *mos*.

**GRUPO 3: FACTORES DE CRECIMIENTO.** En este grupo se encuadran aquellos protooncogenes capaces de producir proteínas que serán segregadas al medio extracelular y que se unirán a receptores específicos de

membrana (secreción autocrina), induciendo en la célula diana distintos tipos de respuesta: entrada en el ciclo de crecimiento, diferenciación, etcétera.

**Tabla 4.-Selección de oncogenes y sus funciones.**

<b>ONCOGÉN CLASE</b>	<b>PROTEÍNA LOCALIZACIÓN</b>	<b>PROTEÍNA FUNCIÓN</b>
<b>Clase I:</b> Factores de crecimiento  <i>Sis</i>	Secretada	PDGF
<b>Clase II:</b> Receptores de los factores de crecimiento  <i>ErbB</i>  <i>Fms</i>  <i>Trk</i>	Membrana  Membrana  Membrana	Receptor del EGF  Receptor del CSF-1  Receptor del NGF
<b>Clase III:</b> Transductores intracelulares.  <i>Src</i>  <i>Abl</i>  <i>Ras</i>  <i>Mos</i>	Citoplasma  Citoplasma  Citoplasma  Citoplasma	Tirosina quinasa  Tirosina quinasa  Proteína unida a GRP/GDP  Promotor de maduración
<b>Clase IV:</b> Factores de transcripción nuclear.  <i>Jum</i>  <i>Fos</i>  <i>Myc</i>  <i>ErbA</i>	Núcleo  Núcleo  Núcleo  Núcleo	Factor de transcripción AP-1  Factor de transcripción AP-1  Posible factor de transcripción Receptor esteroideo

En este grupo están integrados los oncogenes: *sis* y *k-FGF*.

## **GRUPO 4 FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

**NUCLEAR:** Codifican proteínas nucleares que actuarán en el propio ADN, van a unirse a determinadas secuencias del ADN celular (los promotores y enhancers) acelerando o retrasando la transcripción.

Corresponden a este cuarto grupo: *myc, fos, myb, jun* y *ski*.

Muchos de los productos de estos genes interaccionan unos con otros formando una compleja red de control.

Otra cuestión a dilucidar es, ¿cómo se activan estos protooncogenes?

Existen ciertos mecanismos que conducen a que ese gen normal (protooncogén) activo normalmente sólo durante el desarrollo embrionario se convierta en un oncogén.<sup>91</sup>

**A-. ACTIVACIÓN POR VIRUS:** Se inserta el virus en el ADN y provoca la mutación de los genes próximos, transformándolos en oncogenes. P. ej: El virus de Epstein-Barr en el linfoma de Burkitt.<sup>92</sup>

**B-. REORGANIZACIÓN CROMOSÓMICA:** Mediante la translocación o recombinación de material genético. P. ej: La translocación 8;14 en el Linfoma de Burkitt (en la cual el protooncogén *myc*, situado en el extremo del brazo largo del cromosoma 8 es translocado al cromosoma 14, colocándose cerca de los genes que codifican las inmunoglobulinas, que al tener una gran actividad de transcripción provoca su activación), y la translocación 9;22 en la Leucemia Mieloide Crónica, en la que está implicado el protooncogén *c-abl*.

**C.- MUTACIONES GÉNICAS PUNTIFORMES:** Se sustituye un sólo par de bases, lo que provoca el cambio en un aminoácido. P. ej: El oncogén *K-ras* en el cáncer de páncreas, colon y pulmón.

**D.- AMPLIACIÓN GÉNICA:** Por un mecanismo de multiplicación génica, se obtienen numerosas copias de un mismo protooncogén. Comienza con la duplicación, por un mecanismo desconocido, de un gen, después intercambios desiguales entre cromátides hermanas pueden amplificarlo hasta que el cromosoma contiene decenas o cientos de copias. Es muy frecuente en células tumorales humanas, por ejemplo el *N-myc* en el neuroblastoma.

#### **IV. GENES SUPRESORES O ANTIONCOGENES:**

Los *genes supresores o antioncogenes* son genes que inhiben la proliferación celular, suprimiendo en condiciones normales el crecimiento tumoral, por lo que su ausencia o mutación resultan decisivas para el desarrollo de cáncer.<sup>94</sup>

En 1971 *Knudson* descubrió el primer antioncogén, el *gen Rb*, aislado en el cromosoma 13; su ausencia provoca la aparición del retinoblastoma (cáncer de la infancia en la que el tumor se desarrolla sobre la retina inmadura).

En la actualidad, se han aislado muchos otros antioncogenes: el *p53* (el más conocido y prevalente dentro de las neoplasias humanas: mama, pulmón, colon, etc. ), *APC* (en la poliposis adenomatosa de colon), *DCC* y *MCC* (en el carcinoma de colon), *NFI* (en la neurofibromatosis tipo 1), y *WT1* (en el tumor de Wilms).<sup>95</sup>

Los antioncogenes se pueden suprimir o mutar en la línea de células germinales y por tanto ser heredables, lo que los diferencia de los oncogenes. Es necesario que el antioncogen pierda las dos copias del gen (paterna y materna) para que el tumor se manifieste.

Los genes supresores, son recesivos por naturaleza, no participan en el mantenimiento de la supervivencia celular, pero sí tienen un papel central en la regulación del crecimiento celular y diferenciación.<sup>93</sup>

El **cáncer**, es el resultado de la aberración en la proliferación y diferenciación celular debido a la acumulación de alteraciones genéticas en la célula y que estos eventos radicarían fundamentalmente en dos categorías: activación de protooncogenes e inactivación de genes supresores.<sup>96</sup>

## V. PROTOONCOGENES EN EL ESTUDIO DE LOS FEOCROMOCITOMAS.

Estudiaremos los diferentes protooncogenes que utilizaremos en nuestro trabajo, para poder comprender su activación, expresión, e implicación en la génesis del feocromocitoma.

### 1.- c-erbB-2e.

Pertenece al grupo de oncogenes que codifican receptores de membrana de factores de crecimiento u hormonas, como son entre otros el *fms* y el *trk*, que se incluyen en la familia de los receptores de las *herregulinas* (*c-erbB-2*, *erbB3*, *erbB4*).<sup>97</sup>

En 1984 Waterfield, buscando secuencias homólogas a la del receptor *EGF* (Epidermal Growing Factor), identificó el primer oncogén, el **v-erbB**, éste presentaba actividad tirosín-quinasa de un factor de crecimiento. La secuencia fue casi idéntica a la del oncogén *v-erbB* del virus de la eritroblastosis aviar, a partir de entonces se denominó protooncogén **c-erbB**.

El oncogén *c-erbB* codifica el receptor para el factor de crecimiento epidérmico, EGF,<sup>98</sup> y el factor de crecimiento transformado alfa, TGF- $\alpha$ ..<sup>99</sup> Pero sería una forma truncada del protooncogén *c-erbB*, a la que le falta el dominio extracelular y el extremo carboxiterminal del dominio citoplásmico, esto produce una activación permanente de la proteína que es capaz de fosforilar residuos de tirosina sin necesidad de unirse a moléculas de EGF, su ligando fisiológico, provocando en consecuencia un crecimiento celular descontrolado.

Se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, en los segmentos 21-22 (17q21-22).<sup>100</sup> Codifica una glicoproteína de 185 kiloDaltons, **p185**, localizada en la superficie celular y formada por tres porciones: extracelular, transmembrana, e intracelular. Ésta última con actividad tirosina quinasa. Mediante estudios inmunohistoquímicos, se ha demostrado la existencia de otra proteína relacionada de 155 KD pero de localización citoplásmica, que podría ser un producto de degradación o incluso un precursor del receptor de membrana.

El protooncogén *c-erbB2* es el receptor de la *herregulina NDF* y de una familia de receptores de factores de crecimiento de células gliales llamados **GGF** (Glial cell Growth Factors). Se le llama también *c-erbB-2/neu* por ser el equivalente humano del oncogén *neu* de los roedores.<sup>100</sup>

La activación del receptor de membrana con actividad tirosina-quinasa inicia una cascada de acontecimientos que culminan con fenómenos de expresión génica a nivel nuclear, que provoca el crecimiento o transformación celular. Aunque aún desconocemos el mecanismo íntimo por el que se produce el proceso.

Sí se sabe, que el factor de crecimiento que estimula al receptor *c-erbB-2*, la *herregulina* ó NDF (factor de diferenciación de *neu*), actuaría por un mecanismo de dimerización activando al receptor.

Existiría un proceso de regulación negativa de la actividad del receptor mediante un sistema de proteínas quinasas (entre las que se encontrarían la *Proteína quinasa calmodulín-dependiente tipo II* y la *Proteína quinasa C*), las cuales inactivarían al receptor al fosforilar una parte del dominio citoplásmico de dicho receptor (la treonina 1172 en el caso de la *Cam quinasa II*).<sup>101</sup>

Existen al menos tres proteínas que actúan como factores de transcripción, y que van a regular la expresión del oncogén *c-erbB-2*, que son los factores *AP-2α* (antes llamado *0B2*), *AP-2β*, *AP-2γ*, cuya sobreexpresión podría ser oncogénica a su vez.

En el desarrollo fetal, se expresa el oncogén *c-erbB-2* en diversos órganos como riñón, intestinos y mama, entre otros. Siendo esencial para el desarrollo neural y cardíaco.<sup>102</sup>

Este oncogén, ha sido implicado en la génesis de múltiples neoplasias humanas, como son mama, estómago, ovario y vesícula.<sup>103</sup> La importancia de *c-erbB-2* en la transformación maligna celular está bien establecida, ya sea a nivel experimental en líneas celulares, como ejemplo la *NIH3T3*,<sup>104</sup> o en animales, con el desarrollo de diversos tipos de tumores en ratones transgénicos con la incorporación del oncogén *c-erbB2/neu*,<sup>105</sup> como en humanos, correlacionándose clínica e histopatológicamente con un peor pronóstico en determinados tumores.

La sobreexpresión del oncogén *cerbB-2* en el cáncer de mama ha demostrado ser el factor pronóstico más importante tras la existencia de afectación ganglionar, usándose actualmente en los estudios citopatológicos rutinarios de las biopsias de mama.<sup>106</sup>

## 2.- c-Myc.

Este protooncogén, forma parte de una familia de genes compuesta por el protooncogén *c-myc*, homólogo del oncogén retroviral *v-myc*, y los genes relacionados *N-myc* y *L-myc*, existen otros dos genes similares *S-myc* y *L-myc*, que por el contrario parecen inhibir la transformación maligna.<sup>97</sup>

Estudiando la secuencia oncogénica en determinados retrovirus de pollo se descubrió el protooncogén *v-myc*. La activación del protooncogén de pollo *c-myc*, mediante la integración cromosómica del retrovirus aviar, fue el primer ejemplo de activación de un protooncogén celular.

Analizando el DNA y RNA del *virus de leucosis aviar (ALV)*, se observó que éste contenía un gen oncogénico el *MC29* y que se correspondía con una secuencia homóloga en el DNA de las células de pollo, el gen *c-myc*, y que en ocasiones el provirus *ALV* se integraba adyacente al gen *c-myc* provocando al replicarse el virus su sobreexpresión y consecuentemente la transformación maligna celular.

El gen *c-myc* se localiza en el brazo corto del cromosoma 8, en concreto en la región *q24* de dicho cromosoma, y se encuentra organizado en tres exones, el primero de los cuales actuaría como punto de unión de una proteína reguladora.

Se expresan, en el núcleo de las células en proliferación; así, por ejemplo, se encontraría a nivel de la mucosa colónica a nivel de las zonas base y de maduración de las criptas.<sup>107</sup> Durante la embriogénesis, el protooncogén *c-myc* actúa en las primeras fases de la gestación, presentándose en los derivados endodérmicos (intestino, hígado y páncreas) y mesodérmicos (riñón).<sup>93</sup>

Estos genes van a ser sobreexpresados en multitud de tumores humanos por dos tipos de mecanismos.<sup>108</sup>

a) Mecanismo de sobreexpresión:

- *N-myc*: neuroblastomas y carcinoma microcítico de pulmón

- *L-myc*: carcinoma microcítico de pulmón

- *c-myc*: carcinomas de mama, estómago, pulmón y colon, neuroblastomas y glioblastomas.

b) Mecanismo de translocación:

- *c-myc*: Linfomas de Burkitt (en el 100% de los casos, mediante un intercambio genético entre la región del oncogén *c-myc* y los genes de las inmunoglobulinas). Se han descrito tres traslocaciones específicas en el linfoma de Burkitt: t (8; 14), t (8; 22), t (2; 8).<sup>109</sup>

El gen *c-myc*, codifica una proteína nuclear de 62.000 Daltons de peso molecular, la **p62**, la cual está formada por diversos dominios: de activación transcripcional, básico y hélice-bucle-hélice de unión al DNA, y de cremallera de leucinas por el que se une a otras proteínas.

Se han descrito dos productos a partir de del gen *c-myc*: *c-Myc1* y *c-Myc2*, debido a la presencia de dos codones de iniciación, que además tendrían acciones contrapuestas.<sup>108</sup>

El oncogén *c-myc* sería, por tanto, un factor de transcripción del tipo **BHLHZ** (basic-helix-loop-helix-leucine-zipper).<sup>110</sup>

Eisenman ha demostrado que la proteína *c-Myc* se une a una secuencia **CACGTG** (caja E) o secuencias similares, formando heterodímeros con otra proteína denominada *Max*, capaces de activar la transformación génica. Max puede también formar homodímeros (Max-Max) con acción represora transcripcional. La familia de proteínas llamadas *Mad* (*Mad1*, *Mad2*, *Mad3* y *Mxi1*), pueden formar heterodímeros con Max, inhibiendo a su vez la transcripción, por lo que tendrían una acción inhibidora sobre Myc mediante competición por la unión a la proteína Max.<sup>111</sup>

Se conocen muy pocos genes regulados por *c-myc*. Se ha descrito la regulación por *c-myc* de la *ornitina descarboxilasa* (ODC) y la *protinosina-a*, y la represión de algunos otros.<sup>97</sup>

El protooncogén *c-myc* tendría un papel central en el crecimiento celular y diferenciación, y que estaría frecuentemente activado en el cáncer humano.<sup>112</sup> Actuaría a nivel de la transición de la fase *G1*/*S* a la fase S (fase de síntesis de DNA). Sin embargo, se ha demostrado que la activación de *c-myc* tendría un doble efecto: por un lado actuaría induciendo la progresión en el ciclo celular, y, en el caso de ausencia de factores de crecimiento en el momento de la inducción o si existe la actuación de citostáticos, induciría la *apoptosis* (también llamado "suicidio celular", que consiste en un mecanismo endógeno de muerte celular programado), es el llamado *modelo de múltiples efectores*.<sup>113</sup>

La sobreexpresión de este oncogén se ha asociado a un peor pronóstico en algunos tumores,<sup>107</sup> e incluso a la resistencia al tratamiento quimioterápico.<sup>114</sup>

### **3.- p53.**

La alteración del gen *p53*, es la anomalía genética más frecuente en el cáncer humano.

Es una molécula clave en el estudio de la oncogénesis, sobre la cual ya se han publicado más de 6.000 trabajos de investigación. En 52 tipos de cánceres humanos, aproximadamente el 50% de todos los tumores, encontramos mutación del gen *p53*.<sup>97</sup>

Se descubrió en 1979 por dos investigadores, David Lane, de la Universidad de Dundee, Escocia, y Arnold Levine, de la Universidad de Princeton, EEUU, como una proteína fosforilada que se unía al producto del oncogén T grande del virus SV40.

Al principio, se consideró como una proteína oncogénica, al encontrarse en mayores niveles en células cancerosas que normales. Sin embargo, en 1989, J. Levine comprobó que era capaz de suprimir el fenotipo tumorigénico, y que, por tanto, *p53* era un gen supresor de tumores.<sup>115</sup>

El antioncogén *p53*, se haya implicado en más de la mitad de los cánceres humanos, entre los que destacan: pulmón, mama, colon, hígado, ovario, vejiga, cerebro, estómago, esófago, sarcomas, linfomas, y leucemias.<sup>97</sup> También se ha descrito la transmisión de la mutación del *p53*, en individuos con la *enfermedad de Li-Fraumeni*, que heredan un alelo mutado, y tienen un 50% de posibilidades de desarrollar cáncer antes de los 30 años.<sup>116</sup>

El gen *p53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), tiene 20 kb y presenta 11 exones. Codifica una fosfoproteína nuclear de 53 KD, la *proteína p53*, presenta una estructura tetramérica formada por cuatro subunidades, cada una de ellas de 393 aminoácidos formadas a su vez por diferentes dominios: uno de activación transcripcional (aminoácidos 1-43), otro de unión a secuencias específicas de DNA, que hacen de la proteína un factor de transcripción (aminoácidos 100-300), un dominio de oligomerización, responsable de la formación de tetrámeros (aminoácidos 320-360), y un extremo carboxi-terminal (aminoácidos

330-390) de modulación de la actividad transcripcional y de unión inespecífica a DNA y RNA.<sup>95</sup>

La proteína p53 se expresa en pequeñas cantidades en todas las células del organismo sano, aunque, debido a su vida media tan corta, 6 a 30 minutos, no se acumula a niveles suficientes para ser evidenciada por medios inmunohistoquímicos convencionales. Por el contrario, la forma mutada de la proteína p53, producida en las células malignas, tiene una vida media más prolongada y se va a acumular en el interior de la célula; debido a la formación de complejos post-transcripcionales con otras proteínas como son el antígeno T del SV 40 ó la proteína del choque de calor (hsp70), siendo por ello fácilmente detectable.<sup>117</sup>

Las alteraciones que se producen en el antioncogén p53 aparecen en fases relativamente tardías del desarrollo tumoral, y, a diferencia de otros genes supresores, se deben a mutaciones puntuales debidas a la sustitución de un aminoácido por otro. Estas mutaciones causan una alteración en la molécula que provoca un cambio drástico en su función, pasando de suprimir a promover la aparición de tumores.

La mayoría de las mutaciones que se encuentran en las células tumorales se localizan en el dominio central de unión al DNA, y dentro de éste, en ciertas posiciones muy concretas o *hot spots*: los residuos 175, 248, 249, 273 y 282. Además, de por mutación, la función de la p53 puede ser inactivada por interacción con el producto del oncogén celular mdm-2 y de los oncogenes virales E6 de papilomavirus, T grande del SV 40 y E1B de adenovirus.<sup>118</sup>

La proteína p53, actúa como un factor de transcripción capaz de activar y reprimir genes específicos, entre los que destacan:

- 1.- El gen p21, que participa en la inhibición del ciclo celular cuando se produce daño en el DNA.

2.- El gen de la **ciclina G**, media el bloqueo del ciclo en G1.

3.- El gen ***gadd45*** (**growth arrest and DNA damage-45**), que contribuye al bloqueo de la fase G1 y en la reparación del DNA.

4.- El gen ***mdm-2***, que inactiva a la propia proteína ***p53***, participando en el ciclo celular.

5.- El gen ***hic-1*** (**hypermethylated in cancer-1**), un factor de transcripción que parece actuar como gen supresor tumoral.

6.- El gen de la ***trombospondina-1*** (TSP-1), un componente de la matriz extracelular que modula la aparición de metástasis.

7.- Los genes ***bax*** y ***fas***, que favorecen la apoptosis.

8.- El gen ***IGF-BP3*** (**Insulin-like Growth factor-Binding Protein-3**), una proteína que inhibe la unión del factor de crecimiento celular IGF-I a sus receptores celulares, inhibiendo la proliferación celular.

La función de la proteína ***p53*** depende de la especie y tejido de la célula en estudio.<sup>95</sup> Interviene en el control del ciclo celular, y en la replicación y reparación del DNA, manteniendo la estabilidad del genoma. Así la proteína ***p53***, actúa como controlador del genoma, sería una proteína producto de la evolución de las especies, hecho que lo sugiere su distribución filogenética, restringida sólo a vertebrados, y su aparente falta de función durante el desarrollo embriológico normal.

Por otro lado, la proteína ***p53*** activa la apoptosis celular, mediante la inducción de los genes ***bax*** y la represión paralela del oncogén ***bcl-2***, y participa en la respuesta celular a agentes externos nocivos.<sup>119</sup>

Al inducir la forma no mutada (ó *wild lype*) de la proteína *p53*, la *apoptosis*, muerte celular programada, en aquellas células con alteración génica, podemos pensar que la pérdida de su función daría lugar a la supervivencia de esas células y a la acumulación de alteraciones génicas. La existencia de una proteína *p53* funcionando es necesario para una respuesta eficiente de los agentes quimioterápicos.

Éstos dos hechos, justificarían el pensar que la existencia de mutaciones en la proteínas *p53* en cualquier proceso canceroso sería, un factor pronóstico importante a considerar.<sup>120</sup>

A pesar de la cantidad de trabajos existentes, correlacionando las mutaciones del gen *p53* y la evolución clínica de los tumores, los resultados son en ocasiones contradictorios. Allred y cols; obtienen, sobre una muestra de 700 casos de tumores de mama, que la presencia de *p53* mutado es el factor pronóstico independiente más importante de recurrencia precoz.<sup>121</sup> Por otro lado, el grupo de Callefi y cols., estudiando 196 cánceres de mama, no encontraron un valor pronóstico a la mutación de *p53*.<sup>122</sup> Por tanto, aunque a la vista de la gran mayoría de trabajos la mutación del antioncogén *p53* tendría un valor pronóstico, no todos los estudios lo corroboran, siendo la cuestión a dilucidar cuál es la *significación clínica* de dicho valor pronóstico.

