

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**ASOCIACIÓN DE EGFR, FGFR, COX-2 Y PROLIFERACIÓN CELULAR COMO
INDICADORES DE COMPORTAMIENTO MALIGNO EN TUMORES
NEUROENDOCRINOS DEL PÁNCREAS, ÁMPULA DE VATER Y DUODENO.**

T E S I S

QUE PRESENTA:

IBI. BRENDA LETICIA ROCHA GUTIÉRREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CO-TUTORA: DRA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

CO-TUTOR: DR. GUILLERMO ROBLES DÍAZ

ASESOR: DR. ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de Posgrado de Excelencia del CONACYT con número de registro 309-0. Actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

Mi reconocimiento al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo a través de la beca-crédito con número de registro 176373.

COMITÉ TUTORAL

Co-Tutora

Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Co-Tutor

Dr. Guillermo Robles Díaz

Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

“Salvador Zubirán”

Asesor

Dr. Armando Gamboa Domínguez

Departamento de Patología y Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas

y Nutrición “Salvador Zubirán”

Con toda mi admiración, amor y respeto este trabajo se lo dedico a

Bertha y Gustavo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Armando Gamboa Domínguez por dedicarme tantas horas de su tiempo, permitirme ser parte de su grupo de trabajo y sobre todo por enseñarme a crecer profesionalmente. Al Dr. Guillermo Robles Díaz y a la Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz por su apoyo y observaciones.

A mis Padres por el apoyo diario, por creer y por confiar en mí. A Bertha (pachis), Martha (flaca) y Marco Antonio (marquín) por su cariño.

A Milena Saqui Salces por su amistad y apoyo continuo y lo más importante, por “hacerme pensar” en el momento menos esperado.

A Angélica por ser más que una amiga. A Lulú y Abel por ayudarme a entender la Biología Experimental además de su apoyo y amistad.

A Felipe por aparecer en el momento adecuado y por ser un suequito.

**ASOCIACIÓN DE EGFR, FGFR, COX-2 Y PROLIFERACIÓN CELULAR COMO
INDICADORES DE COMPORTAMIENTO MALIGNO EN TUMORES
NEUROENDOCRINOS DEL PÁNCREAS, ÁMPULA DE VATER Y DUODENO.**

TESIS

QUE PRESENTA:

IBI. BRENDA LETICIA ROCHA GUTIÉRREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CO-TUTORA: DRA. CONCEPCIÓN GUTIÉRREZ RUÍZ

CO-TUTOR: DR. GUILLERMO ROBLES DÍAZ

ASESOR: DR. ARMANDO GAMBOA DOMÍNGUEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALA

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Tumores neuroendocrinos pancreáticos (TNE)	3
Tumores carcinoides de ámpula de Vater y duodeno (TC-AV/D)	5
Proliferación celular	6
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVOS	11
General	11
Particulares	11
HIPÓTESIS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
Diseño del estudio	12
Selección de casos	12
Criterios de inclusión	12
Criterios de exclusión	12
Serie de estudio	12
Evaluación morfológica	13
Inmunohistoquímica	14
Interpretación de resultados	16

Análisis estadísticos	16
RESULTADOS	17
Tumores neuroendocrinos pancreáticos	17
Tumor endocrino bien diferenciado	19
Carcinoma endocrino bien diferenciado	20
Carcinoma endocrino pobremente diferenciado	20
Tumores carcinoides de ampulla de Vater y duodeno	22
Funcionalidad	24
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	31

RESUMEN

Los tumores neuroendócrinos de la región duodeno-pancreática son neoplasias de lento crecimiento, en ocasiones su presencia se percibe cuando el tumor produce alguna hormona funcional en cantidades descontroladas dando origen a síndromes clínicos. Los tumores no sindrómicos se identifican cuando el tamaño del tumor es capaz de dar manifestaciones clínicas y por tanto en algunos casos, la enfermedad es avanzada, sin embargo, ni la funcionalidad de un tumor endócrino ni el análisis histológico del mismo son herramientas suficientes para determinar el potencial maligno en estos tumores. Recientemente se ha descrito que los índices de proliferación celular pueden estar relacionados con las neoplasias malignas. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de receptores de factores de crecimiento (EGFR y FGFR) y COX-2 relacionando su expresión con la proliferación celular (Ki-67 y topoisomerasa II α) para discriminar entre tumores benignos y malignos de origen neuroendocrino.

Se identificaron 29 tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNE-P), 7 tumores carcinoides de ámpula de Vater y 3 duodenales (TC-AV/D). Se realizó inmunohistoquímica para EGFR, FGFR, COX-2, Ki-67 y topoisomerasa II α . Se identificó el porcentaje e intensidad de marca en células neoplásicas. La malignidad se estableció de acuerdo a la clasificación de la OMS. La información demográfica, clínica y seguimiento se obtuvo de los expedientes clínicos. Se utilizó U de Mann-Whitney y análisis de varianza para las comparaciones.

El tamaño en los TNE-P no funcionales fue mayor que en los TNE-P funcionales y en los TC-AV/D no hubo diferencias. El tamaño también varió entre los cuatro grupos de TNE-P, asociándose mayor tamaño del tumor con mayor agresividad de la enfermedad ($p < 0.05$). La expresión de los marcadores en estos tumores no presentó asociación con el comportamiento biológico maligno, sin embargo la expresión de FGFR y COX-2 fue menor en los grupos malignos sin presentar diferencias significativas. La enzima COX-2 se expresó en todos los casos malignos y en 67% de los benignos en

TC-AV/D, pero no se identificó asociación significativa en la expresión de EGFR, FGFR y COX-2 con malignidad, aunque sí se asoció mayor proliferación celular (Ki-67) con malignidad en este grupo ($p=0.03$) y no en los TNE-P. En conclusión, la expresión de EGFR, FGFR y COX-2 no es de utilidad para predecir comportamiento biológico maligno en TNE-P ni tampoco los índices de proliferación, que sí se asociaron con malignidad en TC-AV/D. La medición del tamaño del tumor es el mejor predictor de comportamiento biológico en los TNE-P. La funcionalidad de los TNE-P es útil para su pronta detección, sin ser un factor confiable para predecir el comportamiento biológico.

INTRODUCCIÓN

Tumores neuroendócrinos pancreáticos (TNE-P)

Los TNE-P abarcan entre 1-2% de todas las neoplasias pancreáticas y tienen incidencia anual en la población general de aproximadamente cinco casos por millón de habitantes [1]. Estas neoplasias se caracterizan por presentar crecimiento lento y su diferenciación neuroendocrina se determina por morfología convencional, histoquímica e inmunohistoquímica [2]. Histológicamente, las células de los TNE-P tienen aspecto citológico uniforme, en ocasiones presentan mitosis y su patrón de crecimiento puede ser sólido, acinar, trabecular, formando mantos e incluso se puede observar más de un patrón en el mismo tumor [3]. En general el patrón histológico de un TNE-P no permite determinar su estado funcional ni su comportamiento biológico.

Hasta hace pocos años la presencia de metástasis a ganglios o a órganos adyacentes era la única evidencia firme para determinar la malignidad de los tumores neuroendócrinos localizados en el páncreas, sin embargo, en la clasificación actual se analizan varias características. Cuando se trata de un tumor bien diferenciado con ausencia de metástasis, éste se puede ubicar en dos grupos, benigno e incierto, dependiendo de sus características morfológicas, si el análisis incluye al menos una de las siguientes características: más de dos centímetros en tamaño, entre dos y diez mitosis en diez campos, invasión perineural, angioinvasión y proliferación celular mayor al dos por ciento, se trata de un tumor con comportamiento incierto. De manera que los tumores de comportamiento incierto son más susceptibles a generar comportamiento agresivo.

El comportamiento biológico maligno de un TNE-P se determina de bajo-grado cuando el tumor es bien diferenciado, presenta metástasis y/o invasión local; y de alto-grado, cuando el tumor es pobremente diferenciado y presenta más de 10 mitosis en 10 campos; mientras que para determinar de manera definitiva el comportamiento biológico benigno de un TNE-P, no debe haber evidencia de metástasis y además se requiere de un periodo largo de tiempo en el seguimiento clínico del paciente [4].

Clínicamente entre el 50 y 60% de los TNE-P son funcionalmente activos, es decir, hay secreción descontrolada de hormonas como insulina, gastrina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) o glugagon, entre otras. Los síndromes característicos de cada hormona son: síndrome hipoglucémico o glucopénico, síndrome de Zollinger-Ellison, síndrome de Verner-Morrison y síndrome glucagonoma, respectivamente. Estas manifestaciones clínicas permiten sospechar la existencia de los tumores endócrinos aun en etapas iniciales.

