



11201 1-A  
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE MEDICINA  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DELEGACIÓN No. 3 DEL DISTRITO FEDERAL  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI  
HOSPITAL DE ONCOLOGIA CMN SIGLO XXI

LA EXPRESIÓN DISMINUIDA DE P21<sup>WAF1</sup> Y ANEUPLOIDIA  
CORRELACIONAN CON MALIGNIDAD EN  
PARAGANGLIOMAS ADRENALES Y EXTRA-ADRENALES

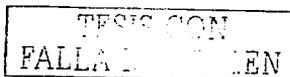
TESIS QUE PRESENTA  
DRA. BRENDA IVETT BARRAZA FRANCO  
PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD EN  
ANATOMÍA PATOLÓGICA

ASESOR: DR. FERNANDO A. CANDANEDO GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2003





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

1



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**DIRECCION REGIONAL CENTRO**  
**DELEGACION No. 3 SURESTE DEL DISTRITO FEDERAL**  
**JEFATURA DE PRESTACIONES MEDICAS**  
**COORDINACION DE INVESTIGACION EN SALUD**

Delegación 1 Noroeste  
Delegación 3 Sureste  
Delegación Estado de México Centro  
Delegación Cuernavaca  
Delegación Morelos

Delegación 2 Pinar del Rio  
Delegación 4 Sureste  
Delegación Estado de México Poniente  
Delegación Querétaro

27 de Agosto de 2002  
Ref. 37.56.91.2800/

JJSS

**Dr. Fernando A. Candanedo González**  
Hospital de Oncología CMN S XXI  
**PRESENTE**

Con el presente comunico a usted que su proyecto de investigación titulado: "ANÁLISIS DE DNA, PROLIFERACIÓN CELULAR E INHIBIDORES DE CICLO CELULAR EN PARAGANGLIOMAS ADRENALES Y EXTRAADRENALES " ha quedado registrado con el número 2002-717-0027.

Asimismo le informo que con objeto de tener conocimiento del desarrollo de su proyecto es necesario que requiste semestralmente el formato "Informe Semestral de Avances de Proyectos de Investigación" y se lo entregue al Jefe de Educación e Investigación Médica

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
Seguridad y Solidaridad Social

Autorizada por el Jefe de Educación e Investigación Médica  
UNEM a cargo de la JEFATURA DE PRESTACIONES MEDICAS  
contactada por el teléfono 56 23 11 11

NOBRES  
BARRAZA FRANCISCA IVETT  
FECHA 27 - NOV - 2003  
FIRMA [Signature]

**Dra. Zamira Apis Hernández**  
Coordinadora Delegacional de  
Investigación Médica

Anexo: "Formato 3" Informe semestral de avances de proyectos

ZAH/Ahc



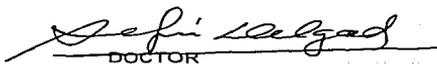
HOJA RECOLECTORA DE FIRMAS



DOCTOR  
ANTONIO CASTELLANOS OLIVARES  
JEFE DE LA DIVISION DE EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DOCTORA  
MA. DE LOURDES CABRERA MUÑOZ  
PROFESOR TITULAR DEL CURSO  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI



DOCTOR  
SERAFÍN DELGADO GALLARDO  
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION DE POSGRADO  
HOSPITAL DE ONCOLOGIA CMN SIGLO XXI



DOCTOR  
FERNANDO A. CANDANEDO GONZÁLEZ  
MEDICO ADSCRITO AL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DEL  
HOSPITAL DE ONCOLOGIA CMN SIGLO XXI



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
SECRETARÍA DE SALUD  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIONES

DELEGACION SURORIENTE DEL  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
RECIBIDO  
18 NOV 2003  
DIV. EDUCACION Y INVESTIGACIONES MEDICAS

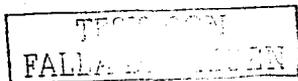
FA  
11

## **AGRADECIMIENTOS**

***Gracias Dios por tu inmenso amor.***

***Gracias a mis Padres y Hermanos por su incondicional apoyo e inagotable paciencia, por creer en mí siempre.***

***Gracias Karla, José Ricardo, Norma y Bebé, por su tiempo, amor y oraciones que han sido de gran bendición para mí.***

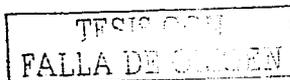


INDICE	PAG.
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	9
JUSTIFICACIÓN.....	10
MATERIAL Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	14
DISCUSIÓN.....	20
REFERENCIAS.....	24

TESIS CON  
FALLA DE CENSO

**RESUMEN**

Actualmente no existen marcadores moleculares que permitan predecir un comportamiento más agresivo de los paragangliomas y feocromocitomas y los criterios histológicos no son suficientes. **Objetivo:** analizar las características clinicopatológicas de inmunohistoquímica y de contenido de DNA de paragangliomas y feocromocitomas benignos y malignos. **Material y Métodos:** Se revisaron expedientes clínicos y laminillas de todos los casos. El estudio de inmunohistoquímica incluyó proteína S-100, cromogranina, p53, p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> y Ki-67. Además se hizo citometría de flujo para análisis de contenido de DNA. **Resultados:** Se estudiaron 23 mujeres y 8 hombres. 27 tumores fueron benignos y 4 malignos. La edad promedio para el grupo de pacientes con tumores benignos fue de 48 ±11.3 años y de 33 ±12.3 años para el grupo con tumores malignos. Sólo un caso benigno expreso p53, mientras que ninguno de los malignos lo expreso. 91% de los casos benignos expresaron p21<sup>WAF1</sup>, mientras que sólo 50% de tumores malignos fueron positivos. La aneuploidia fue mayor en los tumores malignos que en los benignos, 100% vs 23%, respectivamente. **Conclusiones:** la expresión disminuida de p21<sup>WAF1</sup> y la aneuploidia correlacionan con un comportamiento más agresivo en los paragangliomas y feocromocitomas. **Palabras clave:** paraganglioma, feocromocitoma, benignos, malignos, p21, p27, ki-67, contenido de DNA.



