



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del

Principado de Asturias

# **Análisis Genético de Paragangliomas de cabeza y cuello**

**María Agustina Sevilla García  
Oviedo, 26 de Mayo de 2008**

Memoria de Tesis Doctoral





Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del

Principado de Asturias

# **Análisis Genético**

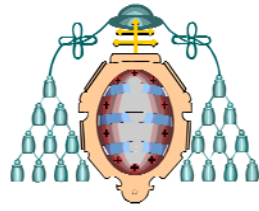
## **de Paragangliomas de**

### **cabeza y cuello**

Memoria de Tesis Doctoral

Nombre del Autor/a  
Dña. Maria Agustina Sevilla García

Nombre Directores  
D. Carlos Suárez Nieto  
D. Mario Hermsen  
D. José Luis Llorente Pendás



Reservados todos los derechos  
© El autor  
Edita: Universidad de Oviedo  
Biblioteca Universitaria, 2009  
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 37  
ISBN: 978-84-691-6705-2  
D.L.: AS. 05356-2008



A mis padres,  
por darme la vida y enseñarme el mundo,  
A Carlos Suárez, mi maestro,  
por enseñarme esta profesión y ser todo un ejemplo de superación,  
A Fernando mi compañero en la vida,  
por enseñarme el Amor. . .



Durante estos años, siempre soñé que un día escribiría los agradecimientos de mi tesis, lo que supondría que estaba prácticamente terminada. Ahora ese momento ha llegado y no sé muy bien por donde empezar. Habéis sido muchos los que me habéis apoyado este tiempo, de muy distinta forma, en momentos no poco difíciles. Sin vosotros este trabajo nunca habría visto la luz. A todos vosotros, **GRACIAS**. Ahora se cierra un capítulo importante de mi vida y comienza otro, del que espero también seáis mi motor principal.

Así, el presente trabajo de tesis doctoral debe lo mejor que pueda ofrecer a la orientación, sugerencias y estímulo de sus directores:

**Dr. Carlos Suárez Nieto.** Quien a pesar de otras muchas ocupaciones y dificultades se comprometió y trabajó intensamente en esta tesis. Por haber sido responsable de mi formación global en esta profesión, por su magistral dirección y apoyo personal. Su influencia ha sido, es y será fundamental para mi formación integral, científica y clínica por ser todo un ejemplo para todos nosotros.

**Dr. José Luis Llorente Pendás.** Es obligatorio expresar también mi agradecimiento al profesor Llorente Pendás por trasmitirme su espíritu inquieto e inagotable de trabajo y ansias de saber, por su docencia, gran profesionalidad y por su incondicional apoyo.

**Dr. Mario Hermsen.** Por su inestimable ayuda, su sólida experiencia e inmensa paciencia, siempre aportando valiosas observaciones y correcciones que he procurado atender en la medida de lo posible. Trabajar junto a él y personas como **Marta Guervós, Milagros Balbín, Aurora Astudillo, Eva Alloca y todo el personal también del laboratorio del IUOPA...** ha sido para mí un gran honor y vaya de antemano todo mi agradecimiento a todos. Y, quisiera que estas palabras no sean consideradas como una simple formalidad para cubrir un



requisito impuesto por la costumbre, sino un sentimiento de profundo reconocimiento a todas aquellas personas que me han ayudado y han podido hacer realidad esta tesis doctoral.

**Dr. Juan Pablo Rodrigo Tapia.** A quien considero también con mayúsculas MI MAESTRO, por sus múltiples enseñanzas, su apoyo personal y su colaboración desinteresada en mis proyectos, que siempre ha tratado como si fueran suyos.

A **todos los médicos de la plantilla y compañeros residentes** del servicio de ORL del HUCA, quiero expresar también mi agradecimiento. No puedo nombrarlos a todos ahora, pero cada uno de ellos ha contribuido de alguna manera especial a la realización de este trabajo. Y, no podía olvidarme de **los profesionales de enfermería y auxiliares, y demás trabajadores del hospital** por su gran profesionalidad y el trato humano que han demostrado con los enfermos.

A **todos los miembros de este Tribunal** por aceptar sin trabas la propuesta realizada de estar hoy aquí y honrarme con su presencia y apoyo.

Y, en el plano personal, el primer agradecimiento va por supuesto para **mi familia**. Empezando por los más cercanos y hasta los más lejanos todos han ayudado, desde los imprudentes que insistían en enterarse del tema de la tesis hasta los que preguntaban que cuando estaría terminada, pasando por los que se reían de ella, contribuyendo así a aligerar el peso. Cada uno sabe la parte que le corresponde.

Esta tesis está dedicada a **mis Padres**, a quienes agradezco de todo corazón el haberme enseñado el bien y la perseverancia del trabajo, les doy las gracias por sus esfuerzos y por su eterna confianza en mí.

A mis hermanas **Mercedes y Alexandra**, y a mi “hermanica” **Beatriz Llorente**, quiero darles las gracias por haber estado a mi lado en todo

momento, por su confianza y lealtad. Sé que cuento con vosotras siempre.

**A mis abuelos**, quien seguro que intentarán leerlo, todo mi agradecimiento y cariño.

Finalmente, agradezco haber encontrado el amor y compartir mi existencia con él, **Fernando**. Él es mi mejor amigo, mi compañero y quien mejor me conoce y sabe lo gratificante que ha sido para mí llevar a cabo este proyecto. Muchas de las horas aquí invertidas se las he robado a él, y a pesar de ello me ha prestado siempre el apoyo y cariño necesarios que sólo una gran persona puede dar.



# **Indice**



<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.- PARAGANGLIOMAS DE CABEZA Y CUELLO</b> .....	<b>21</b>
1.1.1. <i>Epidemiología</i> .....	21
1.1.2. <i>Etiopatogenia</i> .....	22
1.1.3. <i>Funciones fisiológicas de los paraganglios</i> .....	23
1.1.4. <i>Histopatología</i> .....	25
1.1.5. <i>Clínica</i> .....	28
1.1.6. <i>Tratamiento</i> .....	30
1.1.7. <i>Genética de los paragangliomas de cabeza y cuello</i> .....	34
1.1.7.1. Los Genes SDHA, SDHB, SDHC y SDHD .....	35
1.1.7.2. Teorías de la Tumorigénesis.....	39
1.1.7.3. El fenómeno del Imprinting genético.....	40
1.1.7.4. Espectro de las mutaciones sobre el gen SDH.....	44
1.1.7.5. Mutaciones en los genes RET, VHL y NF1 .....	49
1.1.7.6. Cambios somáticos en los PGLs y PCC.....	51
1.1.7.7. Cribaje y estudios genéticos en los PGLs de cabeza y cuello/PCC .....	52
<b>1.2.- TECNICAS DE ANALISIS GENETICO</b> .....	<b>54</b>
1.2.1. <i>Microarray-CGH</i> .....	55
1.2.1.1. Consideraciones generales .....	55
1.2.1.2. Aplicaciones de los Microarrays-CGH en la clasificación, pronóstico y tratamiento de cáncer .....	57
<b>2. Hipótesis</b> .....	<b>61</b>
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>65</b>
<b>4. Material y métodos</b> .....	<b>69</b>

4.1. SERIE CLÍNICA DE PARAGANGLIOMAS.....	71
4.1.1. <i>Serie clínica de los 72 pacientes con PGLs</i> .....	71
4.1.2. <i>Serie clínica de los 24 pacientes con PGLs estudiados             mediante Microarrays-CGH</i> .....	73
4.2. MUESTRAS DE PACIENTES CON PGLs.....	77
4.2.1. <i>Procesado de muestras</i> .....	77
4.2.2. <i>Extracción de DNA</i> .....	77
4.2.2.1. <i>A partir de tejido fresco</i> .....	79
4.2.2.2. <i>A partir de sangre fresca</i> .....	79
4.3. LA TÉCNICA DE MICROARRAYS-CGH.....	81
4.3.1. <i>Análisis estadístico</i> .....	83
4.4. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES GERMINALES EN LOS GENES SDHB, SDHC, SDHD, RET Y VHL .....	84
4.4.1. <i>Análisis genético molecular</i> .....	84
4.4.2. <i>MLPA</i> .....	86
4.4.2.1. <i>Fundamento de la técnica</i> .....	86
4.4.3. <i>Algoritmo empleado para priorizar el análisis de los             genes SDHB, SDHC y SDHD</i> .....	90
5. Resultados.....	93
5.1. CLÍNICO PATOLÓGICOS.....	95
5.1.1. <i>Características demográficas y clínico-patológicas</i> .....	95

5.1.2. Tratamiento y <i>evolución postoperatoria de los PGLs</i> .....	97
5.2 ESTUDIO DE LAS MUTACIONES GERMINALES EN LOS GENES SDHB, SDHD, SDHC, VHL Y RET .....	102
5.2.1.- <i>Algoritmo empleado para priorizar el análisis de     los genes SDHB, SDHC y SDHD</i> .....	109
5.3 ESTUDIO MEDIANTE MICROARRAYS-CGH.....	111
6. <b>Discusión</b> .....	117
6.1. JUSTIFICACIÓN.....	119
6.2. ASPECTOS CLÍNICO PATOLÓGICOS.....	120
6.3. ASPECTOS GENÉTICOS.....	122
6.3.1 <i>Estudio de las mutaciones en los genes SDHB, SDHC,         SDHD, VHL y RET</i> .....	122
6.3.2 <i>Algoritmo empleado para priorizar el análisis de         los genes SDHB, SDHC y SDHD</i> .....	125
6.3.3 Estudio de las Alteraciones cromosómicas mediante Microarrays-CGH .....	128
6.4. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	131
7. <b>Conclusiones</b> .....	133
8. <b>Acrónimos</b> .....	137
9. <b>Bibliografía</b> .....	141





# **1.- Introducción**

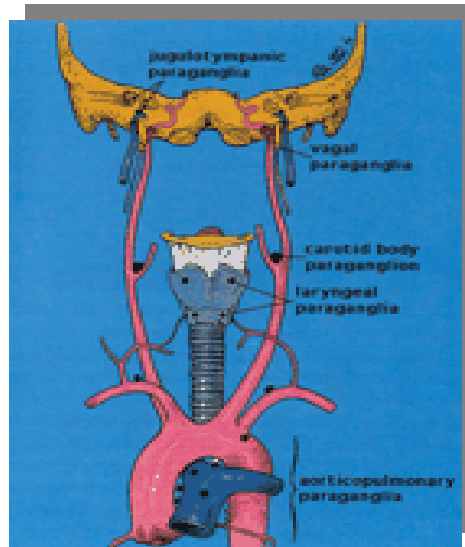
## INTRODUCCIÓN

### 1.1.- PARAGANGLIOMAS DE CABEZA Y CUELLO.

Los paragangliomas son tumores benignos, altamente vascularizados, cuyas células se originan en la cresta neural embrionaria. Se ubican a lo largo de arterias y pares craneales de los arcos branquiales cuando se localizan en la región cérvico-facial, donde son mucho más infrecuentes que en otras áreas del cuerpo<sup>1</sup>. Si bien han recibido otras denominaciones, como quemodectomas, éstas son más bien imprecisas pues suponen una actividad quimiorreceptora tumoral, que es muy infrecuente en cabeza y cuello<sup>2</sup>.

#### 1.1.1. *Epidemiología.*

Los paragangliomas (PGLs) son tumores en su inmensa mayoría benignos y poco frecuentes. Representan el 0,012% de todos los tumores del organismo, y el 0,6% de los tumores de cabeza y cuello. El 90% de los PGLs se ubica en la glándula suprarrenal y reciben el nombre de feocromocitoma. El 85% de los PGLs extra-adrenales se localiza en el abdomen, el 12% en el tórax y sólo un 3% en cabeza y cuello. En esta última región anatómica, los PGLs más comunes son los de cuerpo carotídeo, seguidos por los yugulotimpánicos y vagales. Estos últimos suponen menos del 5% de los PGLs de cabeza y cuello<sup>14,3</sup>. Los PGLs yugulotimpánicos (YT) son el segundo tumor en frecuencia del hueso temporal y el tumor más frecuente del oído medio<sup>15,4</sup>. Otras ubicaciones más infrecuentes son: laringe, cavidad nasal, tiroides, órbita y tráquea<sup>14,16</sup>.