En el grupo de los tumores funcionales, los insulinomas son el tipo más frecuente seguido por los gastrinomas [6]. Los insulinomas originados en el páncreas, tienen la característica de comportarse clínicamente en forma benigna en más del 95% de los casos, mientras que los gastrinomas en la misma región se comportan de forma maligna en aproximadamente el 60% de los casos [7]. El 60% de los casos diagnosticados como gastrinomas múltiples y 20% de los insulinomas múltiples, están asociados con la neoplasia endócrina múltiple tipo 1 (MEN-1) [8].

A diferencia de los TNE-P funcionales, los TNE-P no funcionales se detectan de manera incidental y/o tardía, esto se debe a que son tumores cuya secreción hormonal es escasa o biológicamente inactiva para producir un síndrome clínico, comprenden del 10 al 58% de los TNE-P [9,10] y en algunos casos se incluye en esta clasificación aquellos tumores que son secretores de polipéptido pancreático, neurotensina y calcitonina [11]. Se ha informado que 60% al 80% de los TNE-P no funcionales presentan actividad metastásica al momento del diagnóstico [12]. Aproximadamente el 15% de los casos diagnosticados como TNE-P no funcionales múltiples, están asociados con MEN-1 [8].

Debido a que basarse únicamente en la morfología del tumor para la predicción del comportamiento biológico en un TNE-P es difícil, diversos grupos de estudio han propuesto marcadores para ayudar a esta tarea. Dado que la proliferación celular se ha asociado con la malignidad, entre las proteínas estudiadas se encuentran aquellas que intervienen en el ciclo celular como p27 [13], p21 [13,14] y ciclina D1 [15]; marcadores de funciones que son vitales para el mantenimiento y continuidad del tumor como el receptor de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR) y CD34 [16]; y algunos

otros marcadores que se han asociado, como el receptor de progesterona [16,17]. También se han probado varios marcadores de proliferación celular además de Ki-67 [17,18] como topoisomerasa II α [16] y antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) [19] los cuales también han mostrado ser de utilidad variable en la predicción de comportamiento biológico maligno.

En el estudio realizado por Pelosi y colaboradores [17] comparando dos marcadores de proliferación celular, encontraron que existen índices de proliferación mayores al 5% en TNE-P malignos, medido con Ki-67 pero no así con PCNA. Del análisis de supervivencia, Ki-67 surge como un indicador de potencial metastático y como un predictor independiente de supervivencia. En el estudio realizado por Díaz-Rubio y colaboradores [16] se informa que el índice de proliferación medido con topoisomerasa II α es significativamente mayor en TNE-P malignos en comparación con los TNE-P benignos ($p=0.001$). Sin embargo ambos estudios no estratifican las diversas categorías de lesiones endocrinas establecidas por la OMS.

Por otro lado, Jorda y colaboradores [18] confirmaron los resultados de Pelosi en los que la inmunotinción para determinar la actividad proliferativa medida con Ki-67 en TNE-P con índices mayores al 5%, presenta asociación con pobre pronóstico y que estos descubrimientos son útiles en predecir la agresividad clínica de estos tumores, además de que la detección de Ki-67 por medio de inmunohistoquímica ha probado ser un método sencillo y confiable para la determinación de la actividad proliferativa en estas neoplasias.

Tumores carcinoides de ampulla de Vater y duodeno (TC-AVD)

Al igual que las células endocrinas del páncreas, las células endocrinas del ampulla de Vater y del duodeno se originan del endodermo [20], los tumores carcinoides se originan a partir de estas células y son neoplasias de lento crecimiento con distintas características clínicas y biológicas [21]. Los tumores carcinoides que surgen en el ampulla de Vater son neoplasias extremadamente raras y por esta razón usualmente se incluyen en el grupo de tumores carcinoides de duodeno.

Un estudio reciente evaluando la actividad proliferativa con Ki-67, muestra que índices de proliferación altos reflejan comportamiento biológico agresivo y potencial metastático en tumores carcinoides de ámpula de Vater y en tumores carcinoides de duodeno [22].

Proliferación celular

La proliferación celular depende de la actividad de diversos factores en condiciones fisiológicas y patológicas. Entre estos se han identificado factores de crecimiento y sus ligandos, así como otras moléculas como la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2).

Receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

La familia de receptores erbB se expresa en tejido epitelial, mesenquimal y de origen neuronal, en donde juegan papeles críticos en procesos como desarrollo embrionario, proliferación y diferenciación [21]. La familia erbB consiste de cuatro receptores transmembranales: receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR, c-erbB1 o HER1), erbB2 (HER2 o Neu), erbB3 (HER3) y erbB4 (HER4). EGFR es una glicoproteína de 170-kDa y es miembro de la familia de receptores tirosina cinasa (RTK). Este contiene un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembranal única y un dominio intracelular con un extremo C-terminal con múltiples sitios de fosforilación [24]. Los ligandos que activan el EGFR incluyen al factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el factor de crecimiento tipo-EGF de unión a heparina (HB-EGF), amfirregulina (AR), betacellulina (BTC), epirregulina (EPR) y epigeno (EPI) [25,26].

Las diversas respuestas celulares que se producen a causa de la activación de EGFR dependen en su mayoría del ligando que se le une, de modo tal que para activar proliferación celular, los ligandos encargados de producir dicha respuesta son EGF, TGF- α , AR y BTC [27]. Diversos estudios demuestran que EGFR se encuentra sobre-expresado en tumores pancreáticos malignos [28] y en TNE-P malignos [29], además que su sobre-expresión tiene implicaciones en la transformación a comportamiento maligno [30].

La ruta de señalización corriente abajo después de la activación de EGFR se inicia cuando se lleva a cabo la unión del ligando al receptor y da como resultado la formación de dímeros o heterodímeros. Esta unión genera la activación del dominio catalítico del receptor y con ello la autofosforilación de tirosinas del dominio catalítico del mismo, por consiguiente la unión a proteínas adaptadoras como Shc y Grb2. Estas proteínas se acoplan por medio de sus dominios SH2. Grb2 recluta a la proteína, Sos, cuando estas dos proteínas están unidas se cataliza la sustitución de GDP unido a Ras por GTP. Cuando GTP está unido, Ras puede activar una proteína cinasa, Raf-1, la primera de tres proteínas cinasas (Raf-1, MEK, MAPK) que forman una cascada en la que cada cinasa activa la siguiente por fosforilación. La última de este grupo, la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), se activa por la fosforilación en uno de sus residuos de treonina y uno de tirosina. Al activarse, entra en el núcleo y fosforila a factores de transcripción activándolos. De este modo se inicia la traducción de genes involucrados con el proceso de proliferación celular [31], ver figura 1.

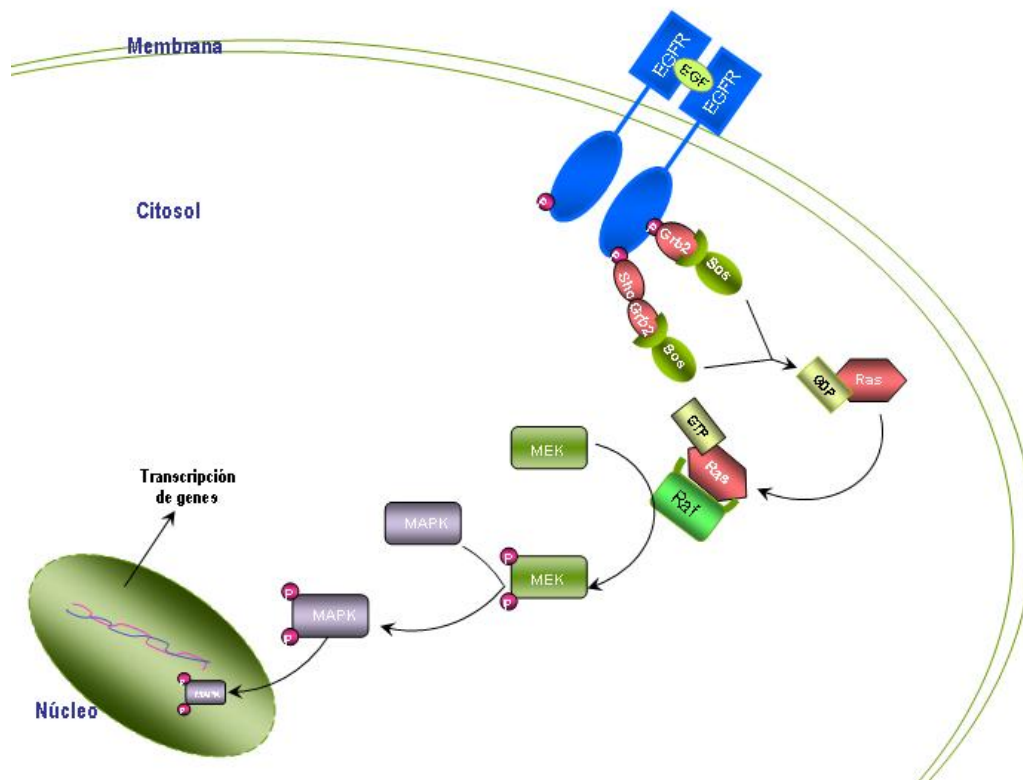


Figura 1. Respuesta celular asociada con señalización a través de la activación de EGFR.