#### **4.- Ras.**

Es un protooncogén que codifica proteínas citoplasmáticas que transducen la señal mitogénica dentro de la superfamilia de proteínas G.

Se describieron a partir de retrovirus causantes de sarcomas en ratas: el *H-ras* (sarcoma de Harvey) y el *K-ras* (sarcoma de Kirstein), y su función descubierta a finales de la década de los setenta por Edwar Scolnick.

Se los identificó estudiando la habilidad de estos genes para transformar la línea celular de ratón NIH/3T3 mediante experimentos de transfección génica.<sup>123</sup>

La superfamilia ras esta formada por tres protooncogenes ras: **H-ras**, **K-ras** y **N-ras**, un gen muy similar denominado **TC2I** y otros 50 genes relacionados que codifican proteínas análogas con actividad que regulan diversos procesos generales.<sup>124</sup>

A nivel cromosómico la localización de los genes ras va a variar según sea el oncogén: *H-ras* se localiza en el segmento 15 del brazo corto del cromosoma 11, *k-ras* en el segmento 12 del brazo corto del cromosoma 12, y finalmente *N-ras* en el segmento 22 del brazo corto del cromosoma 1.<sup>109</sup>

Codifican una proteína de 21.000 Daltons, *p21*, que es una *proteína G* de tipo monomérico y de pequeño tamaño localizada en la cara interna de la membrana citoplásmica. Está formada por 188 aminoácidos, constituidos en 4 exones, y está unido a la membrana por su extremo carboxiterminal a través de un radical *farnesilo* que es un elemento esencial para el anclaje a la membrana y su actividad, de ahí que las investigaciones para el diseño de estrategias anticancerosas intenten inhibir la enzima que cataliza esa unión, la *farnesil-transferasa* (FT).<sup>97</sup>

Interviene en la transducción de la señal proliferativa inducida por los factores de crecimiento cuando se unen a sus receptores tirosín-quinasa localizados en la membrana celular. También interviene en la señal generada por receptores de factores y hormonas asociadas a proteínas G heterodímeras, así como tirosín-quinasa no receptoras.

En ausencia de estimulación, la proteína ras se encuentra inactiva en el citoplasma y unida al nucleótido difosfato de guanina (GDP). La activación se produce cuando intercambia el GDP por el nucleótido trifosfato (GTP), uniéndose a la cara interna de la membrana citoplásmica a través de su terminal lipídico

isoprenoide *farnesilo*, transmitiendo entonces la señal a otras moléculas (*efectores*). Tras ello el GTP unido a Ras es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de Ras, que vuelve así a su estado inactivo. Esta reacción de intercambio es catalizada por los llamados factores intercambiadores de nucleótidos o GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors), que en el caso del Ras reciben el nombre de Ras-GEF, y potenciada por otros factores que se denominan GAP, proteínas activadoras de la capacidad GTPasa (GTPase Activating Proteins), en este caso Ras-Gap.<sup>125</sup>

Existen múltiples moléculas posibles efectoras de la activación de la proteína Ras: la proteína *Raf* una serín/treonín-quinasa implicada en la transmisión de la señal mitogénica, la PI3K implicado en el control de la morfología celular mediante su actuación en el citoesqueleto, la MEKK-1 proteína quinasa activadora de la cascada que conduce a la fosforilación de la proteína *Jun*, entre otras. Sin embargo, aunque la oncogenicidad de Ras implica la acción de múltiples efectores, desconocemos aún si la proteína Ras tiene efectores diferentes en los distintos tipos de células, ni cómo afectan las distintas mutaciones a su interacción con cada uno de ellos.<sup>126</sup>

La activación de los genes *ras* puede ocurrir mediante una mutación puntual, la forma más frecuente, o mediante sobreexpresión. Se piensa que las mutaciones ocurren muy posiblemente en la fase S (de síntesis del DNA) del ciclo celular, que es cuando las células son más vulnerables a la acción de agentes mutágenos, y afecta predominantemente a los codones 12, 13, y 61 del oncogén *ras*.

Ello provoca la sustitución de un aminoácido, normalmente de los implicados en la unión a los grupos fosfatos del *GDP/GTP*, disminuyendo su afinidad por GDP/GTP y su actividad GTPasa, provocando una activación permanente y, por tanto, un estímulo continuo intracelular.<sup>127</sup>

Los oncogenes *ras* se van a expresar, aunque débilmente, en las células adultas, de determinados tejidos, como por ejemplo el tiroides, sin embargo es durante las primeras fases del desarrollo embrionario cuando mayor es su expresión, tanto en tejidos embrionarios como membranas extraembrionarias y placenta.<sup>93</sup> Se ha descrito su participación en un 30% de los tumores humanos, aunque el porcentaje varía según el tipo de tumor: 50-90% de los cánceres de páncreas, 50% de los de colon, 30% adenocarcinomas de pulmón y síndrome mielodisplásicos, 25% carcinoma de tiroides y el 20% de los melanomas.<sup>128</sup>

El papel de la familia de oncogenes *ras* en los distintos tumores humanos aún no está aclarado, aunque se ha demostrado que induce la transformación maligna y aparición de metástasis en líneas celulares experimentales;<sup>129</sup> parece que en los cánceres humanos constituirían un acontecimiento precoz en la tumorigénesis, existiendo ya en las lesiones precancerosas, y sin tener un valor pronóstico ponderable.

Sin embargo, si parece ser útil en el diagnóstico precoz de procesos neoplásicos,<sup>109</sup> como demuestran, por ejemplo, los estudios para el diagnóstico de cáncer de páncreas mediante el análisis de los jugos pancreáticos.<sup>130</sup>

## **5.- c-fos.**

El protooncogén *c-fos* es el homólogo al oncogén *v-fos* que está presente en dos virus: el FBJ (*Finkel-Bisliis-Jinkjns*) y el FBR (*Finkel-Biskis-Reilly*), que producen osteosarcomas en ratones. Forma parte de una familia de genes formada a su vez por: *cfos*, *fosB*, *fra-1* y *fra-2*.<sup>97</sup>

La expresión del protooncogén *c-fos* se produce en pequeñas cantidades en la mayoría de los tejidos adultos, aunque se han descrito niveles altos de expresión en la piel de adultos sanos.

En estudios experimentales en ratas se demuestra que este gen es activo en los días 7.5 al 9.5 en las células que formarán la placenta y en las membranas extraembrionarias en el día 11.5, en embriones de 18 días de gestación se detecta el mRNA en el hígado fetal y después del nacimiento la expresión de *c-fos* está presente en la médula ósea fundamentalmente.<sup>131</sup>

Además, la expresión del oncogén *c-fos* se ha asociado a múltiples neoplasias humanas: Osteosarcomas (en el 60% de los casos), carcinomas de mama, colon y tumores cutáneos, entre otros.<sup>97,114</sup>

El gen *c-fos*, codifica una proteína nuclear de 55-65 kDa, la cual se une a otra proteína nuclear, la *p39*, que ha sido identificada como la proteína producto del oncogén *c-jun*, formando un complejo proteico denominado AP-1 (Activating Protein- 1), que actúa como factor de transcripción.

El factor AP-1 está compuesto por homodímeros formados por dos moléculas de la familia *Jun* o heterodímeros entre una proteína de la familia *Fos* y otra de *Jun*. Ambas proteínas *Fos* y *Jun* muestran homologías estructurales, teniendo ambas un dominio responsable de activar la transcripción y otro de la unión al DNA.

Éste último contiene dos subregiones: una rica en aminoácidos básicos, que interacciona con el DNA, y otra cremallera de leucinas necesaria para la dimerización, requisito imprescindible para unirse al DNA.<sup>132</sup>

La actividad biológica de este complejo está regulado por la fosforilación de aminoácidos *serina* y *treonina* llevada a cabo por distintas quinasas, sin embargo la forma oncogénica de dicho complejo está siempre activa transcripcionalmente, sin ser regulada por la fosforilación.

En condiciones normales el *c-fos* actuaría como factor de transcripción inducible como respuesta a la acción de las hormonas esteroideas (como sería la respuesta a los estrógenos) y factores de crecimiento (como por ejemplo el EGF o *factor de crecimiento epidérmico*).

Se conocen múltiples genes regulados por *AP-1*. Entre ellos, los de proteínas fundamentales para el crecimiento celular (como oncogenes, antioncogenes), genes proteasas implicados en la invasividad y en la respuesta inflamatoria (colagenasa 1, estromelisinas), y genes de factores angiogénicos (VEGF), citoquinas y otros factores reguladores del sistema inmune, lo que hace de *AP-1* (y por tanto de *c-fos*) un factor clave e la aparición y/o progresión del cáncer.

Experimentalmente se ha demostrado que la transfección de *v-fos* oncogén a líneas celulares de fibroblastos de rata aumenta la invasividad tisular y origina la aparición de metástasis.<sup>133</sup> Por tanto, al igual que a otros oncogenes, la sobreexpresión del *cfos* se ha correlacionado con un peor pronóstico<sup>114</sup> y se considera como factor de resistencia a la terapéutica oncológica.

## 6.- Bcl-2.

En 1984, Tsujimoto descubrió el protooncogén *bcl-2*, de **B-Cell Leukemia-2**, al estudiar los cambios cromosómicos producidos en los linfomas foliculares. Encontró que el gen *bcl-2* resultaba sobreexpresado como resultado de una translocación entre los cromosomas 14 y 18 (t (14; 18)), al situarse yuxtapuesto al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, causando un aumento de la supervivencia de los linfocitos B, y que esta acción era oncogénica porque aumentaba la posibilidad de acumulación de mutaciones en estas células, que normalmente tienen una vida media muy corta.<sup>134</sup>

Se expresa ampliamente durante el desarrollo fetal, mientras que en el adulto está confinado a células de supervivencia prolongada, como son las stem cells medulares, los linfocitos B quiescentes, y las neuronas. A su vez, el oncogén *bcl-2*, también se va a expresar en múltiples tumores: Linfomas de células B, enfermedad de Hodking, carcinoma de mama, carcinoma folicular de tiroides, carcinoma de pulmón, hepatocarcinoma, carcinoma colorrectal, y neuroblastoma.<sup>97</sup>

El gen *bcl-2* codifica dos proteínas similares, *bcl-2* y *bcl-2B*, que sólo difieren en la región carboxiterminal. La proteína *BCL-2* es una proteína de 25kDa, que contiene un extremo hidrófobo COOH- terminal que le permite su inserción postranscripcional en las membranas intracelulares y su orientación hacia el citosol.

Diversos estudios sobre localización subcelular del *bcl-2* han demostrado su localización en la membrana nuclear, parte del retículo endoplásmico, la membrana mitocondrial externa, y en menor cantidad en la membrana citoplasmática.<sup>135</sup>

Se han propuesto distintos mecanismos de acción, como la regulación del flujo de calcio a través de las organelas intracelulares o actuando sobre el transporte a través de la membrana nuclear; la propuesta más aceptada sería actuando sobre el mecanismo oxidativo celular como agente antioxidante.

No obstante aún no se conoce bien la actividad bioquímica de la proteína *BCL-2*. Lo que sí se sabe, es que ejerce su función formando heterodímeros con la proteína de un gen parecido llamado *bax*, el cual codifica una proteína de 21 kDa con un 21% de homología a la proteína *BCL-2*. Sin embargo, los homodímeros *bax-bax* tendrían una acción contraria.<sup>136</sup>

Su acción carcinogénica se realizaría mediante la inhibición de la muerte celular por apoptosis pero sin provocar proliferación celular, así por ejemplo se ha demostrado mediante experimentos de transferencia génica que la sobreexpresión

del oncogén *bcl-2* previene de la apoptosis a células hematopoyéticas privadas de factores de crecimiento, o incluso que su transferencia a células tratadas con quimioterápicos o sometidas a dosis de radiación que provocan daño en el DNA, evita la muerte celular.<sup>97</sup>

Es evidente, por tanto, que la expresión del oncogén *bcl-2* se asocia a un peor pronóstico en la supervivencia del paciente y una peor respuesta a la terapia antitumoral.<sup>137</sup>

## **VI. APLICACIÓN DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA EN EL ESTUDIO DE LOS ONCOGENES.**

La aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas (*IHQ*), utilizando el principio de anticuerpos policlonales y más tarde monoclonales, al estudio de las células y tejidos ha supuesto el avance más importante en el campo de la medicina de laboratorio de la últimas décadas, comparable con lo ocurrido con la RMN en Radiología o la endoscopia en Gastroenterología.<sup>138</sup>

El uso clínico de estas técnicas comenzó en 1941 cuando Coombs aplicó por primera vez el método de los anticuerpos fluorescentes a los tejidos, permitiendo la localización mediante fluorescencia de antígenos tisulares “in situ”. Posteriormente, a finales de los sesenta, Sternberger desarrolló la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP), que mediante la utilización de enzimas para el marcaje de los anticuerpos aumentó la sensibilidad de los ensayos y permitió el estudio retrospectivo en material en parafina.

Con la aplicación por Kohier y Milstein en 1975 de la técnica de los anticuerpos monoclonales, que sólo reconocen un antígeno concreto, el crecimiento en el uso de las técnicas de IHQ en el laboratorio ha sido exponencial.

Pronto se planteó este método para el estudio de la enfermedad neoplásica. El patólogo frecuentemente tenía que enfrentarse al dilema de si un tejido determinado, especialmente en biopsias con escaso material o de tejidos artefactados, era o no de origen tumoral, así por ejemplo en el examen de un infiltrado linfoplasmocitario la restricción de cadenas ligeras diferenciaba el origen neoplásico de éste frente al inflamatorio, o en el caso de una reacción pleomórfica del estroma tras radioterapia, separando el tejido conjuntivo de granulación marcado con anticuerpos anti-vimentina de las células carcinomatosas que expresan cytoqueratina.

No obstante, aunque la aplicación inicial de estas técnicas fue para la identificación y tipaje de la célula tumoral, con el estudio de los oncogenes y antioncogenes, formas alteradas de genes celulares implicados en el funcionamiento celular normal (crecimiento, división y diferenciación) que van a provocar la transformación maligna celular; el desarrollo de la IHQ se ha comprometido en la búsqueda de marcadores predictores pronósticos en estadios tempranos de crecimiento tumoral, proporcionando así unas bases para el manejo del paciente y selección de la terapéutica.<sup>139</sup>

Desde el descubrimiento de los oncogenes y antioncogenes las distintas formas de cánceres humanos se han ido progresivamente asociando a la excesiva expresión, mutación, o delección de estas secuencias génicas, siendo el objetivo de la gran mayoría de los estudios de la IRQ actual el de su identificación y caracterización.

Así, por ejemplo, sobre mutaciones en el antioncogén *p53* se han publicado más de 6.000 estudios en los últimos años, han sido demostradas en más de 30 tipos de neoplasias humanas, siendo su prevalencia incluso superior al 80% de los casos en las formas más malignas e indiferenciadas de tumores mamarios.<sup>140</sup>

Además, mediante el estudio de la correlación entre la expresión de estos genes y diferentes parámetros histopatológicos y clínicos (grado de diferenciación tumoral, índice de proliferación, invasión vascular, existencia de metástasis, y supervivencia, entre otros) se han obtenido marcadores celulares que ayudan a definir el potencial biológico del tumor ya en el mismo momento de su diagnóstico, condicionando por sí sólo las expectativas de supervivencia del enfermo y terapias a utilizar. De hecho la expresión del oncogén *c-erbB-2* en el cáncer de mama es el factor pronóstico más importante tras la existencia de afectación ganglionar,<sup>106</sup> o la asociación entre la expresión del oncogén *N-myc* en los tumores pulmonares microcíticos y la pobre respuesta a la quimioterapia, va a condicionar que el enfermo no se someta a un tratamiento citotóxico por otra parte inútil.<sup>107</sup>

Dado que la aplicación de la IHQ al estudio de los oncogenes y antioncogenes cumple las condiciones para ser usada como marcador pronóstico útil:

1.- Tiene un valor predictivo significativo e independiente, validado por estudios clínicos.

2.- Capaz de ser determinado por métodos sencillos, reproducibles, fácilmente accesibles con adecuado control de calidad.

3.- Rápidamente interpretables y con implicaciones clínicas y terapéuticas.

Se ha trasladado su uso de los laboratorios de investigación a la práctica diaria de los servicios de patología hospitalarios, usándose paneles de oncogenes y antioncogenes en el estudio rutinario de determinados cánceres.

Una de las implicaciones más recientes e importante de las aplicaciones de la IHQ al estudio de los oncogenes y antioncogenes, aunque aún en fase experimental, es su uso en la terapéutica antitumoral.<sup>97</sup>

- Se han utilizado anticuerpos marcados con sustancias citotóxicas que reaccionan con aquellas células que expresan un determinado oncogén, consiguiendo así mayor especificidad de acción y menor cantidad de efectos secundarios; por ejemplo se ha experimentado en animales con inmunoliposomas que contienen doxorubicina, un agente quimioterápico, frente a la proteína gp185 producto de la expresión del oncogén *c-erbB-2*.

- Ha sido la base para la aparición de la *terapéutica genética* que intenta actuar sobre esos genes celulares modificados, mediante el uso de distintas técnicas: virus manipulados genéticamente que portan formas funcionantes de esos genes, manipulación genética de linfocitos para que reaccionen frente anticuerpos frente a esos oncogenes, etcétera.

Por último la IHQ también se aplica en las formas familiares de cáncer para la evaluación del riesgo genético, fundamentalmente mediante técnicas de biología molecular: las técnicas del DNA recombinante (esto es, el marcaje de fragmentos de DNA "complementario" que nos va a permitir desvelar la existencia de determinadas secuencias de DNA, por ejemplo las de un oncogén, en el cromosoma celular).

Así se demuestra alteraciones en el gen *p53*, localizado en la rama corta del cromosoma 17, en casi la mitad de las familias con el síndrome de *Li Fraumeni* (un raro síndrome en el que aparece cáncer de mama a una edad temprana, asociado a sarcomas, tumores suprarrenales, gliomas y cánceres infantiles), o la mutación del gen *APC* (adenomatous polyposis coli), antioncogén identificado en el cromosoma 5, cuya alteración predispone a la poliposis adenomatosa familiar (*FAP*), síndrome autosómico dominante que afecta a 1/10.000 personas en Estados Unidos y es responsable del 0,5% al 1% de los casos de cáncer colorrectal.

Dado que en un porcentaje nada despreciable (el 5% de los cánceres de mama y el 10% de los colorrectales, por ejemplo) de neoplasias existe una predisposición genética, se plantea el uso de técnicas de screening entre los familiares con predisposición para, en aquellos casos que se demostrara la existencia de dicha alteración, llevar a cabo medidas de seguimiento o terapéuticas mas adecuadas.

Sin embargo, esta última aplicación de la IHQ, que abre el camino para el desarrollo de una nueva medicina: la *Medicina Predictiva*, sigue siendo una herramienta experimental que, aún no habiendo comenzado su andadura, plantea cuestiones clínicas y éticas actuales de difícil solución.<sup>141</sup>

## **GENÉTICA TUMORAL DEL FEOCROMOCITOMA.**

Se realizó un análisis de la patogenia de los feocromocitomas en casos familiares, bilaterales o multicéntricos, que pertenecían a neoplasias endocrinas múltiples (MEN), tipo II A y II B. Se demostró una delección del brazo corto del **cromosoma 1** en una alta proporción de tumores procedentes de estos individuos, incluidos los feocromocitomas. Otras anomalías citogenéticas, entre ellas el **protooncogén RET**, fueron identificadas sobre el cromosoma 10, que está implicado en la herencia del síndrome MEN II A.<sup>142</sup>

En el feocromocitoma, el protooncogén RET, se sobreexpresa con menos proporción en los tumores esporádicos (15%) que en los casos asociados a síndrome MEN.<sup>143</sup>

El oncogén **N-myc** de los feocromocitomas muestra una disminución significativa de su expresión. La expresión del N-myc es muy baja en los feocromocitomas adrenales a diferencia del neuroblastoma.<sup>144</sup>

El oncogén **c-erbB-2** se detecta en el 20% de los feocromocitomas con un patrón heterogéneo de tinción. La glándula adrenal adyacente no neoplásica nunca es inmunoreactiva para el c-erbB-2.

El significado pronóstico desfavorable del c-erbB-2 en el carcinoma de mama y ovario, sugiere que la sobreexpresión del c-erbB-2 en los feocromocitomas puede tener un valor pronóstico predictivo, aunque esto último aún no está establecido.

Usando el porcentaje de células tumorales, el c-erbB-2 se obtiene una correlación entre el porcentaje de células que expresan el oncogén y la agresividad del tumor; considerando la existencia de metástasis a distancia o la asociación con otras neoplasias malignas.<sup>145</sup>

Se han encontrado niveles altos de c-erbB-2 sobreexpresado en el MEN en comparación con los casos esporádicos.

Estos datos prueban la implicación del oncogén c-erbB-2 en la patogenia de los feocromocitomas y el posible significado pronóstico desfavorable de su expresión.

Se ha descrito un alto grado de heterogeneidad para los productos **N-myc** en los feocromocitomas.<sup>68</sup> La detección del producto **L-myc** en estos tumores es importante ya que representa la primera evidencia inmunohistoquímica de la presencia de esta proteína en tumores humanos.<sup>68</sup>

Las oncoproteínas **c-myc** y **c-fos** se detectan rara vez en los feocromocitomas.<sup>68</sup>

## **CRITERIOS DE VALOR PRONÓSTICO EN EL FEOCROMOCITOMA.**

Excepto en los casos donde se demuestra **metástasis** a distancia, no hay criterios absolutos que nos permitan distinguir los feocromocitomas benignos de los malignos.