**Figura 1.****Localizaciones comunes de los paragangliomas de cabeza y cuello.***1.1.2. Etiopatogenia.*

Embriológicamente los PGL derivan de células de la cresta neural. Forman parte del sistema neuroendocrino difuso, antes conocido como sistema APUD. En la cabeza y cuello, el tejido paraganglionar se encuentra asociado a estructuras neurovasculares derivadas de los arcos branquiales y se incluye en el sistema nervioso autónomo parasimpático, mientras que en la médula adrenal tiene función simpática<sup>14,16</sup>. (Figura 1)

Los términos “paraganglioma”, “tumor glómico” y “quemodectoma” hacen referencia al mismo tipo de tumor. Los tumores del hueso temporal también han sido denominados como “glomerocitomas”, “tumores del cuerpo timpánico” o “receptomas” y los

## INTRODUCCIÓN

PGL vagales “tumores del cuerpo vago”, “glomus yuxtavago”, “glomus intravago” o “glomus vago”. En la actualidad, se prefiere emplear el término “paraganglioma” para definir los tumores originados a partir del sistema paraganglionar, denominándose feocromocitomas (FCC) los que asientan en la médula adrenal<sup>15</sup>.

La primera descripción de tejido paraganglionar carotídeo corresponde a Von Haller en 1743. Von Luschka, en 1862, describe tumores en esa localización y Scudder en 1903 reseca uno de esos tumores. En el mismo año, Kohn acuña el término paraganglión para describir el cuerpo carotídeo y Mulligan propone el término de quemodectoma para reflejar el origen quimiorreceptor, demostrada por Heymans en 1930 y corroborada por estudios ulteriores. En la primera mitad del siglo XX (1945) Rosenwasser<sup>5</sup> describe la presencia de tejido paraganglionar en el trayecto del nervio de Jacobson, en el perineuro vago y en la convexidad del golfo de la yugular. En 1975, Mascorro y Yates<sup>6</sup> denominan sistema paraganglionar al grupo de células cromafines, derivadas del neuroectodermo y de localización extra-adrenal<sup>15,7,8</sup>

### *1.1.3. Funciones fisiológicas de los paraganglios.*

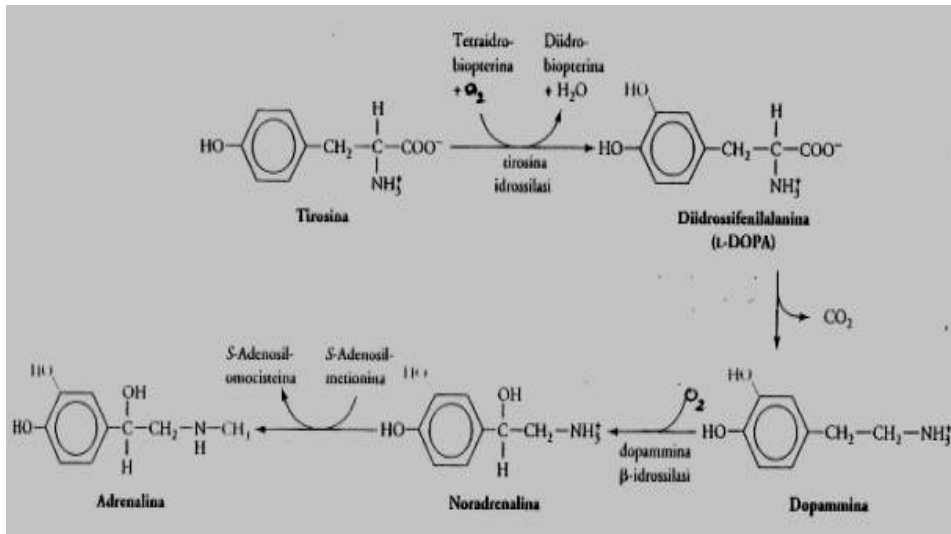
En la médula adrenal la función de estas células derivadas del sistema paraganglionar es secretora; sin embargo, en cabeza y cuello se le asigna una función quimiorreceptora, monitorizando la PCO<sub>2</sub> de la sangre. La evidencia fisiológica de la función quimiorreceptora fue probada en 1930 por Heymans et al<sup>9</sup>, que demostró cambios en la

## INTRODUCCIÓN

actividad refleja respiratoria y cardiovascular en respuesta a las variaciones en la concentración de la  $PO_2$  arterial,  $PCO_2$ , pH y otros agentes. La activación de las células quimiorreceptoras por la hipoxia principalmente depende de la presencia de canales en la membrana celular cuya actividad se encuentra modulada por la baja concentración de oxígeno<sup>10</sup>. Aunque el papel de los canales iónicos como efectores de la respuesta celular a la hipoxia está bien establecida, la identificación de moléculas sensibles a la concentración de oxígeno y sus rutas de señalización permanecen todavía por descubrir<sup>11,12</sup>. Una de las hipótesis considera a la cadena de transporte de electrones mitocondrial como la candidata más probable como quimiosensor de la  $PO_2$  o un papel transductor en los paragangliomas de cabeza y cuello. Así, en la adaptación aguda a la privación de oxígeno o la exposición crónica a la hipoxia (como ocurre por ejemplo, en las personas que viven a grandes altitudes) implica la generación, por parte de la cadena de transporte mitocondrial, de ROS, el cual es necesario para la actividad de HIF1 y la consecuente síntesis de mRNA que codifica la eritropoyetina, el VEGF y enzimas glicolíticas<sup>13</sup>.

Los feocromocitomas tienen la capacidad de producir catecolaminas pero, a diferencia de éstos, los PGL de cabeza y cuello no suele ser habitual que sean secretores, presentando esta característica entre el 1 y el 3% de los tumores (Figura 2). Otra característica diferente frente a los feocromocitomas es que los PGL secretan fundamentalmente noradrenalina en lugar de adrenalina. Sólo está indicado estudiar la funcionalidad del PGL en presencia de síndrome paraneoplásico (HTA, palpitaciones, cefaleas); para producir síntomas es preciso que el nivel de noradrenalina se multiplique por cuatro o cinco. Mucho menos frecuente

si cabe, los PGL también pueden producir serotonina con el consiguiente síndrome carcinoide<sup>14,15</sup>.



**Figura 2.**

**Esquema de la biosíntesis de catecolaminas.**

#### 1.1.4. Histopatología.

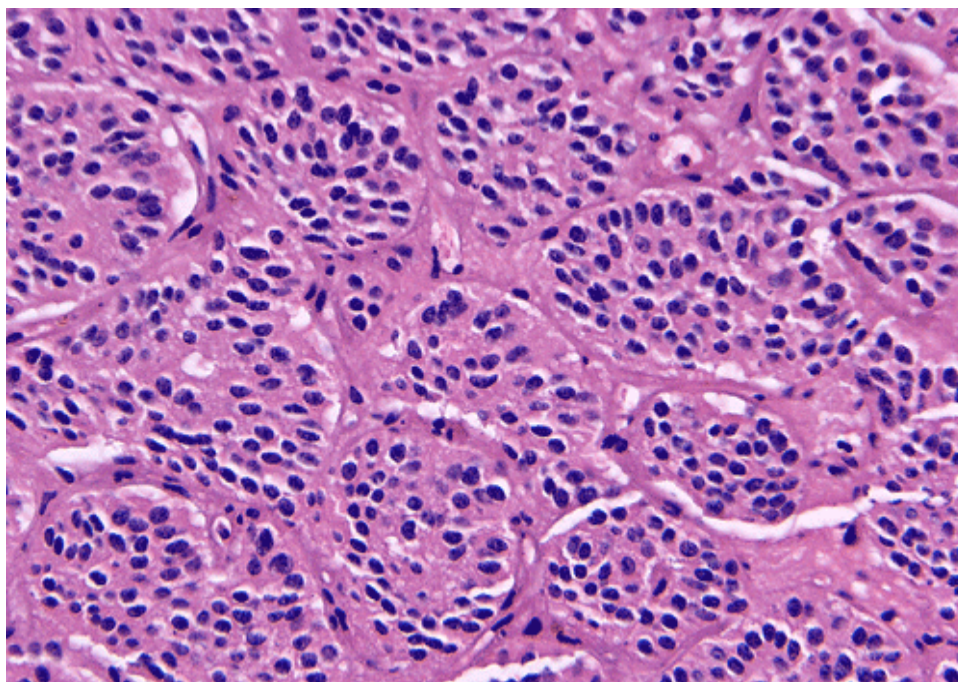
La histopatología de los PGLs, con independencia de su ubicación anatómica, es similar a la del feocromocitoma suprarrenal (Figura 3).

Predominan las *células tipo I* o *células tumorales principales*, con abundante citoplasma granular eosinófilo, de aspecto poligonal o fusiforme, dispuestas en nidos adoptando un patrón pseudo-alveolar conocido como *zellballen*. Derivan del neuroectodermo, y poseen gránulos secretores con catecolaminas y neuropéptidos. Se tiñen con hematoxilina de plata pero no con dicromato de potasio (son «no



cromafines»). Presentan grados variables de atípia que no se correlaciona con el comportamiento biológico del tumor.

Las *células tipo II o sustentaculares* rodean a las células tumorales principales o tipo I y su morfología es similar a la de las células de Schwann. La inmunohistoquímica facilita la identificación microscópica de estos dos tipos celulares y ayuda en el diagnóstico diferencial con el tumor carcinoide, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma tiroideo medular y hemangiopericitoma<sup>14,16,17,16</sup>



**Figura 3.**

### **Histopatología de un paraganglioma yugulotimpánico.**

El componente celular bifásico propio de estos tumores adopta un patrón pseudo-alveolar o “zellballen”. Las células tumorales o principales tipo I, de citoplasma finamente granular y eosinófilo, se

## INTRODUCCIÓN

disponen en nidos claramente delimitados por células fusiformes, inconspicuas, que reciben el nombre de células sustentaculares tipo II.

La ultraestructura de los PGL es muy similar a la del tejido no neoplásico.

La relación entre células sustentaculares/células principales es menor y las células principales son mayores y a veces vacuoladas, pleomorfas e hiperocrómicas, y se encuentran muy próximas a estructuras vasculares.

Los tumores tienden a ser más vasculares que los paraganglios normales. Esta rica vascularización tumoral se asocia a una elevada expresión tisular de algunos factores angiogénicos (factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF, y factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, PD-EGF)<sup>26</sup>. Es preciso citar el estudio clínico en fase I-II de López Barneo<sup>17</sup>, en el que aprovechando las características del cuerpo carotídeo, altamente dopaminérgico y que expresa células de la glía derivadas del factor neurotrófico, se autotransplantaron células pluripotenciales con diferenciación a neuronas en la sustancia negra en pacientes que presentaban la enfermedad de Parkinson. Los pacientes consiguieron una mejoría clínica de entre 5-74% a los 6-12 meses del autotransplante. Los factores predictivos principales para la mejoría clínica motora eran la integridad histológica de las células del cuerpo carotídeo y el hecho de presentar una enfermedad moderada en severidad. Así, el autotransplante del cuerpo carotídeo puede inducir una mejoría clínica en los pacientes que presentan la enfermedad de Parkinson debido a las características biológicas de las células del cuerpo carotídeo<sup>18,19,20</sup>

Dentro del diagnóstico diferencial de los paragangliomas se incluyen el tumor carcinoide, carcinoma medular de tiroides, adenoma del oído medio y meningioma<sup>14</sup>.

### *1.1.5. Clínica..*

Las manifestaciones clínicas difieren dependiendo de la localización del tumor. Los paragangliomas carotídeos clásicamente se presentan como masas cervicales asintomáticas de lento crecimiento<sup>14,27,21</sup>. A medida que van creciendo, ocasionan sintomatología fruto de la invasión de pares craneales. El examen clínico demuestra la presencia de una masa móvil en sentido horizontal, pero fija en el plano vertical. Los tumores vagales tienen una presentación similar. Biller et al<sup>22</sup> describieron su experiencia con un grupo de 19 pacientes con paragangliomas vagales, en la que los síntomas más frecuentes en orden descendente fueron: masa cervical y ronquera, seguidos de abombamiento de las paredes faríngeas, disfagia, disfonía, dolor y aspiración. Series mayores, como las Jackson et al<sup>23</sup>, revisan 46 pacientes con paragangliomas vagales poniendo énfasis en el papel de un equipo multidisciplinar de cirugía de base de cráneo para realizar una extirpación del tumor y rehabilitación satisfactorias. Los tumores yugulotimpánicos se presentan con un acúfeno pulsátil, hipoacusia y otros déficits de pares craneales bajos, dependiendo de su localización y tamaño<sup>14,27,28</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Apenas un 1-3% de los PGLs son funcionantes y presentan sintomatología asociada a la secreción de noradrenalina<sup>14,16,27</sup>. La presencia de cefalea, hipertensión paroxística y palpitaciones puede indicar la existencia de un tumor funcional. En estos casos se recomienda la medición de noradrenalina y sus metabolitos en orina de 24 horas previamente a la intervención quirúrgica. Las sustancias que se determinan generalmente en orina son las catecolaminas libres y metabolitos como metanefrinas y ácido vanilmandélico, siendo éste último el menos específico de los tres, como se ha comentado anteriormente. La excreción de metanefrinas (niveles normales inferiores a 1,3 mg de metanefrinas totales en orina de 24h) se ve incrementada tanto por las catecolaminas exógenas como endógenas, así como con el tratamiento con IMAOS. El propanolol también puede causar un aumento espúreo de secreción de metanefrinas. El Acido Vanilmandélico (niveles normales en orina de 24 horas de hasta 7,0 mg) se ve menos afectado por las catecolaminas exógenas y endógenas pero puede incrementarse con la ingesta de algunas medicaciones, como la carbidopa. Si el tumor segrega solamente dopamina hay que medir ácido homovalínico. Si segrega únicamente adrenalina, el tumor está confinado a la glándula suprarrenal. Una elevación urinaria de noradrenalina menor que la de adrenalina sugiere un origen adrenal, ya que la adrenalina puede ser fabricada por enzimas que solo se encuentran en la médula suprarrenal.