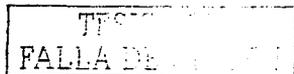
## INTRODUCCIÓN

Los paragangliomas y feocromocitomas adrenales son tumores poco frecuentes, compuestos predominantemente por células principales y sustentaculares. Clínicamente se manifiestan con síntomas asociados a incremento en los niveles séricos de catecolaminas. Estos síntomas incluyen cefalea, hipertensión, palpitaciones y diaforesis excesiva.

Los paragangliomas pueden manifestarse en diferentes sitios del organismo como es el cuerpo carotideo que representa más de 80% de todos los casos. Otros sitios menos frecuentes son la órbita, laringe, glándula tiroides, mediastino, pulmón, duodeno, cauda equina, vejiga urinaria, región para-aórtica (órgano de Zuckerland) y retroperitoneo.<sup>1,2</sup>

Aproximadamente 10% de los feocromocitomas se asocian a Neoplasia Endocrina Múltiple tipo 2 A y B, von Hippel Lindau o neurofibromatosis tipo I. Los casos hereditarios son usualmente benignos, pero aproximadamente 10% de los feocromocitomas y 15-35% de los paragangliomas son malignos.<sup>3,4</sup>

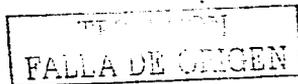
El comportamiento biológico del 90% de los paragangliomas es benigno y sólo 10% son malignos. La distinción de los paragangliomas malignos es difícil debido a que no existen criterios histológicos que sirvan para predecir malignidad.<sup>1,5</sup> Pleomorfismo, hiper cromasia nuclear y aumento en el número de mitosis no son parámetros confiables como predictores de malignidad.<sup>2</sup> Sin embargo, según la reciente clasificación de la OMS para tumores endocrinos, el principal indicador de malignidad es la presencia de metástasis.<sup>6,7</sup> Otra clasificación es la de Armed Forces Institute of Pathology, que reconoce la invasión local extensa como un



indicador adicional para malignidad.<sup>5</sup> Otros hallazgos morfológicos que apoyan malignidad es la invasión capsular, presencia de necrosis, invasión venosa, ausencia de glóbulos hialinos y disminución en la expresión de proteína S-100 en las células sustentaculares.<sup>8-11</sup>

El pronóstico de los pacientes con feocromocitoma o paraganglioma maligno metastásico es pobre con sobrevida a 5 años de 20-45%.<sup>12-13</sup> La resección quirúrgica completa es el único tratamiento curativo.<sup>1</sup> La terapia adyuvante incluye quimioterapia, m-iodobenzylguanidina y radioterapia externa, pero no hay un consenso sobre el manejo óptimo de pacientes con tumores malignos.<sup>12</sup>

El análisis del contenido de DNA de tumores sólidos ha mostrado aparente utilidad para distinguir el comportamiento biológico más agresivo de algunas neoplasias.<sup>14,15</sup> La aneuploidia en tumores de colon, laringe y mama se ha correlacionado con un comportamiento más agresivo.<sup>12,16,17</sup> En paragangliomas la información es diversa y aún no se comprende del todo bien. Sin embargo, algunos trabajos han mostrado asociación entre comportamiento agresivo y la presencia de aneuploidia.<sup>19-25</sup> Además, el análisis del contenido de DNA es un método que permite analizar poblaciones celulares en distintas fases del ciclo celular, lo cual se puede correlacionar con marcadores de ciclo celular por inmunohistoquímica.<sup>3, 9,10</sup> Ki-67 (MIB-1) es un marcador de proliferación celular que comienza a expresarse en fase G1 y alcanza su máxima expresión durante la fase G2. En carcinomas de mama, ovario y pulmón, la agresividad de los tumores está relacionada no sólo con el contenido de DNA sino también con la fase S del ciclo celular y a un alto índice de proliferación. Este índice de proliferación celular



puede ser medido sobre la base de la expresión de Ki-67, que en caso de los paragangliomas malignos se encuentra significativamente aumentado, de ahí la utilidad de Ki-67 como marcador pronóstico.<sup>2,16-22</sup>