La invasión vascular focal y la capsular, son criterios insuficientes por sí mismos, para diagnosticar un feocromocitoma maligno.

Se han descrito factores que se encuentran a menudo en los tumores malignos, pudiendo tener un valor predictivo: Localización extra-adrenal, el mayor peso tumoral(383 gramos frente a 73 para los tumores benignos), la necrosis tumoral confluyente, la predominancia de varones, la presencia de invasión vascular y extensa invasión local.<sup>59</sup>

La citomorfometría, también se ha utilizado en el diagnóstico y pronóstico de feocromocitomas sin resultados definitivos.

## **PLANTEAMIENTO DEL TEMA**

El feocromocitoma, es una neoplasia en la que es difícil diferenciar aquellas que tienen un carácter benigno de las malignas, ya que no existen factores o criterios inequívocos de malignidad, salvo como es lógico la presencia de metástasis.

Tradicionalmente, al estudiar una pieza quirúrgica se está en condiciones de diferenciar una neoformación benigna de otra maligna. Sin embargo, los criterios normalmente aceptados, como el número de imágenes mitóticas, el polimorfismo nuclear y la hipercromasia; en el caso de los feocromocitomas son histológicamente idénticas las células que los componen.

No obstante, se han buscado criterios que pudieran indicar la malignidad de esta tumoración, señalándose así la localización extraadrenal, la existencia de necrosis tumoral, la nodularidad del tumor, la ausencia de glóbulos hialinos en el citoplasma de las células proliferantes, etc.

A pesar de todo aparte de la presencia de metástasis, no existe ningún dato que por medios convencionales histopatológicos asegure la malignidad o benignidad del feocromocitoma.

Es por ello, que nosotros nos planteamos hacer un estudio en el que incluyamos la demostración inmunohistoquímica de determinadas sustancias, que puedan ser producidas por el tumor, como puede ser el VIP, la ACTH, etc. ; y correlacionar éstas con los datos clínicos.

Por último, hemos creído conveniente, realizar el estudio de determinados protooncogenes y antioncogenes que parecen ser, se pueden correlacionar con el estado de diferenciación tumoral, la agresividad local, la aparición de metástasis e incluso con el pronóstico a largo plazo relativo al enfermo.

En resumen, en el presente estudio, lo que se intenta es agrupar las técnicas disponibles para poder establecer en primer término el diagnóstico de malignidad, y en segundo lugar, establecer la posible correlación entre los hallazgos encontrados y el pronóstico de la enfermedad.

Los objetivos marcados, por tanto, son los siguientes:

1.- Demostrar mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de cromogranina, sinaptofisina, somatostatina, HMB-45, Calcitonina, ACTH, VIP y enolasa neuronal específica; en todos los casos analizados.

2.- Establecer el patrón de distribución de diversos marcadores génicos.

3.- Intentar correlacionar estas dos técnicas con los aspectos morfológicos y clínicos en los feocromocitomas esporádicos para que puedan ayudar a conocer el comportamiento biológico de los mismos, con las consiguientes implicaciones en el diagnóstico precoz.

## **MATERIAL Y MÉTODOS.**

## **MATERIAL.**

Se seleccionaron 25 casos de feocromocitomas esporádicos de los archivos de los departamentos de Anatomía Patológica de los hospitales Virgen Macarena y Virgen del Rocío.

Todas las muestras fueron obtenidas mediante extirpación quirúrgica y al mismo tiempo se revisaron las historias clínicas y controles posteriores correspondientes a dichos pacientes.

## **MÉTODO.**

### **I.- Valoración de los criterios clínicos y de seguimiento.**

Basándonos en los criterios clínicos y de seguimiento posteriormente descritos, los casos fueron divididos en dos grandes grupos:

**A.- Feocromocitomas esporádicos benignos:** Son aquellos casos que se presentan en pacientes sin historia familiar de feocromocitomas y el tumor no presenta metástasis en el momento del diagnóstico.

**B.- Feocromocitomas esporádicos malignos:** Son considerados como tales los feocromocitomas que se presentan en pacientes sin historia familiar de feocromocitomas pero el tumor si presenta metástasis en el momento del diagnóstico. No se incluyeron aquellos casos que en su evolución postcirugía presentaron recidiva tumoral.

Todos los pacientes fueron tratados quirúrgicamente con finalidad curativa o paliativa (en caso de neoplasia maligna diseminada), y en determinados casos aquellos con evidencia de metástasis o recidiva, recibieron ciclos posteriores (de 3 a 5) de radioterapia con MIBG (Metil-yodobenzilguanidina) marcada con I-131 radioactivo.

En cada caso se analizaron las siguientes variables clínicas.

**TABLA 1: Variables clínicas y de seguimiento.**

<b>VARIABLES CLÍNICAS Y DE SEGUIMIENTO</b>	
<b>Edad (años)</b>	<b>Tiempo de seguimiento (meses)</b>
<b>Sexo (hombre/mujer)</b>	<b>Presencia de recidivas(si/no)</b>
<b>Sintomatología:</b> Hipertensión arterial Manifestaciones cardiacas Alteraciones metabólicas Otros	<b>Tipo de recidiva:</b> Local Contralateral Bilateral A distancia
<b>Motivo de consulta:</b> Crisis hipertensiva Paroxismos de cefaleas, sudor y palpitaciones Otros	<b>Tiempo libre de la enfermedad (meses)</b>
<b>Tiempo de evolución (meses)</b>	<b>Presencia de metástasis (si/no)</b>
<b>Estado de seguimiento</b> Vivo sin evidencia de enfermedad Vivo con evidencia de enfermedad Muerto de la enfermedad Muerto por otras causas (esp.)	<b>Localización de metástasis</b> Ganglionar Higado Hueso Pulmón Otros (esp.) Múltiples

## **II.- Criterios histopatológicos.**

Las muestras se fijaron en formol al 10% e incluidas en parafina de forma rutinaria y seleccionados los bloques para realizar cortes histopatológicos de 4 a 5 micras de grosor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

### **A.- Estudio macroscópico.**

En las piezas quirúrgicas remitidas, se analizaron las siguientes variables:

- 1.- Peso y diámetro tumoral.
- 2.- Aspecto de la lesión, donde se recoge el color y consistencia tumoral, la existencia de nódulos, área de hemorragia o de necrosis etc.
- 3.- Vascularización, especificando si eran lesiones poco o muy vascularizadas.
- 4.- Invasión local, se registra la existencia de rotura capsular y extensión a otras estructuras vecinas.
- 5.- Bilateralidad, se recoge para saber si existe afectación o no suprarrenal bilateral, en caso de extirpación quirúrgica intraoperatoria.

### **B.- Estudio Microscópico.**

Se estudió de forma independiente el estado del parénquima peritumoral y la lesión proliferativa. Del análisis histopatológico de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina se recogieron las siguientes variables:

1.- Del parénquima peritumoral: Se valoró el estado de la médula y corteza suprarrenal adyacentes al tumor, considerando si se encontraban intactas, atróficas o hipertróficas, según el caso.

2.- De la lesión:

a) Patrón arquitectural, donde se valoró la disposición de las células feocromocitos en nidos redondeados u ovals (alveolos), trabéculas de diferente espesor, nódulos más o menos confluentes, grupos endotelizados con o sin necrosis (insular) o la ausencia de un patrón definido (crecimiento sólido o difuso).

b) Características citoplasmáticas. Donde se describió principalmente la tinción (eosinofílica, basofílica o clara), y el aspecto (homogéneo, espumoso o granular).

c) Características nucleares, donde a su vez, se analizaron de forma independiente:

- *Anisocariosis*, o variabilidad marcada del tamaño nuclear.
- *Pleomorfismo*. Con esta variable se estudió, fundamentalmente la irregularidad del contorno nuclear y la presencia de hendiduras nucleares.
- *Presencia de nucleolo/s manifiesto/s*, de forma generalizada en las células neoplásicas.
- *Presencia de bi o multinucleación y pseudoinclusiones nucleares*.
- *Relación núcleo/citoplasma*.

d) Contaje de mitosis. Para la identificación de las mitosis se siguieron los criterios de Van Diest y cols (1992).

La cuantificación se realizó en las áreas subjetivamente peor diferenciadas, de mayor celularidad, y mayor índice mitótico. Se evaluaron por microscopía en campo de gran aumento (CGA), cada uno de los cuales ocupaba un área de 0, 0105 mm<sup>2</sup>, expresándose el número de mitosis en forma de índice mitótico, resultado de la relación entre el número de mitosis halladas por cada 10 CGA estudiados.

e) Necrosis: Donde se valoró su presencia (reconocida por citoplasmas densamente eosinofílicos con núcleos en cariorrexis o sin ellos, acompañada de infiltrado inflamatorio agudo), tipo prevalente (en células aisladas confluyente o peritelial) y extensión (medida como porcentaje de la masa tumoral).

f) Hemorragia. Valorándose su existencia y extensión intratumoral (medida como porcentaje de la masa tumoral).

g) Material coloidal. Donde se valoró su presencia y extensión (medida como porcentaje de la masa tumoral).

h) Invasión vascular. Se consideró su presencia (identificada por la existencia de nidos tumorales regulares, con atipia nuclear alta, situados en luces que mostraban tapizamiento endotelial y adheridas a su pared), tipo de vasos (con o sin capa muscular) y localización (capsular o extracapsular).

i) Invasión capsular. Reconocida por la presencia de cordones o nidos de células tumorales a través de la cápsula.

j) Reacción estromal. En este apartado se estudió su existencia (entendida como la aparición de una marcada reacción desmoplásica formando haces hialinos homogéneos, con escasa densidad nuclear e infiltrado inflamatorio, o el depósito de un material basófilo laxo), el tipo (desmoplásico o mixoide) y la extensión (valorada como porcentaje de la masa tumoral).

K) Apoptosis. Para valorar la apoptosis, forma de muerte celular programada en la que la propia célula activa los mecanismos específicos que conducen a su muerte, se consideraron cinco signos marcadores de dicho proceso: cariorrexis, desplazamientos a la periferia del núcleo, picnosis, eosinofilia citoplásmica y disminución del tamaño de la célula. Registrándose como número de cuerpos apoptóticos por 10 CGA.

### **III.- Estudio inmunohistoquímico.**

Dentro del estudio inmunohistoquímico podemos separar dos grandes grupos en cuanto al elemento antigénico utilizado, por una parte utilizaremos sustancias hormonales, y por otra marcadores génicos.

#### **A.- Marcadores Hormonales y otros.**

En el material empleado para el estudio inmunohistoquímico destaca en primer lugar, el uso de una serie de anticuerpos primarios del tipo de:

- **ACTH**: Prediluido a la solución de trabajo y de la casa comercial Dako.
- **Calcitonina**: Utilizada a la dilucción 1:200 suministrada por la casa Dako. Necesitando tratamiento enzimático previo con tripsina.
- **Cromogranina**: Se utilizó el anticuerpo monoclonal a la solución de trabajo suministrado por la casa Biomeda.
- **Enolasa Neuronal Específica**: Se utilizó a la dilucción 1:200 suministrado por Dako.
- **Sinaptofisina**: Se utilizó la sinaptofisina de conejo anti-humano a la dilucción 1:50 con tratamiento enzimático previo con tripsina.
- **Somatostatina**: Empleamos anticuerpos policlonales de conejo contra la somatostatina a la dilucción de trabajo proporcionado por Chemicon internacional.

- **VIP**: Se usó un anticuerpo policlonal contra el VIP proporcionado por Biomeda a la dilución 1:200.
- Anticuerpo **anti Ki-67**: Anticuerpo monoclonal de ratón, del clon Ki-67 y preparado a dilución 1:50. Laboratorio Dako. Copenhague Dinamarca.
- **HMB-45**: Prediluido a la solución de trabajo y de la casa Biomeda.

Dentro de los anticuerpos empleados, el secundario o puente se encuentra marcado con biotina y ha sido suministrado por la casa comercial Dako y utilizado a las diluciones de 1/50 y 1/100.

Destaca, dentro del material utilizado, el uso de controles positivos o tejidos conocidos previamente como poseedores de receptores para los diferentes anticuerpos estudiados. El páncreas y los islotes de Langerhans del páncreas fueron el control elegido para el estudio de la somatostatina y el VIP; las células corticotropas de la adenohipófisis para la ACTH; el melanoma para el HMB-45; siendo el propio caso conocido de feocromocitoma el control para la enolasa neuronal específica y la cromogranina; con la calcitonina se utilizó como controles célula C del tiroides de rata que muestran reacción cruzada con la calcitonina humana.

La pauta seguida fue la siguiente:

- 1.- Desparafinar los cortes en dos cambios de xilol, de diez minutos cada uno.
- 2.- Llevar a etanol absoluto e hidratar en alcoholes de graduación decreciente hasta llegar al agua destilada.
- 3.- En los casos que lo necesitaron, como por ejemplo la sinaptofisina y la calcitonina se realizó un tratamiento con tripsina.

Este tratamiento consistió en la preparación de una solución que contenía 0,1 gramos de cloruro cálcico y 0,1 gr. de tripsina, disuelta en 75 cc. De solución de agua destilada a 37°C durante un minuto.

4.- Inhibir la peroxidasa endógena y la pseudoperoxidasa con agua oxigenada al 3%, durante 20 min.

5.- Lavar en agua destilada en 5 min.

6.- Lavar en tampon TRIS 0,05 con ClNa al 7,5% (TBS) durante 5 min.

7.- Bloqueo de la tinción inespecífica con suero normal de la especie del antisuero secundario a dilución 1/10, durante 20 min., en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

8.- Escurrir e incubar con el antisuero específico frente a los anticuerpos ya señalados en el material inmunohistoquímico a las diluciones ya especificadas durante 18-24 horas en cámara húmeda a 4°C.

9.- Realizar tres lavados con TBS, de 3 minutos cada uno.

10.- Incubar con el antisuero secundario biotinado a dilución 1/100 durante 20 min en cámara húmeda a temperatura ambiente.

11.- Realizar 3 lavados con TBS, de 3 min. cada uno, en puente.

12.- Incubación con el complejo ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasas) durante 20 min. en cámara húmeda a temperatura ambiente.

13.- Realizar 3 lavados con TBS de 3 min cada uno.

14.- Revelado en DAB (Diaminobencidina tetrahidroclorídrico: 3 mgr./10ml más una gota de agua oxigenada al 30% durante uno a tres minutos bajo control microscópico. Los cortes se cubrieron con la mezcla recién preparada y filtrada. El tiempo empleado en el revelado varió sustancialmente según el antisuero utilizado.

15.- Los cortes se lavaron bien en agua destilada.

16.- Contratación con hematoxilina de Harris.

17.- Deshidratación y montaje.

## 2.- Marcadores Génicos

Para el estudio inmunohistoquímico usamos el método streptavidina-biotina-peroxidasa(método ABC), según las técnicas estándar establecidas (Heydeman, 1979; Hsu y cols., 1981). En la mayoría de los casos se usaron técnicas de desenmascaramiento antigénico mediante calentamiento tisular con microondas (ondas electromagnéticas < 1cm) en horno de microondas (Shi y cols. 1991).

Como anticuerpos primarios se seleccionaron los siguientes productos:

- Anticuerpo ***anti-c-erbB-2***: Anticuerpo policlonal obtenido en conejos, y usado a una dilución 1:200. Laboratorio DAKO, Copenhage, Dinamarca.
- Anticuerpo ***anti bcl-2***: Anticuerpo monoclonal obtenido en ratones a partir del clon 124, y usado a una dilución 1:50. Laboratorio DAKO Copenhage, Dinamarca.
- Anticuerpo ***anti p-53***: Anticuerpo monoclonal de ratón, del clon DO-7, a dilución 1:50. Laboratoio DAKO, Copenhage, Dinamarca.

- Anticuerpo ***anti c-myc***: anticuerpo monoclonal de ratón, a partir del clon 9E10, y usado a una dilución 1:50. Laboratorios Concepta ATOM, España.
- Anticuerpo ***anti c-fos (Ab-2)***: Anticuerpo policlonal de ratón y prediluido a una proporción 1:50. Laboratorio Oncogene Science. U.S.A.
- Anticuerpo ***anti pan-ras***: Anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG2b , del clon F 132-62, a dilución 1:50; Laboratorio Oncogene Science. U.S.A.

Para el bloqueo de la tinción inespecífica se usó suero normal de conejo, de la marca Dako, Copenhagen. Dinamarca.

Como anticuerpo secundario y complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa, se usó el kit ABC del Laboratorio Dako, Copenhagen. Dinamarca.

Y por último, como controles de reproductividad de las técnicas inmunohistoquímicas se usaron:

Como controles positivos: Muestras de tumores en los que existía probada positividad de los anticuerpos usados: Adenocarcinoma de mama (en el caso del oncogén c-erbB-2), Ganglioneuroblastoma (para la tinción con bcl-2), Adenocarcinoma de colon (para los restantes anticuerpos).

Como controles negativos: Muestra de tejido tumoral de los feocromocitomas en los cuales se sustituía el anticuerpo primario por suero normal de conejo.

De cada caso se seleccionó el mismo bloque para el estudio histopatológico, sometiéndolo a la siguiente sistemática:

1.- Desparafinar los cortes mediante la inmersión consecutiva en dos cubetas con xilol, de 10 minutos cada una.

2.- Llevar a etanol absoluto y someter las preparaciones a un proceso de rehidratación mediante su inclusión en alcoholes de gradación decreciente hasta llegar a agua destilada.

3.- Luego los cortes eran sometidos a un Pretratamiento antes de iniciar el método inmunohistoquímico propiamente dicho.

En el caso del oncogén p-ras, consistía en la saponificación de tejido mediante su inclusión en una cubeta con saponina al 0,005% en agua destilada durante 30 minutos.

En los restantes casos, se los sometía a su calentamiento en horno microondas, como método de realce antigénico, de la siguiente manera: los cortes se incluían en una solución tampón de citrato (formada por 10 mM de citrato monohidratado en agua destilada, a pH 6,0) contenidas en borreles de vidrio resistentes al calor que luego eran introducidos en el horno microondas. Allí se los sometía a 4 ciclos de 5 minutos, a una potencia de 750 W. Posteriormente se los dejaba enfriar y luego eran lavados en TBS (Tris-buffered-Saline).

4.- Inhibición de la actividad peroxidasa y pseudoperoxidasa endógena. Para ello se incluían los cortes en agua oxigenada al 3%, durante 20 minutos.

5.- Lavado en agua destilada durante 5 minutos.

6.- Lavado en TBS (tampón Trís 0,05 con ClNa al 7,5%), durante 5 minutos.

7.- Bloqueo de la tinción inespecífica con suero normal de la especie delantisuero secundario a una dilucción 1/10, durante 20 minutos, en cámara húmeda y a temperatura ambiente.

8.- Incubación con el antisuero específico primario durante 18-24 horas en cámara húmeda y en refrigeración (4° C), a la dilucción antes especificada según cada antisuero.

9.- Realizar 3 lavados con TBS, de 3 minutos cada uno.

10.- Incubación con antisuero biotinado a una dilucción 1/100 durante 20 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

11.- Realizar nuevamente 3 lavados con TBS, de 3 minutos cada uno.

12.- Incubación con el complejo ABS (Avidina-Biotina –Peroxidasa) durante otros 20 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.

13.- realizar 3 lavados con TBS, de 3 minutos cada uno.

14.- Revelado en DAB (Diaminobencidina tetrahidroclorhídrico. 3 mg de DAB en 10 ml de TBS, a la que se le añade una gota de peróxido de hidrógeno al 30%), durante 1 a 3 minutos, y bajo control microscópico.

15.- Lavado en agua destilada y contratinción con hematoxilina de Harris.

16.- Por último, se someten los cortes a un proceso de deshidratación (usando la secuencia inversa de alcoholes), inclusión en xilol y montaje.

#### **IV.- Análisis Estadístico.**

Para el análisis estadístico, los datos fueron integrados en un procesador *pentium* a 133 MHz y posteriormente analizados mediante el paquete estadístico SPSS for Windows. Para valorar la significación estadística entre variables se usó:

En el análisis **univariante**:

- Para **variables cualitativas**, el test de la Chi-Cuadrado de Mantel-Haenszel de tendencia lineal, usando posteriormente la corrección de Yates y el test exacto de Fisher en aquellos casos que lo precisaron.
- Para **variables cuantitativas**, el test de Levene para igualdad de varianzas.

En el análisis **multivariante**:

- Diseñamos un modelo de regresión logística, designamos como variable dependiente el ser maligno, y como variables independientes aquellas que nos permitan mejorar el modelo y predecir con mayor seguridad la probabilidad de ser maligno.

La normalidad de la distribución de las variables se verificó por medio del test de Kolmogorov Smirnof. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de  $p < 0.05$ .