En caso de confirmarse la actividad secretora del paraganglioma, el paciente deberá ser tratado durante el preoperatorio con alfa- y betabloqueantes<sup>25,26</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Los PGLs se consideran tumores benignos aunque en ocasiones tienen un comportamiento biológico similar al de los tumores malignos, con recurrencias, metástasis e invasión de tejidos vecinos. Las formas familiares y los tumores que se hallan en la vecindad del órgano de Zuckerkandl tienen el mayor potencial maligno (14-50%)<sup>24,25</sup>. Parámetros histológicos sugestivos de agresividad tumoral en otras neoplasias (Ej. pleomorfismo nuclear, mitosis atípicas, elevada actividad mitótica, invasión vascular o capsular, etc.) no constituyen un criterio determinante de malignidad en los PGL. El criterio aceptado para definir el comportamiento maligno de los PGL es la confirmación histológica de metástasis regionales o a distancia. Según este criterio, la prevalencia de PGLs malignos es del 3%-20% dependiendo de su ubicación: 1,41% de los PGL del cuerpo carotídeo, 5,1% de los PGL yugulotimpánicos, 10-19% de los PGL vagales y 3% de los PGL laríngeos. La localización más habitual de las metástasis a distancia es pulmón, hueso, mama, páncreas, tiroides, riñón e hígado<sup>31,32, 26,27,28</sup>

### *1.1.6. Tratamiento.*

En general, en la actualidad existe una tendencia a restringir el tratamiento quirúrgico de los paragangliomas a determinadas situaciones, ya que se trata de una enfermedad que generalmente no es causa de mortalidad (sólo del 6% en los PGLs yugulares y del 11% en los vagales), mientras que la cirugía puede causar secuelas importantes.<sup>1,21,29</sup>

## INTRODUCCIÓN

La mayoría de los PGLs carotídeos se tratan quirúrgicamente, dado que las complicaciones son poco frecuentes. En caso de afectación extensa de la arteria carótida, en los que deba sacrificarse dicha arteria, se podrá realizar en el mismo tiempo la reconstrucción de la misma con un injerto de vena safena o una prótesis, pero deben valorarse otros factores como la edad y el estado de salud del paciente, así como el comportamiento biológico del tumor, ya que la sustitución de la carótida no está exenta de riesgos y la enfermedad de base que la motiva no suele ser mortal. Esta situación, no es un hecho frecuente, y en la mayoría de los casos, aunque no lo parezca se puede preservar.

La resección de los PGLs vagales entraña casi siempre una parálisis vagal, con la consiguiente disfonía y aspiración, por lo que diversos autores cuestionan la cirugía salvo que el tumor haya producido ya una parálisis de pares bajos o en pacientes jóvenes. La tiroplastia supone una solución eficaz para corregir el defecto glótico posterior a la parálisis vagal, con la consecuencia de mejorar las aspiraciones. Se puede realizar en un segundo tiempo o en el momento de la resección tumoral. Teniendo en este caso, la ventaja de realizarse en un sólo tiempo y el inconveniente que el tubo de anestesia puede dificultar el procedimiento.

Existe todavía una mayor controversia sobre la conducta a seguir con los PGLs yugulotimpánicos<sup>21,30</sup>

Los PGLs timpánicos pequeños se resecan fácilmente por vía endomeatal con escasa morbilidad, y por tanto deben ser intervenidos para evitar la hipoacusia y el acúfeno pulsátil<sup>29</sup>. Incluso en los de mayor tamaño suele ser suficiente un abordaje transmastoideo por timpanotomía posterior respetuoso con la función auditiva.

## INTRODUCCIÓN

Los PGLs yugulares requieren por el contrario abordajes infratemporales con posibilidad de mayores riesgos y complicaciones, como la afectación de pares craneales bajos y del nervio facial, cuyo manejo es una parte intrínseca de la cirugía de los paragangliomas yugulares. Aunque han sido desarrolladas nuevas técnicas quirúrgicas que tratan de disminuir las complicaciones intra y postoperatorias,<sup>31,32,33,34</sup> como el abordaje a través del receso facial ampliado, que minimiza las secuelas auditivas y relacionadas con el nervio facial, o la esqueletización del nervio facial sin realizar una transposición del mismo en los casos en que por la magnitud del crecimiento intratimpánico y pericarotídeo no sea posible conservar el conducto auditivo externo.<sup>35,36</sup> Según revisiones recientes de la literatura, como la realizada por Sanna<sup>33</sup>, se puede afirmar que el abordaje quirúrgico sin trasposición del facial es un método aceptado y que consigue excelentes resultados con una incidencia del 72% de funcionalidad del n. facial grado I y II largo plazo<sup>30,32,32,33</sup>.

Otra complicación a mencionar, son las fistulas de LCR en caso de invasión intracraneal, que aparecen con una frecuencia entre 4 y 11% de los casos según las series.<sup>32,33</sup>

Por otra parte, tenemos también la opción de mantener una conducta expectante con estudios de imagen seriados en pacientes mayores de 50 años, planteándonos la cirugía cuando se trate de pacientes jóvenes, o bien presenten sintomatología de pares bajos o un crecimiento agresivo, siendo la radiocirugía otra opción a valorar<sup>21,29</sup>.

La radiocirugía debe ser también tenida en cuenta en aquellos pacientes que presentan múltiples PGLs para reducir los riesgos de la

## INTRODUCCIÓN

cirugía,<sup>32,37,38,39,40</sup> y se ha llegado a conseguir un control a largo plazo del tumor (incluyendo posibles transformaciones malignas inducidas por la radiación) hasta en el 96% de los casos con la radiocirugía, especialmente en pacientes jóvenes.<sup>21,32</sup>

Existen diversas opiniones respecto a la actitud quirúrgica en los tumores con extensión intracraneal. Hay autores que consideran preferible hacer el abordaje de la extensión intracraneal en un segundo tiempo.<sup>41</sup> Otros pensamos que la resección en un solo tiempo, al tener oportunidad de una mejor exposición intra y extracraneal, ofrece la mejor oportunidad de lograr la extirpación total del tumor y facilita la preservación de los nervios craneales.<sup>42</sup> Sin embargo, siempre es necesario individualizar los casos.

Aunque se trata de una cirugía considerada difícil, una adecuada técnica quirúrgica realizada por equipos experimentados obtiene un buen control de la enfermedad con escasas complicaciones. Actualmente la aplicación de técnicas como autotransfusión, monitorización de pares craneales, estudios de imagen prequirúrgicos, etc, hacen la cirugía más asequible y segura<sup>43</sup>. En nuestra serie no hemos tenido ningún éxito ni tampoco ningún déficit neurológico central (a excepción de un accidente isquémico transitorio acontencido por complicación de una embolización previa a la cirugía, que se se resolvió sin secuelas). La lesión de pares craneales depende en gran parte de la localización y extensión del tumor, ocurriendo fundamentalmente en nuestra serie en el caso de tumores multicéntricos y en los casos de PGLs de grandes dimensiones con extensión medial respecto al bulbo yugular o en reoperaciones.



### *1.1.7. Genética de los paragangliomas de cabeza y cuello.*

Los PGLs pueden ser esporádicos o familiares. Las formas familiares pueden presentarse aisladas (“paraganglioma syndrome”) o integradas en otras entidades sindrómicas como la neoplasia endocrina múltiple tipo II (MEN IIA y IIB), el síndrome de Von-Hippel-Lindau, y la neurofibromatosis tipo 1 entre otros<sup>44,45,46</sup>.

Con la evidencia científica actual, un oncogen (RET) y cinco genes supresores (VHL, NF1, SDHB, SDHC y SDHD) parecen estar implicados en el origen de la etiopatogenia de los PGL y feocromocitomas. Sin embargo, aunque las mutaciones germinales se hallan en casi todos los tumores de origen familiar y en una proporción considerable de los PGLs aparentemente esporádicos, las mutaciones somáticas de todos estos genes son relativamente infrecuentes (0-15%) en los PGLs verdaderamente esporádicos<sup>37,47,48</sup>.

La prevalencia de las formas familiares oscila entre el 10%-50% según las distintas series publicadas. En general, se acepta que en un 35% de los pacientes con PGL existe predisposición hereditaria. La probabilidad de que un paraganglioma tenga un componente familiar es casi 6 veces mayor en el caso de los tumores del cuerpo carotídeo que en los PGLs de otras ubicaciones<sup>49,50</sup>.

Los PGLs familiares suelen presentarse a edades más tempranas que los esporádicos, con aparición más precoz en generaciones sucesivas, lo que se ha denominado anticipación genética.<sup>42</sup> En algunas series

## INTRODUCCIÓN

clínicas se ha observado una mayor prevalencia en mujeres, especialmente de los PGLs del cuerpo carotídeo y vagales<sup>40,41,51</sup>.

La incidencia de tumores del cuerpo carotídeo aumenta en personas que habitan en altitudes superiores a los 2.000 metros sobre el nivel del mar, ya que como se ha citado con anterioridad, la exposición crónica a la hipoxia implica la generación por parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial de ROS, el cuál es útil para la actividad de HIF1 y la consecuente síntesis de mRNA que codifica la eritropoyetina, el VEGF y enzimas glicolíticas<sup>52,53</sup>.

Aunque la mayor parte de los tumores esporádicos se presentan como una masa única, los tumores multicéntricos o bilaterales pueden ocurrir en un 10% de los casos<sup>14,17</sup>. En las formas familiares, un 30-40% debutan bien como PGLs bilaterales o como PGLs multicéntricos en diferentes localizaciones de la región cervico-facial o en el tejido paraganglionar simpaticoadrenal del abdomen<sup>17,28,41</sup>. Para algunos autores, los PGLs multicéntricos, aun sin historia familiar, debieran considerarse de tipo hereditario dado lo inhabitual de la multifocalidad en las formas esporádicas<sup>40,41</sup>.

### 1.1.7.1. *Los Genes SDHA, SDHB, SDHC y SDHD.*

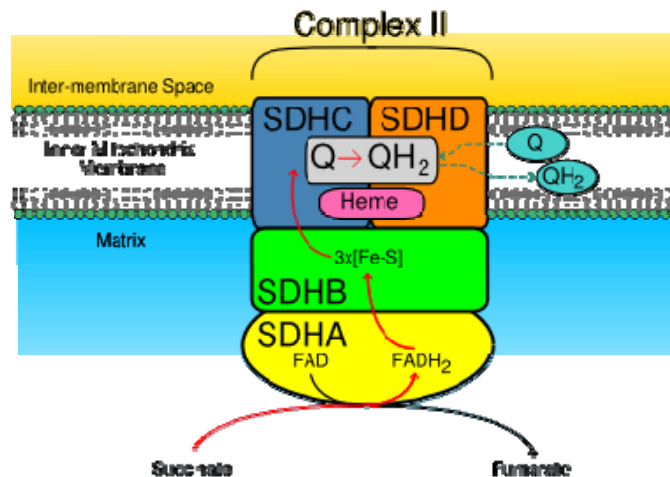
Los PGLs familiares constituyen una entidad genéticamente heterogénea.

## INTRODUCCIÓN

Hasta el momento se han identificado cuatro locus cromosómicos que se segregan con la enfermedad: 11q23 (PGL1), 11q13 (PGL2), 1q21 (PGL3) y 1p36.1p35 (PGL4). Estudios genéticos de asociación han permitido identificar los genes responsables de la enfermedad que mapean en 3 de los locus: *SDHD* (11q23), *SDHC* (1q21) y *SDHB* (1p36.1p35). El gen causante de la enfermedad que mapea en el locus PGL2 todavía no se ha identificado<sup>37,38</sup>.