Receptor de factor de crecimiento fibroblástico (FGFR)

El proceso de proliferación celular a través de la activación de la proteína MAPK también se lleva a cabo por la activación de otro miembro de la familia de RTK; el receptor de factor de crecimiento fibroblástico (FGFR). FGFR contiene un dominio extracelular de unión al ligando, una región única transmembranal y un dominio intracelular con un extremo C-terminal con múltiples sitios de fosforilación. La familia de FGFR está constituida por cuatro miembros FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 y FGFR-4 [32].

El ligando encargado de la activación de FGFR es el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), del cual se conocen al menos 18 miembros en la familia (FGF1-18). La activación de FGFR además de activar proliferación celular, también está implicado en procesos celulares tales como diferenciación y migración durante la embriogénesis [32].

La activación de FGFR requiere de la presencia de moléculas de heparina o del proteoglicano heparan sulfato (HSPG), que forman oligómeros con FGFs como se muestra en la figura 2 [33], la oligomerización y posterior unión con FGFR da como resultado la dimerización o heterodimerización del receptor y la activación del dominio tirosina cinasa [34].

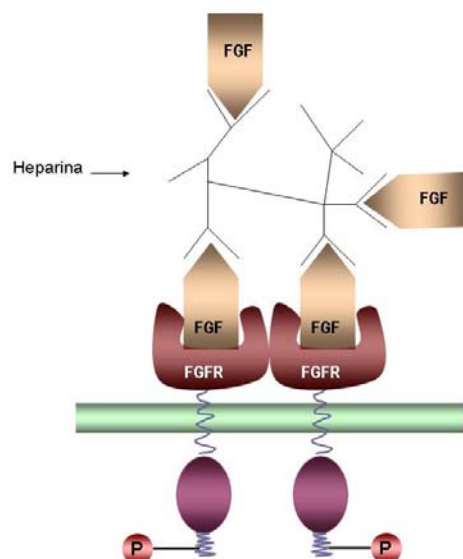


Figura 2. Oligomerización de FGF y posterior activación de FGFR.

Ciclooxigenasa-2 (COX-2)

En la activación del proceso celular de proliferación no solo están involucrados los receptores de factores de crecimiento y sus ligandos, En diversos estudios se ha encontrado que, en células endoteliales [35], líneas celulares de tumores endocrinos humanos [36] y líneas celulares de cáncer de colon [37], la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) se encuentra ampliamente relacionada en este proceso celular.

La enzima COX-2 también referida como prostaglandina endoperóxido H sintasa, es una proteína integral de membrana, que se encuentra en el retículo endoplásmico y en la envoltura nuclear. COX-2 tiene 72-kDa y se encuentra formando dímeros [38]. Esta enzima cataliza el primer paso en la biosíntesis de ácido araquidónico a prostaglandina H₂, un intermediario común en la síntesis de todas las prostaglandinas.

En la actualidad se le conocen dos isoformas, COX-1 y COX-2. La enzima COX-1 se expresa constitutivamente en tejidos del sistema cardiovascular y en la mucosa gástrica. Por otro lado COX-2 sólo se expresa de manera constitutiva en cerebro y riñón y es difícil encontrarla en tejido normal. Su expresión se induce rápidamente por ciertas citocinas inflamatorias, protooncogenes, oncogenes o por la acción de factores de crecimiento [39].

Se ha encontrado que la sobre-expresión de COX-2, además de inducir proliferación celular [35-37], también es capaz de incrementar el potencial metastásico [39] y generar angiogénesis en líneas celulares de carcinoma de colon [40].

JUSTIFICACIÓN

La falta de un método efectivo para identificar los TNE-P con potencial de comportamiento maligno, así como la asociación de malignidad con mayor proliferación celular, nos lleva a investigar si alguno de los factores determinantes del proceso de metástasis pudiera ser un marcador útil para identificar a las neoplasias malignas.

La evaluación por inmunohistoquímica de las proteínas antes mencionadas y la medición de su probable impacto en los índices de proliferación celular de los tumores endócrinos de la región duodenopancreática son de particular relevancia dado que existen bloqueadores farmacológicos específicos de EGFR, FGFR y COX-2.

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad de EGFR, FGFR y COX-2 como marcadores diferenciales en el diagnóstico y pronóstico de neoplasias neuroendocrinas de región duodenopancreática.

Particulares

- 1) Determinar la expresión de EGFR, FGFR y COX-2 en TNE-P y en TC-AV/D.
- 2) Establecer la asociación de los diversos marcadores inmunohistoquímica evaluados con las categorías diagnósticas establecidas y su pronóstico.
- 3) Identificar índices de proliferación celular y correlacionarlos con la expresión de EGFR, FGFR y COX-2.
- 4) Investigar diferencias en las otras variables estudiadas entre los tumores benignos y malignos.
- 5) Investigar diferencias en los resultados de acuerdo al origen anatómico de los tumores.

HIPÓTESIS

La expresión EGFR, FGFR, COX-2 y la proliferación celular, serán mayores en los TNE malignos.

La expresión de EGFR, FGFR y COX-2 permitirá la identificación oportuna de TNE malignos independientemente de su sitio de origen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Retrospectivo, transversal y comparativo

Selección de casos

a) Criterios de inclusión

- 1) Pacientes sometidos a biopsia quirúrgica o resección de neoplasias de páncreas, ampulla de Vater y duodeno con diagnóstico morfológico de TNE en el periodo de 1983 hasta 2004.
- 2) Contar con laminillas y bloques de parafina disponibles en el archivo de patología quirúrgica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.

b) Criterios de exclusión

- 1) Pacientes sometidos a biopsia o resección de neoplasias de páncreas, ampulla de Vater y duodeno sin comprobación morfológica de diferenciación neuroendocrina.
- 2) Pacientes en los que no se cuente con material patológico para estudio (laminillas o bloques de parafina).

Serie de estudio

Se seleccionaron en total 39 casos de neoplasias neuroendocrinas entre 1983 y 2004 del archivo de patología quirúrgica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Del expediente clínico se obtuvo edad, género, síndrome clínico asociado con la secreción de hormonas, tamaño del tumor, invasión vascular, metástasis a distancia y/o ganglionar, tiempo de seguimiento y estado actual de cada uno de los pacientes.

Evaluación morfológica

De los casos seleccionados, se confirmó el diagnóstico de neoplasia neuroendocrina revisando los tejidos de cada caso teñidos con hematoxilina y eosina. De la evaluación morfológica de cada uno de los casos se incluyó tamaño del tumor, presencia o ausencia de necrosis, número de mitosis en 10 campos (40X), invasión vascular, metástasis ganglionar y metástasis a distancia. La revisión de todos los casos se hizo en conjunto con un patólogo con experiencia en lesiones neuroendocrinas (AGD). Los TNE tanto del páncreas como de la región duodenal se clasificaron según la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [4]. Tabla 1 y 2.

Clasificación de TNE-P

Tumor endocrino bien diferenciado	Benigno <2 cm en tamaño, no angioinvasión, no invasión perineural, <2 mitosis en 10 campos y <2% Ki-67.
	Incierto ≥2 cm en tamaño, 2-10 mitosis en 10 campos, >2% Ki-67, angioinvasión e invasión perineural.
Carcinoma endócrino bien diferenciado	Maligno bajo-grado Invasión de órganos adyacentes y/o metástasis.
Carcinoma endócrino pobremente diferenciado	Maligno alto-grado >10 mitosis en 10 campos.