## **RESULTADOS.**

## I.- VALORACIÓN CLÍNICA.

**TABLA 1: Variables clínicas y de seguimiento en pacientes con feocromocitomas esporádicos.**

CASO	SEXO	EDAD	HTA (*)	SIGNOS Y SÍNTOMAS CLÍNICOS
1	M	64	III	Crisis hipertensivas. Miocardiopatía HVI. Dcha
2	V	10	II	Cefaleas. Crisis tónico-clónicas. Feoc. Extraadrenal
3	V	47	II	Retinopatía hipertensiva I-II. IAM. DMNID. Crisis hipertensivas. Feocromocitoma. Dcho.
4	V	34	III	Corioretinopatía hipertensiva II-III. Feoc. Dcho.
5	V	20	II	Crisis hipertensivas. Feocromocitoma Dcho.
6	M	20	N.C.	Feocromocitoma Dcho.
7	V	36	II	Feocromocitoma Dcho. Crisis hipertensivas.
8	M	57	II	Crisis hipertensivas. IAM. Feocromocitoma Dcho.
9	V	59	II	DMNID. Crisis hiperten. Miocardiopatía. Dcho.
10	V	34	III	Glomerulonefritis. Feocromocitoma Dcho.
11	M	26	III	Insuficiencia cardíaca izda. Miocardiopatía. Feocromocitoma extraadrenal .
12	M	57	II	Paraganglioma extraadrenal.
13	V	51	N.C.	Tuberculosis. Feocromocitoma Izdo.
14	M	46	II	Obesidad. Feocromocitoma Dcho.
15	V	40	II	Crisis hipertensivas. Cólicos Nefríticos. Feocromocitoma Izdo.
16	V	12	III	Miocardiopatía hipertensiva. Feocromocito. Dcho.
17	M	47	II	Paraganglioma extraadrenal. Riñón izdo. ectópico.
18	V	46	N.C.	Paraganglioma de vejiga urinaria.
19	M	57	I	Cáncer de cérvix y ovario. Feocr. Izdo. Metástasis ganglionar.
20	V	22	II	Crisis hipertensivas. Miocardiopatía. Feocromocitoma Izdo. Metástasis ganglionar.
21	M	41	II	Cáncer de mama. Feocromocitoma izdo. Metástasis ganglionar y hepática. Retinopatía hipertensiva.
22	M	44	II	Crisis Hipertensivas. Feo. Izdo. Metás. Ganglionar
23	M	62	I	Cáncer de mama. Neo de sigma y cérvix. Feocrom. Dcho Metástasis ganglionar.
24	V	33	II	Hipertensión juvenil. Feocromocitoma bilateral. Metástasis ganglionar.
25	V	36	II	Insuficiencia cardíaca izda. Miocardiopatía. Feocrom. Dcho. Metástasis Ganglionar.

N.C.: No constatado. Nose han obtenido datos fidedignos de la historia clínica.

\* Clasificación según la OMS. V= Varón M= Mujer

Estos datos clínicos se obtuvieron de 25 pacientes diagnosticados de Feocromocitoma entre los años 1976 y 1993 y estudiados en los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío de Sevilla.

Se consideraron benignos, aquellos feocromocitomas que no presentaban metástasis, 18 de los 25 tumores estudiados (72%) cumplieron ese criterio.

Los tumores malignos fueron 7 (28%), considerando como tales aquellos en los que se consiguió demostrar en el estudio anatómo-patólogo alguna metástasis.

Posteriormente, durante los controles posquirúrgicos, dos de los pacientes afectos de feocromocitomas benignos, casos nº 2 y 9, presentaron recidiva de la tumoración, al cabo de 45 y 108 meses respectivamente. No siendo suficiente el criterio de recidiva para considerarlos como malignos.

En cuanto al **SEXO**, del total de los tumores estudiados, 14 fueron varones (56 %) y 11 mujeres (44 %); en una proporción varón- mujer 1,27:1.

Dentro de los benignos, 11 fueron varones (61,11%) y 7 mujeres (38,88%), con una proporción varón-mujer de 1,57:1.

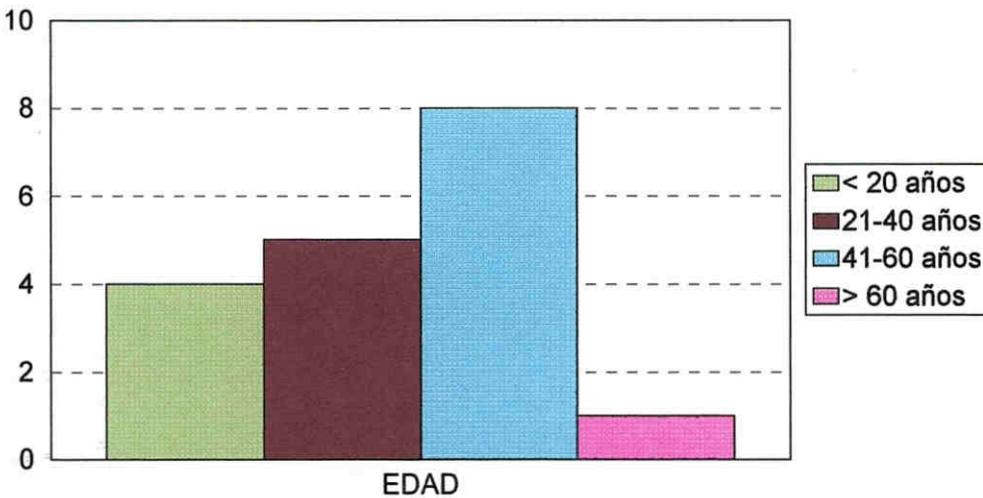
En los feocromocitomas esporádicos malignos de la presente serie, encontramos 3 varones (42,85%) y 4 mujeres (57,14%), con una relación varón-mujer de 0,75:1.

La **EDAD** de presentación de los feocromocitomas esporádicos osciló entre los 10 y los 64 años; con una media de 40,04 años, y una desviación estándar, DS, de 15,48.

La distribución por edad fue, cuatro casos (16%) se diagnosticaron en pacientes menores de 20 años. Ocho casos (32%), se presentaron en pacientes entre 20 y 40 años. Once pacientes (44%) tenían entre 40 y 60 años en el momento del diagnóstico. Se detectó el feocromocitoma en dos pacientes (8%) mayores de 60 años.

En los tumores benignos, la media de la edad fue de 39,22 años, con una DS de 16,38. En este grupo se incluyeron dos casos de feocromocitomas de la infancia, en dos pacientes de 10 y 12 años respectivamente.

## Feocromocitomas benignos

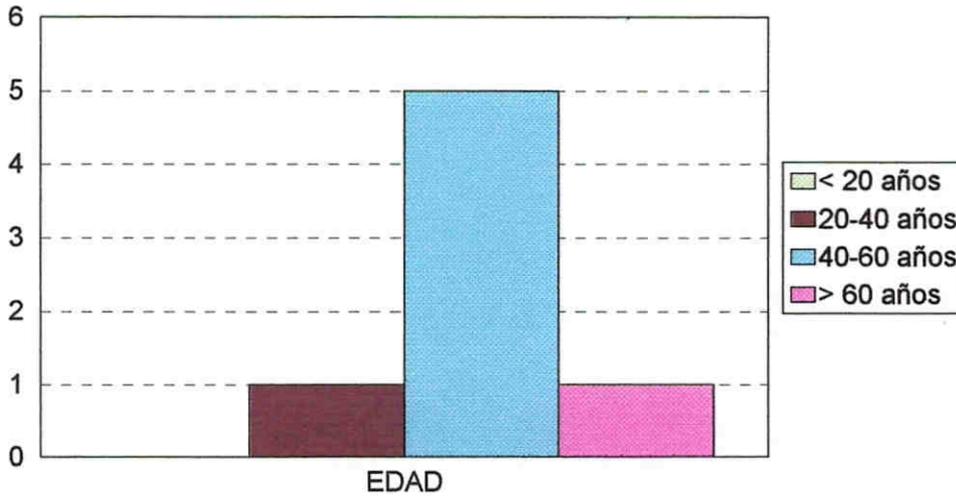


**Figura 1: Feocromocitomas esporádicos benignos. Distribución por grupos de edad.**

La distribución por edad de los feocromocitomas benignos fue, 4 casos en menores de 20 años (22,22%), 5 pacientes entre 20 y 40 años (27,77%), 8 entre 40 y 60 años (44,44%) y 1 paciente tenía más de 60 años en el momento del diagnóstico (5,55%).

En los feocromocitomas malignos del presente estudio, la media de la edad fue de 42,14 años con una desviación típica de 13,82.

## Feocromocitomas malignos



**Figura 2: Feocromocitomas esporádicos malignos. Distribución por grupos de edad.**

La distribución por edad de los 7 tumores considerados como malignos fue, 1 caso en paciente entre 20 y 40 años (14,28%), 5 entre 40 y 60 años (71,42%), y un caso en paciente mayor de 60 años (14,28%). No encontramos ningún caso dentro de los malignos con menos de 20 años.

El cuadro clínico más frecuente fue la **HIPERTENSIÓN ARTERIAL**, presentándose en 22 pacientes, (88% de los casos), generalmente mantenida, aunque en 7 pacientes (28%), cursaba en forma de crisis hipertensivas con labilidad tensional, manifestándose con paroxismos ocasionales.

Para su clasificación hemos atendido a la repercusión en órganos dianas (OMS, 1993):

**Estadio I.** Sin señales objetivas de cambios orgánicos.

**Estadio II.** Al menos una de las siguientes señales de involucreción orgánica:

- Hipertrofia del ventrículo izquierdo (Rx, ECG, ECO).
- Estrechamiento de arterias retinianas.
- Proteinuria y/o descenso creatinina (1,5-2,0 mg/dl).
- Evidencia ultrasónica o por Rx de placas arterioscleróticas.

**Estadio III.** Signos y síntomas de daño orgánico:

-Corazón: Angina de pecho, Infarto de miocardio, Insuficiencia cardíaca.

-Cerebro: TIA accidente cerebrovascular, Encefalopatía hipertensiva.

-Fondo de ojo: Hemorragias retinianas y exudados con ó sin papiledema.

-Riñón: Creatinina plasmática > 2,0 mg/dl. Insuficiencia renal.

-Vasos: Aneurisma disecante, Enfermedad arterial oclusiva sintomática.

La hipertensión en los pacientes con feocromocitoma se caracteriza por una mala respuesta al tratamiento antihipertensivo habitual, y con frecuencia se comportó como maligna, esto es, con repercusión sistémica importante en forma de retinopatía hipertensiva, hipertrofia ventricular o proteinuria lo cual ocurría en el 90% de los pacientes en los que pudimos constatar la presencia de hipertensión en los datos recogidos en la historia clínica.

En los tumores benignos, detectamos hipertensión arterial en 15 de los 18 casos estudiados (83,33%) en 3 casos no pudimos constatar hipertensión arterial (16,66%).

Los 7 casos de feocromocitomas malignos estudiados presentaron hipertensión arterial.

El motivo de consulta más frecuente fue la aparición de crisis hipertensivas o paroxismos, con cefaleas sudoración y palpitaciones, presentes en el 55% de los casos. Estas crisis eran expresión de una liberación brusca y masiva de catecolaminas, que se constató mediante la medición en orina de aminas biógenas. Estas mismas aminas sirvieron de control y evolución de los casos estudiados tras la extirpación quirúrgica.

Otras causas menos frecuentes que motivaron su diagnóstico fueron, crisis comicial (caso 2), Diabetes Mellitus de inicio (caso 9), y hallazgo casual tras radiología abdominal o control tensional.

Entre las personas afectas del feocromocitoma se detectó obesidad en un 25% de los casos, principalmente en mujeres. Este sobrepeso, que en algunos pacientes superó el 50% del peso teórico, no se pudo especificar si se encuadraba dentro de un hábito cushingoide.

En tres pacientes (12%), existían otras neoplasias asociadas, independientes del tumor cromafín, del tipo de cáncer de mama, cérvix, ovario y sigma.

En siete pacientes (28%), existe miocardiopatía severa, manifiesta en forma de trastornos de la conducción, diversas formas de taquiarritmias, e incluso Infarto Agudo de Miocardio (en el caso 8); posiblemente como consecuencia de la actuación de las aminas a nivel cardíaco (*miocardiopatía catecolaminica*).

En 5 de los 18 casos considerados benignos (27,77%), encontramos miocardiopatía. En dos casos de los feocromocitomas malignos (28,57%), detectamos dicha afección miocárdica.

La excrección urinaria de catecolaminas en 24 horas presentó el siguiente perfil:

**TABLA 2: Niveles de aminas biógenas en orina de los pacientes con feocromocitomas esporádicos.**

<b>CASO</b>	<b>VAMA. (mg/día)</b>	<b>NORAD. (µg/mg creat)</b>	<b>ADR. (µg/mg creat)</b>	<b>HVA. (mg/día)</b>
<b>1</b>	103	4,500	0,0025	6
<b>2</b>	51	1,470	0,0012	4
<b>3</b>	15	0,012	0,0250	4
<b>4</b>	7	0,220	0,0051	5
<b>5</b>	91	4,800	0,0018	4
<b>8</b>	69	0,410	0,0460	5
<b>9</b>	4	0,830	0,0011	6
<b>11</b>	6	-	-	4
<b>15</b>	34	1,830	-	-
<b>16</b>	9	4,800	0,0050	4
<b>17</b>	33	0,790	0,0050	4
<b>20</b>	10	0,830	0,0830	7
<b>21</b>	15	0,513	0,0056	4
<b>23</b>	15	0,280	0,0020	4
<b>25</b>	16	-	-	-

**VAMA** = Ácido Vanilmandélico. Valores normales < 10mg/día.

**HVA** = Ácido Homovanílico. Valores normales < 6mg/día.

**ADR.** = Adrenalina. Valores normales < 0,0035 µg/mg/creatinina.

**NORAD.** = Noradrenalina. Valores normales < 0,2 µg/mg/creatinina

**El ácido Vanil-Mandélico (VAMA)**, se encontró elevado, (normal: < 10 mg/día), en la orina de 10 de los 15 pacientes en los que se pudo determinar (66,66%), con unos valores medios de 31,86 mg/día y una desviación típica DS de 32,15.

En los 11 feocromocitomas benignos en los que se determinó esta amina en orina, la media fue de 38,36 mg/día y la DS de 35,65. Se encontró elevada en la orina de 7 pacientes (63,63%). En 3 de los 4 tumores malignos en los que se pudo determinar (75%), se encontró elevada en orina, la media fue de 14 mg/día y la DS de 2,70.

**El ácido Homovanílico (HVA)**, se eliminaba en exceso en orina, (normal: < 6 mg/día), en sólo un caso de los 13 estudiados (7,6 % de los pacientes), con unos valores promedios de 4,69 mg/día, y una DS de 1,03.

En ningún tumor de los 10 benignos estudiados se detectó exceso en orina de esta amina. Los valores medios obtenidos fueron de 4,6 mg/día y la DS de 0,84. En un tumor de los tres malignos en los que se determinó esta amina (33,33%), la excrección en orina se encontraba elevada. La media obtenida fue de 5 mg/día y la DS de 1,73.

**La Noradrenalina (NA)**, se detectó elevada en la orina, (normal < 0,2 µg/mg creat.), de 12 de los 13 pacientes estudiados (92,30%), con una media de 1,637 µg/mg creat. y una DS de 1,815.

Se encontraron valores elevados en la orina de 9 de los 10 tumores benignos estudiados (90%), con una media de 1,96 µg/mg creat. y una DS de 1,96. En todos los tumores malignos estudiados se detectó esta amina elevada en orina, con una media de 0,541 µg/mg creat. y una DS de 0,27.

**La Adrenalina (A)**, se excretaba elevada en orina, (normal < 0,0035 µg/mg creat.), en 7 de los 12 casos estudiados (58,33%), con una media de 0,0152 µg/mg creat. y una DS de 0,0251.

En los tumores benignos se encontró exceso en orina en 5 de los 9 estudiados (55,55%), con una media de 0,0103  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creat. y una DS de 0,0153. En 2 de los 3 tumores malignos estudiados se encontraron valores elevados en orina (66.66%), la media obtenida fue de 0,0302  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creat. y la DS de 0,0457.

## II.- ESTUDIO MORFOLÓGICO.

**Tabla 3.- Principales rasgos anatomopatológicos de los feocromocitomas esporádicos.**

Caso	Peso (gr)	Infiltra. Cápsula	Necrosis	Hemor	Invas. Vascul	Pleomorf	Mitosis (*)	Apop-tosis(*)
1	38	Nula	Nula	Franca	Nula	Franco	1	57
2	40	Nula	Leve	Nula	Nula	Moderado	10	30
3	114	Nula	Leve	Moder.	Nula	Franco	2	116
4	15	Nula	Nula	Leve	Franca	Moderado	0	104
5	45	Leve	Nula	Leve	Nula	Franco	0	23
6	80	Leve	Nula	Moder.	Nula	Leve	1	172
7	105	Nula	Nula	Leve	Nula	Nulo	2	274
8	22	Nula	Nula	Leve	Nula	Moderado	0	246
9	125	Nula	Nula	Nula	Nula	Moderado	0	402
10	20	Leve	Modera.	Moder.	Nula	Moderado	1	172
11	30	Nula	Nula	Leve	Nula	Leve	0	174
12	5	Leve	Nula	Leve	Nula	Franco	4	198
13	140	Nula	Nula	Nula	Leve	Leve	5	134
14	550	Franca	Modera.	Franca	Moder	Franco	4	152
15	60	Nula	Nula	Leve	Nula	Franco	0	152
16	34	Nula	Modera.	Franca	Nula	Leve	0	130
17	200	Franca	Leve	Franca	Franca	Leve	1	660
18	90	Nula	Nula	Leve	Nula	Nulo	0	476
19	140	Franca	Nula	Franca	Moder	Moderado	0	222
20	480	Franca	Nula	Leve	Franca	Leve	1	246
21	20	Leve	Nula	Franca	Franca	Moderado	0	7
22	50	Franca	Nula	Nula	Moder	Leve	0	76
23	75	Modera.	Nula	Franca	Nula	Moderado	0	704
24	50	Modera.	Modera.	Nula	Moder	Franco	4	100
25	125	Franca	Leve	Leve	Franca	Franco	2	520

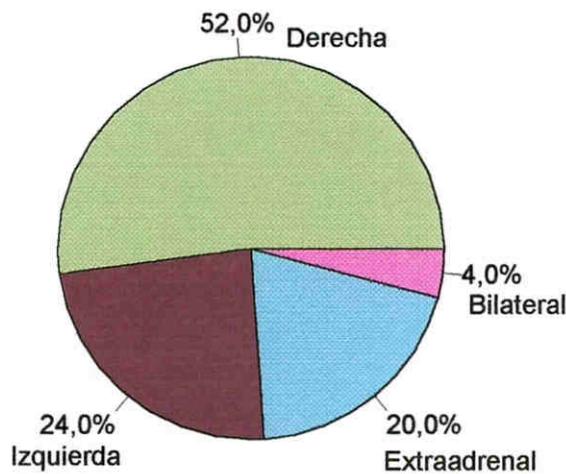
\*(Número por 10 CGA).

## A.- Estudio macroscópico.

Al examen macroscópico, los feocromocitomas contenidos en las piezas quirúrgicas remitidas, tenían forma ovoide o redondeada, generalmente adheridas a uno de los bordes de la glándula suprenal, con superficie lisa o ligeramente abollonada y de coloración amarillenta y/o grisácea.

Al corte presentaban una consistencia blanda, algo elástica, observándose en el exterior una cápsula, bien delimitada, de color blanco-pardusco, con un parénquima amarillento parduzco irregular en su interior, con zonas quísticas ocasionales y un componente variable de necrosis y hemorragia.

## Localización feocromocitoma



**Figura 3: Localización feocromocitomas esporádicos. Porcentaje.**

La principal **localización** del tumor fue en la glándula suprenal derecha en 13 pacientes (52%), en la izquierda en 6 casos (24%), localización extraadrenal en 5 casos (20%) y en un paciente (4%) encontramos feocromocitoma suprenal bilateral.

El **peso** de las piezas tumorales osciló entre los 5 y los 550 gramos, con un peso medio de 106,12 gramos y una DS de 132,79.

En los feocromocitomas considerados benignos, la media de los pesos fue de 95,16 gramos y la DS de 124,87.

En los tumores malignos, el peso medio fue de 134,28 gramos y la DS de 158,33.

## **B.- Estudio microscópico.**

Desde el punto de vista microscópico, se observó que los tumores estaban formados por células cromafines poligonales, que variaban en forma y tamaño, con un núcleo redondeado con un nucleolo prominente y un citoplasma finamente granular basófilo.

En trece casos (52%) encontramos **infiltración de la cápsula**, siendo importante en seis de ellos (24%), y leve o moderada en siete (28%). En seis casos de los benignos (33,33%) encontramos infiltración capsular, siendo leve en cuatro de ellos (22,22%) y franca en 2 (11,11%).

En todos los feocromocitomas malignos estudiados, encontramos infiltración capsular, siendo franca en cuatro (57,14%), moderada en dos (28,57%) y leve en uno (14,28%).

La **invasión vascular**, fue evidente a nivel microscópico en 10 casos (40%), presentándose de forma leve en un caso (4%), moderada en cuatro (16%) y franca en cinco (20%).

Sólo cuatro de los dieciocho tumores benignos estudiados (22,22%) presentaron invasión vascular, siendo leve en un caso (5,5%), moderada en otro (5,5%) y franca en dos (11,11%).

En seis de los siete tumores malignos se detectó invasión vascular (85,71%), en tres pacientes fue en forma moderada (42,85%) y en otros tres fue franca (42,85%). En un caso de los malignos no se encontró invasión vascular.