Los genes *SDHB*, *SDHC* y *SDHD* codifican las subunidades del mismo nombre en el complejo heterotetramérico mitocondrial II, también conocido como enzima succinato-ubiquinona óxido-reductasa o succinodehidrogenasa (SDH)<sup>37,38,40</sup>: (Figura 4)

- *SDHA* y *SDHB* son una flavoproteína y una Fe-S proteína respectivamente, que conforman el centro catalítico hidrofílico del enzima.
- *SDHC* (*cybL*) y *SDHD* (*cybS*) corresponden a la subunidad grande y subunidad pequeña del citocromo b y su función es fijar el dominio catalítico a la membrana mitocondrial interna.



**Figura 4.**

**Esquema que representa el complejo mitocondrial II.**

Q: ubisemiquinona, QH<sub>2</sub>: ubiquinol

Dicho enzima desempeña un papel crucial en el ciclo de Krebs y cataliza la oxidación de succinato a fumarato, transfiriendo el electrón resultante al pool de ubiquinona celular (coenzima Q)<sup>37,38,40</sup>. (Figura 5)

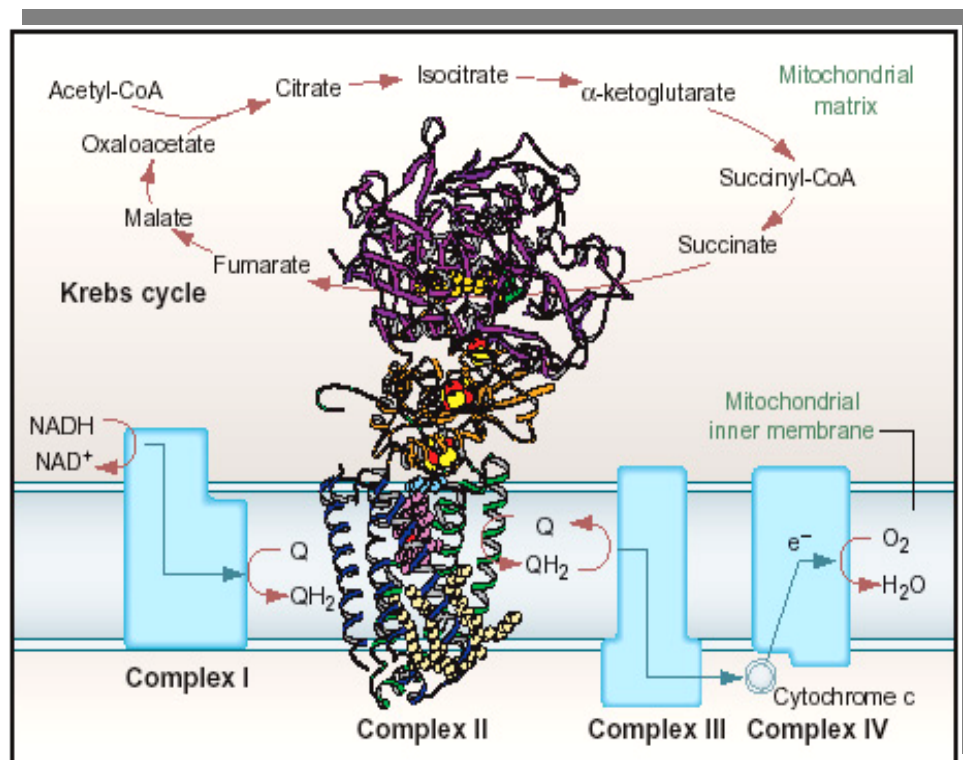
Las deficiencias totales o casi totales del enzima SDH conducen a un cuadro de atrofia cerebral e hipotonía, comprometiendo seriamente la fosforilación oxidativa celular<sup>54</sup>. Cuando el componente disfuncionante de SDH es la subunidad A, se produce el Síndrome de Leigh, caracterizado por una neurodegeneración progresiva con epilepsia, retraso psicomotor y espasticidad<sup>55</sup>.

La inactivación por mutación de SDH parece mimetizar el efecto de una estimulación crónica, por hipoxia, de las células paraganglionares.

## INTRODUCCIÓN

Al igual que ocurre en los PGLs que se desarrollan en altitudes superiores a los 2.000 metros sobre el nivel del mar, en los PGLs causados por mutaciones en *SDHD* y *SDHB* se produce un incremento ostensible en los niveles intracelulares de los mediadores moleculares de hipoxia (HIF) y genes que promueven la angiogénesis (VEGF), lo que se traduce en una mayor proliferación celular, hiperplasia y finalmente transformación neoplásica<sup>43,44</sup>

La penetrancia de los casos familiares asociados a mutaciones de SDH es mayor en las alturas<sup>44,56</sup>.



**Figura 5.**

**Complejo Mitochondrial II.**

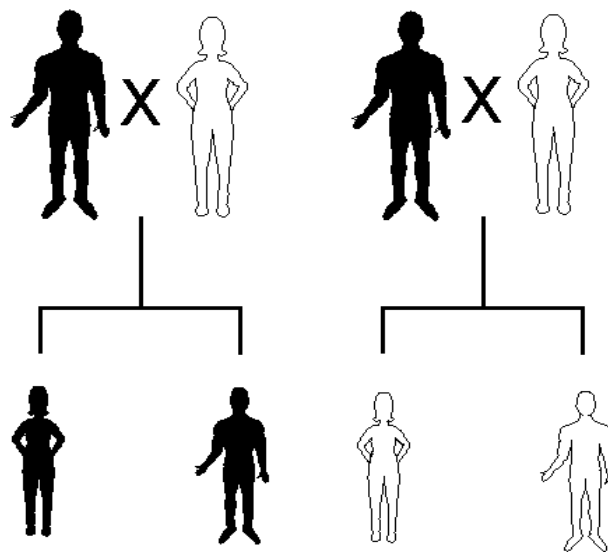
### 1.1.7.2. *Teorías de la tumorigénesis.*

Se han propuesto varios mecanismos patogénicos a través de los cuales se produce la transformación neoplásica del tejido, entre ellos las más destacadas son las siguientes:

- 1- La inactivación de SDH conduce a un incremento de los niveles intracelulares de succinato y disminución de la conversión de semiubiquinona (Q) a ubiquinol (QH<sub>2</sub>), con lo cual se pierde poder reductor y se acumulan ROS. El incremento “in vitro” de succinato se asocia a desregulación de HIF<sup>57</sup>. El resultado de estos procesos sería la estabilización de HIF-1 y HIF-2 que conducen a la transcripción de genes inducibles por hipoxia como VEGF.<sup>36,39</sup> Como consecuencia, se produce una señal de hipoxia que conduce a la proliferación celular y eventual transformación neoplásica.
- 2- Evasión de la apoptosis por parte de las células tumorales. Se basa en la degeneración del tejido paraganglionar extra-adrenal en edad adulta asociado a una disminución del factor de crecimiento neural NGF e inicio de programas apoptóticos. El succinato es capaz de inactivar la prolin hidroxilasa EglN3, la cual esta implicada en la apoptosis de las células paraganglionares<sup>36,39,58</sup>.

1.1.7.3. *El fenómeno de imprinting genético.*

Las subunidades de SDH se comportan como un gen oncosupresor, siguiendo un patrón de herencia autonómico dominante con penetrancia incompleta y que, en el caso de PGL 1 y PGL 2, exhiben el *fenómeno de imprinting genético*, expresándose sólo la enfermedad si es el padre el que transmite el gen defectuoso<sup>59,60</sup>. (Figura 6)



**Figura 6.**  
**Fenómeno de Imprinting genético.**

En el caso de mutaciones germinales en *SDHD* la expresión fenotípica de la enfermedad va a estar condicionada por el progenitor que transmite la mutación, manifestándose únicamente cuando se hereda del padre<sup>49,50</sup>. (Figura 7a/7b)

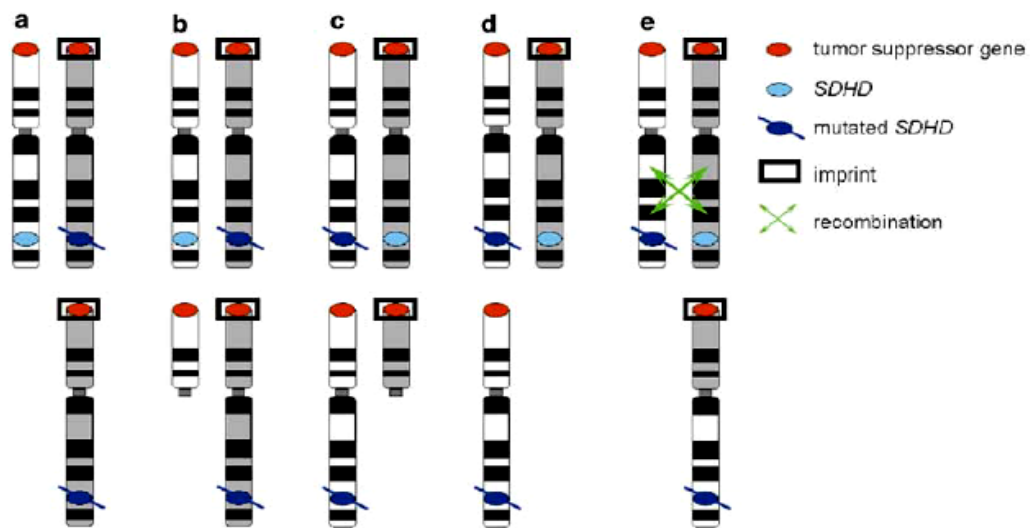
## INTRODUCCIÓN

La primera hipótesis para explicar la falta de transmisión de la enfermedad por vía materna en estos casos de familias con mutación SDHD y PGL2, ha sido el imprinting del alelo materno durante la gametogénesis específica de cada sexo, porque a pesar de los genes endógenos que presentaban imprinting, SDHD no se ha encontrado en un dominio genómico con este fenómeno.

Por otro lado, estudios de expresión genética en pacientes afectos y portadores de imprinting mostraron que SDHD tenía una expresión bialélica en el cerebro, riñones y líneas de linfoblastos, aunque las bases moleculares de la herencia mediante el patrón de imprinting en las familias con SDHD parecen estar confinadas a las células tumorales del paraganglioma<sup>49</sup>.

Recientemente, Hensen et al<sup>61</sup> propusieron un modelo para explicar el patrón de herencia en familias con mutación en SDHD (figura 7b), en el cual la pérdida somática de todo el cromosoma 11 es la responsable de este modelo de transmisión genética. En este modelo, un segundo gen de la región 11p15 (con imprinting y heredado del padre) actuaría como un modificador del riesgo, bloqueando la transformación neoplásica cuando el correspondiente alelo materno sin imprinting está presente en la célula paraganglionar. De hecho, estos tumores únicamente se desarrollarían después de una pérdida del alelo normal de ambos, del gen SDHD y del gen paterno con imprinting en la región 11p15.



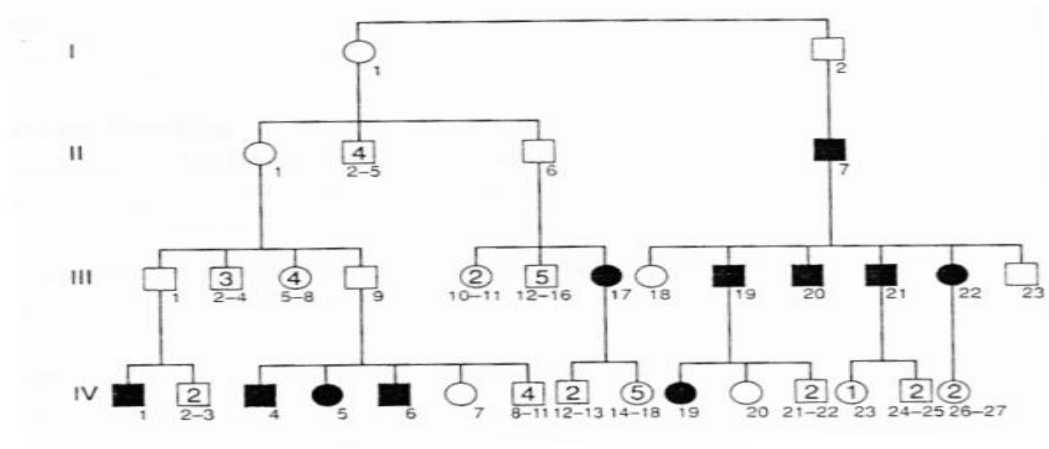


**Fig. 7 a.**

**Modelo de transmisión mediante imprinting de familias con paragangliomas y mutación en SDHD.** Los cromosomas maternos se representan de color blanco, y los paternos de gris. **(a)** Se muestran ambas regiones 11q maternas, aquella que es portadora del alelo salvaje SDHD, y la región materna 11p, que presenta el alelo activo del gen supresor. Este es el caso de en el que el peso recae exclusivamente en el alelo salvaje materno SDHD en 11q, **(b)** el alelo con el gen supresor activo materno en 11p15 no se ve afectado y se inhibe el desarrollo tumoral. En caso de la herencia materna de la mutación SDHD, una segunda mutación en el alelo salvaje paterno, por ejemplo, una delección 11q paterna de la región, **(c)** o incluso la pérdida completa del cromosoma 11 paterno. **(d)** Presenta la región 11p15 materna intacta y la formación del tumor no se inhibe. Cuando la mutación SDHD se transmite por línea materna, al menos dos eventos causados por diferentes mecanismos cromosómicos son necesarios para inactivar

## INTRODUCCIÓN

ambos alelos salvajes SDHD y la activar del alelo materno que presenta el gen supresor con imprinting en la región 11p15, a saber, la pérdida del alelo salvaje del gen SDHD, mediante por ejemplo, la recombinación mitótica, seguido de la pérdida del cromosoma paterno recombinada que contiene la región paterna 11q23 y la región materna 11p15. Al parecer, esta secuencia de acontecimientos es muy poco probable in vivo.