Tabla 1. Criterio de clasificación clínico-patológica de los TNE-P de acuerdo a la organización Mundial de la salud (OMS), 2004.

Clasificación de TC-AV/D

Tumor neuroendocrino bien diferenciado	Benigno Mucosa-submucosa, ≤ 1 cm en tamaño, sin angioinvasión.
	Incierto Mucosa-submucosa, > 1 cm en tamaño, con o sin angioinvasión.
Carcinoma neuroendocrino bien diferenciado	Maligno bajo-grado Invasión de musculares propia y/o metástasis.
Carcinoma neuroendocrino pobremente diferenciado	Maligno alto-grado

Tabla 2. Criterio de clasificación clínico-patológica de los TC-AV/D de acuerdo a la OMS, 2004.

Inmunohistoquímica

Las muestras de tumores se cortaron a 4 micrómetros de espesor y se colocaron en laminillas cargadas positivamente o en laminillas silanizadas. Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas en baños consecutivos de xilol, alcohol y por último solución amortiguadora (Tris pH 7.6).

La recuperación antigénica se realizó en olla de presión en dos ciclos de 7 minutos cada uno, utilizando solución amortiguadora de citrato 10mM a pH 6 para FGFR, solución amortiguadora EDTA 10mM a pH 8 para Ki-67 y topoisomerasa II α . Para EGFR se realizó digestión proteica con tripsina durante 5 minutos, para la recuperación del antígeno, mientras que para COX-2 no fue necesaria la recuperación antigénica, ver tabla 3 para las diluciones utilizadas. Después de la recuperación antigénica, se realizó inmunohistoquímica usando el sistema avidina-biotina de la siguiente manera:

1. Incubación durante 10 minutos con proteasa (únicamente para el anticuerpo EGFR).
2. Lavar e incubar durante 20 minutos con bloqueador de peroxidasa endógena.

3. Lavar e incubar durante 32 minutos el anticuerpo primario (EGFR, FGFR, COX-2, Ki-67 y topoisomerasa II α) para el control negativo se sustituye el anticuerpo por diluyente.
4. Lavar e incubar el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 minutos.
5. Lavar y dejar reaccionar la estreptoavidina asociada a peroxidasa durante 15 minutos.
6. Lavar y revelar con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno durante 5 minutos.
7. Lavar y contrastar con hematoxilina.

Nota: En todo el proceso de tinción no se debe dejar secar el tejido y todos los lavados se hacen con Tris pH 7.6.

Después del proceso de tinción, el tejido fue deshidratado en baños consecutivos de alcohol y xilol y las laminillas se montaron con resina para su posterior análisis en microscopio de luz.

Como control positivo para los anticuerpos Ki-67 y topoisomerasa II α se utilizó amígdala, para EGFR se utilizó piel; para FGFR se utilizó una cicatriz de piel, para COX-2 se utilizó un caso de carcinoma de pulmón y como control negativo en todos los casos se omitió el anticuerpo primario en el paso 3.

Fabricantes y diluciones de anticuerpos primarios utilizados en el método de inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Tipo	Fabricante	Dilución	Recuperación
EGFR	M	**Dako	1:25	Proteasa
FGFR	M	Abcam	1:100	Citrato
COX-2	P	Cayman	1:400	No
Ki-67	M	*Dako	1:75	EDTA
Topoisomerasa II α	M	*Dako	1:100	EDTA

Tabla 3. M: monoclonal; P: policlonal; Abcam Inc. Cambridge; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA; *Dako Cytomation, Carpinteria; **Dako Cytomation, Denmark.

Interpretación de resultados

La expresión de los marcadores COX-2, EGFR y FGFR se consideró como positiva en las células inmunoteñidas, tomando en cuenta todas las células del tumor se aproximó el porcentaje de células marcadas y la intensidad de la marca se clasificó como: negativo, cuando las células no presentaron expresión; 1+, cuando la tinción fue débil; 2+, cuando la tinción fue moderada y 3+, cuando la tinción se presentó intensa. Para la actividad proliferativa (Ki-67 y topoisomerasa II α) se consideraron los núcleos inmunoteñidos como células en proliferación (positivas). El análisis se hizo utilizando el objetivo 40X.

Análisis estadístico

Promedio, desviación estándar y mediana se usaron en forma descriptiva. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación entre grupos. Se hizo correlación de Pearson para establecer la relación entre la expresión de COX-2, EGFR FGFR con la proliferación celular y el comportamiento biológico. Se utilizó análisis de varianza para las comparaciones entre los grupos de TNE-P. Los resultados se consideraron significativos si el valor P fue menor a 0.05. Se usó el programa SPSS versión 11.0 para Windows.

RESULTADOS

Se identificaron 39 tumores neuroendócrinos, 29 localizados en páncreas (TNE-P) y 10 en región duodenal (TC-AV/D), del último grupo tres en ampulla de Vater. Los datos demográficos, las características de los tumores y resultados de marcadores de la serie de estudio se listan en la tabla 4.

Tumores neuroendócrinos pancreáticos

Las edades en el grupo TNE-P variaron entre 17 y 70 años, 17 tumores pertenecieron a mujeres y 12 a hombres. El 82% de los tumores funcionales fueron insulinomas y el 18% restante gastrinomas. De los pacientes con tumor no funcional 86% debutaron con dolor abdominal. El tamaño del tumor en este grupo fue significativamente mayor ($p=0.0001$) en comparación con el grupo de TC-AV/D.

Características	TNE-P (n=29)	TC-AV/D (n=10)
Género (M:F)	12:17	3:7
Edad promedio (años)	44	62*
Funcionales	22	3
Insulinomas	18	0
Gastrinomas	4	3
No funcionales	7	7
Tamaño del tumor (cm) (media \pm DE)	4.5 \pm 3.8	1.2 \pm 0.9*
Metástasis a ganglios	4	3
Metástasis a distancia	6	3
Invasión Vascular	4	4
Tiempo de seguimiento (meses) (media \pm DE)	46 \pm 51	65 \pm 50
EGFR (%)	2(7)	1(10)
FGFR (%)	10(35)	1(10)
COX-2 (%)	12(41)	8 (80)

Tabla 4. Características clínicas de TNE-P y TC-AV/D. M: masculino; F: femenino; DE: desviación estándar; * $p<0.05$ con U de Mann-Whitney.

Las neoplasias neuroendocrinas del páncreas fueron clasificadas utilizando los criterios propuestos por la OMS (tabla 1), en la tabla 5 se presentan las características clínicas y morfológicas de acuerdo a esta clasificación.

Características	Tumor endocrino bien diferenciado		Carcinoma endocrino bien diferenciado	Carcinoma endocrino pobremente diferenciado
	Benigno (n=9)	Incierto (n=14)	Maligno bajo-grado (n=5)	Maligno alto-grado (n=1)
Género (M:F)	4:5	5:9	2:3	1:0
Edad promedio (años)	41	42	46	67
Funcionales	9	11	2	0
Insulinomas	9	9	0	0
Gastrinomas	0	2	2	0
No Funcionales	0	3	3	1
Tamaño del tumor (cm) (media ±DE)	1.5±0.3	4.9±3.1*	7.6±5.5*	10*
Metástasis a ganglios	0	0	4	0
Metástasis a distancia	0	0	5	1
Invasión vascular	0	1	2	1
Invasión perineural	0	2	0	0
Necrosis	0	1	0	1
Mitosis (media ±DE)	1±1.22	2±2.85	1±2.23	10
Casos positivos Ki-67>2%	0	4	2	1
% Ki-67 (media ±DE)	0.7±0.5	1.3±1.3	1.4±1.1	60
Tiempo de seguimiento (meses) (media ±DE)	65±60	45±50	24±34	1

Tabla 5. Características clínicas y morfológicas de TNE-P. M: masculino; F: femenino; DE: desviación estándar. * p<0.05 ANOVA, con respecto al grupo de benignos.

Tumor endocrino bien diferenciado

Benigno

Cinco pacientes en este grupo fueron mujeres, la edad promedio fue de 41 años, todos los pacientes presentaron síndrome neuroglucopénico a causa de insulinoma y el tamaño promedio del tumor fue de 1.5 cm. Un paciente con insulinomas múltiples presentó neoplasia endocrina múltiple tipo-1 (NEM-1). El tiempo promedio de seguimiento en este grupo fue de 65 meses.