En la búsqueda de otros marcadores pronóstico se ha estudiado la influencia de oncogenes y genes supresores de tumor. En ese sentido el ciclo celular está regulado por complejos proteicos compuestos por ciclinas y cinasas dependientes de ciclina (CDK) que favorecen la progresión del ciclo celular.<sup>23</sup> La actividad de estos complejos está regulada por dos familias de proteínas que inhiben el ciclo celular.<sup>9</sup> La primera familia, el grupo INK4 (p16, p15, p18 y p19) que depende de la presencia del producto del gen de retinoblastoma.<sup>23</sup> La máxima expresión de proteínas del grupo INK4 ocurre durante la mitad de la fase S, en células que se encuentran proliferando.<sup>9</sup> El segundo grupo corresponde al de los inhibidores de la CDK que comprende a p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>kp1</sup> y p57, que son proteínas que inhiben la actividad de la CDK preactivada en fase G1.<sup>15,24</sup>

p27<sup>kp1</sup> es un inhibidor de la actividad de la CDK o supresor tumoral.<sup>25-28</sup> A nivel experimental mediante el empleo de ratones transgénicos con deficiencia de p27<sup>kp1</sup> se ha logrado desarrollar hiperplasia orgánica múltiple, lo que sugiere que este inhibidor de CDK tiene una actividad anti-proliferativa *in vivo*.<sup>29</sup> En este sentido, se ha encontrado que algunos tumores malignos en humanos muestran disminución de la expresión de p27<sup>kp1</sup>, contrario a lo que sucede en tejido normal.<sup>16</sup> Tratando de encontrar alguna relación entre Ki-67 y p27<sup>kp1</sup>, se ha observado que la expresión de Ki-67 se encuentra estrechamente relacionada con la de p27<sup>kp1</sup>.<sup>21</sup> Por lo que se ha sugerido que la disminución de la expresión de p27<sup>kp1</sup> juega un papel importante en el proceso de tumorigénesis.<sup>20-25,33-36</sup>



En algunos estudios se ha considerado la expresión de p27<sup>KIP1</sup> como factor pronóstico independiente y potencialmente útil en el diagnóstico de un gran espectro de tumores malignos incluyendo los endocrinos.<sup>22-25</sup> p21<sup>WAF1</sup> es otro importante regulador del ciclo celular que actúa inhibiendo varias CDK's deteniendo a la célula en fase G2. El empleo de líneas celulares como PC12 de paraganglioma en ratón ha permitido observar que p21<sup>WAF1</sup> tiene una actividad antimitogénica y que participa en la diferenciación de células neurales.<sup>21,36</sup> p21<sup>WAF1</sup> actúa en conjunto con p53 que tiene efecto inhibitor del crecimiento y se activa cuando hay daño en el DNA. Este bloqueo celular permite la reparación del DNA dañado antes de entrar en la fase S. Además, se ha observado que las células apoptóticas pueden expresar p21<sup>WAF1</sup>.<sup>24-26</sup> Aún no está del todo claro el papel que juega el hecho que p53 se exprese de manera dependiente a la expresión de p21<sup>WAF1</sup>. En paragangliomas malignos se ha informado que p53 se encuentra mutado en un alto porcentaje de casos.<sup>9,27</sup>

TESIS CON  
PALMA DE ORO

## OBJETIVO GENERAL

Analizar las características clinicopatológicas de inmunohistoquímica y de contenido de DNA de paragangliomas benignos y malignos, adrenales y extra-adrenales.

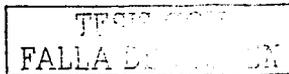
## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Analizar por inmunohistoquímica la expresión de Ki-67, p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p53.
2. Analizar contenido de DNA en paragangliomas adrenales y extra-adrenales.
3. Correlacionar la expresión de Ki-67, p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p53 y contenido de DNA de los paragangliomas adrenales y extra-adrenales en base a su comportamiento clínico (benigno o maligno).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## JUSTIFICACIÓN

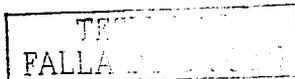
El diagnóstico histopatológico de paraganglioma es relativamente sencillo, sin embargo, la posibilidad de poder predecir mediante criterios histológicos su contraparte maligna es difícil. Esto se debe en parte a que el entendimiento de su comportamiento biológico aún no está bien comprendido. A nivel experimental se han estudiado algunos marcadores de ciclo celular como p21<sup>WAF1</sup> y p27<sup>KIP1</sup> en paragangliomas, empleando la línea celular PC12, desarrollada en ratones transgénicos.<sup>36</sup> Sin embargo, sólo se ha explorado la expresión de Ki-67 y p53 en paragangliomas de humanos, encontrando que ambos pueden servir como marcadores pronóstico debido a que correlacionan con comportamiento maligno. El índice de proliferación celular es mayor en paragangliomas malignos y p53 se encuentra mutado.<sup>27</sup> Por tanto, consideramos que es necesario explorar la expresión de p21<sup>WAF1</sup> y p27<sup>KIP1</sup>, en conjunto con otros marcadores mejor reconocidos que correlacionan con malignidad, en busca de nuevos marcadores que permitan predecir el comportamiento biológico de los paragangliomas.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó estudio retrolectivo, descriptivo y transversal, en el que se revisaron todos los casos de paragangliomas y feocromocitomas benignos y malignos del archivo de quirúrgicos del departamento de Patología del Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, que fueron estudiados entre 1995-2002. Datos demográficos como son edad, género, pruebas de laboratorio y gabinete, localización del tumor y estadio se obtuvieron de los expedientes clínicos. Las metástasis fueron definidas como la presencia post-operatoria de tejido de paraganglio en sitios que normalmente no presentan tejido cromafín, confirmado por histología, o identificado por I<sup>131</sup> metayodobenzilguanidina (MIBG) y tomografía axial computada en conjunto con elevación sérica y urinaria de catecolaminas. Los paragangliomas o feocromocitomas que invadieron localmente o recurrieron en ausencia de metástasis no fueron considerados como malignos. Un sitio extra-adrenal fue definido como la presencia por debajo del diafragma de paraganglioma productor de catecolaminas. El paraganglioma o feocromocitoma benigno fue definido como tumor sin signos de recurrencia o metástasis durante un periodo mínimo de 5 años. La evaluación clínica consistió de una historia clínica, examen físico y medición de niveles de catecolaminas en suero y orina.