**Figura 7 b.**

### **Ejemplo de Imprinting genético en una familia afectada de PGL 2.**

Los círculos representan mujeres, los cuadrados varones. Las figuras negras son los familiares afectados con paragangliomas.

No obstante, Pigny et al<sup>62</sup> en una revisión de 3 generaciones familiares que eran portadoras de una mutación en SDHD W43X demostró la posibilidad de presentar un PGL cuando es la madre quien

## INTRODUCCIÓN

trasmite el alelo SDHD mutado. Confirmaron esta hipótesis demostrando la pérdida de la copia materna del gen supresor tumoral localizado en la región 11p15 en el tejido tumoral. De esta manera, se ha demostrado una forma de transmisión materna de los PGLs que presentan mutación germinal en el gen SDHD.

Por el contrario, las mutaciones germinales en *SDHB* y *SDHC* se pueden transmitir cualquiera que sea el sexo del progenitor. Algunos portadores de mutaciones en SDH permanecen asintomáticos<sup>36,37</sup>.

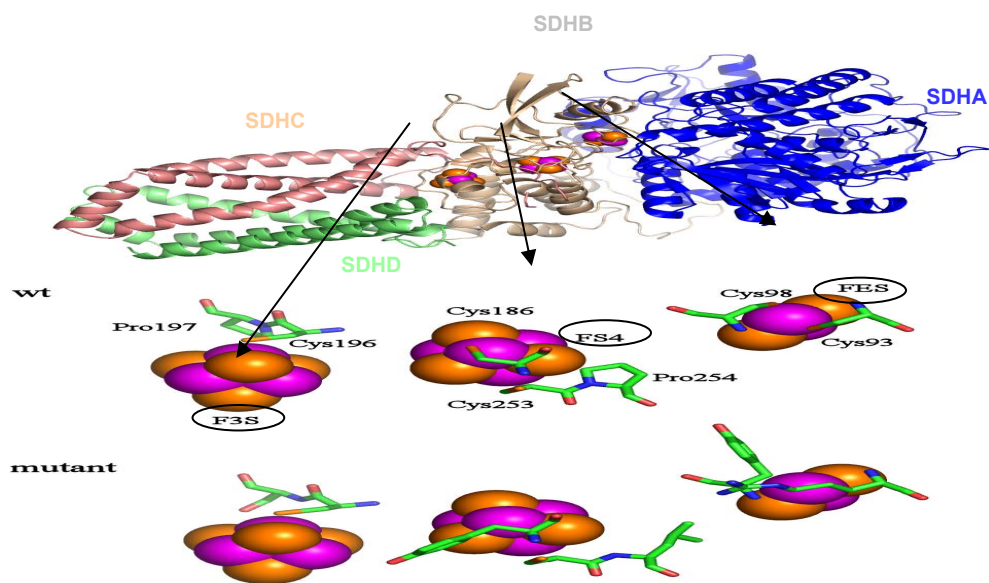
Los factores que influyen en la penetrancia del alelo mutado y los modificadores medio-ambientales o genéticos de la expresión fenotípica precisan ser investigados, pero se estima que el 50% de aquellos que heredan la mutación manifiesta la enfermedad antes de los 30 años y el 70% antes de los 50<sup>36,37,47</sup>.

### 1.1.7.4. *Espectro de las mutaciones sobre el gen SDH.*

Las alteraciones germinales encontradas hasta el momento en los genes SDH incluyen mutaciones missense, nonsense y frameshift. Mientras que los portadores de mutaciones en SDHB la alteración más común es la sustitución missense, seguida de las alteraciones frameshift, entre los pacientes portadores de mutaciones SDHD, las sustituciones nonsense se detectan más frecuentemente que las sustituciones missense.

## INTRODUCCIÓN

Estudios de biología molecular realizados por Fernández-Ballester G.<sup>63</sup> reflejan que todas las mutaciones missense halladas en SDHB interfieren en el anclaje de los clusters FES, FS4 y F3S con el centro catalítico de la enzima SDH, y pueden interferir con la interacción con otras subunidades implicadas en el complejo mitocondrial tipo II (Figura 8).



Collaborative study with the Structural and Computational Biology Programme EMBL. G. Fernandez Ballester and L. Serrano.

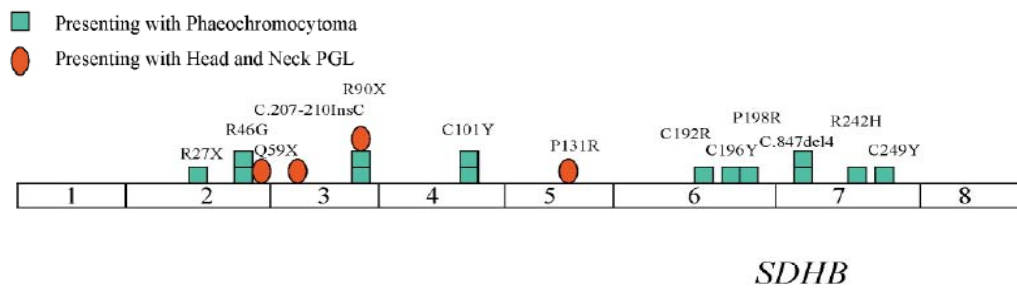
### **Figura 8.**

**Las mutaciones missense halladas en SDHB interfieren en el anclaje de los clusters FES, FS4 y F3S con el centro catalítico de la enzima SDH.**

## INTRODUCCIÓN

Así pues, las características de la transmisión genética en los portadores de mutación en SDH y los factores medioambientales pueden influir en la penetrancia y la expresividad de la mutación genérica que desarrollen los paragangliomas<sup>49,64</sup>

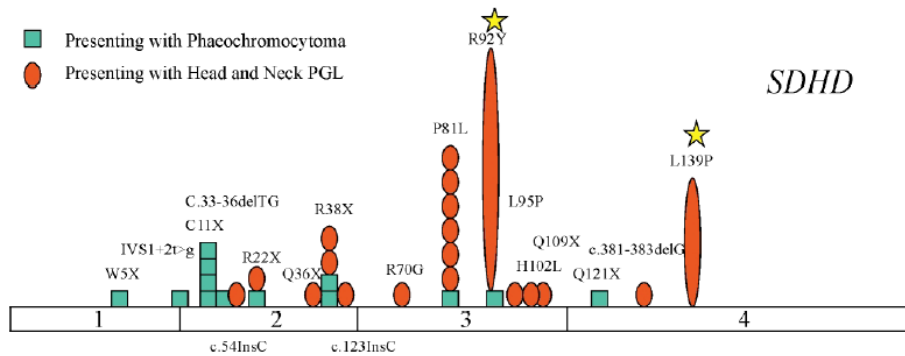
Según revisiones de Charis Eng et al<sup>65</sup>, el espectro de las mutaciones en el gen SDHB en los PGLs/PCC ocurren habitualmente en los exones del 1 al 7 pero no en el exón 8 (figura 9), mientras que las mutaciones en el gen SDHD se distribuyen por igual en los 4 exones pero tienden a ser más frecuentes en el exón 1<sup>40</sup>. (Figura 10).



### **Figura 9.**

#### **Distribución de las mutaciones en los exones del gen SDHB.**

Charis Eng et al. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. Nature Reviews Cancer 2003, 3: 193-202



**Figura 10.**

**Distribución de las mutaciones en los exones del gen SDHD.**

Charis Eng et al. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nature Reviews Cancer* 2003, 3: 193-202

Según los estudios realizados hasta el momento, las mutaciones en *SDHD* parecen predisponer a PGLs de cabeza y cuello de comportamiento benigno y con gran frecuencia multifocales (74% en portadores de mutación en *SDHD* frente a 28% en portadores de la mutación en *SDHB*)<sup>36,37,40</sup>. Por el contrario, las mutaciones en *SDHB* parecen asociarse a PGLs abdominales y más agresivos, además de los PGL de cabeza y cuello. En una serie analizada por Neumann et al<sup>66</sup> un 34 % de los PGL mutados en *SDHB* se habían comportado de forma agresiva. No se han descrito pacientes portadores de mutaciones germinales en *SDHD* con feocromocitomas o PGLs malignos.

Entre los PGL de forma global, la presencia de mutaciones en genes de SDH oscila entre 17-41%<sup>67</sup>. Considerando de forma aislada los PGL esporádicos y de otro los que presentan antecedentes familiares, las diversas series arrojan entre 8-28% de prevalencia de mutaciones

## INTRODUCCIÓN

germinales en SDH para los PGL esporádicos<sup>68</sup>, siendo especialmente interesante el dato de Bayley<sup>69</sup> et al con un número de casos de 95, donde la prevalencia es del 28%. En el caso de pacientes con antecedentes familiares, la prevalencia de mutaciones oscila entre el 66 y 91%<sup>54</sup>

En todas las series publicadas acerca de las mutaciones en línea germinal, las mutaciones mas frecuentes se encuentran en SDHD, seguidas de SDHB. Las mutaciones en SDHC son muy raras, ya que hasta 2005 sólo se habían publicado 22 casos. Son principalmente benignas y rara vez presentan los pacientes PGLs múltiples<sup>53</sup>.

Es interesante reseñar, dada la gran casuística de PGL tanto esporádicos como familiares, los resultados de los estudios de Boederek et al<sup>53</sup> (n=195. 23% SDHD, 7% SDHB, 3% SDHC), Badenhop et al<sup>70</sup> (n=34. 32% SDHD, 9% SDHB, 0% SDHC), Baysal et al<sup>55</sup> (n=47. 15% SDHD, 6% SDHB, 0% SDHC) y Schiavi et al<sup>71</sup> (n=121. 17% SDHD, 7% SDHB, 4% SDHC). A la vista de estos resultados, se evidencia que existe un porcentaje nada desdeñable de casos en los que pacientes carecen de antecedentes familiares pero presentan mutaciones germinales en SDH. Esto se debe tanto a la penetrancia incompleta de la enfermedad como al fenómeno de imprinting genético en SDHD, mencionado con anterioridad y a la posibilidad de que la enfermedad sea silente clínicamente.

### 1.1.7.5. *Mutaciones en los genes RET, VHL y NF1*

Además de los genes SDH implicados en la patogénesis del Síndrome de PGL familiares, han sido descritos varios genes responsables de la aparición de PGL en el contexto de síndromes pluritumorales<sup>37</sup>. Mutaciones germinales en el gen VHL (3p25-p26) responsables de la enfermedad de Von-Hippel Lindau, RET (10q11.2) que provoca los Síndromes MEN II y NF-1 (17q11) que causa la enfermedad de Von Recklinhausen, se han asociado a la aparición de PGL<sup>37,38</sup>

Las mutaciones germinales del protooncogen RET (10q11) son responsables de la herencia de la neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN2)<sup>72</sup>.

El síndrome MEN tipo2 se clasifica en tres subtipos: MEN2A, FMTC (carcinoma medular de tiroides familiar) y MEN2B, todos caracterizados por la presencia de carcinoma medular de tiroides en casi el 100% de los casos. MEN 2A y MEN2B presentan mayor riesgo de desarrollar feocromocitomas (50% de los pacientes)<sup>73,74</sup>

RET se expresa únicamente en tejidos derivados de la cresta neural, y se conoce que existe relación con el desarrollo de los riñones. Como receptor de tirosin-kinasa, RET activa una variedad de rutas de señalización intracelular que incluyen: RAS/ERK, (PI3K)/AKT, y la ruta de la fosfolipasa C<sup>75</sup>.

Las mutaciones somáticas de RET son infrecuentes en los feocromocitomas esporádicos: 15% en los feocromocitomas benignos y únicamente 3% en los malignos<sup>76,77</sup>. En los casos que no presentan mutaciones somáticas o amplificaciones de RET se observa



## INTRODUCCIÓN

principalmente una sobreexpresión (50-70%), lo que indica que RET presenta un papel importante en la tumorigénesis de los casos esporádicos<sup>78</sup>.