Incierto

El grupo de tumores con comportamiento incierto se determina cuando se presenta al menos una de las características enlistadas en la tabla 1. Nueve pacientes en este grupo fueron mujeres y la edad promedio fue de 42 años. Nueve pacientes presentaron síndrome neuroglucopénico por producción anormal de insulina y dos síndromes de Zollinger-Ellison a causa de gastrina. El tamaño promedio en este grupo fue de 4.9 cm y fueron significativamente mas grandes ($p=0.0001$) en comparación con el grupo benigno. Dos pacientes con insulinomas multicéntricos presentaron NEM-1. El tiempo promedio de seguimiento fue de 44 meses. La figura 3 muestra la morfología característica de este grupo de tumores y la baja actividad proliferativa medida con Ki-67.

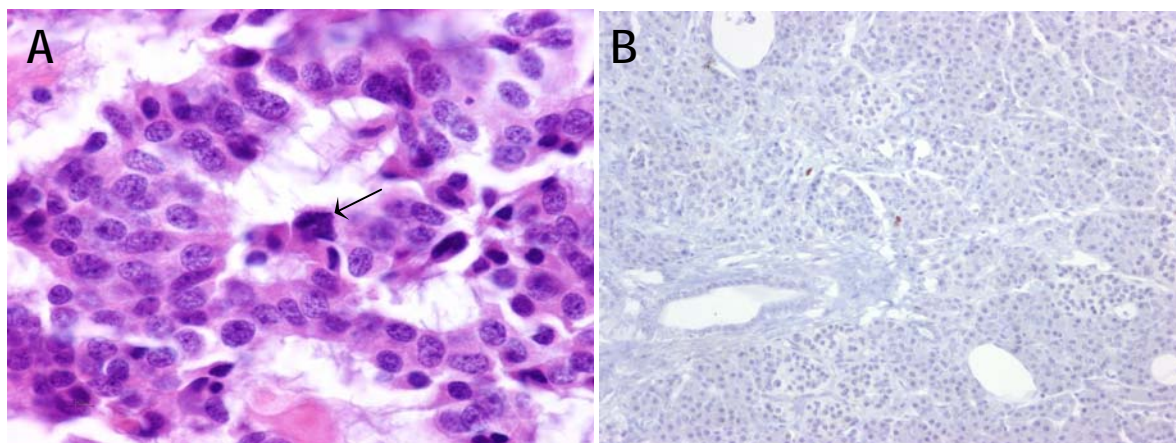


Figura 3. A: tinción hematoxilina y eosina de TNE-P de comportamiento incierto la flecha señala una célula en mitosis (40X). B: tinción inmunohistoquímica para Ki-67 con 2% de marca en el tumor (10X).

Carcinoma endocrino bien diferenciado

Maligno bajo-grado

Tres tumores en este grupo pertenecieron a mujeres y dos a hombres, la edad promedio fue de 46 años, hubo tres tumores no funcionales y los dos pacientes con tumor funcional (gastrinoma) presentaron síndrome de Zollinger-Ellison. El tamaño promedio de los tumores fue 7.6 cm y se encontró diferencia significativa ($p=0.029$) con respecto al grupo benigno. En este grupo el paciente con NEM-1 tuvo gastrinomas múltiples. El tiempo promedio de seguimiento fue de 24 meses.

Carcinoma endócrino pobremente diferenciado

Maligno alto-grado

Solo un hombre de 60 años presentó tumor no funcional con tamaño de 10 cm. El análisis morfológico del tumor reportó presencia de necrosis, más de 10 mitosis en 10 campos y la inmunoreacción para Ki-67 fue de 60% (figura 4), el paciente murió al mes de haber sido intervenido quirúrgicamente.

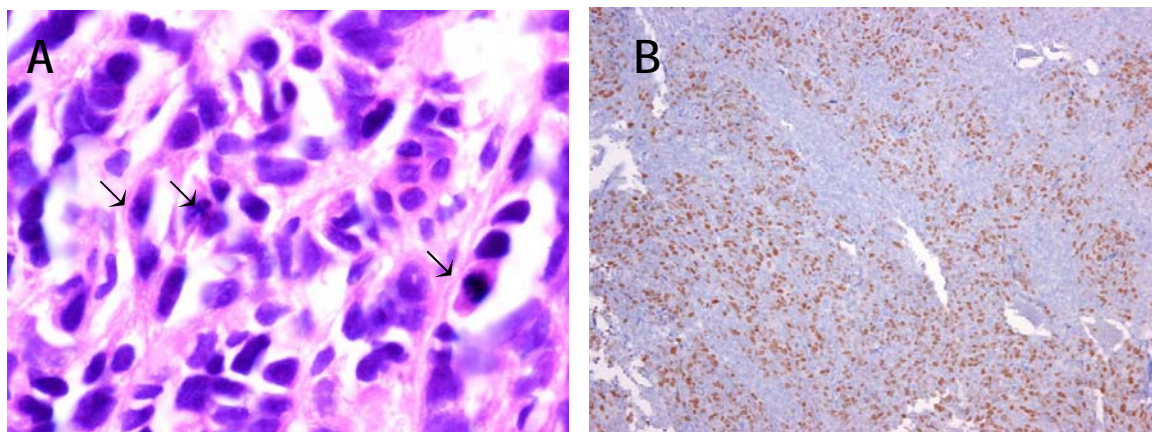


Figura 4. A: Tinción hematoxilina y eosina de TNE-P de comportamiento maligno alto-grado, las flecha señalan células en mitosis (40X). B: Tinción inmunohistoquímica para Ki-67 con 60% de marca en el tumor (10X).

La tinción para los diferentes marcadores no mostró diferencias significativas entre grupos. Para los TNE-P benignos la expresión de EGFR fue negativa y para COX-2 y FGFR la expresión fue del 56% en ambos casos. En los TNE-P inciertos el 43% de los casos expresó COX-2, el 21% de los casos expresó FGFR y el 7% de los casos EGFR con intensidad débil, ver tabla 6.

Marcador	Tumor endócrino bien diferenciado		Carcinoma endócrino bien diferenciado	Carcinoma endócrino pobremente diferenciado
	Benigno (n=9)	Incierto (n=14)	Maligno bajo-grado (n=5)	Maligno alto-grado (n=1)
EGFR	0/9	1/14 (7)	0/5	1/1
FGFR	5/9 (56)	3/14 (21)	1/5 (20)	1/1
COX-2	5/9 (56)	6/14 (43)	1/5 (20)	0/1

Tabla 6. Tinción inmunohistoquímica para, EGFR, FGFR y COX-2. Los casos que se presentan en intervalo son casos positivos/casos negativos y el porcentaje de casos positivos se presenta entre paréntesis.

Para el grupo con carcinoma endócrino bien diferenciado, la expresión de COX-2 y FGFR solo se presentó en un caso, mientras que en ninguno de estos casos se expresó EGFR. El carcinoma endócrino pobremente diferenciado no expresó COX-2, FGFR se expresó con intensidad débil y la expresión de EGFR fue positiva y de intensidad moderada (2+), ver tabla 6.

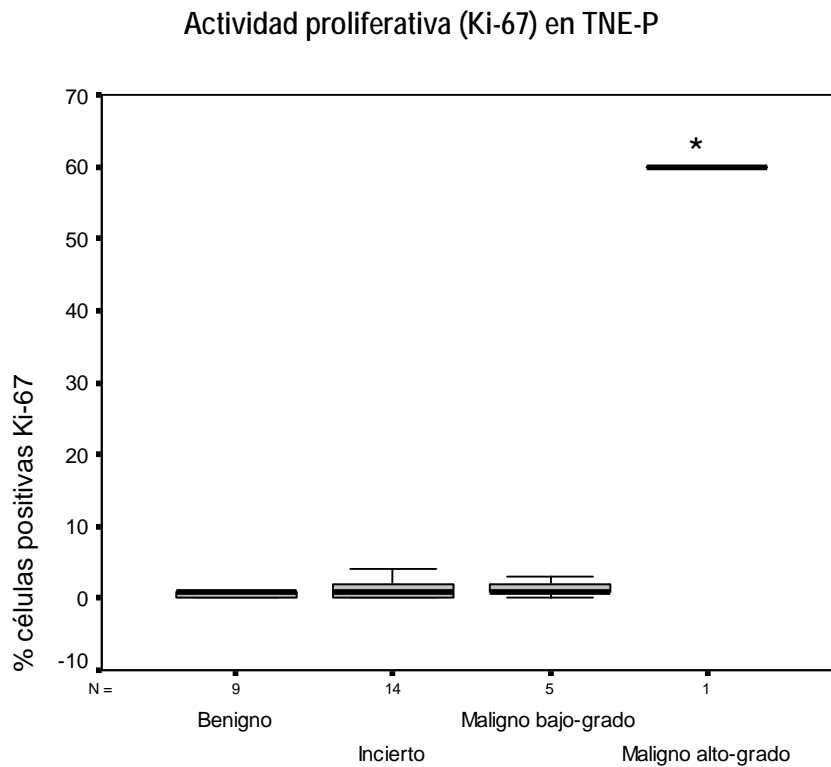


Figura 5. Porcentaje de células positivas para Ki-67. * $p=0.0001$ ANOVA.