Todos los casos fueron re-evaluados en forma cegada por dos observadores. Sólo 11/31 (36%) casos contaron con bloque de parafina se les realizó estudio de inmunohistoquímica y citometría de flujo. Todos los tejidos fueron fijados en formaldehído al 10%, incluidos en parafina, cortados a 5 µm y teñidos con hematoxilina y eosina. Además a cada caso se le realizaron tres



cortes en blanco a 5  $\mu\text{m}$ , para estudio de inmunohistoquímica. Se empleo el método de avidina-biotina peroxidasa utilizando los siguientes anticuerpos: proteína S-100 (Dako, Glostrup, Denmark), cromogranina, p53 (dilución), p21<sup>MWAF1</sup>, p27<sup>KIP1</sup> (dilución) y Ki-67 (dilución). Se emplearon controles negativos y positivos para cada marcador. La evaluación de la inmunohistoquímica se realizó por dos patólogos en forma cegada. Se consideró positivo cuando hubo más de 5% de células neoplásicas con expresión nuclear, para el caso de marcadores de proliferación y ciclo celular (p27<sup>KIP1</sup>, p21<sup>MWAF1</sup>, p53 y Ki-67). Para el análisis de proliferación celular (Ki-67) se contaron 5000 células al azar en campo a seco fuerte, de las cuales se obtuvo el porcentaje de células positivas y con este el índice de proliferación. La expresión de p21<sup>MWAF1</sup> se definió como la expresión de más de 20% de núcleos de células cromafines.

#### Preparación del tejido y tinción para DNA

Se obtuvieron cortes histológicos de 50  $\mu\text{m}$  de espesor, que fueron incubados en xileno (MERCK Art: 21586) por 10 min, se rehidrataron con etanol a concentraciones decrecientes (Omnichem 17019). Se fragmentaron los cortes histológicos y se incubaron por 30 min. a 37°C en solución de pepsina al 0.5% (pH 1.5); Las muestras se centrifugaron a 1000xg por 30 min, el sobrenadante fue desechado y el residuo se resuspendió en PBS y se filtro con fibras de nylon. Las muestras fueron teñidas con tinción de DNA usando DNA-prep de COULTER. El contenido de DNA fue medido con citómetro de flujo multiparametro láser (EPICS-ALTRA, coulter) se proceso y analizó con programas de análisis de ciclo celular (Phoenix flow System, San Diego, CA, USA). Se contaron 10, 000 núcleos. Las

TESIS  
FALLA DE

células mononucleares fueron usadas como control diploide de DNA. El índice de DNA fue calculado como la proporción de tumor en fase G0/G1 dividido por el pico estandarizado G0/G1.

El proyecto recibió el apoyo del departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (Dr. Armando Gamboa Domínguez) para la realización del estudio de inmunohistoquímica, y de la Unidad de Citometría de flujo del Instituto Nacional de Perinatología (Dr. Arturo Cébulo Vázquez).

TFIS CON  
FALLA DE CI EN

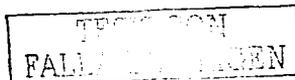
## RESULTADOS

La Tabla 1 describe las principales características clinicopatológicas. Se identificaron 31 pacientes con diagnóstico histopatológico de paraganglioma adrenal o extra-adrenal. 23 (74%) pacientes fueron mujeres y 8 (26%) hombres, con una relación 3:1 a favor de las mujeres. Se identificaron 27 paragangliomas benignos y 4 malignos. 3/4 de los tumores malignos se presentaron en hombres. La edad promedio para el grupo de pacientes con paragangliomas benignos versus malignos fue de  $48 \pm 11.3$  años y  $33 \pm 12.3$  años, respectivamente.

Cuarenta y ocho por ciento de los pacientes manifestaron hipertensión arterial, le siguieron en frecuencia cefalea (23%), pérdida de peso (16%), palpitaciones (13%), sudoración (7%) y diarrea en un paciente. El tiempo promedio de evolución previo al diagnóstico fue de 6.4 meses (intervalo, 1-36 meses). Los estudios de Imagen (arteriografía, tomografía axial computada (TAC) y tomografía lineal) permitieron identificar y precisar la localización del tumor en todos los casos. La Tabla 2 muestra la distribución por topografía de todos los casos.

**Tabla 1. Características clinicomorfológicas de 31 pacientes con paraganglioma.**

	N	Porcentaje
Género		
Mujeres	23	74
Hombres	8	26
Edad		
<40 años	8	26
>40 años	23	74
Comportamiento clínico		
Benigno	27	87
Malignos	4	13

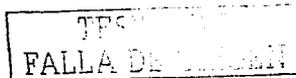


**Tabla 2. Distribución por localización topográfica de los 31 paragangliomas.**

Localización	No casos	Porcentaje
Adrenales	2	6
Extra-adrenales		
Cuerpo carotideo	18	58
Para-aórticos	2	6
Retroperitoneal	2	6
Submaxilar	2	6
Orbita	1	3
Nasal	1	3
Vejiga	1	3
Laringe	1	3
Parafaríngeo	1	3

#### Características morfológicas

El tamaño promedio de los paragangliomas fue de 4.0 cm (Intervalo, 1.0-20.0 cm). Los tumores benignos y malignos midieron en promedio  $\pm$  DE, 4.5 cm  $\pm$  1.9 versus 7.5 cm  $\pm$  8.3, respectivamente. 20/31 (65%) tumores midieron  $>$ 4 cm y 11 (34%)  $<$ 4 cm. Los tumores fueron ovoides de superficie sólida de color café-rojizo y aspecto congestivo. En el análisis histológico se observó la formación de nidos compuestos por células cromafines de aspecto balonoide con abundante citoplasma eosinófilo, granular y núcleos ovoides con nucleolo aparente. Estas células se encontraban separadas por finos septos fibrovasculares y por células fusiformes de tipo sustentacular que mostraban núcleos hiper cromáticos y escaso citoplasma (Figura 1A y B). En ninguno de los tumores se apreció necrosis, invasión a la cápsula o permeación vascular.