Existían áreas de **hemorragias** en 20 pacientes (80%) de la presente serie, siendo ésta franca en siete de ellos (28%), moderada en tres (12%) y leve en diez (40%).

En 15 de los 18 tumores benignos encontramos áreas de hemorragias (83,33%), siendo ésta franca en 4 de ellos (22,22%), moderada en 3 (16,66%) y leve en 8 (44,44%).

En cinco de los siete feocromocitomas malignos estudiados encontramos áreas de hemorragias (71,42%), siendo ésta leve en 2 de ellos (28,57%), y franca en los tres restantes (42,85%).

Se encontraron áreas de **necrosis** en ocho de los veinticinco casos (32%). En cuatro casos (16%) se consideraron leves y en otras cuatro piezas quirúrgicas (16%) detectamos necrosis moderada.

En seis de los 18 tumores benignos detectamos áreas de necrosis (33,33%), siendo ésta leve en tres casos (16,66%) y moderada en tres (16,66%). Encontramos necrosis en 2 de los 7 feocromocitomas malignos estudiados (28,57%), leve en un caso (14,28%) y moderado en otro (14,28%).

En cuanto a las características nucleares cabe destacar que, en 23 de los 25 feocromocitomas esporádicos (92%), encontramos un grado variable de atipia o

**pleomorfismo**, siendo considerado franco en ocho casos (32%), moderado en ocho (32%) y leve en siete (28%); en dos casos (8%) no encontramos ningún grado de atipia o pleomorfismo.

En los tumores benignos, encontramos pleomorfismo en 16 de los 18 de la presente serie (88,88%), siendo éste franco en seis (33,33%), moderado en cinco (27,77%) y leve en cinco (27,77%). En dos casos no encontramos pleomorfismo (11,11%).

En todos los casos de los siete feocromocitomas malignos (100%) detectamos algún grado de pleomorfismo; leve en dos (28,57%), moderado en tres (42,85%) y franco en dos (28,57%).

La presencia de cuerpos de **apoptosis**, (entendida ésta como una forma de muerte celular programada y valorada por cinco signos marcadores del proceso: cariorrexis, picnosis, eosinofilia citoplasmática, desplazamiento a la periferia del núcleo y disminución de del tamaño de la célula) fue constante en todos los tumores presentando una media de 221,88 por 10 campos de gran aumento (CGA), con una desviación típica, DS, de 189,17.

En los 18 feocromocitomas esporádicos benignos estudiados, la media de cuerpos de apoptosis fue de 204 y la desviación estándar de 162,50. En los tumores malignos la media de cuerpos de apoptosis fue de 267,85 y la DS de 254,75.

La actividad mitótica que se registró fue baja, oscilando el **índice mitótico** (resultado de la relación entre el número de mitosis halladas por cada diez campos de gran aumento CGA), entre 0 y 10, con una media de 1,52/10 CGA, y DS de 2,34. Doce de los feocromocitomas analizados en el presente estudio (48%), presentaban ausencia de mitosis.

Entre los tumores benignos, 8 presentaban ausencia de mitosis (44,44); la media del índice mitótico fue de 1,72 y la DS de 2,60. Entre los malignos en 4 no se detectaba mitosis (57,14%), siendo la media del índice mitótico de 1 y la DS de 1,52.

### III.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.

#### A.- Marcadores Génicos.

Los resultados obtenidos mediante el estudio inmunohistoquímico en los feocromocitomas esporádicos se reflejan en la siguiente tabla:

**TABLA 6: Análisis inmunohistoquímico de los feocromocitomas esporádicos.**

Caso	C-erbB- 2	P 53	C fos	C myc	Bcl- 2	P ras
1	+	-	-	++	-	+
2	++	-	-	++	-	+
3	+	-	-	++	-	++
4	++	-	-	++	-	+
5	++	-	-	+++	-	++
6	+	-	-	+	-	++
7	-	-	+	+	-	-
8	++	-	+	+++	-	++
9	+	-	-	++	-	+
10	++	-	++	++	-	++
11	+	-	+	++	-	++
12	+	-	-	+++	-	+
13	+	-	-	-	-	+
14	+	-	-	+	-	+
15	++	-	-	++	-	+
16	+	-	-	++	-	+
17	+	-	-	++	-	+
18	++	-	-	+++	-	++
19	+++	-	+	+++	-	+
20	++	-	-	++	-	+
21	++	-	+	+++	-	+
22	+++	-	-	++	-	+
23	+++	-	-	+++	++	+
24	+++	-	+	++	-	++
25	+++	-	+	+++	-	++

- negativo  
+ débilmente positivo

++ moderadamente positivo.  
+++ positividad muy fuerte.

El protooncogén **c-erbB-2**, se expresa en 24 de los 25 feocromocitomas esporádicos analizados en el presente estudio inmunohistoquímico (96%), aunque la intensidad de la tinción fue variable.

Los cortes mostraron un patrón de tinción difuso granular intracitoplasmático, mientras que la tinción asociada a la membrana sólo se pudo diferenciar en un caso (caso 13). Las células de la corteza suprarrenal, fueron negativas para el protooncogén **c-erbB-2**, mientras que el tejido medular adrenal expresaba una muy débil positividad.

En la mayoría de los casos, existió un patrón heterogéneo de tinción por todo el tumor, mientras que en tres de ellos (12%), casos 7, 11 y 19, se demostró un patrón focal.

La proporción de células expresando la proteína *c-erbB-2*, variaba según cada caso, 10 de los feocromocitomas estudiados (40%) se consideraron débilmente positivos (< 25% de células positivas); 9 casos (36%) moderadamente positivos (25-50% de células positivas) y 5 casos (20%) con positividad muy fuerte (> 50% de células positivas).

Diecisiete de los dieciocho tumores benignos estudiados expresaban el protooncogén *c-erbB-2* (94,44%), diez con positividad débil (55,55%), siete moderadamente positivos (38,88%) y ninguno presentó positividad muy fuerte.

Todos los siete tumores malignos (100%) expresaron el protooncogén *c-erbB-2*, siendo con positividad moderada dos de ellos (28,57) y los restantes cinco presentaron positividad muy fuerte (71,42%).

Ninguno de los feocromocitomas esporádicos, tanto los benignos como los malignos, expresó el antioncogén **p-53**, aunque los controles, adenocarcinomas de mama, fueron muy positivos.

En ocho de los feocromocitomas (32%), se demostró inmunoreactividad positiva para el protooncogén **c-fos**. En 7 casos (28%) se consideró débilmente positivo y sólo un caso (4%) fue claramente positivo.

Presentaron un patrón de tinción intracitoplasmático, en ocasiones granular, homogéneo por todo el tumor, mostrando tres (13,04%) de los casos un patrón focal (casos 7, 11 y 19). La corteza suprarrenal fue negativa para la tinción de *c-fos*, mientras que se evidenciaron células aisladas medulares positivas en algunos cortes.

Cuatro de los dieciocho tumores benignos expresaron el protooncogén *c-fos*, (22,22%), tres con positividad débil (16,66%) y uno con positividad moderada (5,55%).

Cuatro feocromocitomas malignos (57,14%), expresaron el protooncogén *c-fos*, todos ellos débilmente positivos.

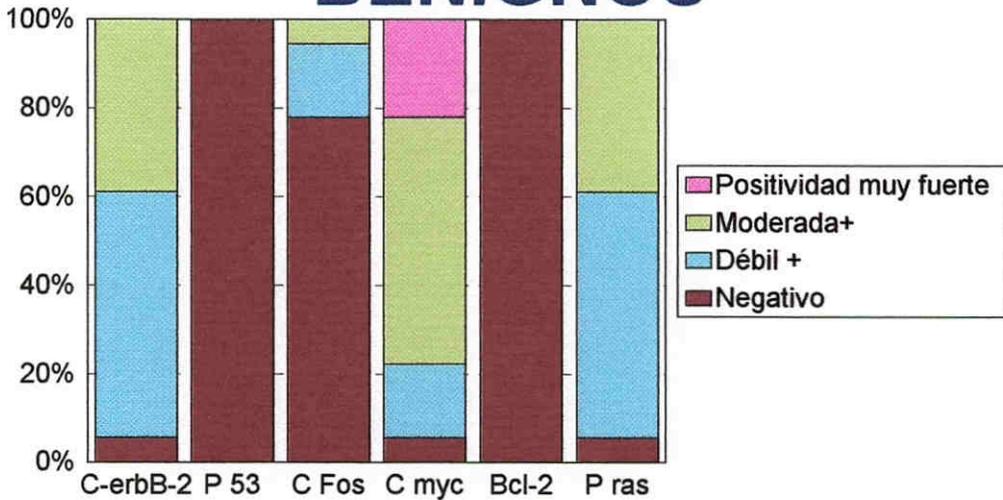
El protooncogén **c-myc**, fue positivo en 24 (96%) de los 25 feocromocitomas esporádicos estudiados, siendo la positividad débil en 3 casos (12%), moderada en 13 (52%) y tinción fuertemente positiva en 8 (32%).

Se observó que la tinción intracitoplasmática fue homogénea, en ocasiones granular. La médula presentó una tinción débilmente positiva, al igual que la corteza, aunque en ésta sólo se afectaba la capa más interna o reticular.

Diecisiete de los dieciocho tumores benignos (94,44%), expresaron el protooncogén *c-myc*, 3 casos con positividad débil (16,66%), 10 con moderada positividad (55,55%) y 4 con positividad muy fuerte (22,22%).

Todos los tumores malignos (100%), expresaron el protooncogén *c-myc*. 4 con positividad muy fuerte (57,14%) y 3 con moderada positividad (42,85%).

## FEOCROMOCITOMAS BENIGNOS



**Figura 4: Feocromocitomas esporádicos benignos. Marcadores genéticos, distribución según inmunopositividad.**

Únicamente en un feocromocitoma (4%), siendo éste maligno, encontramos inmunoreactividad positiva para el protooncogén **bcl-2**, siendo ésta moderada.

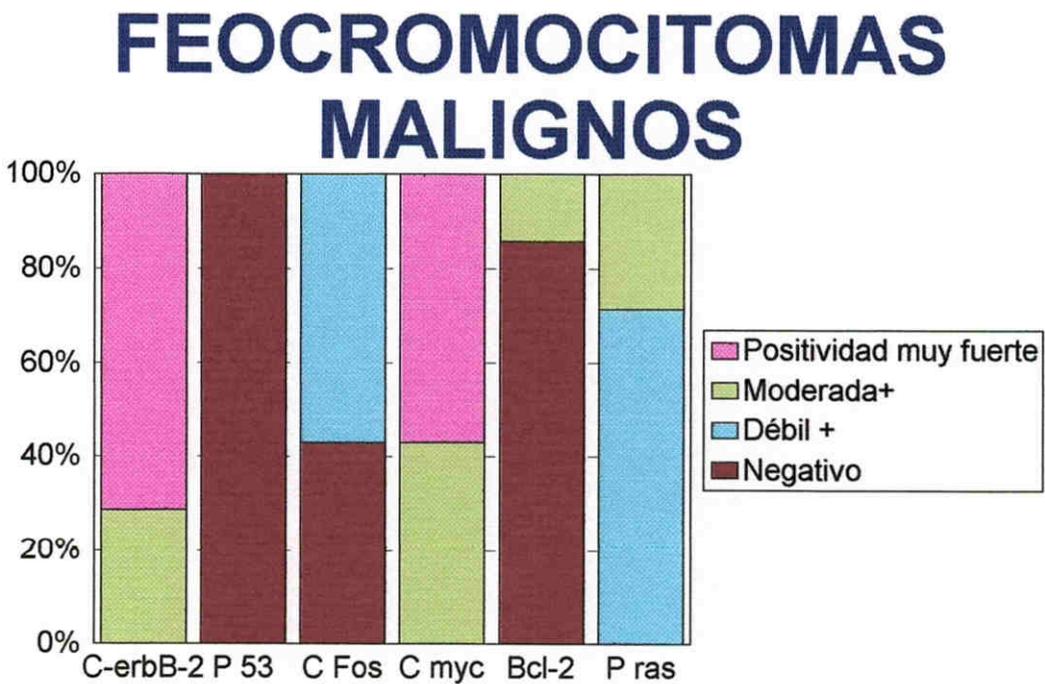
El patrón de tinción citoplasmático que presentó este único caso fue homogéneo. La corteza suprarrenal fue negativa.

La inmunopositividad para los protooncogenes **ras**, se detectó en 24 de los feocromocitomas estudiados (96%), siendo débilmente positiva la tinción en 15 casos (60%), moderadamente positiva en 9 (36%) y no se encontró ningún caso con positividad muy fuerte.

El patrón citoplasmático hallado fue granular, afectando a todo el tumor. La corteza y la médula adrenales fueron débilmente positivas.

Diecisiete de los dieciocho tumores benignos (94,44%), presentaron inmunopositividad para el protooncogén *ras*, siendo débilmente positiva en diez de ellos (55,55%) y siete mostraron moderada positividad (38,88%).

Todos los tumores malignos estudiados presentaron inmunopositividad para el protooncogén *ras*, cinco fueron débilmente positivos (71,42%) y dos mostraron moderada positividad (28,57%).



**Figura 5: Feocromocitomas esporádicos malignos. Distribución de marcadores genéticos según inmunopositividad.**

## B.- Marcadores Hormonales y otros.

En el presente estudio hemos incluido diversos marcadores hormonales y dos sustancias no hormonales con características especiales como son el antígeno de proliferación Ki-67 y la proteína HMB-45. Realizaremos un análisis inmunohistoquímico de los marcadores en todos los casos incluidos en nuestra serie.

**TABLA 7: Análisis inmunohistoquímico de diversos marcadores en los feocromocitomas esporádicos.**

Caso	Sinaptofisina	Cromogranina	Calcitonina	ACTH	VIP
1	++	++	-	-	-
2	++	++	-	-	+
3	++	++	+	-	+
4	+	++	+	++	-
5	+++	++	-	-	-
6	++	++	-	-	-
7	++	++	+	++	+
8	++	++	-	-	-
9	++	++	-	-	+
10	++	++	+	+	++
11	++	++	-	-	-
12	++	++	-	-	+
13	++	++	-	-	+
14	+	++	-	-	-
15	++	++	-	-	++
16	++	++	+	+	+
17	+	++	+	+	-
18	++	++	-	-	-
19	++	++	-	-	-
20	+++	++	+	-	-
21	+++	++	-	+	+
22	++	++	+	+	+
23	+	++	+	+	+
24	+++	++	-	-	-
25	++	++	-	-	-

+ débilmente positivo.

++ moderadamente positivo.

+++ positividad muy fuerte.

ACTH= Hormona Adenocorticotropa.

**Tabla 8.- Análisis inmunohistoquímico de diversos marcadores hormonales y otros en los feocromocitomas esporádicos.**

CASO	Somatostatina	HMB-45	ENE	Ki 67
1	-	-	+	-
2	-	-	+	+
3	-	-	+	+
4	-	-	+	-
5	-	-	+	+
6	-	-	+	-
7	-	-	+	-
8	-	-	-	-
9	-	-	+	+
10	-	-	++	+
11	-	-	-	++
12	+	-	+	-
13	-	-	+	-
14	-	-	+	+++
15	-	-	-	+
16	-	-	++	+++
17	-	-	-	+
18	-	-	+++	-
19	+	-	-	-
20	-	-	+	-
21	-	-	+	-
22	-	-	-	-
23	-	-	++	-
24	-	-	++	-
25	-	-	++	-

+ débilmente positivo.

++ moderadamente positivo.

+++ positividad muy fuerte.

ENE. = Enolasa Neuronal Específica.

El estudio inmunohistoquímico de los feocromocitomas esporádicos ha demostrado que el 100% de los casos son positivos para la **Sinaptofisina**, siendo en 4 casos (16%) débilmente positivo; 17 moderadamente positivos (68%) y 4 con positividad muy fuerte (16%).

El patrón de tinción predominante ha sido el homogéneo, excepto en el caso 23 donde las células positivas formaron un pequeño grupo aislado en el interior del tumor.

En los 18 tumores benignos estudiados, 3 eran débilmente positivos (16,66%) a la sinaptofisina, 14 moderadamente positivos (77,77%) y uno presentó positividad muy fuerte (5,5%).

Entre los tumores malignos, 3 presentaron positividad muy fuerte (42,85%), 3 eran moderadamente positivos (42,85%) y uno fue levemente positivo (14,28%).

Todos los tumores estudiados (100%), tanto los benignos como los malignos, han tenido inmunoreacción positiva a la **Cromogranina**, con una distribución tisular homogénea de moderada positividad.

La tinción citoplásmica de dichas células muestran un carácter granular afectando a la totalidad del mismo.

La **Calcitonina**, presenta una reacción positiva en 9 de los tumores estudiados (36%), todos ellos con débil positividad.

El patrón más frecuentemente observado fue en grupos celulares. La tinción celular se localizó a nivel citoplasmático sin patrón granular.

Entre los tumores benignos encontramos 6 con reacción positiva a la calcitonina (33,33%), todos ellos con positividad débil.

En tres de los siete tumores malignos estudiados (42,85%), se demostró débil positividad a la calcitonina.

La inmunotinción con **ACTH**, fue positiva en 8 de los 25 casos del presente estudio (32%), 6 fueron débilmente positivos (24%) y 2 moderadamente positivos (8%).

El 90% de los feocromocitomas que presentaron inmunoreacción positiva presentaron patrón homogéneo en todo el tumor.

En un 10% la inmunoreactividad frente a la **ACTH** fue en grupos pequeños a modo de islotes entre el parénquima tumoral negativo.

El 40% de los tumores calcitonina +, son positivos a **ACTH**.

La corteza suprarrenal adyacente a los feocromocitomas con inmunoreactividad positiva frente a la **ACTH**, es positiva a este reactivo tanto en la capa fasciculada como en la zona reticular con una distribución homogénea.

Entre los tumores benignos, 5 presentaron reacción positiva a la **ACTH** (27,77%), 3 con débil positividad (16,66%) y 2 casos mostraron moderada positividad (11,11%).

De los 7 tumores malignos estudiados, 3 mostraron reacción positiva a la **ACTH** (42,85%), todos ellos con débil positividad.

El **VIP**, fue positivo en 12 casos (48%), siendo en 10 débilmente positivo (40%) y en 2 moderadamente positivo (8%).

No presenta un patrón de tinción morfológico plenamente definido.

Nueve feocromocitomas benignos (50%) fueron **VIP** +. Siete débilmente positivos (38,88%) y dos moderadamente positivos (11,11%).

Entre los tumores malignos 3 fueron VIP + (42,85%), todos ellos débilmente positivos.

Encontramos inmunopositividad para la **Somatostatina**, en dos de los casos estudiados (8%), mostrando ambas una débil positividad.

El caso 19 (tumor maligno), presentó tinción citoplasmática homogénea. El caso 5 (feocromocitoma benigno), mostró positividad en grupos celulares a modo de islotes entre zonas de inmunotinción negativa.

La inmunoreactividad para el **HMB-45**, ha sido negativa en el 100% de los feocromocitomas esporádicos estudiados, tanto en los casos benignos como en los malignos.

Con el anticuerpo para la **Enolasa Neuronal Específica (ENE)**, se obtuvo positividad en 19 feocromocitomas (76%), 13 presentaron inmunoreactividad débilmente positiva (52%), 5 moderadamente positivas (20%) y en un caso observamos positividad muy fuerte (4%).

El patrón de tinción más frecuente detectado fue el homogéneo. Un 15% presentaron una distribución en forma de células aisladas débilmente positivas.

Entre los 18 feocromocitomas esporádicos benignos estudiados, 14 presentaron tinción positiva a ENE (77,77%), once mostraron tinción débilmente positiva (61,11%), dos casos fueron moderadamente positivos (11,11%) y en un paciente la tinción fue fuertemente positiva (5,55%).

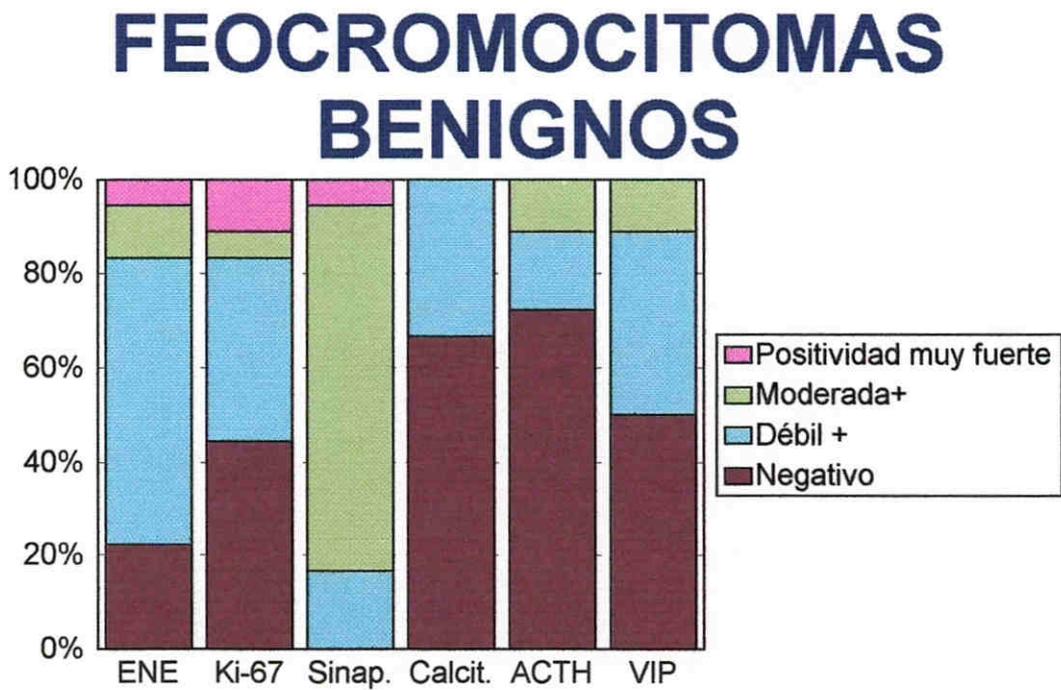
Cinco de los siete tumores malignos (71,42%), presentaron tinción positiva a ENE, siendo en tres casos con positividad moderada (42,85%) y en dos pacientes la positividad fue débil (28,57%).