Tumores carcinoides de ampulla de Vater y duodeno

En general para los TC-AV/D las edades variaron entre 31 y 82 años (promedio: 62 años) y fueron significativamente de mayor edad en comparación a los TNE-P ($p=0.007$); siete tumores pertenecieron a mujeres y tres a hombres. Todos los pacientes que presentaron síndrome clínico en los TC-AV/D se debieron a la producción de gastrina y se localizaron en duodeno. El 71% de los pacientes con tumor no funcional presentó dolor abdominal como síntoma predominante al momento del diagnóstico, seguido por ictericia, náusea y vómito 57%. El tamaño promedio en este grupo fue de 1.15 cm y el tiempo promedio de seguimiento fue de 65 meses (tabla 4).

Las neoplasias neuroendocrinas del área duodenal (TC-AV/D) fueron clasificadas utilizando los criterios propuestos por la OMS (tabla 2), en la tabla 7 se presentan las características demográficas, funcionales, de invasión y resultados inmunohistoquímicos de acuerdo a esta clasificación.

TC-AV/D	Benigno (n=6)	Maligno (n=4)
Género (M:F)	0:6	3:1
Edad (años) (media ±DE)	71±13	48±15*
Funcionales	2	1
Insulinomas	0	0
Gastrinomas	2	1
No funcionales	4	3
Tamaño del tumor (cm) (media ±DE)	0.96±0.62	1.43±1.21
Metástasis a ganglios	0	2
Metástasis a distancia	0	3
Tiempo de seguimiento (meses) (media ±DE)	50±33	88±67
EGFR (%)	0	1(25)
FGFR (%)	0	1(25)
COX-2 (%)	4(67)	4 (100)

Tabla 7. Características clínicas de TC-AV/D divididos por malignidad. M: masculino; F: femenino; DE: desviación estándar; * p=0.038 con U de Mann-Whitney, malignos versus benignos.

En los TC-AV/D no se presentaron lesiones con características de comportamiento incierto o maligno de alto grado. Se observó mayor expresión de los marcadores en los TC-AV/D malignos mientras que los benignos la expresión fue nula para ambos receptores. En los TC-AV/D malignos se presenta mayor proliferación medida por Ki-67 que los benignos (p=0.038) figura 6, sin embargo dicha diferencia no se observó con la reacción para topoisomerasa II α .

Actividad proliferativa (Ki-67) en TC-AV/D

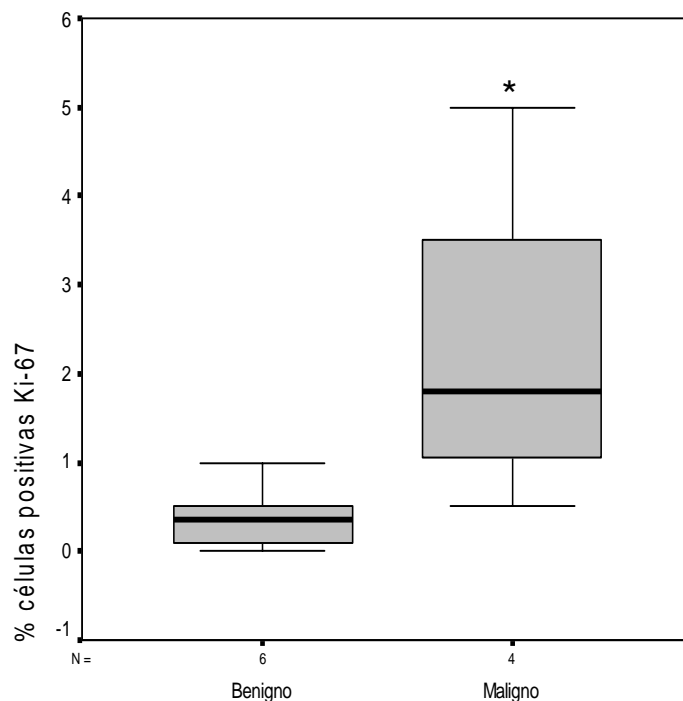


Figura 6. Porcentaje de células positivas para Ki-67. * $p=0.038$ U de Mann-Whitney, TC-AV/D malignos versus benignos.

Funcionalidad

Adicional a lo propuesto en los objetivos también se realizó la clasificación de las neoplasias neuroendocrinas de acuerdo a su funcionalidad en ambos sitio anatómicos, (tabla 8).

La mayoría de los TNE-P fueron funcionales ($n=22$) y ocurrieron principalmente en mujeres. La edad promedio de los pacientes con TNE-P funcional fue 41 años y 53 en los pacientes con tumor no funcional, presentándose diferencia significativa ($p=0.032$) entre ambos. El tamaño de los TNE-P funcionales fue significativamente menor que los no funcionales ($p=0.0001$).

En los TC-AV/D el 70% de los tumores fueron no funcionales y la mayoría ocurrió en hombres, mientras que en los TC-AV/D funcionales todos los tumores pertenecieron a mujeres. El tamaño promedio en los TC-AV/D funcionales fue de 1.5 cm y de un cm en los no funcionales.

Características	TNE-P		TC-AV/D	
	Funcionales (n=22)	No Funcionales (n=7)	Funcionales (n=3)	No Funcionales (n=7)
Género (M:F)	8:14	4:3	0:3	4:3
Edad promedio (años)	41	53*	60	62
Insulinomas	18	-	0	-
Gastrinomas	4	-	3	-
Tamaño del tumor (cm) (media ±DE)	3.0±1.5	10.4 ±2.4*	1.50±0.26	1.00±1.01
Metástasis a ganglios	2	2	0	2
Metástasis a distancia	2	4	1	2
Invasión vascular	1	3	0	0
Tiempo de seguimiento (meses) (media ±DE)	53±54	26±36	73±61	62±50

Tabla 8. Características clínicas de TNE-P y TC-AV/D. M: masculino; F: femenino; DE: desviación estándar. * $p < 0.05$ U de Mann-Whitney, funcionales versus no funcionales del mismo sitio anatómico.

En la tabla 9 se listan los resultados de tinción e intensidad de los diferentes marcadores en ambos sitios anatómicos divididos por funcionalidad, en el análisis comparativo entre tumores funcionales y no funcionales no se encontraron diferencias significativas en expresión ni en intensidad. El porcentaje de expresión en los tres marcadores fue de menos del 50% en todos los casos, con excepción de COX-2, que se expresó en 67% de los TC-AV/D funcionales y en 86% en los no funcionales.

Marcador	No. de casos positivos		Intensidad de tinción ^a			
			1+		2+	
TNE-P						
	Funcionales (n=22)	No Funcionales (n=7)	F	NF	F	NF
FGFR	8	2	6	2	2	-
EGFR	1	1	1	-	-	1
COX-2	10	2	8	-	2	2
TC-AVD						
	Funcionales (n=3)	No Funcionales (n=7)	F	NF	F	NF
EGFR	0	1	-	1	-	-
FGFR	0	1	-	1	-	-
COX-2	2	6	2	3	-	3

Tabla 9. Inmunotinción para COX-2, EGFR y FGFR comparando la expresión e intensidad entre tumores funcionales y no funcionales en TNE-P y TC-AVD. F: funcionales; NF: no funcionales; ^aIntensidad de tinción, 1+: tinción débil; 2+: tinción moderada.