La enfermedad de Von Hippel-Lindau (VHL) es un síndrome que se hereda con un carácter autosómico dominante y predispone a tumores mesenquimales y derivados de la cresta neural altamente vascularizados. Se han identificado mutaciones o deleciones en el gen VHL (locus 3p25) en las células germinales de casi la práctica totalidad de los pacientes que presenta la enfermedad de VHL y, además, se pueden encontrar en aproximadamente el 6% de los casos aparentemente esporádicos. Las mutaciones somáticas de VHL están presentes en un 2-4% de los casos esporádicos y, se hallan en mayor proporción (17%) en los casos malignos<sup>79, 80</sup>

Las mutaciones germinales en más del 95% de los pacientes con MEN 2 se encuentran en los exones 10, 11, 13 y 16 del gen RET, mientras que el 100% de los pacientes que presentan la enfermedad de VHL tienen mutaciones en cualquiera de los 3 exones del gen VHL y tienen grandes deleciones que afectan a gran parte del gen VHL<sup>81,82</sup>.

Existe también una conocida relación entre la Neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y los feocromocitomas. Se calcula que entre 1-5% de los pacientes que padecen NF1 desarrollarán feocromocitomas, suponiendo un 5 % de todos los feocromocitomas. Igual que ocurre en los pacientes que presentan MEN2, la inmensa mayoría de los feocromocitomas se localizan en la glándula adrenal. Las alteraciones en el gen NF1 no han sido todavía estudiadas en los paragangliomas aunque no parece implicado este gen en la génesis de este tipo de tumores<sup>83,84</sup>.

### 1.1.7.6. *Cambios somáticos en los PGLs y PCC.*

En los últimos años se ha estudiado ampliamente la presencia de mutaciones germinales de SDH en pacientes afectos de PCC. Sin embargo, poco se ha publicado sobre la presencia de deleciones o amplificaciones de sus genes. Además, apenas existen estudios en los que el sustrato del análisis sea el tejido tumoral, estando la mayor parte basados en muestras de sangre. Estudios citogenéticos han mostrado que las alteraciones más frecuentes en muestras de PGL y PCC afectan a los cromosomas 1, 3 y 11, en los cuales se localizan los genes de SDH y VHL<sup>85,86</sup>. La pérdida total o parcial de un cromosoma es mas frecuente que las ganancias<sup>38,60</sup>. Las deleciones totales o parciales del cromosoma 11 se han descrito en el 63% de los PCC, siendo estadísticamente significativa la asociación de deleciones de 11q con la presencia de PCC familiares<sup>60</sup>. Las deleciones que afectan a este cromosoma son mas frecuentes en los PGL que en los PCC<sup>60</sup>. Se han descrito deleciones en el cromosoma 1 en el 67 % de los PGL y PCC; en este sentido, la pérdida de 1q se ha descrito sólo en los PGL y la pérdida de 1p es más frecuente en los PCC<sup>38,59</sup>. Las deleciones del cromosoma 3 se han descrito en el 72% de los PCC y 37% de los PGL. Las ganancias cromosómicas en los PGL, que como se ha dicho antes son menos frecuentes, han sido descritas sobre todo para el cromosoma 19 (54%), 11q13 (42%) y cromosoma 4 (37%)<sup>59</sup>.

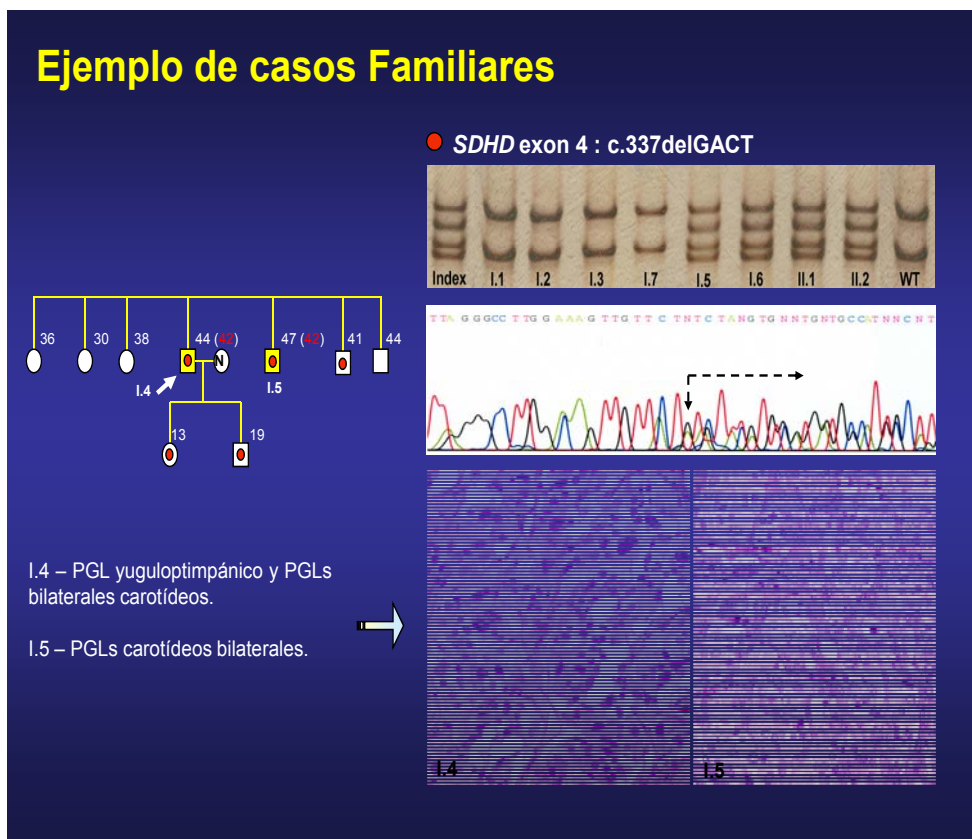
### 1.1.7.7. *Cribaje y estudios genéticos en los PGLs de cabeza y cuello/PCC.*

Es preciso reseñar además, la importancia del cribaje y estudio genético dado que la detección y tratamiento temprano de los PGLs reduce de manera considerable la incidencia de morbilidad. Es en consecuencia, un arma de gran utilidad en familiares de pacientes afectados. Así, identificar pacientes con riesgo de presentar paragangliomas mediante estudios genéticos permitiría una detección de la enfermedad en una fase más temprana. Y dado que existe una fuerte correlación entre el tamaño tumoral y las complicaciones por la exéresis del tumor tras la cirugía, un diagnóstico temprano es beneficioso<sup>87</sup>.

Mediante el cribaje genético, la mutación más frecuente que se detecta es la SDHD<sup>88</sup>. Sobre todo, en casos de pacientes con antecedentes de historia familiar, múltiples paragangliomas y aquellos casos en los que se diagnostica el tumor a edades más tempranas. Si en el paciente portador de la mutación en la SDHD no se objetivan paragangliomas, es necesario un seguimiento periódico anual dado el lento crecimiento de estos tumores. Los tests diagnósticos más útiles son la RMN cervical, el (18)F-DOPA PET y la gammagrafía con pentreótido/123I-MIBG<sup>89</sup>. Los pacientes portadores de la mutación en SDHB necesitan similar vigilancia. Dado que no existe un patrón de herencia paterna, toda la descendencia está en riesgo. La edad para iniciar el cribaje y el seguimiento es debatible. Se ha sugerido los 10 años de edad<sup>72,90</sup>. La base de datos del grupo de estudio de Paragangliomas Europeo-Americano incluye pacientes con tan sólo 13 años de edad<sup>91</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Por lo tanto, después de identificar una mutación SDH en un paciente con feocromocitoma y/o paraganglioma, es preciso realizar estudios genéticos a toda la descendencia a partir de los 10 años de edad (Figura 11). Y, si el estudio genético es positivo es necesaria una cuidadosa historia clínica y un examen físico, así como la medición de catecolaminas en orina junto con pruebas de imagen (TAC/RMN) así como un PET para completar el cribaje<sup>72</sup>.



**Figura 11.**

**Ejemplo de resultados de cribaje en casos familiares.**

### 1.2.- TECNICAS DE ANALISIS GENETICO

Las primeras alteraciones cromosómicas descritas en los tumores humanos datan de principios del siglo XX<sup>92</sup>. Posteriormente se demostró la alteración del cromosoma Philadelphia en la leucemia mieloide crónica<sup>93</sup>. Las técnicas de bandeado cromosómico supusieron un avance importante al identificar cada cromosoma mediante un patrón de bandas<sup>94,95</sup>. La citogenética molecular dio un impulso decisivo al estudio del cáncer al incorporar técnicas fluorescentes para la determinación de las alteraciones cromosómicas. Las técnicas de citogenética molecular se han utilizado ampliamente en enfermedades hematológicas para identificar regiones cromosómicas con genes implicados en la génesis y evolución de distintos tumores<sup>96</sup>.

En lo que respecta a los tumores sólidos el diagnóstico citogenético no ha tenido tanto impacto por problemas metodológicos (dificultad de los cultivos celulares y metafases, el proceso de disgregación enzimática que perjudica la supervivencia del cultivo, la contaminación con microorganismos y la nutrición específica). No obstante, todos estos problemas han podido ser solventados en los últimos años<sup>97,98</sup>.

La mayoría de las técnicas citogenéticas utilizadas en la actualidad tratan de determinar el número de copias secuencias cromosómicas o génicas. Muchas de estas técnicas no son capaces de detectar deleciones o duplicaciones de exones únicos. Además son costosas y requieren gran cantidad de ADN y tiempo.

Mientras que los microarrays son aún poco sensibles y reproducibles para detectar una deleción o duplicación de una pequeña secuencia de ADN de longitud similar a un exón, la PCR (reacción en

cadena de la polimerasa) en tiempo real ofrece la posibilidad de detectar una gran cantidad de amplificaciones de secuencias cromosómicas. Sin embargo, al tener que utilizar múltiples pares de “primers” su sensibilidad disminuye.

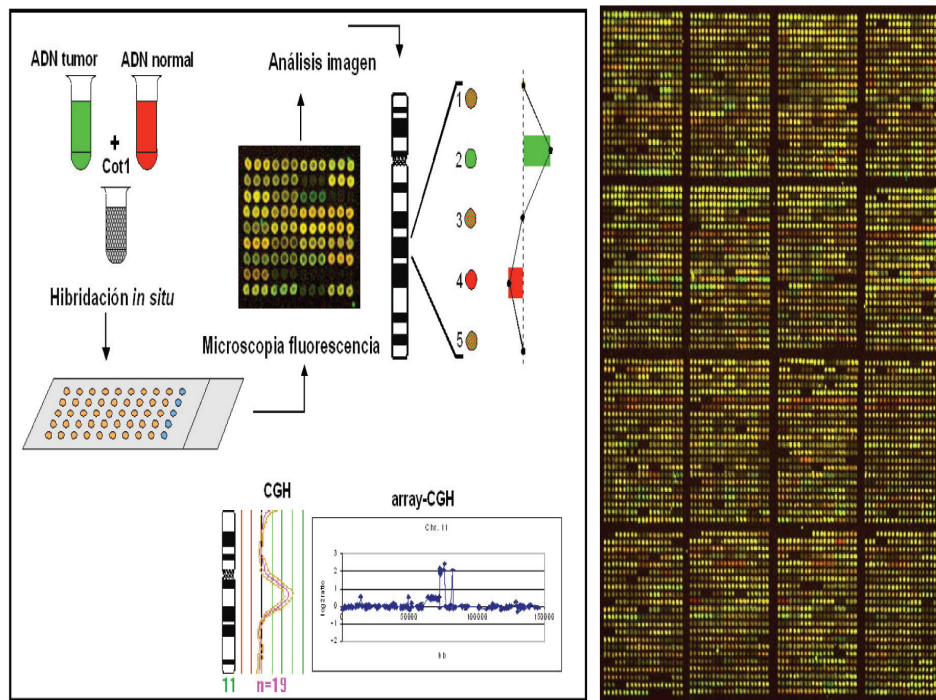
### **1.2.1.- MICROARRAYS- CGH**

#### *1.2.1.1.- Consideraciones generales*

En la actualidad existen en el mercado científico herramientas de análisis genómico en forma de cDNA (ADN monocatenario y complementario al ARNm que contiene la secuencia codificante de un gen), secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) y ADN de doble cadena. En todos los casos el material genético que se dispone en el “array” se refiere a un gen de situación y características conocidas, siendo la información generada la que se refiere a la presencia de ese gen en la muestra analizada. Los microarrays más extendidos y utilizados son los dos primeros tipos (cDNA y oligos) y los experimentos en los que se utilizan son, casi exclusivamente, estudios de análisis masivo o global de expresión genética.