El antígeno **Ki-67**, marcador de la proliferación celular, se expresó en 10 (40%) de los feocromocitomas esporádicos estudiados.

La tinción fue débilmente positiva en siete casos (28%), en uno (4%) moderadamente positiva y en dos casos (8%) con positividad muy fuerte.

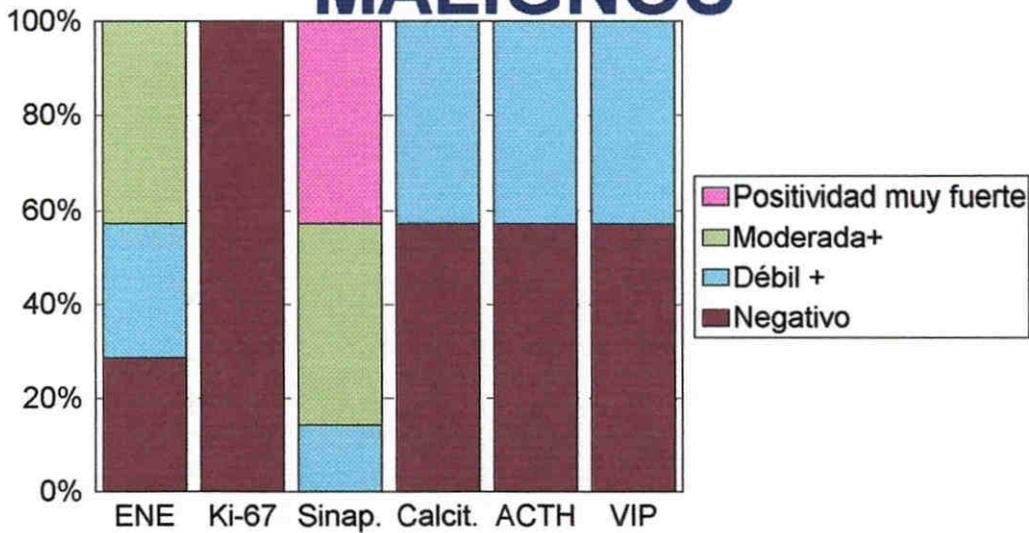
Diez de los dieciocho tumores benignos (55,55%), expresaron el protooncogén *Ki-67*, siete mostraron débil positividad (38,88%), uno moderada positividad (5,55%) y dos mostraron positividad muy fuerte (11,11%).

Entre los feocromocitomas esporádicos malignos del presente estudio ninguno expresó el antígeno Ki 67.



**Figura 6: Feocromocitomas benignos. Distribución inmunohistoquímica de diversos marcadores.**

# FEOCROMOCITOMAS MALIGNOS



**Figura 7: Feocromocitomas malignos. Distribución inmunohistoquímica de diversos marcadores.**

## IV.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

La variable determinante en el presente estudio, es la benignidad o malignidad de los feocromocitomas. Definimos como malignos aquellos casos en los que se constató la presencia de metástasis.

Con respecto al hecho de ser maligno o no serlo, (ser benigno) vamos a estudiar el resto de las variables, una a una, y detectar si hay diferencias significativas entre ambos grupos, con relación a esa variable estudiada, **análisis univariante**.

Analizaremos dos tipos de variables: de descripción y de predicción.

**A.- Variables de descripción:**

**1.- Demográficas y clínicas:**

Cuantitativas: Edad, HTA.

Cualitativas: Sexo, Neoplasia asociada, Miocardiopatía.

**2.- Morfológicas (Macro y microscópicas):**

Cuantitativas: Apoptosis, Mitosis.

Cualitativas: Localización, Invasión vascular, Infiltración de cápsula.

**B.- Variables de predicción:**

**1.- Marcadores incompletos:** Son aquellas variables en las que no poseemos datos de todos los casos. VAMA, HVA, Adrenalina y Noradrenalina.

**2.- Marcadores completos:** Poseemos datos de todos los casos. Corresponden a los marcadores inmunohistoquímicos, génicos o de otro tipo. C-erbB-2, c-myc, sinaptofisina, somatostatina, calcitonina, ACTH, VIP, ENE, c-fos, p ras, Ki 67.

Los marcadores completos, son las únicas variables a las que se puede someter a un análisis multivariante, mediante el cual obtendremos aquellas que mejor nos valdrán par calcular la probabilidad de malignidad del tumor.

## 1.- Estudio univariante:

a) **Variables cualitativas:** Hemos utilizado el test de la Chi-cuadrado de Mantel-Haenszel de tendencia lineal y el test exacto de Fisher con una o dos colas.

Comparamos la distribución de la variable en el grupo de los tumores benignos con el de los malignos y estudiamos si hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

Mediante estos test obtenemos la **ODDS RATIO** ó razón de riesgo, que es el riesgo de padecer una feocromocitoma maligno si se presenta la variable estudiada; el **intervalo de confianza al 95 %** y calculamos la **p**, considerando que hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, cuando el valor de ésta es  $< 0,05$ .

<b>Factor</b>	<b>Benignos</b>	<b>Malignos</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	<b>Casos/Total</b>	<b>Casos/Total</b>			
<b>Sexo= Hembra</b>	7 / 18	4 / 7	2,10	0.26-18,44	0,66
<b>Neoplasia Asociada</b>	0 / 18	3 / 7	Indefinida		<b>0,015</b>
<b>Miocardopatía</b>	4 / 18	2 / 7	1,40	0,13-13,84	1
<b>Extraadrenal</b>	5 / 18	0 / 7	0	0-2,73	0,27
<b>Feo.derecho</b>	11 / 18	3 / 7	0,48	0,05-3,91	0,66
<b>Feo.Izquierdo</b>	2 / 18	5 / 7	20	1,57-301,7	<b>0,007</b>
<b>Infiltración capsular</b>	6 / 18	7 / 7	Indefinida		<b>0,005</b>
<b>Invasión vascular</b>	4 / 18	6 / 7	21	1,55-1032,1	<b>0,007</b>

El presentar una neoplasia asociada, localización izquierda del feocromocitoma, infiltración capsular y la presencia de invasión vascular; conllevan un peor pronóstico en los pacientes afectos de feocromocitomas esporádicos.

**b) Variables cuantitativas:** Para comparar estas variables en el grupo de los tumores malignos con el de los benignos, utilizamos el test de Levene para igualdad de varianzas y obtenemos la **media ( $\chi$ )** y la **desviación típica ( $\sigma$ )** de la variable estudiada en ambos grupos, el **intervalo de confianza al 95%** y la **p**. Considerando que hay diferencias estadísticamente significativas en tre ambos grupos, en relación a la variable cuando el valor de p es  $<0,05$ .

<b>Factor</b>	<b>Benignos</b>	<b>Malignos</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P</b>
	$\bar{\chi}/\sigma$	$\bar{\chi}/\sigma$		
<b>EDAD</b>	39,22/16,38	42,14/13,82	-11,59;17,43	0,68
<b>VAMA</b>	38,36/32,15	14/2,70	-48,17;-1,53	<b>0,04</b>
<b>NORADRENALINA</b>	1,96/1,96	0,541/0,27	-2,853;0,003	<b>0,05</b>
<b>ADRENALINA</b>	0,01/0,015	0,03/0,045	-0,088;0,128	0,53
<b>HVA</b>	4,6/1,03	5/1,73	-3,55;4,351	0,73
<b>SINAPTOFISINA</b>	1,88/0,47	2,28/0,75	-0,11;0,913	0,12
<b>SOMATOSTATINA</b>	1,94/0,53	2,0/1,15	-1,018;1,129	0,90
<b>CALCITONINA</b>	1,66/0,48	1,0/0,81	-1,21;-0,123	<b>0,01</b>
<b>ACTH</b>	0,388/0,69	0,42/0,53	-0,568;0,647	0,89
<b>VIP</b>	0,611/0,698	0,42/0,53	-0,79;0,425	0,54
<b>ENE</b>	1,0/0,767	1,14;0,9	-0,598;0,883	0,69
<b>C-erbB-2</b>	1,33/0,59	2,71/0,48	0,85;1,90	<b>0,00</b>
<b>C-Fos</b>	0,27/0,57	0,57/0,53	-0,226;0,814	0,25
<b>c-myc</b>	1,94/0,80	2,57/0,53	-0,05;1,31	0,07
<b>P-ras</b>	1,33/0,59	1,28/0,48	-0,57;0,47	0,85
<b>Ki 67</b>	0,83/0,98	0,0/0,0	-1,61;-0,05	<b>0,03</b>
<b>APOPTOSIS</b>	204,0/162,5	267,8/254,7	-112,0;239,7	0,46
<b>MITOSIS</b>	1,72/2,60	1,0/1,52	-2,91;1,46	0,50
<b>HTA</b>	1,94/0,99	1,57/0,53	-1,20;0,45	0,36

La excreción urinaria de **VAMA** y **Noradrenalina**, la secreción de calcitonina por la tumoración y la expresión de *c-erbB-2*, conllevan un mayor riesgo estadísticamente significativo de presentar feocromocitoma esporádico maligno.

El factor de proliferación **Ki-67**, representa un factor pronóstico benigno o un factor de protección.

La **sinaptofisina** y el *c-myc*, tienen tendencia a ser más elevados en los malignos, pero sin alcanzar las diferencias entre ambos tumores significación estadística.

## **2.- Estudio Multivariante.**

Mediante regresión logística, se diseña un modelo para calcular la probabilidad de ser maligno.

Las dos variables más válidas fueron la expresión del protooncogén *c-erbB-2* y la secreción de **sinaptofisina** por el tumor.

Analizando estas dos variables en cada caso estudiado, obtendremos la probabilidad de presentar feocromocitoma esporádico maligno.

Predecir la malignidad del feocromocitoma mediante estas dos variables, en la presente serie, tiene una **sensibilidad** del 100%, una **especificidad** del 94%, un **valor predictivo positivo** del 87,5% y un **valor predictivo negativo** del 100%.

## **DISCUSIÓN**

Como se ha referido en la introducción, hoy día se intentan buscar marcadores predictivos en el comportamiento biológico que puedan tener los feocromocitomas esporádicos, en base a analizar la expresión de distintos protooncogenes y genes supresores, que nos permitan además, establecer un diagnóstico precoz y por tanto, un tratamiento adecuado en aquellos que pudieran dar lugar a lesiones metastásicas.

Por otra parte, hemos analizado no sólo los datos relativos a distintos marcadores génicos, sino también, otros marcadores microscópicos, clínicos, hormonales etc.

En este apartado, lógicamente lo que haremos será cotejar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los referidos en los distintos estudios que aparezcan en la bibliografía consultada por nosotros.

Con referencia al análisis de las variables clínicas obtenidas para nuestro grupo de estudio se pueden establecer diversas consideraciones.

En cuanto al **SEXO**, la proporción es discretamente mayor en varones que en mujeres, datos que son comparables a los obtenidos por Robbins.<sup>17</sup>

Del segundo parámetro analizado, que fue la **EDAD** de presentación de estos feocromocitomas y que en nuestro estudio está alrededor de los 40 años, coincide igualmente con lo referido por otros autores en otras series,<sup>146,147</sup> pero en estos trabajos, si bien consideran que la máxima prevalencia es en la 5ª década, tenemos que tener en cuenta que ellos incluyen no sólo los feocromocitomas esporádicos sino también los feocromocitomas familiares.

Debemos resaltar en este apartado, que al igual que en otras series, el 22% de los tumores aparecen en menores de 20 años.<sup>25,30,148</sup>

En cuanto a la clasificación de estos tumores en **malignos** y **benignos** y habiendo antes mencionado que el único rasgo patognomónico de malignidad era la presencia de metástasis, en nuestra serie de veinticinco casos, siete tenían afectación a distancia, por lo que fueron considerados como malignos y el resto no presentaron afectación a distancia.

Si hacemos la diferencia entre ambos grupos, la media de edad varía aunque no encontramos significación estadística en tre ellas. Hecho éste, que también es aceptado en otros trabajos.<sup>25,30,148</sup>

La **Hipertensión arterial** mantenida fue el dato clínico más habitual de presentación de la tumoración y por tanto, el dato que ante la ausencia de otras alteraciones, hicieron pensar en la posibilidad de una neoplasia suprarrenal.

Esta hipertensión arterial, aparece en el 88% de los casos, cursando con crisis hipertensivas con una mala respuesta al tratamiento redutensor, es decir, que se comportaba como una hipertensión maligna.

Estas crisis paroxísticas hipertensivas, fueron el dato clínico que con más frecuencia aparece reflejado en los múltiples trabajos como cuadro clínico inicial de presentación de un feocromocitoma.<sup>39, 149</sup>

Al igual que en nuestra serie, un alto porcentaje de pacientes, presenta repercusiones sistémicas de la hipertensión en forma de retinopatía, arteriopatía etc. que evidenciamos en numerosos casos y que parece que son debidas a la acción de las catecolaminas segregadas por el tumor.<sup>52</sup>

Un apartado especial merece comentar las manifestaciones cardíacas aparecidas en el feocromocitoma, pudiéndose observar que existe una **Miocardopatía** severa en el 28% de los pacientes, miocardopatía que se postula sería debida a la acción directa de las catecolaminas sobre el corazón.

Sin embargo, nosotros no encontramos una relación estadísticamente significativa, entre los niveles de catecolaminas y la aparición de la miocardiopatía, por lo que nos cuestionamos que exista una acción directa de esta amina sobre las células musculares cardíacas, pensando que quizás halla una mayor relación con otros factores como puede ser la susceptibilidad individual.

Por otra parte, al comparar el grupo de los tumores benignos con los malignos tampoco obtenemos datos que nos hagan pensar que la miocardiopatía sea un signo de peor o mejor pronóstico; es decir, que no está relacionada con la malignización del tumor.

Las **alteraciones metabólicas** registradas y referidas en otros trabajos,<sup>39</sup> no son significativas en nuestro grupo de estudio, ya que sólo dos de los veinticinco pacientes presentaron Diabetes Mellitus y un número reducido fueron obesos, aunque esta obesidad no pudimos aclarar si era debida a sobrepeso o respondía a alteraciones de tipo Cushing.

En relación a la excreción de **catecolaminas por la orina**, como referimos en los resultados, hemos encontrado que existe una relación estadísticamente significativa entre los valores de ácido Vanilmandélico (VAMA) y Noradrenalina con la malignidad tumoral. Las cifras de ambas catecolaminas mantienen unos niveles paralelos, y así observamos, que tanto el VAMA como la Noradrenalina, muestran valores superiores a las cifras consideradas como normales, aunque en los tumores benignos los valores de excreción de estas catecolaminas son muy superiores a los de los tumores malignos. Por lo que en realidad, la alta excreción de VAMA y Noradrenalina no supondría un factor de riesgo en cuanto a la malignidad, sino más bien, un factor protector.

Estos datos no son comparables a los descritos por otros autores, dado que como es sabido, existe una gran variabilidad de los valores de estas sustancias a lo largo del día, por lo que realmente para comparar nuestros datos con otros,

necesitamos saber en que condiciones estaba el paciente en el momento de la obtención de la muestra, sobre todo, habría que conocer si la detección la hiciéramos en sangre en lugar de en orina, si la recogida se ha hecho inmediatamente después de una crisis hipertensiva.<sup>25,26,150,151</sup>

Los datos referidos a las cifras de ácido Homovanílico y Adrenalina en orina no muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de los malignos y el de los benignos.

Entre los hallazgos macroscópicos, el primer dato estadísticamente significativo es la **localización**, pudiéndose considerar que la afectación en el lado izquierdo supone un mayor riesgo de malignidad.

Al mismo tiempo, podríamos decir que la bilateralidad también supone un peor pronóstico de la lesión, pero debemos tener en cuenta que sólo disponemos de un caso de bilateralidad por lo que creemos que estos datos no son concluyentes.

En cuanto a los hallazgos microscópicos, son rasgos de mal pronóstico con significación estadística, tanto la **infiltración capsular** como la **invasión vascular**, datos que son superponibles a los obtenidos por Linnoila,<sup>59</sup> quien además de la infiltración e invasión, añade que otro dato indicativo de malignidad es el diámetro tumoral.

Aunque la mayoría de los autores coinciden con nuestros resultados, otros parámetros señalados como posibles rasgos histológicos predictivos serían la celularidad tumoral, el diámetro celular, la nodularidad etc.<sup>36,59, 152</sup>

En nuestra serie ni la **necrosis** ni la **hemorragia** representan parámetros estadísticamente significativos.

El **pleomorfismo nuclear** y el **índice mitótico**, que en otros tumores, como por ejemplo en el cáncer de mama, son considerados como factores de malignidad, en éste, al contrario de lo esperado, ninguno de los dos representan un peor pronóstico del tumor.<sup>59,25</sup>

Para finalizar con el estudio de los rasgos microscópicos, señalaremos que la **apoptosis**, tampoco se pudo correlacionar con el comportamiento del tumor.

Con respecto al estudio inmunohistoquímico de diversos marcadores génicos en nuestra serie, debemos destacar las siguientes consideraciones:

La sobreexpresión del protooncogén **c-erbB-2**, que codifica una proteína que actúa como receptor de membrana de factores de crecimiento u hormonas,<sup>100, 153</sup> se ha revelado en nuestro estudio como un protooncogén esencial en el desarrollo del feocromocitoma apareciendo en casi la totalidad de los casos, el 96% de las muestras, siendo posiblemente el oncogén más relevante para la transformación neoplásica de las células medulares suprarrenales, posiblemente condicionado por su íntima implicación con las células adrenales ya que se ha demostrado que el protooncogén *c-erbB-2* es esencial en el desarrollo neural,<sup>154</sup> del cual forma parte la médula adrenal, actuando como receptor de la herregulina /NDF (Neural Derived Factor) y de una familia de factores de crecimiento glial llamados GDF (Glial cell Growth Factor)<sup>97</sup> demostrándose a su vez su activación en la mayoría de los tumores neuroectodérmicos.<sup>153,155</sup>

El haber obtenido una débil positividad para c-erbB-2 en las células medulares no neoplásicas en nuestras preparaciones, además de corroborar lo antes expuesto y coincidir con lo que señalaban De Potter y cols<sup>156</sup> de que se expresaba aunque a niveles muy bajos en tejidos adultos; nos dio la oportunidad de pensar que era un acontecimiento precoz en la oncogénesis del feocromocitoma, aunque posiblemente insuficiente, que provocaría una ventaja proliferativa mantenida sobre el resto de las células medulares que daría lugar a la transformación maligna.

A favor de esta hipótesis, iría un estudio realizado por Nikitin en el cual la oncogénesis inducida por N-etil-N-nitrosaura (EtNU), en células de Schwann del sistema periférico de rata, estaría desencadenado por la activación mutacional del oncogén *erbB-2*, actuando por tanto como elemento precoz.<sup>157</sup>

La acción que la activación del protooncogén *c-erbB-2*, provocaría sobre los feocromocitos sería la de proliferación delular descontrolada, lo cual justificaría que en el análisis discriminante estadístico encontrásemos una relación directa entre la expresión de *c-erbB-2* y la malignidad en el feocromocitoma.

Otro de los protooncogenes relacionado con la malignidad, aunque no de forma estadísticamente significativa es el **c-myc**, que si que muestra una tendencia a ser más elevado en las lesiones malignas.

Posiblemente, la sobreexpresión de ambos protooncogenes juntos, *c-erbB-2* y *c-myc*, sería un factor más fiable en cuanto a la predicción evolutiva.

Mediante el análisis estadístico de nuestros resultados, encontramos una relación lineal entre la expresión de *c-myc* con la expresión del protooncogén *c-erb-2*.

Entre otros datos de interés que reveló el análisis del oncogén *c-myc* en los feocromocitomas de nuestro estudio, se encontraba que las células medulares normales, presentaron una débil positividad para *c-myc*. Este hallazgo coincide con lo señalado por otros autores que demuestran que *c-myc* se expresa en los tejidos proliferantes no tumorales,<sup>158</sup> e incluso que la expresión de *c-myc* está en ocasiones regulada por el estímulo de hormonas y factores de crecimiento, tal es así que se demostró mediante el estudio de cultivos celulares que la TSH, regula via AMP cíclico, la expresión del protooncogén *c-myc* en células tiroideas normales. Aunque, como era de esperar, los niveles de *c-myc* en las células tumorales sobrepasan con creces a los de la médula suprarrenal acompañante.<sup>159</sup>

Un segundo hallazgo fue la localización citoplásmica de la proteína del protooncogén *c-myc* en las células del feocromocitoma. Aunque normalmente la localización de la proteína que codifica el gen *c-myc* es nuclear, revelando en el análisis inmunohistoquímico un patrón nuclear, también se demuestra la existencia de una tinción citoplásmica para *c-myc* en algunos tumores, como los adenocarcinomas renales y los de colon.<sup>160,161</sup> El valor de este hallazgo es aún motivo de controversia.