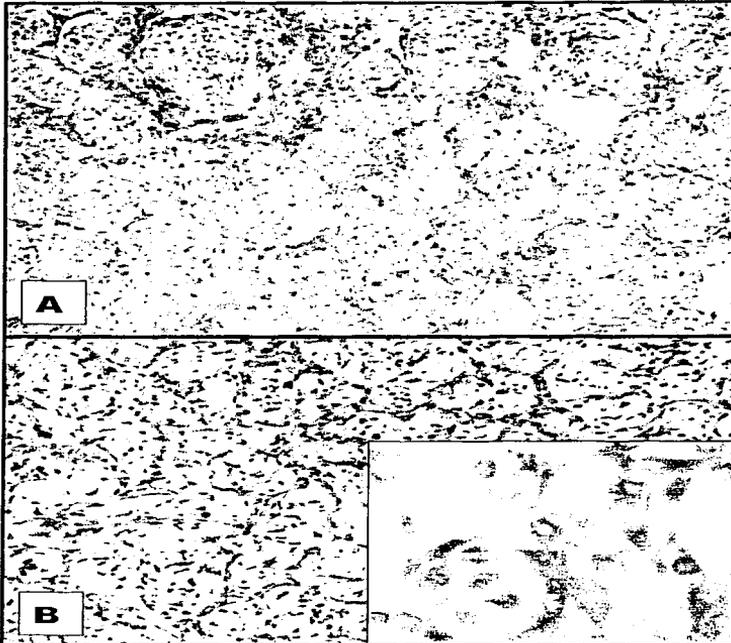


Figura 1. Paraganglioma benigno. A) Células cromafines de citoplasma eosinófilo y núcleos ovoides. B) Células de aspecto baloñide con citoplasma claro y nucleolo aparente, separadas por septos fibrovasculares y célula sustentacular.

TESIS CON  
FALLA DE CENSURA

### Evaluación de inmunohistoquímica y citometría de flujo

Todos los casos fueron positivos para cromogranina, mientras que sólo siete de estos tumores expresaron proteína S-100. Los siete tumores fueron benignos y ningún tumor maligno expreso proteína S-100. Se observó sólo un paraganglioma benigno (9%) que expreso p53 con 10% de positividad, mientras ninguno de los malignos lo presento. 4 (29%) casos expresaron Ki-67, con un índice de proliferación promedio de 1.12 (Figura 2). Todos los casos que expresaron Ki-67 fueron benignos. Diez (91%) casos expresaron positividad para p21<sup>WAF1</sup>, de los cuales 7 casos mostraron más de 20% de células neoplásicas positivas y en 3 casos se observo menos de 10% (Figura 3). 2/4 (50%) casos malignos expresaron p21<sup>WAF1</sup> mientras que 8/8 (100%) benignos lo expresaron. Cuando se comparo la expresión de p21<sup>WAF1</sup> entre paragangliomas benignos y malignos de más de 4 cm se encontró diferencias entre ambos grupos. 3 tumores benignos mayores de 4 cm expresaron p21<sup>WAF1</sup> mientras que sólo un caso maligno lo expreso. La Tabla 3 muestra algunas otras características de los casos que resultaron positivos para p21<sup>WAF1</sup>. Ninguno de los casos mostró expresión para p27<sup>KIP1</sup>. Diez (77%) casos benignos fueron diploides (Figura 4) y 3 (23%) aneuploides (Figura 5) mientras que 3 (100%) casos malignos fueron aneuploides y ninguno diploide.

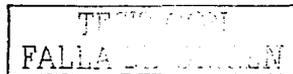
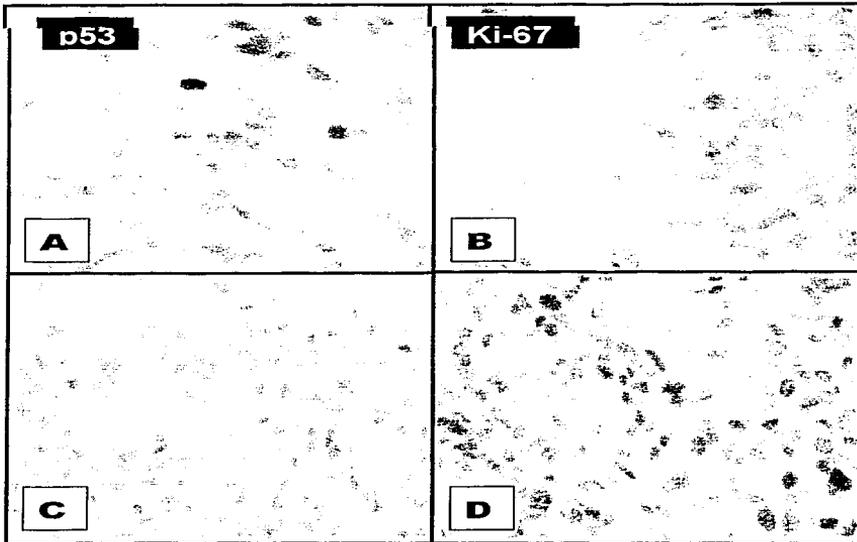


Figura 2. Análisis de inmunohistoquímica. A) sólo caso expreso p53. B, C y D) Expresión nuclear de Ki-67.