DISCUSIÓN

Identificar el potencial maligno de tumores neuroendocrinos en la fase inicial de su abordaje diagnóstico persiste como un gran reto para morfológicos y médicos clínicos en general. Los patrones de crecimiento, atipia, displasia y mitosis no son indicadores confiables de comportamiento biológico y por otro lado, la presencia o ausencia de síndrome clínico por producción hormonal anormal tampoco es indicativo de su comportamiento. Las dificultades mencionadas no son privativas de los tumores endocrinos del páncreas y se reconocen al intentar predecir el comportamiento de casi cualquier neoplasia endocrina. En el presente estudio, la búsqueda de la expresión inmunohistoquímica de receptores involucrados en vías de crecimiento y diferenciación en tumores endocrinos de páncreas, ámpula de Vater y duodeno no permitió establecer asociaciones positivas para predecir su comportamiento maligno.

Los TNE-P se clasificaron en cuatro grupos utilizando los criterios propuestos por la OMS [4]. La principal característica en la cual se presentó diferencia significativa entre los cuatro grupos fue el tamaño del tumor, siendo de 1.5 cm para los tumores benignos y hasta de 10 cm para el carcinoma endocrino poco diferenciado. Es claro observar que el tamaño del tumor va en aumento conforme aumenta la agresividad del mismo en los TNE-P. De manera inversa, el tiempo promedio de seguimiento de los pacientes disminuye conforme aumenta la agresividad del tumor. Nuestra serie confirma la confiabilidad del análisis macroscópico cuidadoso del tamaño mayor de 2 cm, como indicador de malignidad en TNE-P que ha sido recientemente avalado [4].

No se presentó mayor expresión inmunohistoquímica de EGFR y FGFR, tampoco se observó correlación entre la expresión de estos factores con la proliferación celular (Ki-67 y topoisomerasa II α), lo que nos indica que la activación del proceso proliferativo celular y por tanto el crecimiento del tumor no se debe a la acción de estos dos receptores. Al igual que en el estudio realizado por Srivastava [28] la expresión de EGFR en nuestra serie de estudio no muestra correlación con el tamaño del tumor, estatus funcional y mucho menos con el comportamiento biológico en los TNE-P.

Aunque se conoce que durante la embriogénesis FGFR está involucrado en la proliferación de las células precursoras del epitelio pancreático y su diferenciación [42], no existen trabajos previos evaluando la expresión de FGFR en neoplasias de origen endocrino. Nuestra búsqueda de FGFR ha sido original en ese sentido, sin embargo, la expresión de dicho marcador no se asoció con el grado de agresividad de los TNE-P. Al contrario de lo esperado, apreciamos una disminución de la expresión de FGFR entre las neoplasias benignas y malignas bien diferenciadas del páncreas.

En el caso de COX-2 existen dos trabajos previos evaluando su expresión en TNE-P. En el estudio realizado por Ohike [43] sus datos demuestran que COX-2 está sobre-regulada en TNE-P malignos y que existe una relación cercana entre la expresión de COX-2 y la actividad proliferativa. Sin embargo, en el estudio realizado por Okami [44] el 73% de los TNE-P benignos y el 50% de los malignos expresaron COX-2, concluyendo que la expresión de esta enzima no se relaciona con malignidad. Nuestros datos concuerdan con los reportados por Okami; considerando como benignos la ausencia de metástasis y como malignos la presencia de éstas, la expresión de COX-2 fue de 48% y de 16% respectivamente. Creemos que la expresión de COX-2 tampoco es un marcador de malignidad en TNE-P y contrariamente, apreciamos una tendencia de menor expresión conforme menor diferenciación de los tumores.

Topoisomerasa II α se ha utilizado como marcador de proliferación celular por ser un factor necesario para el funcionamiento normal de la célula controlando la conformación del ADN, replicación y otros eventos transcripcionales. Díaz-Rubio [16] reporta que topoisomerasa II α es un marcador útil para evaluar la fracción de crecimiento tumoral y predecir malignidad en TNE-P. En el análisis de nuestros datos este marcador de proliferación no fue de utilidad en la predicción de malignidad en TNE-P bien diferenciados. La expresión de la proteína nuclear Ki-67 está estrictamente asociada con proliferación celular y se usa de rutina en patología como un marcador confiable de proliferación midiendo la fracción de crecimiento de células tumorales humanas [45]. A excepción del TNE-P pobremente diferenciado en el cual el índice de proliferación celular fue del 60%, en el análisis del resto de los TNE-P no se identifica relación entre proliferación celular y comportamiento maligno.

El número de mitosis y tamaño en los tumores endocrinos del páncreas son variables en aumento de acuerdo a la agresividad del tumor. El número de mitosis se correlacionó con el porcentaje de células positivas para Ki-67 ($p=0.0006$), esta correlación es esperable ya que ambos marcadores expresan la actividad con la que un tumor prolifera. Sin embargo, en nuestra serie dichas variables no son significativas para predecir comportamiento maligno.

El análisis de los TC-AV/D no aportó diferencias significativas entre comportamiento biológico benigno y maligno de las variables estudiadas, a excepción de la edad a la cual los pacientes desarrollan la enfermedad, siendo significativamente mayor en los TC-AV/D benigno (71 años), que los pacientes con tumor maligno (48 años). Por otro lado, en el análisis de proliferación celular medido con Ki-67 se observó que los TC-AV/D malignos presentan mayor porcentaje de marca que los benignos ($p=0.038$), este resultado coincide con el estudio de Bornstein-Quevedo [22], en el cual se reporta mayor actividad proliferativa en los tumores carcinoides metastásicos.

En cuanto a la expresión de EGFR, FGFR y COX-2, no se identificaron diferencias significativas entre los TC-AV/D benignos y malignos. Sin embargo, sí se observaron casos positivos de dichos marcadores en los TC-AV/D malignos.

Los pacientes con tumores no funcionales pueden ser asintomáticos al inicio de la enfermedad. El retraso en la aparición de los síntomas puede ser la razón por la cual en nuestro estudio los TNE-P no funcionales son de mayor tamaño que en los funcionales ($p=0.0001$). Sin embargo en los TC-AV/D no se observó esta diferencia, por lo que la funcionalidad de un tumor es una característica muy útil en la detección temprana del mismo, siempre y cuando se genere un síndrome clínico característico. En nuestro análisis, el que un tumor endocrino de la región duodeno-pancreática sea o no funcional no está implicado en el comportamiento biológico del mismo. El análisis de los receptores evaluados dividiendo los tumores endocrinos por funcionalidad en las tres localizaciones, no identificó diferencias significativas entre lesiones benignas y malignas.

En la presente serie prevalecieron las mujeres portadoras de tumores endocrinos. En los TNE-P la relación hombre/mujer es de aproximadamente 1 a 1.5 y de 1 a 2 en los TC-AV/D. Aunque

ligeramente menor, esta tendencia también se observó en el estudio realizado por Tomassetti [41]. El análisis demográfico de la serie total ofrece diferencias significativas en cuanto a la edad en que los pacientes desarrollan el tumor; para los TNE-P la edad promedio fue de 44 años, la cual es menor que la reportada en estudios previos [5,10,18,41]. En pacientes con TC-AV/D la edad promedio fue de 62 años. El tamaño del tumor también es un factor que ofrece diferencias significativas entre los TNE-P y los TC-AV/D, los primeros fueron de 4.5 cm en promedio y en los TC-AV/D el tamaño fue de 1.15 cm, esta diferencia en tamaño tal vez se deba a que los tumores que se generan en el duodeno y ampulla de Vater crean obstrucción en los ductos necesarios para el paso de enzimas producidas por las células exocrinas del páncreas y el drenaje biliar. La acumulación de estas enzimas en sitios inadecuados puede producir síntomas clínicos obstructivos en los pacientes y de este modo hacer evidente la presencia del tumor, aunque el tumor sea no funcional.

CONCLUSIONES

El tamaño mayor a 2 centímetros se asocia con mayor frecuencia al comportamiento maligno en TNE-P.

La funcionalidad de los TNE-P no es un factor determinante de comportamiento biológico, pero sí es de utilidad en la detección temprana del tumor.

La expresión de COX-2, EGFR y FGFR no es de utilidad en la predicción de comportamiento maligno en los TNE-P ni en los TC-AV/D.

Los TNE-P bien diferenciados muestran tendencia a menor expresión de FGFR y COX-2. Dichos hallazgos deben re-evaluarse utilizando métodos cuantitativos y mayor número de casos.

Para los TC-AV/D la determinación del índice de proliferación con Ki-67 se asoció con comportamiento maligno.