El procedimiento consiste en que el material genético obtenido de la muestra problema, convenientemente tratado y marcado (radioactividad, fluorescencia) se pone en contacto con el “array”, en aquellas posiciones en que se complementa con las sondas. El patrón de hibridación se revela con un escáner basado en microscopía confocal,

siendo la imagen resultante convertida a valores numéricos. El nivel de expresión de un gen se reflejaría en el número de copias de ADN o de ARNm presentes en la muestra problema según el tipo utilizado y, por tanto, sería proporcional al nivel de señal detectado<sup>83,99,100</sup> (Figura 12).



**Figura 12.**

**Esquema de la técnica de “array-CGH”.**

La hibridación de los ADNs se realiza sobre “arrays” y no sobre metafases normales. El predominio verde indicaría ganancia o amplificación y el rojo pérdida. En los 30.000 spots se representa todo el genoma. Obsérvese que en el estudio con HGC la amplificación de la región 11q13 corresponde en realidad a la ganancia de varios genes localizados con los “arrays”.

### *1.2.1.2 Aplicaciones de los microarrays-CGH en la clasificación, pronóstico y tratamiento del cáncer.*

La metodología de los primeros Array CGH fue descrita y publicada por Pinkel y cols en 1998<sup>101</sup>, mejorando en gran medida la resolución y sensibilidad del la HGC cromosómica existente hasta entonces.

En los microarray CGH la diana cromosómica de la HGC se sustituye por fragmentos de genoma clonados (oligos) de los cuales se conoce su localización exacta en el genoma<sup>83</sup>.

Una ventaja importante es que por la miniaturización del sistema, la alta concentración del material permite identificar en las muestras un bajo número de copias. El alto grado de integración del “array” permite, en un solo ensayo, obtener multitud de valores de expresión génica en distintas condiciones biológicas, siendo una herramienta de alto rendimiento en genómica funcional al proporcionar un gran número de datos que deben tratarse con procedimientos bioinformáticos.

Aunque la aplicación más conocida de los “biochips” de ADN es la determinación de perfiles de transcripción, el formato “microarray” también ha sido utilizado de manera eficaz en genómica estructural para la detección de polimorfismos puntuales (Single Nucleotide Polymorphisms o SNPs) y en las variaciones en el número de copias (arrays-CGH), completando el procedimiento clásico de la HGC. Como se citó la HGC tiene una capacidad de resolución limitada y los cambios que impliquen segmentos inferiores a 7-10 MB no se pueden detectar, aunque pueden contener decenas de genes cuyo comportamiento se



## INTRODUCCIÓN

escapa al análisis. Por medio de los microarrays-CGH, se combina la tecnología de los microarrays con la HGC, realizando la hibridación sobre segmentos de ADN de menor tamaño, clonados en forma de Cromosomas Artificiales Bacterianos o Plasmídicos (BAC o PAC, respectivamente). El nivel de resolución pasa, por tanto, de cromosómico a bacteriano o subcromosómico (150 Kb). Los segmentos de ADN estudiados son secuencias conocidas y localizadas según los datos previos del Proyecto Genoma Humano. Los primeros arrays usados tenían alrededor de 3000 BAC por Mbp cubriendo el genoma con una resolución de un BAC por Mbp<sup>102</sup>. Actualmente mediante microarrays, como los que nosotros empleamos en este trabajo, se estudian casi 30.000 genes, prácticamente la totalidad de los genes descritos en todo el genoma humano.

Una limitación para realizar la técnica es la cantidad de tejido necesario, aunque es menor que el que se necesita en la HGC clásica y podría así ser optimizado cuando se seleccionen “biochips” específicos de 1000 genes<sup>83-85</sup>.

Para finalizar se debe citar que los resultados de “microarrays-CGH” son muy reproducibles, aportando gran cantidad de datos sobre la regulación génica en condiciones normales y patológicas. Los perfiles se pueden utilizar para clasificar mejor los distintos tipos de cáncer y verse modificados por distintos estímulos internos o externos.

La validación de estos análisis ha de realizarse mediante técnicas de PCR cuantitativa para solventar algunos de los problemas que presentan como:

## INTRODUCCIÓN

- a) La naturaleza normalmente lábil y diluida de las muestras biológicas.
- b) Relación no equivalente entre los procesos moleculares y los datos histopatológicos.
- c) Sensibilidad indeterminada a factores y procedimientos poco estandarizados y controlados (temperatura y volúmenes de disoluciones, concentración de ozono atmosférico).
- d) Dependencia en instrumentación calibrada de forma variable (baños termostatzados, escáneres).
- e) Diversidad de procedimientos de procesamiento de datos.
- f) Sistemas inapropiados de análisis de datos y escasez de recursos bioinformáticos para el tratamiento y comprensión de datos masivos.
- h) Diversidad existente de alternativas plataformas tecnológicas con variabilidad del proceso de producción. Muchas de estas plataformas están “hechas en casa” por laboratorios de apoyo a la investigación de centros académicos.

Aunque esta tecnología es revolucionaria y va a tener un gran impacto en los próximos años, ninguna técnica es suficiente para contribuir por sí sola al avance de las grandes cuestiones abiertas en la investigación biomédica del cáncer. Lo importante son los conceptos y las respuestas a las preguntas planteadas. No nos cabe duda que en este aspecto los “microarrays CGH” (junto con los de expresión) van a ser una herramienta que, una vez validada, permitirá incorporar todas sus aportaciones a la práctica clínica<sup>84,88,89</sup>.



## **2.- Hipótesis**



1.- Con la evidencia científica actual, se conoce que los PGL familiares son una entidad genéticamente heterogénea. Hasta el momento se han identificado mutaciones en los genes SDH y en los genes VHL, RET y NF1 relacionados con la enfermedad, pero existe un porcentaje variable en el que desconocemos la alteración genética que origina el PGL. Dada la diversidad y complejidad genética de estos tumores sería necesario estudiar nuevos cromosomas o loci cromosómicos con nuevos genes implicados en la tumorigénesis de los PGL.

2.- En los PGLs de cabeza y cuello esporádicos aproximadamente un tercio tienen alteraciones germinales que afectan al complejo SDH y representan por lo tanto casos familiares ocultos. La alteración genética responsable de los dos tercios restantes no ha sido identificada todavía.

3.- Además, hasta ahora, ningún estudio científico o base de datos ha publicado un análisis de las alteraciones cromosómicas somáticas de todo el genoma mediante microarrays-CGH en PGLs de cabeza y cuello esporádicos o familiares. Este es un paso importante para conocer la tumorigénesis en PGLs.

4.- Los efectos biológicos de las mutaciones identificadas en los PGLs podrían hacer posible realizar un perfil de estas alteraciones en cada paciente que podría aplicarse en el diagnóstico precoz, tratamiento y pronóstico. Y asimismo, correlacionar las características clínicas con una alteración genética determinada que permitiera priorizar la secuencia de estudio de alteraciones genéticas en estos pacientes.

## **3.-Objetivos**

## OBJETIVOS



1.- Describir las mutaciones germinales de SDHB, SDHC, SDHD, RET y VHL en pacientes que presentaban paragangliomas de cabeza y cuello, familiares y esporádicos.

2.- Realizar un cribado de las alteraciones cromosómicas somáticas en los paragangliomas mediante la técnica de microarray-CGH.

3.- Buscar correlaciones entre los resultados génicos (de los microarrays-CGH y del estudio de mutaciones) con los datos clínico-patológicos de los pacientes.

4.- Establecer una secuencia de estudio de las mutaciones germinales de los genes SDHB, SDHD, SDHC, VHL y RET en relación a los síntomas clínicos.



## **4.- Material y Métodos**



### **4.1.- SERIE CLÍNICA DE PACIENTES CON PGLs**

Comprende 78 pacientes controlados en el servicio de Otorrinolaringología de Hospital Central de Asturias, con un total de 97 PGLs, ya que 6 pacientes presentaban PGLs múltiples. Son pacientes con el diagnóstico de PGL de cabeza y cuello diagnosticados en el período comprendido entre noviembre de 1980 y abril de 2005.

Se realizó un estudio retrospectivo

Los métodos diagnósticos previos al tratamiento comprendieron: historia clínica, exploración otorrinolaringológica y neurológica, audiometría, timpanograma, arteriografías, tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RMN). En los pacientes con clínica sospechosa de tumor funcionante, se realizó una determinación de catecolaminas en orina. La duración del seguimiento fue una media de 8 años con un rango entre 1-19.

#### *4.1.1. Serie clínica de los 72 pacientes con PGLs.*

De los 78 pacientes (se excluyeron 6 pacientes de la serie inicial por no ser localizados para realizar la extracción sanguínea o haber fallecido) los 72 pacientes estudiados eran 50 mujeres y 22 varones, con una edad media de 50 años (16- 79 años).

Los síntomas y signos clínicos que presentaban los pacientes al diagnóstico se muestran en la Tabla I y, como es lógico, variaban según

la localización del tumor. Se encontró clínicamente afectado el nervio facial en el momento del diagnóstico en dos pacientes con paragangliomas múltiples. Se trataba en un caso de una paciente, previamente intervenida de un paraganglioma carotídeo, que presentaba además un PGL vagal y otro timpánico, mostrando una parálisis facial grado IV de House-Brackman que se mantuvo en el postoperatorio. La otra paciente tenía PGLs carotídeos bilaterales y otro yugular, cuya sintomatología debutó con una parálisis facial.

**TABLA I.**

**Presencia de signos y síntomas en el momento del diagnóstico y parálisis de pares craneales bajos en el preoperatorio:**

Signos/síntoma	N° de Pacientes (n=72)			
	PY (n=29)	PT (n=14)	PC (n=20)	PV (n=9)
Hipoacusia .....	20	14	0	0
Acúfenos.....	21	14	0	0
Tumoración de aspecto rojizo en caja timpánica .....	2	14	0	0
Vértigo.....	10	3	0	0
Otorrea.....	3	0	0	0
Síndrome de Collet-Sicard.....	1	0	0	0
Tumoración cervical.....	0	0	20	9
Disfagia.....	8	0	0	3
Disfonía .....	8	0	0	3
Crisis de HTA.....	1	0	0	1
Parálisis de Pares craneales en el diagnóstico:				
- V .....	1	0	0	0
- VII.....	1	0	0	1
- IX.....	4	0	0	1
- X.....	10	0	1	4
- XI.....	3	0	1	1
- XII.....	7	0	1	1

PT= Paraganglioma Timpánico. PY= Paraganglioma Yugular. PC= Paraganglioma Carotídeo.  
PV= Paraganglioma Vagal

El estudio histopatológico definitivo fue realizado sobre la pieza de resección quirúrgica por un patólogo experimentado en cabeza y cuello en el Servicio de Anatomía Patológica. El planteamiento terapéutico fue realizado según los protocolos establecidos en nuestro servicio.

De esta muestra inicial se seleccionaron dos grupos en los que se realizaron las técnicas descritas a continuación. La separación en estos grupos se debió principalmente a la cantidad de material tisular disponible y a la incorporación progresiva de nuevos pacientes, así como de las técnicas.

### *4.1.2. Serie clínica de los 24 pacientes con PGLs estudiados mediante microarrays-CGH.*

Al final estudiamos 24 casos por microarrays-CGH.

En 72 pacientes se extrajo DNA genómico de 10 mL de sangre extraída y conservada en tubos EDTA mediante los métodos estándar y se analizaron las mutaciones en los genes SDHB, SDHC y SDHD, junto a los genes VHL y RET (en este último gen, únicamente los exones 10, 11, 13 y 16).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para hacer la selección de los pacientes y muestras para realizar la técnica de microarrays-CGH se aplicaron los siguientes criterios de inclusión en el estudio:

1. Los pacientes no debían haber recibido tratamiento previo por su tumor que incluyera cirugía o radioterapia en el cuello, área donde se va a recoger la muestra tisular, ni quimioterapia antineoplásica previa a la intervención.
2. El tipo histopatológico del tumor debía ser paraganglioma, requiriendo que el material fuera suficiente y estuviera en buen estado.
3. El seguimiento clínico mínimo debía ser de 2 años o hasta el fallecimiento del paciente, ajustándose a los procedimientos habituales de los centros hospitalarios.
4. No se estudió más de un miembro de la misma familia.

Finalmente se seleccionaron 24 pacientes para realizar el análisis mediante microarrays-CGH.



## MATERIAL Y MÉTODOS

En la tabla II se describen las características clínicas de los 24 pacientes seleccionados entre los 72 casos con PGLs de cabeza y cuello descritos con anterioridad, para realizar el análisis mediante microarrays-CGH.