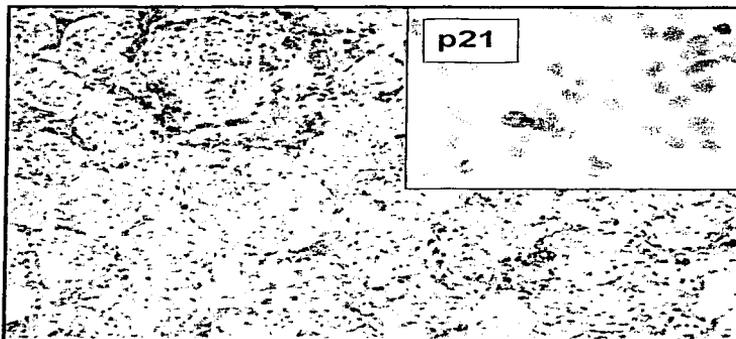


TECNOLOGIA  
FALLA DE CÁNCER

**Tabla 2. Porcentaje de positividad para p21**

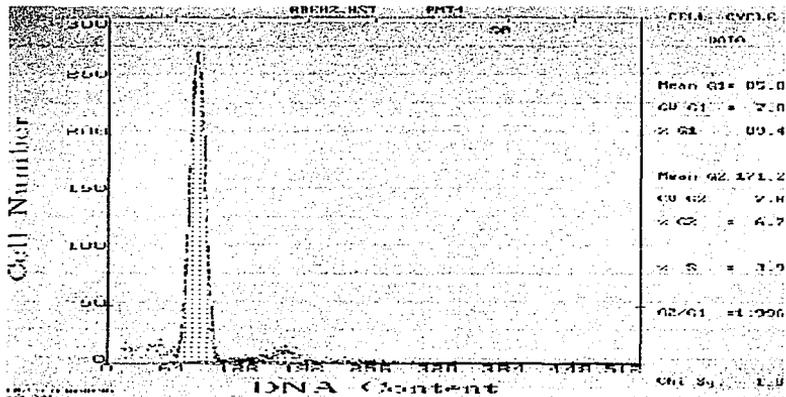
Número de casos	células positivas	%
1	> 40	10
4	> 30	40
1	> 25	10
1	> 20	10
3	< 10	30
<b>Total:</b>		<b>100%</b>

Figura 3. Paraganglioma benigno que muestra expresión nuclear para p21.



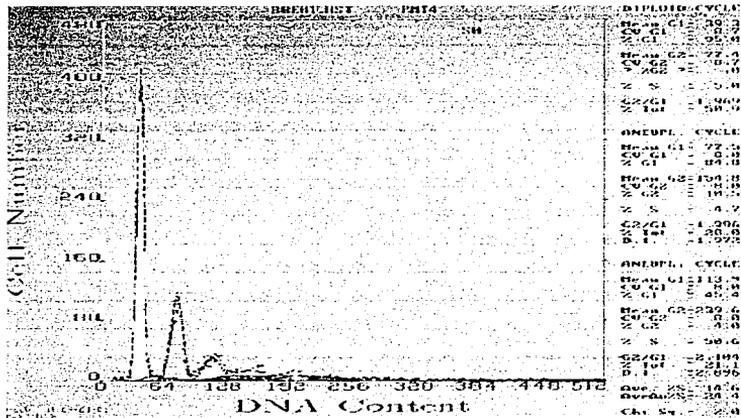
TECNOLOGIA  
FALLA DE CALIDAD

Figura 4. Paraganglioma benigno. El histograma muestra una neoplasia diploide.



FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Paraganglioma maligno. El histograma muestra neoplasia aneuploide con dos picos.



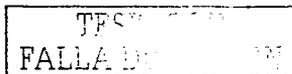
TECN. GEN  
FALLA DE ORIGEN

## DISCUSION

Los paragangliomas son neoplasias raras caracterizadas por la presencia de hipertensión paroxística secundaria a la producción de catecolaminas. Su diagnóstico histológico es relativamente fácil. Sin embargo, el comportamiento biológico y la identificación oportuna de un tumor maligno, basado exclusivamente en parámetros histológicos son difícil de predecir.<sup>2,7</sup> Determinar comportamiento biológico maligno en los paragangliomas y feocromocitomas en base a criterios puramente morfológicos es difícil de realizar. De acuerdo a la literatura, la definición más estricta es aquella que engloba la presencia de metástasis en sitios donde normalmente no hay tejido cromafín.<sup>3,16</sup> Esto excluye la posibilidad de confundir lesiones multicéntricas o en su defecto el desarrollo de recurrencia locorregional.

La prevalencia de los paragangliomas malignos en la actualidad no se conoce con exactitud. Sin embargo, se estima que representan 6.5% de todos los paragangliomas. En esta serie representaron 12.9% de todos los casos y mostraron predilección por el género masculino. Además, los paragangliomas malignos se presentaron en pacientes que fueron 15 años más jóvenes y 4 cm más grandes que el grupo de paragangliomas benignos. Ninguno de los tumores malignos mostró necrosis, invasión a la cápsula o permeación vascular. No obstante, todos estos casos desarrollaron recurrencia.