REFERENCIAS

1. Norton J. Neuroendocrine tumors of the pancreas and duodenum. *Curr Probl Surg* 1994;31(2):89-156.
2. Armando Gamboa-Domínguez. Patología y ultraestructura de los tumores endocrinos. In: Miguel F. Herrera, Luis F. Uscanga, Guillermo Robles Días, Manuel Campuzano Fernández. *PANCREAS*. Eds: McGraw-Hill Interamericana. 439.2000.
3. Heitz P, Kasper M, Polak J, Kloppel G. Pancreatic endocrine tumors. *Hum Pathol* 1982;13: 263-271.
4. Heitz U, Komminoth P, Perren A, Klimstra D, Dayal Y, Bordi C, Lechago J, Centeno B, Klöppl. Pancreatic endocrine tumors. In: *Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs*. WHO Classification of Tumors. International Agency for Research on Cancer (IARC) 69008 Lyon, France. 2004;179.
5. Hochwald S, Zee S, Conlon K, Colleoni R, Louie O, Brennan M, Klimsta D. Prognostic factors in pancreatic endocrine neoplasms: an analysis of 136 cases with a proposal for low-grade and intermediate-grade groups. *J Clin Oncol* 2002;36:421-432.
6. Proye C, Lokey J. Current concepts in functioning endocrine tumors of the pancreas. *World J Surg*. 2004;28:1231-1238.
7. Norton J, Doppman J, Jensen R. Cancer of the endocrine system. In: DeVita V, Hellman S, Rosenbers S., eds. *Cancer: principles and practice of oncology*. Philadelphia: Lippincott, 1989;1269-1344.
8. Dean P, Heerden J, Farley D, Thomson G, Grant C, Harmsen W, Ilstrup D. Are patients with Multiple Endocrine Neoplasia type I prone to premature death?. *World J Surg* 2000;24:1437-1441.
9. Phan G, Yeo C, Hruban R. Surgical experience with pancreatic and peripancreatic neuroendocrine tumors: review of 125 patients. *J Gastrointest Surg* 1998;2:472-482.
10. Chu Q, Hill H, Douglass H, Driscoll D, Smith J, Nava H, Gibbs J. Predictive factors associated with long-term survival in patients with neuroendocrine tumors of the pancreas. *Ann Surg Oncol* 2002;9:855-862.
11. Mansour J, Chen H. Pancreatic endocrine tumors. *J Surg Res* 2004;120:139-161.

12. Schindl M, Kaczirek K, Kaserer K, Niederle B. Is the new classification of neuroendocrine pancreatic tumors of clinical help? *World J Surg* 2000;24:1312-1318.
13. Canavese G, Azzoni C, Pizzi S, Corleto V.D, Pasquali C, Davoli C, Pellegrino C, Fave G.D, Bordi C. p27: A potential main inhibitor of cell proliferation in digestive endocrine tumors but not a marker of benign behavior. *Hum Pathol* 2001;32:1094-1101.
14. Sydney S, Xinyi W, Shimoide A, Wong J, Sawicki M. Anomalous overexpression of p27^{Kip1} in sporadic pancreatic endocrine tumors. *Journal of Surgical Research* 2001;96:284-288.
15. Chung D, Brown S, Graeme-Cook F, Seto M, Warshaw A, Jensen R, Arnold A. Overexpression of cyclin D1 occurs frequently in human pancreatic endocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4373-4378.
16. Díaz-Rubio J, Duarte-Rojo A, Saqui-Salces M, Gamboa-Domínguez A, Robles-Díaz G. Cellular proliferative fraction measured with topoisomerase II α predicts malignancy in endocrine pancreatic tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:426-429.
17. Pelosi G, Bresaola E, Bogina G, Pasini F, Redella S, Castelli P, Iacono C, Serio G, Zamboni G. Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables. *Hum Pathol* 1996;27:1124-1134.
18. Jorda M, Ghorab Z, Fernandez G, Nassiri M, Hanly A, Nadji M. Low nuclear proliferative activity is associated with nonmetastatic islet cell tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:196-199.
19. Pelosi G, Zamboni G, Doglioni C, et al. Immunodetection of proliferating cell nuclear antigen assesses the growth fraction and predicts malignancy in endocrine tumors of the pancreas. *Am J Surg Pathol* 1992;16:1215-1225.
20. Leotlela P, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Thakker R. Genetics of neuroendocrine and carcinoids tumors. *Endocrine-Related Cancer* 2003;10:437-450.
21. Modlin I. M, Lye K. D, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid Tumors. *Cancer* 2003;97:934-959.
22. Borntein-Quevedo L, Gamboa-Domínguez A. Carcinoid tumors of the duodenum and ampolla of Vater: a clinicomorphologic immunohistochemical, and cell kinetic comparison. *Hum Pathol* 2001;32:1252-1256.

23. Simon M. Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. *Cell* 2000;103:13-15.
24. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31: 637-643.
25. Harris R, Chung E, Coffey R. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003;284:2-13.
26. Bogdan S, Klämbt C. Epidermal growth factor receptor signaling. *Curr Biol* 2001;11:R292-R295.
27. Cohen S. EGF and its receptor: historical perspective. Introduction. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1997;2:93-96.
28. Srivastava A, Alexander J, Lomakin I, Dayal Y. Immunohistochemical expression of transforming growth factor α and epidermal growth factor receptor in pancreatic endocrine tumors. *Human Pathol* 2001;32:1184-1189.
29. Fjällskog M, Lejonklou M, Öberg M, Ekicsson B, Janson E. Expression of molecular targets for tyrosine kinase receptor antagonists in malignant endocrine pancreatic tumors. *Clin Cancer Res* 2003;9:1469-1473.
30. Tobita K, Kijima H, Dowaki S, Kashiwagi H, Ohtani Y, Oida Y, Yamazaki H, Nakamura M, Ueyama Y, Tanaka M, Inokuchi S, Makuuchi H. Epidermal growth factor receptor expression in human pancreatic cancer: Significance for liver metastasis. *Int J Mol Med* 2003;11:305-309.
31. Singh A, Harris R. Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 2005;17:1183-1193.
32. Jaye M, Schlessinger, Dionne C. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1992;1135:185-199.
33. Spivak-Kroizman T, Lemmon M, Dikic I, Ladbury J, Lax I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell* 1994; 79:1015-1024.
34. Eliceiri B, Klemke R, Stromblad S, Cheresh D. Integrin $\alpha v \beta 3$ requirements for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 1998;140:1255-1263.
35. Leahy K, Ornberg R, Wang Y, Zweifel B, Koki A, Masferrer J. Cyclooxygenase-2 inhibitor by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo. *Cancer Res* 2002;62:625-631.

36. Detjen K, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit growth of human neuroendocrine tumor cell via G₁ cell-cycle arrest. *Int J Cancer* 2003;107:844-853.
37. Tsujii M, Kawano S, DuBois R. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:3336-3340.
38. Garavito R, DeWitt D. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441:278-287.
39. Prescott S, Fitzpatrick. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M69-M78.
40. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois R. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998;93:705-716.
41. Tomassetti P, Campana D, Piscitelli L, Casadei R, Santini D, Nori F, Morselli-Labate A, Pessilli R, Corinaldesi. Endocrine pancreatic tumors: factors correlated with survival. *Ann Oncol* 2005;16:1806-1810.
42. Elghazi L, Cras-Méneur C, Czemichow P, Scharfmann R. Role for FGFR2IIIb-mediated signals in controlling pancreatic endocrine progenitor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3884-3889.
43. Ohike N, Morohoshi T. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase (COX)-2 expression in pancreatic endocrine tumors: Association with tumor progression and proliferation. *Pathol Int* 2001;51:770-777.
44. Okami J, Nakamori S, Yamamoto H, Sakon M, Tsujie M, Hayashi N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Ohigashi H, Monden M. An immunohistochemical study of cyclooxygenase (COX)-2 expression in endocrine tumors of the pancreas. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21:569-576.
45. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M, Key G, Flad H, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993;123:513-522.

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 24 de noviembre del 2005.

Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz
PRESIDENTE

Dr. Guillermo Robles Díaz
SECRETARIO

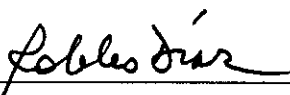
Dr. Armando Gamboa Domínguez
VOCAL

Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 24 de noviembre del 2005.



Dra. Concepción Gutiérrez Ruíz

PRESIDENTE



Dr. Guillermo Robles Díaz

SECRETARIO



Dr. Armando Gamboa Domínguez

VOCAL