En un estudio sobre tumores de colon Royds demostró mediante microscopía electrónica, que en la mucosa colónica las proteínas *c-myc* estarían localizadas en los poros nucleares de las células proliferantes, mientras que en las células neoplásicas éstas se encontrarían asociadas a los polirribosomas y ocasionalmente a las mitocondrias.<sup>107</sup> Para explicarlo, propone dos posibles teorías: la primera es que su localización citoplásmica es debida a que tienen una acción específica a ese nivel en las células tumorales, y la alternativa es que dicha localización es sólo reflejo de la imposibilidad de alcanzar el núcleo celular, ya sea por alteración en la estructura de *c-myc* con la pérdida del extremo C-terminal, alteración del mecanismo de transporte nuclear o modificaciones en el factor de acoplamiento nuclear. Sea como fuere, el resultado final es la acumulación de la proteína del protooncogén *c-myc* a nivel citoplásmico, aunque serán necesarios futuros estudios para aclarar esta cuestión.

Del resto de los marcadores génicos utilizados y con referencia a los protooncogenes **c-fos** y **bcl-2**, debemos decir que, encontramos una expresión muy pobre en ambos casos, por lo que no ha sido posible relacionarlos con el pronóstico de la enfermedad.

Por otra parte, el gen supresor **p-53**, al ser negativo en todos los casos pudiera demostrar que no está relacionado con dicha neoformación.

La mutación del *p-53* se piensa que está implicada en el crecimiento celular y en el desarrollo y progresión de los tumores debido a la pérdida de su actividad supresora tumoral y de su cooperación con otros oncogenes.<sup>115</sup> Por lo tanto, y en vista de su trascendencia, es lógico que nos planteemos la significación de la ausencia de mutación del antioncogén *p-53* en los feocromocitomas estudiados.

La primera duda que podría surgir es de técnica y metodología, pero es poco razonable teniendo en cuenta que, primero, los controles para *p-53* fueron positivos en las sucesivas tandas de preparaciones, y segundo, se ha demostrado que las técnicas de fijación tisular y de parafinación no provocan enmascaramiento ni daño en la antigenicidad de la proteína *p-53*.<sup>162</sup>

Se ha demostrado por técnicas de hibridación in situ de detección directa en el DNA y de correlación entre inmunohistoquímica y técnicas de PCR (Polimerasa Chain Reaction) que los hallazgos por inmunohistoquímica de *p-53* en general se correlacionan bien con los eventos a nivel cromosómico.<sup>95</sup>

Una vez matizadas las cuestiones metodológicas, pasaremos a preguntarnos sobre la significación última de la no implicación de *p-53* en la génesis del feocromocitoma.

La función de la proteína *p-53* es múltiple y depende de la especie y tejido de la célula en estudio,<sup>163</sup> además se ha visto que las alteraciones génicas que llevan a la modificación del antioncogén *p-53* en cada neoplasia están relacionadas con el origen embrionario de la célula precursora,<sup>164</sup> de forma que en los tumores epiteliales y neurógenos sería una delección la que provocaría la alteración de *p-53*, mientras que en los tumores hematopoyéticos y sarcomas serían las traslocaciones. La *p-53*, no participa en la tumorigénesis de otros tumores neuroendocrinos, por tanto, es lógico pensar que la falta de activación del antioncogén *p-53* en los feocromocitomas está condicionado por su origen embriológico.<sup>165</sup>

Las mutaciones en *p-53*, tienen un efecto importantísimo en la aparición de cánceres como resultado de alterar varios procesos fundamentales: incrementan la capacidad de proliferación celular, disminuyen la apoptosis y aumentan la inestabilidad génica,<sup>97</sup> pero lo que es más importante, parece que *p-53* no sólo estaría relacionada con la capacidad proliferativa sino con la angiogénesis y aparición de metástasis.

La angiogénesis es esencial para la diseminación a distancia del tumor, así las células que son angiogénicas tendrán más posibilidades de dar lugar a metástasis tras su paso a la circulación ya que su potencial angiogénico le permitirá un más rápido crecimiento al inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos allá donde se establezca.

Se describe, que formas mutadas de *p-53* son capaces de inducir la expresión del gen del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) que por un mecanismo paracrino estimularían a las células estromales provocando la proliferación endotelial, a la vez que actúa como inductor de la permeabilidad de los vasos, circunstancia que favorece la entrada de las células tumorales en los vasos y la subsiguiente formación de metástasis. Además, se alteraría la producción de trombospondina (TSP), un componente de la matriz extracelular que es expresada en las células con proteína normal *p-53* e inhibe la angiogénesis y migración de las células endoteliales.<sup>166,97</sup>

A todo ello, hay que sumar que la alteración de la proteína *p-53*, va a facilitar la formación de metástasis promoviendo la supervivencia de la célula tumoral en la circulación mediante la inhibición de la apoptosis (muerte celular programada),<sup>167</sup> de forma que se demuestra que aquellas células que pierden el contacto con su entorno natural no sobreviven, sino que van a la muerte celular por un mecanismo autodirigido de apoptosis,<sup>168</sup> lo cual no ocurriría en estas células mutadas.

Thompson, comprobó que los tumores de próstata en ratones inducidos por activación de *ras* + *myc*, no son metastásicos si se conserva la proteína *p-53* normal (wild type *p53* o forma de *p53* salvaje), mientras que sí son metastásicos en animales sin esa proteína (*p53*<sup>-/-</sup>).

Lógicamente, los mecanismos últimos de de la producción de metástasis son más complejos e implican otra serie de genes cuya función debe ser un dilucidada como: el gen nm 23 (non metastatic clon 23), el gen 21 y los genes MTS1 y 2; que actuarían como genes supresores inhibidores de la proliferación celular y de la capacidad metastásica.<sup>169,97</sup>

Todo lo anteriormente expuesto, también tendría implicaciones en el caso de los feocromocitomas, porque posiblemente nos esté dando alguna de las claves sobre su historia natural. En base a nuestros resultados, podemos suponer que la preservación del antioncogén *p-53* esté condicionando el bajo índice de metástasis de estos tumores, una latencia mayor en las recidivas y una supervivencia muy variable a pesar de la existencia de metástasis, de modo que algunos de estos pacientes tienen una larga supervivencia a pesar de padecer metástasis a distancia, todo ello, reflejando un comportamiento menos agresivo y una evolución más indolente.<sup>25,52</sup>

En relación al análisis discriminante del protooncogén *ras*, con respecto al grupo de benignos y malignos, no encontramos una correlación estadísticamente significativa, a pesar de que se expresa en casi el 100% de ambos grupos tumorales. Por lo que, no se puede considerar como factor predictivo, a diferencia de lo que ocurre en líneas celulares de experimentación , donde se induce transformación maligna y aparición de metástasis.<sup>123,129</sup>

En cuanto a los marcadores hormonales, el único que muestra significación estadística es la **calcitonina**, que es positiva en el 30% de los tumores benignos y en el 43% de los malignos.

Estos datos, difieren algo de los referidos en otras series,<sup>59,77</sup> en las cuales, la inmunoreactividad del tumor para calcitonina sólo alcanzó el 23%.

Del resto de los marcadores estudiados, como son la **cromogranina**, que era positiva en toda la serie y la **somatostatina**, que fue negativa en el 90% aproximadamente, no se demostró en el análisis estadístico que intervinieran como marcadores pronósticos.

La **sinaptofisina**, si bien no es un marcador pronóstico per se, su grado de inmunopositividad unida a la sobreexpresión de *c-erbB-2*, constituyen juntos un marcador más fiable que si son valorados independientemente.

Estos datos desgraciadamente, no los podemos comparar con otros, ya que no hemos encontrado en la literatura revisada, ningún estudio donde se complementen los marcadores génicos con los hormonales.

Por último, y con referencia al Ki 67 o factor de crecimiento, como indicador del grado de proliferación celular, son positivos en un alto porcentaje de los tumores benignos con mayor o menor intensidad y como ya hemos referido en los resultados, negativo en todos los casos de feocromocitomas malignos, esto demuestra por una parte, que los feocromocitomas esporádicos malignos tienen una capacidad proliferativa in situ baja, pero no demuestra su posible capacidad metastásica.

Por otra parte, aunque en aparente contradicción con lo publicado sobre otros tumores, quizás aquí sea justificable por que los rasgos microscópicos como por ejemplo el índice mitótico, no comporta signos predictivos en esta neoplasia, en la cual los rasgos morfológicos son insuficientes para establecer el diagnóstico de malignidad.

# **CONCLUSIONES**

1.- Los feocromocitomas esporádicos, tienen una incidencia mayor en los **varones** y la edad media de presentación es de **40 años**.

2.- La **Hipertensión Arterial**, a pesar de ser el cuadro clínico más frecuente de presentación del tumor, no muestra diferencias en cuanto al estadio de afectación orgánica entre tumores benignos y malignos.

3.- La **Miocardiopatía** y las **alteraciones metabólicas**, como afectaciones concomitantes aparecen por igual en ambos tipos de tumores.

4.- La **localización** en la glándula suprarrenal izquierda, supone un factor de riesgo en cuanto al comportamiento maligno del tumor.

5.- De los datos microscópicos, únicamente la **infiltración capsular** y la **invasión vascular**, pueden considerarse como factores predictivos de malignidad.

6.- Los valores elevados del **VAMA** y **Noradrenalina** en orina, pueden ser considerados como factores de protección ante la malignización del tumor.

7.- La demostración de secreción de **Calcitonina** por las células tumorales, supone un factor predictivo débil de posible malignidad.

8.- De todos los marcadores génicos, el único que podría considerarse como un factor de mal pronóstico sería la sobreexpresión del **c-erbB-2**.

9.- La expresión del protooncogén **c-myc**, aunque no estadísticamente significativa, para diferenciar entre tumores benignos y malignos, sí que muestra una tendencia más elevada en lesiones con comportamiento metastásico.

10.- De entre todos los otros marcadores utilizados, hormonales o no, solo la **sinaptofisina**, podríamos considerarla como factor predictivo, incrementándose además su valor, cuando se une a la expresión del *c-erbB-2*.

11.- Como resumen de todo lo anterior, aquel feocromocitoma esporádico, que tuviera una localización **izquierda**, microscópicamente presentara **infiltración capsular e invasión vascular**, que expresara conjuntamente el *c-erbB-2* y el *c-myc*, y que fuese secretor de **sinaptofisina**, sería aquel que tuviera el peor pronóstico en cuanto a supervivencia.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---

<sup>1</sup> **Regidor E, Rodríguez C, Gutiérrez-Fisac JL.** Indicadores de Salud. Tercera Evaluación en España del programa regional Europeo Salud Para Todos. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo 1.995.

<sup>2</sup> **Parkin DM, Laara E, Muir CS.** Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancer in 1.980. *Inter Journal Cancer* 1.988; 41: 184-197.

<sup>3</sup> **Hakulinen T, Hansluwka H, López A, Nakada T.** Global mortality patterns by cause of death in 1.980 *Inter Journal Epidemiologyc* 1986; 15: 226-233.

<sup>4</sup> **International Agency for Research on Cancer.** Annual Report 1.979. World Health Organization-IARC, Lyon 1.979.

<sup>5</sup> **Cole P, Rodu Brad.** Declining cancer mortality in the United States. *Cancer* 1.996; 78 (10): 2045-2048.

<sup>6</sup> **Segura Benedicto A.** La evolución de la mortalidad en España. *Med Clin* 1.996; 107: 458-459.

<sup>7</sup> **Banegas Banegas JR, Villar Álvarez F, Martín Moreno JM, Rodríguez Artalejo F, González Enríquez J.** Relevancia de la mortalidad por enfermedades del aparato circulatorio en España. *Rev Clin Exp.* 1.992; 190: 321-327.

<sup>8</sup> **Ronda E, Regidor E.** Mortalidad según causa de muerte en 1.986 y evolución del periodo 1975-86 en España. *Bol Epidem Sem* 1.991; 1879:17-19.

<sup>9</sup> **Regidor E, Iñigo J, Sendra JM, Gutiérrez-Fisac JL.** Evolución de la mortalidad por las principales enfermedades crónicas en España, 1.975-88 *Med Clin* 1.992; 99:725-728.

- 
- <sup>10</sup> **Plasencia A.** Accidentes de tráfico en España: a grandes males, ¿pequeños remedios? *Quadern CAPS* 1.992; 17: 9-33.
- <sup>11</sup> **Granizo JJ, Guallar E, Rodríguez Artalejo F.** Análisis de los efectos edad-período-cohorte en la mortalidad por suicidio en España entre 1.959 y 1.989. *Gac Sanit* 1.993; 7(Supl): 72-73.
- <sup>12</sup> **Castilla J, Iñigo J, Sendra JM, Tello O.** Años potenciales de vida perdidos por síndrome de inmunodeficiencia adquirida en España, 1981-1990. *Med Clin* 1.993; 100: 245-248.
- <sup>13</sup> **Alonso I, Regidor E, Rodríguez C, Gutiérrez-Fisac JL.** Principales causas de muerte en España, 1992. *Med Clin* 1.996; 107: 441-445.
- <sup>14</sup> **García LA, Cayolla L.** Years of potential life lost: applications of an indicator for assessing premature mortality in Spain and Portugal. *World Health Statistics Quarterly* 1.989; 42: 50-56.
- <sup>15</sup> **Federación de Sociedades Españolas de Oncología (FESEO).** Libro blanco de la Oncología en España. Informe para la planificación global. Editorial JIMS 1.987.
- <sup>16</sup> **Ramírez Fernández R.** Evolución de la mortalidad por cáncer en Andalucía, 1975-1985. Sevilla, Junta de Andalucía. Consejería de Salud. Dirección General de Ordenación Sanitaria, 1.992.
- <sup>17</sup> **Robins SL, Vinay K, Cotran Rs.** Patología estructural y funcional. 4ª edición. Madrid, Interamericana Mc Gray Hill, 1990.
- <sup>18</sup> **Hugo Galera Davidson.** Estudio estructural de las glándulas adrenales. Universidad de Sevilla, 1987.

- 
- <sup>19</sup> **Helman Lj, Cohen Ps, Averbuch SD.** Neuropeptide Y expresión distinguishes malignant from benign pheochromocytoma. *J Clin Oncol* 1989; 11:1720-1725.
- <sup>20</sup> **Glennner GG, Grimley PM.** Tumors of the extraadrenal paraganglio system (including chemosreceptors) En AFID editores. *Atlas of Tumor Pathology*. Washinton DC 1974; 9:270-294.
- <sup>21</sup> **Imai, Finahashi H, Sato Y, Nuzaki H, Vede M y Takagi H.** Multiple functioning paraganglioma associated with polycythemia. *J Surg Oncol* 1984; 39:279-282.
- <sup>22</sup> **Lack EE.** Adrenal medullary hiperplasia and pheochromocytoma. Lack EE. Editores. *Pathology of the adrenal glands*. New York: Churchill Livingstone, 1990: 173-235.
- <sup>23</sup> **Bloom W, Fawcet DW.** Tratado de Histología 7ª edición. Barcelona, de Labor S.A. 1978.
- <sup>24</sup> **Orth Dn, Kovacs Wj, Dobold Cr.** The adrenal cortex. En Wilson Jd, Foster DWs, eds. *Williams textbook of endrocrinology*, 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1992; 489-620.
- <sup>25</sup> **Lack EE.** Tumors of the adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. En: *Atlas of tumor Pathology*. AFIP; 1995.
- <sup>26</sup> **DeLellis RA.** The adrenal gland. En *Diagnostic surgical pathology*, de Stembert. Raven Press Ltd, New York, 1994.
- <sup>27</sup> **Robin SL.** Médula suprarrenal. Feocromocitoma. Saunders editores. 2<sup>nd</sup> edición. *Patología estructural y funcional*. Interamericana 1984; 1299-34.
- <sup>28</sup> **Falkmen S, Hansson G.** Phaeochromocytomas and paragangliomas. En *Diagnostic Histopathology of neuroendocrine tumours*. Polak de. Churchill Livinstone. London. 1993.

- 
- <sup>29</sup> **Tischler AS, Lee Yc, Palmann RL.** Production of ectopic vasoactive intestinal peptide-like and neurotensin-like immunoreactivity in human pheochromocytoma cells clusters. *J Neurosci* 1984; 4:1398-1404.
- <sup>30</sup> **Tischler AS.** The adrenal medulla and the extra-adrenal paraganglia. Functional endocrine pathology. Blackwell Scientific. Oxford 1991.
- <sup>31</sup> **Bishop AE, Powder RF, Polack JM.** Markers of neuroendocrine differentiation. *Pathology, Reserch and Practice.* 1988; 183:176-187.
- <sup>32</sup> **Carney JA, Sizemore GW, Sheps SG.** Adrenal medullary disease in multiple endocrine neoplaisa, type 2. *Am J Clin Pathol* 1976; 66; 279-290.
- <sup>33</sup> **Naeye RL.** Brainstem and adrenal abnormalities in sudden infant death syndrome. *Am J Clin Pathol* 1976; 66:526-530.
- <sup>34</sup> **Case records of the Massachussetts General Hospital.** Case46-1988; Case 45-1989. *N Engl J med* 1988; 319:1336-1343. *N Engl J Med* 1989; 321:1316-1329.
- <sup>35</sup> **Guerrero, LA.** Diagnostic and Therapeutic approach to incidental adrenal mass. *Urology,* 1985; 26:435-440.
- <sup>36</sup> **Medeiros LJ, Wolf BC, Balogh K, Federman M.** Aadrenal pheochromocytoma: a clinicopathological review of 60 cases. *Hum Pathol* 1985; 16:580-589.
- <sup>37</sup> **Frankel F. E.** In fall von doppel setigen volling latent verlaraferien. Weben incretima and gleichzeitiger negnuts int veranderunger and circulaton sopporrat and retunsts. *Virchows Arch (A)* 1986; 103:244-263.

- 
- <sup>38</sup> **Beard CM, Sheps SG, Kurtland LT.** Occurrence of pheochromocytoma in Ronchester MINNESOTA, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc* 1983; 58:802-804.
- <sup>39</sup> **Lansberg L, Young JB.** Catecholamines and the adrenal medulla. En: Wilson Jd, Foster DW, eds. *Williams: textbook of endocrinology*. Filadelfia: WB Saunders 1992; 621-705.
- <sup>40</sup> **Said S, Mult V.** Vasoactive intestinal Peptide. En Said editores. *Immunochemistry*. New York, Raven Press 1982; 230-235.
- <sup>41</sup> **Kaplan RA, Hellenten S y Alou V.** Evaluation of the Hypertensive child. *Child Nephrol Urol* 1992; 12:106-12.
- <sup>42</sup> **Edery P, Lyonnet S, Mulligan Lm, y cols.** Mutation of the RET proto-oncogene in Hirschsprung's disease. *Nature* 1994; 367:378-380.
- <sup>43</sup> **Mulligan Lm, Gardner E, Smith y cols.** Genetic events in tumor initiations and progression in multiple endocrine neoplasia type 2. *Genes Chromosom Cancer* 1993, 6:166-177.
- <sup>44</sup> **Carney JA.** The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma. *Mod Pathol* 1994; 7:324.
- <sup>45</sup> **Kaufman Bh, Telander RL, Van Heerden JA, Zimmerman D, Sheps Sg, Dawson B.** Pheochromocytoma in pediatric age group: current status. *J Ped Surg* 1983; 18:879-884.
- <sup>46</sup> **Quissel B, Mohammed A, Barner JH, Hekani N.** Malignant phaeochromocytoma in childhood: Report of a case with familial neurofibromatosis *Med Pediatr Oncol* 1979; 7:327-33.

- 
- <sup>47</sup> **Tischler AS, Mobtaker H, Kwan PW y cols.** Hypertrophy of pheochromocytoma cells treated with nerve growth factor and activators of adenilate cyclase. *Cell Tissue Res* 1987; 249:161-169.
- <sup>48</sup> **De Lellis RA, Tischler AS, Wolfe HJ.** Multidirectional differentiation in neuroendocrine neoplasm. *J Histochem Cytol* 1983; 32: 899-904.
- <sup>49</sup> **Inagaki S, Kubota Y, Kitos.** Immunoreactive atrial natriuretic polypeptides in the adrenal medulla and sympathetic ganglic. *Regul Pept* 1986; 15: 249-260.
- <sup>50</sup> **Mink W, Clemens A, Bell J, Dick H.** Malignant peripheral nerve sheath tumor and pheocromocytoma: A composite tumor of the adrenal. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112: 266-270.
- <sup>51</sup> **Van Heerden Ja, Sheps SG, Hamberger B, Sheedy PFII, Poston JG, Remine WH.** Pheochromocytoma: current status and changing trends. *Sugery* 1982; 91:367-373.
- <sup>52</sup> **Foz M.** Enfermedades de las glándulas suprarrenales. En Farreras-Rozman, *Medicina Interna. De Doyma* 1992; 213-2116.
- <sup>53</sup> **Harrison.** Feocromocitoma. Mc Graw Hill editores. *Principios de medicina interna. Interamericana* 1992; 2:2016-2025.
- <sup>54</sup> **Manger Wm, Gridfford RW JR.** Pheochromocytoma. Manger Editores. *Endocrinal Pathology. Springer Verlag* 1977; 1220-25.
- <sup>55</sup> **Sikriwi, Varndell MI, Hamdqa.** Medullary carcinoma of the thyroid; An immunocytochemical and histochemical study of 2,5 cases using eight separate markers. *Cancer* 1985; 56:2481-91.