La proteína S-100 se identifica en el núcleo y citoplasma de las células sustentaculares que rodean a las células cromafines. En el presente trabajo se observó una evidente ausencia de expresión de la proteína S-100 en los paragangliomas malignos mientras que su expresión en los tumores benignos fue



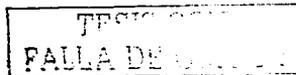
constante, lo cual está de acuerdo con lo informado en la literatura, que refiere marcada disminución en la expresión de proteína S-100 tanto en el tumor maligno primario como en las metástasis.<sup>35</sup> La diferenciación celular es altamente controlada múltiples procesos que requieren de señales específicas para estimular la sobrevida o la pérdida de la capacidad de proliferación. Es la interacción de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas las que determinan la proliferación y diferenciación de las células. Los complejos de ciclina-CDKs juegan un papel esencial en la transición G<sub>1</sub>-S del ciclo celular.<sup>36</sup> Cuando se comparo la expresión de p21<sup>WAF1</sup> entre el grupo de paragangliomas benignos y malignos se apreció una completa ausencia de la expresión p21<sup>WAF1</sup> en las lesiones malignas, lo que apoya la idea de que p21<sup>WAF1</sup> participar en la diferenciación de los paragangliomas, como sucede en otras clases de tumores. Así mismo, al comparar la expresión de p21<sup>WAF1</sup> entre paragangliomas benignos y malignos de más de 4 cm se encontró que ambos grupos mostraron reducción en su expresión, siendo más evidente entre el grupo de tumores malignos. Esta falta de expresión de p21<sup>WAF1</sup> en tumores mayores de 4 cm está en relación con la falta de inhibición de proliferación celular.

p27<sup>Kip1</sup> es un inhibidor de cinasa dependiente de ciclina que regula negativamente la proliferación celular mediante el arresto de las células en fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. En algunos tumores como son el adenocarcinoma de próstata, cáncer de mama con invasión y cáncer de pulmón, se ha observado que la pérdida de expresión de p27<sup>Kip1</sup> está asociada a un comportamiento biológico más agresivo.<sup>26,29</sup> Ninguno de los casos mostró expresión para p27<sup>Kip1</sup>.



El resultado del análisis del contenido de DNA en paragangliomas benignos y malignos ha sido diverso con presencia de tumores diploides, aneuploides y tetraploides en ambos grupos. Previos informes han sugerido que los paragangliomas diploides generalmente siguen un curso benigno y los aneuploides poseen una capacidad mayor para progresar y causar la muerte de los pacientes ( $p < 0.02$ ).<sup>18</sup> Sin embargo, también se han visto tumores aneuploides con comportamiento benigno.<sup>19</sup> Esta discrepancia puede deberse al uso de diferentes métodos de medición de DNA. Lewis y cols. han sugerido que la aneuploidia puede estar asociado a la presencia de metástasis.<sup>17</sup> En estudios de casos y controles retrospectivos se ha observado que un mayor número de tumores malignos son tetraploides ( $P = .0037$ ) y aneuploides ( $P = .0248$ ) contrario a lo observado en el grupo de paragangliomas benignos. En el presente trabajo se observó que todos los casos malignos resultaron aneuploides mientras que el grupo de tumores benignos en general fueron diploides.

En conclusión, observamos que la expresión disminuida de  $p21^{WAF1}$  y contenido de DNA aneuploide se relacionan con un comportamiento más agresivo de los paragangliomas y feocromocitomas. Sin embargo, son necesarios más estudios que reúnan un mayor número de casos, tanto benignos como malignos, que permitan analizar proteínas que regulan ciclo celular como  $p21^{WAF1}$  y  $p27^{KIP1}$ , y su participación en la carcinogénesis y si tienen alguna participación en el comportamiento biológico. De igual forma es importante explorar nuevos marcadores biológicos en busca de predictores de tipo pronóstico.



## Referencias

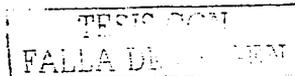
1. Medeiros LJ, Wolf BC, Balogh K, Federman M. Adrenal pheochromocytoma: a clinicopathologic review of 60 cases. *Hum Pathol.* 1985;16:580-589.
2. Kliever KE, Wen DR, Cancilla PA, Cochran AJ. Assessment of prognosis by histologic, immunohistochemical and ultrastructural techniques. *Hum Pathol* 1989; 20:29-39.
3. Kenady DE, McGrath PC, Sloan DA, Schwartz RW. Diagnosis and management of pheochromocytoma. *Curr Opin Oncol* 1997;9:61-67.
4. Tischler A. The adrenal medulla and extra-adrenal paraganglia. In: Kovacs K, Asa S (eds). *Functional endocrine pathology.* Oxford: Blackwell Scientific; 1998:550-595.
5. Lack EE. *Tumours of the adrenal gland and extra-adrenal paraganglia.* Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 1997.
6. Solcia EKG, Sobin LH (eds) *Histological Typing of Endocrine Tumours (2nd).* Berlin: Springer, 2000.
7. Shah MJ, Karelia NH, Patel SM, Desai NS, Mehta HV, Singh S. Flow cytometric DNA análisis for determination of malignant potential in adrenal pheochromocytoma or paraganglioma: an Indian experience. *Ann Surg Oncol* 2002;10:426-431
8. Edström EE, Hjelm SAL, Höög A, Hamberger B. The management of benign and malignant pheochromocytoma and abdominal paraganglioma. *EJSO* 2003;29:278-283.



9. Brown HM, Komorowski RA, Wilson SD. Predicting metastasis of pheochromocytoma using DNA flow cytometry and immunohistochemical markers of cell proliferation. *Cancer* 1999;86:1583-1589
10. Clarke MR, MD, Weyant R, Watson CG, Carty SE, MD. Prognostic markers in pheochromocytoma. *Hum Pathol* 1998;29:522-526.
11. Van Hereden JA, Sep SG, Hamberger B, Sheedy PF, 2nd, Poston JG, ReMine WH. Pheochromocytoma: current status and changing trends. *Surgery* 1982;91:367-373.
12. Averbuch SD, Steakley CS, Young RC, Gelmann EP, Goldstein DS, Stull R, Keiser HR. Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. *Ann Intern Med* 1988;109:267-273.
13. John H, Ziegler WH, Hauri D, Jaeger P. Pheochromocytomas: can malignant potential be predicted *Urology* 1999;53:679-683.
14. O. Nativ, MD, Grant LS, MD, Sheps SG: The clinical significance of nuclear DNA ploidy pattern in 184 patients with pheochromocytoma. *Cancer* 1992;69:2683-2687.
15. Leou-Chuan Pang, Kuo-Chien Tsao, MT. Flow cytometric DNA analysis for the determination of malignant potential in adrenal and extraadrenal pheochromocytomas or paragangliomas. *Arch Pathol Lab Med.* 1993;117:1142-1147.
16. Hosaka Y, Rainwater LM, Grant LS, Farrow GM. Pheochromocytoma: nuclear deoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry. *Surgery* 1986;100:1003-1010.



17. Lewis PD. A cytophotometric study of benign and malignant pheochromocytomas. Virchows Arch B 1971;9:371-176.
18. Klein FA, Kay S, Ratliff JE. Flow cytometric determination of ploidy and proliferation patterns of adrenal neoplasm: an adjunct to histological classification. J Urol 1985;134:862-866.
19. Amberson JB, Vaughan ED, Gray GJ, et al: Flow cytometric determination of nuclear DNA content in benign adrenal pheochromocytomas. Urology 1987;30:102-104
20. González-Campora R, Díaz Cano S, Lerma-Puertas E, et al. Paragangliomas. Static cytometric studies of nuclear DNA patterns. Cancer 1993;71:820-824.
21. Isola J, Helin H, Helle M, Kallioniemi O. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma: comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis and mitotic count. Cancer 1990;65:1180-1184.
22. Sherr CJ: G1 Phase progression, cycling on .Cell 1994,79:551-555.
23. Guan KL, Jenkins LW, Li Y, Nicholas MA. Growth suppression by p18, a p16INK/MTS1 and p14INK4B/MTS2 related CDK6, inhibitor, correlates with wild type Rb function. Genes Dev 1994, 8:2939-2952.
24. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso O, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 1993, 366:701-704.
25. Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A. Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> in non-small lung cancer. Cancer Research 1997; 57: 3381-3385.



26. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inouet, Shishidu N: Mice lacking p27<sup>Kip1</sup> display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors. *Cell* 1996;85:707-720.
27. Tan P, Caddy B, Wanner M, Worland P, Cukor B, Magi-Galluzzi C, Lavin P, Draetta G, Pagano M, Loda M. The cell cycle inhibitor p27<sup>Kip1</sup> is an independent prognostic marker in small (T1a, b) invasive breast carcinomas. *Cancer research* 1997; 57:1259-1263.
28. Yoshimoto T, Naruse M, Zeng Z, Nishikawa T, Kasajima T, Toma H, Yamamori S, Matsumoto H, Tanabe A, Naruse K, Demura H. *J Endocrinol* 1998;159:247-255.
29. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E: Aberrant p27<sup>Kip1</sup> expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 1997, 150:401-407.
30. Chen J, Willingham T, Shoford M, Nisen PD: Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup>. *J Clin Invest* 1996, 97:1983-1988.
31. Tsihlias J, Kapusta LR, DeBoer G, Morava-Protzner I, Zbiernawski I, Bhattacharya N, -catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer research* 1998; 58:542-548.
32. Venkatesen TK, Kuropkat C, Caldarelli DD, Panje WR, Hutchinson JC, Chen S, Coon JS. Prognostic significance of p27<sup>Kip1</sup> expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope* 1999;109:1329-1333.

TRUCCO  
FALLA  
ESTA TESIS NO SE  
DE LA BIBLIOTECA

33. Steeg PS, Abram JS: Cancer prognostics: post, present and p27<sup>Kip1</sup>. *Nature med.* 1997;3:152-154.
34. Lloyd RV, Lori AE, Long J, Kulig E, Xiang Qian, Cheville JC: p27<sup>Kip1</sup>. A multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancer. *Am J Pathol* 1999, 154:313-323
35. Unger P, Hoffman K, Pertsemilidis D, Thung S, Wolfe D Kaneko M. S100 protein-positive sustentacular cells in malignant and locally aggressive adrenal pheochromocytomas. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:484-487.
36. Dobashi Y, Kudoh T, Matsumine A, Toyoshima K, Akiyama T. Constitutive overexpression of CDK2 inhibits neuronal differentiation of Rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 1995;270:23031-23037.