- 
- <sup>56</sup> **Benarroch EE.** Neuropeptides in the sympathetic system: presence, plasticity, modulation and implications. *Ann Neurol* 1994; 36:6-13.
- <sup>57</sup> **Linnoila IR, Lack EE, Steingberg Sm, Keisre Hr.** Decreased expression of neuropeptides in malignant paragangliomas: An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1988; 19:41-50.
- <sup>58</sup> **Yamaketa N, Sartoli M, Marcado Asis Lb, Kitade M, Morita H, Yasuda K.** Asymptomatic adrenal tumors; 386 cases in Japan including on 7 cases. *Endocrinol Jpn* 1990; 37 Suppl 5: 671-84.
- <sup>59</sup> **Linnoila IR, Keisre HR, Steinberg SM, Lack EE.** Histopathology of benign versus malignant sympathoadrenal paragangliomas. Clinicopathologic study of 120 cases including unusual histologic features. *Hum Pathol* 1990; 21; 1160-1180.
- <sup>60</sup> **O'Connor DT, Burton D y Deftos LJ.** Chromogranin A: Immunohistology reveals its universal occurrence in normal polypeptide hormone producing endocrine glands. *Life Sci* 1983;33:1657-1663.
- <sup>61</sup> **De la Torre JC and Surgeon JW.** A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. *Histochem* 1976;49:81-93
- <sup>62</sup> **Hassom J, Monges G, Girard P.** Immunohistochemical study of pheochromocytomas. Aneuploidy investigation of methionine enkephalin, vasoactive intestinal peptide, somatostatin, corticotropin, betaendorphin and calcitonin immunohistoquímicos 16 tumors. *Am J Pathol* 1984; 114:56-63.
- <sup>63</sup> **Lloyd RV, Wilson BS, Kovacs K; Ryan N.** Immunohistochemical localization of chromogranin immunohistoquímicos human hypophysis and pituitary adenomas. *Arch Pathol Lab Med (B)* 1985;109:515-7

- 
- <sup>64</sup> **Miguel F. Herrera MD, Elaine Stone, MD.** Pheochromocytoma producing multiple vasoactive peptides. *Arch Surg* 1992;127:105-108.
- <sup>65</sup> **Wiston E. Gould M.D. and Sheldon C. Sommers MD.** Adrenal medulla and paraganglioma. Sommers editores. *Endocrine Pathology*. Lippicot 1986:473-496.
- <sup>66</sup> **W. Schimd B, Dock Hou-Dwornezak, A. Fahrenkaum R.** "Chromogranin A, secretogranin II and vasoactive intestinal peptide immunohistoquímicos pahechromocytomas and ganglioneuromas" *Histopathology* 1993;22:527-533.
- <sup>67</sup> **Erikson ,H. Aurber K. Oberg V.** A polyclonal antisuerum against chromogranin A and B a new sensitive marker for neuroendocrine tumors. *Acta Endocrinol (Copenh)*1990;122 Suppl 2:145-55.
- <sup>68</sup> **Roncalli M. Springall Jm, Varndell I.** Oncoprotein immunoreactivity immunohistoquímicos human endocrine tumours. *J Pathol* 1991; 163:117-127
- <sup>69</sup> **Rack K, Pirret F, Gasc JM, Guyene TT, Corrol V.** Coexpression of renin angiotensinogen and their messenger ribonucleic acids immunohistochemival arenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 75: 730-7.
- <sup>70</sup> **Schmechel D, Marangos PJ, Brightmann.** Neurons specif enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature* 1978; 276: 834-836.
- <sup>71</sup> **Lloyd IR and Warner TF.** Immunohistochemistry of neuron specific enolase. De Lellis editores. *Advances in Immunohistochemistry*. Lippicot 1986;1:100-150

- 
- <sup>72</sup> **Chejfe CG, Grimelius L, Jacobson B, Rodensjo M, Wiedermann B, Franke WW.** Synaptophysin : A new marker for pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Sur Pathol* 1987; 11: 241-247.
- <sup>73</sup> **Wiedermann OB, Franke WW, Kulm C.** Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Pro Natl Acad Sci* 1986;83:3500-4.
- <sup>74</sup> **Wiedermann B, Huttner WB.** Synaptophysin and chromogranins secretogranins; Widespread constituents of different types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis. *Virchows Arch (B)* 1989;58:95-121.
- <sup>75</sup> **Naruse K, Murakoshi M, Osamura RY, Naruse M, Toma H, Watanabe K.** Immunohistological evidence of renin in human endocrine tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61: 172-177.
- <sup>76</sup> **Horvath E, Hse G, Kovacs K.** Emigrating bodies in human corticotroph cells. *Acta Anat* 1977; 98: 427-33.
- <sup>77</sup> **Ivanova- RS; Dashov GI.** Neuroendocrine features of adrenal pheochromocytoma: histological and immunocytochemical evaluation. *Neoplasma* 1990;37:219-224.
- <sup>78</sup> **Said SL.** Vasoactive intestinal Peptide. En Said editores. *Immunochemistry*. New York, Raven Press 1982;230-235.
- <sup>79</sup> **Verner JV, Morrison AB.** Non B islet tumors and a syndrome of refractory diarrhea, hypokalemia and hypochlorhydria. *Clinic Gastroenterol* 1974;3:595-608.
- <sup>80</sup> **Meyer PH.** Glándulas endocrinas. En Meyer Editores, *Fisiología Humana Salvat* 1990; 1:370-372.

- 
- <sup>81</sup> **Sano T, Saito H, Inabah.** Immunoreactive somatostatin and vasoactive intestinal polypeptide in adrenal pheochromocytoma and immunochemical and ultrastructural study. *Cancer* 1983;52:282-289.
- <sup>82</sup> **Zabel M.** Studies on localization of calcitonin gene related peptide (CGRP) in the thyroid-parathyroid complex. *Virchows Arch Pathol Anat* 1987;411:569-73.
- <sup>83</sup> **Becker.** Immunocytochemical localization of calcitonin in k lchistsky cells of human lung. *Arch Pathol Lab Med* 1980;104:196-8.
- <sup>84</sup> **De Lellis Ra.** Tischler AS, Lee AK. Leu- enkephalin-like immunoreactivity in proliferative lesions of the human adrenal medulla and extra-adrenal paraganglia. *Am J. Surg Pathol* 1983;7:29-37.
- <sup>85</sup> **Ungeer Pd. Hoffmann K. Thurg Sn.** HMB-45 reactivity in adrenal phaechromocytomas. *Arch pathol Lab Med* 1992;116:151-153.
- <sup>86</sup> **Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H.** Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13-20.
- <sup>87</sup> **Sawhney N, Hall PA.** Ki 67 structure, function and news antibodies. *J Pathol* 1992; 168: 161-162.
- <sup>88</sup> **Yu C, Filipe MI.** Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin fixed paraffin- embedded tissue aneuploide their clinical applications. *Histochem J* 1993; 25: 843-853.

- 
- <sup>89</sup> **Verheijen R.** Ki-67 detect a nuclear matrix associated proliferation antigen. Part II. Localisation in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci* 1989; 92: 531-540.
- <sup>90</sup> **Taylor CR, Cote RJ.** Immunochemical markers of prognostic value in surgical pathology. *Histol Histopathology* 1997; 12: 1039-1055.
- <sup>91</sup> **Molina F, Ariza A.** Epidemiología del cáncer. En *Oncología*. Sandoz Farma De. Barcelona 1993; 23-42.
- <sup>92</sup> **Weiss R.** Retroviruses and human cancer. En *Viruses and Human Cancer. Seminars in Cancer Biology* 1992; 3: 253-261.
- <sup>93</sup> **Rosell R, Monzó M, Li S.** Orígenes del cáncer humano. En *Oncología*. Sandoz Farma Ed. Barcelona 1993; 5-22.
- <sup>94</sup> **Weinberger RA.** Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254: 1138-1146.
- <sup>95</sup> **Batsakis JG, El-Naggar AK.** P53: fifteen years after discovery. *Advances in Anatomic Pathology* 1995; Vol nº 2: 71-78.
- <sup>96</sup> **Chang F, Syranen S, Tervahuta A, Syrjanen K.** Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 1993; 68: 653-661.
- <sup>97</sup> **Muñoz A.** *Cancer. Genes y nuevas terapias*. Elice, ed 1997.
- <sup>98</sup> **Downward J, Yarden Y, Mayes E et col.** Close similarity of epidermal growth factor receptor and c-erbB oncogene protein sequences. *Nature* 1984; 307: 521-526.

---

<sup>99</sup> **Todaro Gj, Fryling C, Larco JE.** Transforming growth factors produced by certain human tumours cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 52-58.

<sup>100</sup> **Coussens L, Yang Feng TL, Liao YC, Gray A.** Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. Science 1985; 230: 1132-1139.

<sup>101</sup> **Feinmesser RI, Gray K, Means AR, Chantry A.** HER-2/ c-erbB 2 is phosphorylated by calmodulin-dependant protein kinase II on a single site in the cytoplasmic tail at threonine-1172. Oncogene 1996;12 :2725-2730.

<sup>102</sup> **Marchioni MA, Goodearl ADJ, Maio SC et als.** Glial growth factors are alternatively spliced c-erbB 2 ligands expressed immunohistoquímicos nervous system. Nature 1993; 362: 312-318.

<sup>103</sup> **Wright C, Mellon K, Jhonston P et als.** Expression of p53, c-erbB -2 and the epidermal growth factor receptor in transitional cell carcinomas of the bladder. J Pathol 1991; 163: 620-624.

<sup>104</sup> **Di Fiore PP, Pierce HJ, Fraus MH.** C-erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in nih/3t3 cells. Science 1987; 237: 178-182.

<sup>105</sup> **Bouchard L., Lamarre L, Tremblay PJ, Jolicoeur P.** Stochastic apperance of mammary tumors in transgenic mice carrying the mmtv/c-neu oncogene. Cell 1989;57: 931-936.

<sup>106</sup> **Perrent Tj** The c-erbB-2 oncogene as prognostic marker in breast cancer. Br J Cancer 1991;63:328-332

- 
- <sup>107</sup> **Royd JA, Sharrad M, Wagner B, Polagarz S.** Cellular localisation of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. *J Pathol* 1992; 166: 225-233.
- <sup>108</sup> **Ryan KM, Birnie GD.** Myc oncogenes: The enigmatic family. *Biochem J* 1996; 314: 713-721.
- <sup>109</sup> **Estivil X.** DNA y enfermedad neoplásica. En *Medicina Interna*. De DOYMA 1992.
- <sup>110</sup> **Grandori C, Eisenman RN.** Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 177-181.
- <sup>111</sup> **Eissenman RN y cols.** Signal transduction. Beating a path to Myc. *Nature* 1995; 378: 5646-5659.
- <sup>112</sup> **Amati B, Land H.** Myc-Max-Mad: a transcription factor network controlling cell cycle progression, differentiation and death. *Curr Opin Genet Dev* 1994; 4: 102-108.
- <sup>113</sup> **Packham G, Poter CW, Cleveland JL.** C-Myc induces apoptosis and cell cycle progressions by separable, yet overlapping, pathways. *Oncogene* 1996; 13: 461-469.
- <sup>114</sup> **Walker TL, White JD, Esdale WJ, Burton MA, De cruz EE.** Tumor cells surviving in vivo cisplatin chemotherapy display elevated c-myc expression. *Br J Cancer* 1996; 73: 610-614.
- <sup>115</sup> **Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ.** The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989;57 :1083-1093.
- <sup>116</sup> **Malkin D.** p53 and the Li- Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 66: 83-92.
- <sup>117</sup> **Bartek J, Iggo R, Gannon J, Lane DP.** Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cells lines. *Oncogene* 1990; 5 :893-899.

- 
- <sup>118</sup> **Service R.** Slow DNA repair implicated in mutations found in tumors. *Science* 1994; 263: 1374.
- <sup>119</sup> **Lane DP.** P53 and human cancer. *Br Med Bull* 1994; 50: 528-99.
- <sup>120</sup> **Fisher DE.** Apoptosis in cancer therapy: crossing the treshold. *Cell* 1994; 78 :539-542.
- <sup>121</sup> **Allred DC, Clark GM, Brown RW.** Mutation of p53 is associated with increased proliferation and early recurrence in node-negative breast cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1992; 11: 55.
- <sup>122</sup> **Callefi M, Teague MW, Jensen RA.** P53 protein expression and steroid receptor status in breast cancer. *Cancer* 1994; 73: 2147-2156.
- <sup>123</sup> **Hunter T.** Proteinas de oncogenes.En el Cancer, De española de Scientific American. 1985;75-85.
- <sup>124</sup> **Lowy DR, Willumsen BM.** Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:851-891.
- <sup>125</sup> **Quillian LA, Khosravi-Far R, Huff Y, Der CJ.** Guanine nucleotide exchange factors: activators of the ras superfamily of proteins. *Bio Essays.* 1995;17:395-404.
- <sup>126</sup> **Marshall CJ.** Ras effectors. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:197-20.
- <sup>127</sup> **Spandidos DA, Field JK.** Ras oncogenes as prognostic indicators in the development of human tumors. En *Gtpase controlled molecular machines.* Ed Ares-serono Symposia Publications. 1994;121-127.
- <sup>128</sup> **Bos JL.** Ras oncongenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689.

- 
- <sup>129</sup> **Barbacid M.** Ras genes. *Annu Rev. Biochem* 1987; 56: 779-827.
- <sup>130</sup> **Iguchi H, Sugano K, Fukayama N cols.** Analysis of ki-ras codon 12 mutations in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 1996 ;110 :221-226.
- <sup>131</sup> **Müller R.** Cellular and viral c-fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. *Biochem Biophys Acta Reviews on Cancer* 1986; 823: 207-225.
- <sup>132</sup> **Rausher Fj et als.** Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene. *Science* 1988; 240: 1010-1016.
- <sup>133</sup> **Tanigushi S, Tatsuka M, Nakamatsu K.** High invasiveness associated with augmentation of motility in a fos-transferred highly metastatic rat 3Y1 cell line. *Cancer Res* 1989; 49: 6738-6744.
- <sup>134</sup> **Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM.** Cloning the chromosome breakpoint of follicular cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 84: 1097-1099.
- <sup>135</sup> **Krajewski S et als.** Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmatic reticulum, and outer mitochondria membranes. *Cancer Res* 1993; 53: 4701-4714.
- <sup>136</sup> **Nuñez G, Clarke M.** The bcl-2 family proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol* 1994; 4: 399-404.

- 
- <sup>137</sup> **Öfner D, Richman K, Maier H.** Inmunohimicamente detectable bcl-2 expresión en carcinoma colorrectal: correlación con el estadio del tumor y la supervivencia del paciente. *Br J Cancer* 1995; 72: 981-985.
- <sup>138</sup> **Gatter KC.** Diagnóstico inmunocitoquímico: Archivos y desafíos. *J Pathol* 1989; 159: 183-190
- <sup>139</sup> **Burk KB, Liu ET, Larric JW.** Oncogenes: Aneuploidia introducción al concepto de genes del cáncer: New York, Springer-Verlag 1988.
- <sup>140</sup> **Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC.** Mutación en p53 gen supresor de tumor: Claves para la etiología del cáncer y patogénesis molecular. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878.
- <sup>141</sup> **Hernández- Bromchud M.** Predisposición hereditaria al cáncer de mama: evaluación del riesgo genético y recomendaciones para el seguimiento clínico en los casos de alto riesgo. *Med Clin (Bar)* 1996; 107: 383-387.
- <sup>142</sup> **Mathew CG, Chin KS, Easton DF.** Un marcador genético ligado para neoplasia endocrina múltiple tipo II A en el cromosoma 10. *Nature* 1987; 328: 527-28.
- <sup>143</sup> **Mulligan LM, Ponder B.** Base genética de la enfermedad endocrina. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; 80: 1989-1993.
- <sup>144</sup> **Poliak M, Horki K, Kopecka J, Gregora I, Dvrakova J.** El efecto de clonidina en el factor humoral inmunohistoquímico en un paciente con hipertensión arterial. *Cas Lek Cesk* 1990; 129 Suppl 10: 301-305.
- <sup>145</sup> **Castilla-Guerra L, Moreno A.M., Fernández E, Utrilla J.C., Galera-Davidson H.** Expresión y valor pronóstico del producto del oncogén c-erbB-2 en inmunohistoquímico humano de feocromocitomas.

- 
- <sup>146</sup> **Remine WH, Chong CG, Van Heerden JA.** Current management of pheochromocytoma. *Ann Surg* 1974; 740-747.
- <sup>147</sup> **Aguilo F, Tamayo N, Vázquez-Quintana E.** Pheochromocytoma: a twenty year experience at the University Hospital. *PR Heath SCI J* 1991; 10: 135-142.
- <sup>148</sup> **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 Pediatric* 1963; 63: 315-330.
- <sup>149</sup> **Kaplan NM.** Pheochromocytoma. En *Clinical Hipertension*. 6ª de. De. Williams and Wilkins. Baltimore, 1994; 367-387.
- <sup>150</sup> **Jarrot B, Louis WJ.** Abnormalities in enzymes involved in catecholamines synthesis and catabolism in pheochromocytoma. *Clin Sci Mol Med*. 1977; 53: 529-535.
- <sup>151</sup> **Stein PP, Black HR.** A simplified diagnostic approach to pheochromocytoma. *Medicine*. 1990; 70: 46-66.
- <sup>152</sup> **Sherwin RP.** Histopathology of pheochromocytoma. *Cancer* 1952; 12: 861-877.
- <sup>153</sup> **Schechter AL, Hung MC, Vaidyanathan L.** The neu oncogene: aneuploide erbB homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; 229: 976-978.
- <sup>154</sup> **Marchioni MA.** *Nature*. 1995; 378: 334-335.
- <sup>155</sup> **Gilbertson RJ, Pearson ADJ, Perry RH, Jaros E, Kelly PJ.** Prognosis significance of the c-erbB-2 oncogene product in childhood medulloblastoma. *Br J Cancer* 1995; 71: 473-477.

- 
- <sup>156</sup> **De Potter CR, Van Daele S, Van de Vivjer MJ.** The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult tissues. *Histopathology* 1989; 15: 351-362.
- <sup>157</sup> **Nikitin AY, Jin JJ, Papewalis J.** Wild type transgene mutant homologue in malignant transformation of rat Schwann cells. *Oncogene* 1996; 12: 1309-1317.
- <sup>158</sup> **Ciclitira PJ, Macartney JC, Evan G.** Expression of c-myc in non malignant and premalignant gastrointestinal disorders. *J Pathol* 1987; 151: 293-296.
- <sup>159</sup> **Dere WH, Hirayu H, Rapoport B.** TSH and AMPc enhance expression of the myc protooncogene in cultured thyroid cells. *Endocrinology* 1985; 117: 2249-2251.
- <sup>160</sup> **Lipponen P, Eskelinen M, Syrjanen K.** Expression of tumour-suppressor gene RB, apoptosis-suppressing protein Bcl-2 and c-myc have no independent prognostic value in renal adenocarcinoma. *Br J Pathol* 1995; 71: 863-867.
- <sup>161</sup> **Williams ARW, Piris J, Wylie AH.** Immunohistochemical demonstration of altered intracellular localization of the c-myc oncogene product in colorectal neoplasm. *J Pathol* 1990; 160: 287-293.
- <sup>162</sup> **Kerns BJM, Jordan.** Paraganglioma, Moore MBH. P 53 overexpression in formaline-fixed, paraffin-embedded tissue detected by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1047-1051.
- <sup>163</sup> **Lane DP.** On the expression of the p-53 protein in human cancer. *Mol Biol Rep* 1994; 19: 23-29.
- <sup>164</sup> **Rodriguez E, Sreekantaian C, Chaganti RSK.** Genetic changes in epithelial solid neoplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 3398-3406.

---

<sup>165</sup> **Wang DG, Johnston CF, Anderson N, Sloan JM, Buchanan KD.** Overexpression of the tumour suppressor gene p-53 is not implicated in neuroendocrine tumor carcinogenesis. *J Pathol* 1995; 175: 397-401.

<sup>166</sup> **Gasparini G, Harris AL.** Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995; 13: 765-782.

<sup>167</sup> **Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS.** P-53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 1996; 13: 1709-1719.

<sup>168</sup> **Levine AJ, Momand J, Finlay CA.** The p-53 tumor suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.

<sup>169</sup> **Díaz-Rubio E.** El proceso biológico de las metástasis. En *Perspectivas en Medicina Interna*. Ed Panamericana 1996; 180-203.

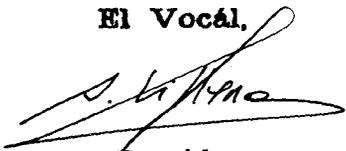
# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. FRANCISCO JESUS CABALLERO GARCIA  
titulada VALOR PRONOSTICO DE MARCHADORES TIPO NUNOCLISTO  
QUINICOS EN EL FECCRONOCITOMA ESPORADICO

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE  
CUM LAUDE

Sevilla, 17 de MARZO 1999.

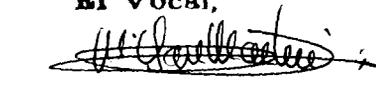
El Vocál,

  
El Presidente

El Vocal,

  
El Secretario,

El Vocal,

  
El Doctorado,  