De entre los 24 pacientes, 16 (67%) no tenían historia familiar previa y 8 (33%) heredaron la enfermedad. Asimismo, en este grupo de casos familiares, casi el 50% de los pacientes tenían PGLs carotídeos bilaterales, sincrónicos o metacrónicos.

Los PGLs timpánicos, sin embargo, se hallaban únicamente en los casos esporádicos y presentaban un pequeño tamaño al diagnóstico (media de 0.8 cm).

Se realizó a los pacientes una medición de los niveles de catecolaminas en orina de 24 horas, pero únicamente dos pacientes (un caso familiar y otro esporádico) tenían niveles elevados.

**Tabla II.**

Características clínicas de los 24 pacientes con paraganglioma en los que se analizaron los genes SDHB, SDHC, SDHD, VHL y RET mediante microarray-CGH

<b>Características clínicas</b>	<b>Todos los pacientes (n=24)</b>	<b>Casos familiares (n=8)</b>	<b>Casos esporádicos (n=16)</b>
<b>Género:</b>			
Mujeres	14	4	10
Hombres	10	4	6
<b>Número:</b>			
Único PGL	19	3	16
Múltiple PGL	5	5	0
<b>Edad Media al diagnóstico</b>			
	42	37	47
<b>PGL funcionante (Secretor de Catecolaminas)</b>			
	2	1	1
<b>Tamaño tumoral medio (en cm.)</b>			
	3.3	4	2.8
<b>Origen tumoral:</b>			
PGL carotídeo	12	5	7
PGL yugular	11	5	6
PGL timpánico	2	0	2
PGL vagal	8	4	4
PGL Extra-adrenal	1	1	0
<b>Recidiva</b>			
	2	1	1
<b>Metástasis locorregional /a distancia</b>			
	1	0	1

## 4.2.- MUESTRAS DE LOS PACIENTES CON PGLs

### 4.2.1.- *Procesado de muestras.*

El almacenamiento de las muestras sanas y tumorales frescas se hizo en nitrógeno líquido (-70°C). Las muestras parafinadas se almacenaron de forma habitual en el Servicio de Anatomía Patológica. El trabajo de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Otorrinolaringología del Instituto Universitario de la Universidad de Oviedo (IUOPA).

### 4.2.2. *Extracción de DNA.*

Los protocolos de extracción de ADN para todas las muestras se realizaron en base al uso de columnas de afinidad (QIAamp®, QIAgen, Valencia, CA, USA). Este “kit” contiene dos tampones de lisis (ATL y AL), dos tampones de lavado (AW1 y AW2) y un tampón de elusión (AE).

#### 4.2.2.1. *A partir de tejido fresco.*

Las 2 muestras que se utilizaron de tejido fresco, se descongelan a temperatura ambiente en una placa Petri y, con ayuda de dos bisturís, se disgregan mecánicamente cortándolas en pequeños fragmentos que son depositados en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.

A continuación se realiza el lisado añadiendo 200 µL del tampón de lisis ATL y 20 µL de proteinasa K (concentración de almacenamiento:

## MATERIAL Y MÉTODOS

10mg/mL). Se mezcla bien en un agitador y se deja incubando a 56°C en una placa térmica con agitación. A las 8 horas se vuelven a añadir otros 20 µL de proteinasa K, se mezcla bien y se deja incubando a 56°C toda la noche.

A la mañana siguiente se añaden 200 µL de tampón AL, se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. A continuación se añaden 200 µL de etanol absoluto y se agita enérgicamente durante 15 segundos para precipitar el ADN. Posteriormente se aplica el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna de afinidad (QIAamp®) que se coloca en un tubo de recolección de 2 mL. La columna y el tubo de recolección se centrifugan durante 1 minuto a 8.000 rpm y el filtrado es eliminado. Más tarde, se procede a la purificación del ADN añadiendo sobre la columna 500 µL del tampón AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tras eliminar el filtrado se continúa con un segundo lavado añadiendo a la columna 500 µL del tampón AW2 y centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente, se coloca la columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 70µL del tampón AE para eluir el ADN de la columna. Se incuba durante 5 minutos y se centrifuga 1 minuto a 8.000 rpm.

La concentración y la pureza del ADN obtenido se determinan midiendo su absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de ADN que tenemos en nuestra muestra y la relación A260/A280 el grado de pureza de la muestra. Se consideran aceptables purezas con valores mayores de 1,5.

### 4.2.2.2. *A partir de sangre periférica.*

El ADN control para MLPA fue obtenido a partir de sangre periférica de donantes citogenéticamente sanos. La extracción de ADN de sangre no requiere disgregación mecánica.

En un tubo de microcentrífuga se añaden 200  $\mu$ L de sangre y se procede al lisado de las células mediante la adición de 200  $\mu$ L del tampón de lisis ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K incubando las muestras a 56°C durante dos horas. A continuación se añaden 200  $\mu$ L de tampón AL, se agita enérgicamente y se incuba a 70°C durante 10 minutos. El resto del protocolo sería igual al descrito anteriormente para muestras en fresco a partir del paso de precipitación del ADN.

### 4.2.2.3. *A partir del tejido en parafina.*

Para extraer las muestras embebidas en parafina se empleó el kit QiAmp. El primer paso consiste en desparafinar la muestra. Se incubó con xylol durante 10 minutos a 45° tras lo cual se centrifugó a 14000 rpm y se descarta el sobrenadante. Esta operación se repitió 3 veces. Posteriormente se realizaron 2 ciclos de centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos a 45° descartando el sobrenadante; en el primero se añadió 1 ml de MeOH y en el segundo 1 ml de PBS. A continuación se añadió 1 ml de NaSCN a concentración 1 M y se incubó durante toda la noche en una placa térmica con agitación a 37°. La mañana siguiente se centrifugó el tubo eppendorf durante 10 minutos a 14000 rpm y se descartó el sobrenadante. Seguidamente se añadió 1 ml de PBS y se

## MATERIAL Y MÉTODOS

centrifugó 10 minutos a 14000 rpm con el fin de eliminar los restos de NaSCN y se desechó nuevamente el sobrenadante.

Una vez esta desparafinado, se procedió a la lisis de las muestras. Se añadieron 200 µl de buffer de lisis ATL del kit QiAmp junto con 20 µl de proteinasa K ( a concentración de 20 mg/ml); esta mezcla se incubó a 55° durante toda la noche y el día siguiente en una placa de agitación térmica, añadiendo 20 µl de proteinasa K al inicio y final del día. Tras 2 días y 2 noches de lisis, se añadieron 200 µl de tampón AL ( QiAgen) y se incubó 10 minutos a 70 °C; al producto resultante se le añadieron 200 µl de EtOH al 100% y tras mezclar y centrifugar, se procedió al siguiente paso.

El siguiente paso consiste en la precipitación del DNA. Para ello, se transfiere el producto resultante del paso anterior a una columna de afinidad que se colocó sobre un tubo colector de 2 ml. Se realizó una centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto del conjunto columna y tubo colector, descartando el eluido.

Llegados a este punto, se añadieron sobre la columna 500 µl del tampón AW1 y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm eliminando el filtrado. Se repitió el lavado con el tampón AW2 y se centrifugó 3 minutos a 14000 rpm, descartando nuevamente el filtrado y transfiriendo la columna a un tubo eppendorf. Para concluir con la extracción, se debe soltar el contenido de DNA que permanece en la membrana de afinidad. Para este fin, se añadieron 70 µl de buffer AE (Qiagen) y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente; después se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm y finalmente se almacenó el DNA a 4°C.

#### **4.3.- LA TÉCNICA DE MICROARRAYS CGH.**

Los arrays CGH se emplearon para analizar las alteraciones genéticas somáticas, y se realizaron según la técnica previamente descrita por Carvalho y cols<sup>103</sup>.

En resumen, la muestra y el control de ADN se marcó de forma diferente. Se hibridaron 300 ng de cada ADN con un 30K array (60-mer oligo's, diseñados por Compugen y sintetizados por Sigma-Genosys), e impresos en portas activados de Codelink (Amersham).

Este array contiene 29.134 oligonucleótidos que representan a unos 28.830 genes diferentes. La hibridación se realizó en dos noches en una cámara de hibridación especializada (Perkin Elmer HybArray 12™). Las imágenes fueron obtenidas usando un Agilent DNA Microarray Scanner.

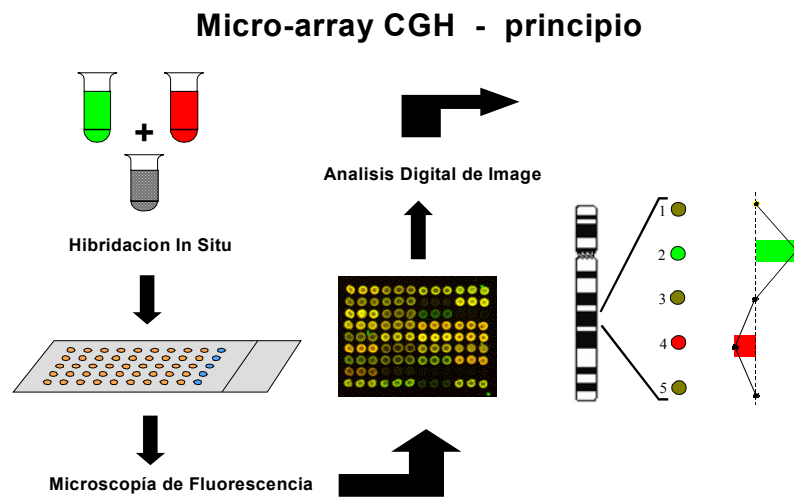
La extracción de los datos y el análisis cuantitativo se realizaron por BlueFuse (BlueGnome, Cambridge, UK).

BlueFuse es un programa para alinear sobre la plantilla los spots y calcular la intensidad de los señales en rojo y en verde, y el cociente entre los dos. También evalúa posibles desperfectos en los spots y da un valor p de confianza. Valores <0,10 no se usan en la interpretación.

El DNA control de mujer sirvió como referencia y control de calidad. Debido a que todos los tumores provienen de hombres, los clones X normalmente mostraron pérdidas mientras que los clones de Y siempre mostraron importantes ganancias.

Se realizó una normalización estadística de los índices calculados a partir de la media de todos los índices. Los gráficos se hicieron con una media variable de  $\log_2$  de índices de 5 clones vecinos.

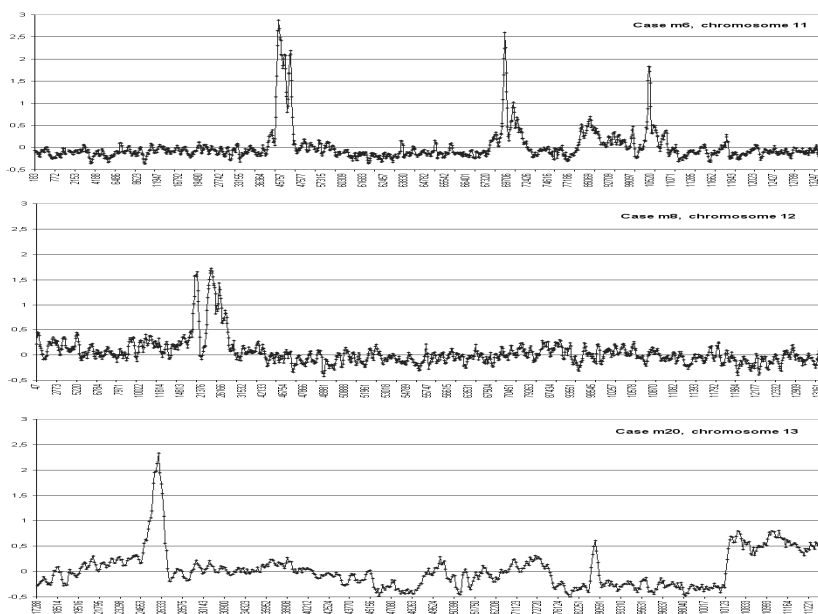
Las ganancias y las pérdidas se definieron como desviaciones de 0,2 o más del  $\log_2$  de índices = 0. Se consideró amplificación cuando al menos dos clones vecinos alcanzaban un  $\log_2$  índice de 1,0 o mayor. (Figuras 13-14)



**Figura 13.**

**Técnica de los microarray-CGH.**





**Figura 14.**

**Representación gráfica de un microarray-CGH donde se muestran los picos de ganancias en los cromosomas 11, 12 y 13.**

#### 4.3.1.-Análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de las variables descriptivas y longitudinales se realizó mediante el paquete informático “Statistical Package for the Social Science”, SPSS versión 11.0 para Windows (SPSS® Inc. Illinois, EE.UU).

La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la Prueba de Correlación  $\chi^2$  de Pearson o la Prueba Exacta de Fisher

cuando existían celdas con menos de 5 individuos. El nivel de significación se fijó para una  $p$  menor o igual a 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

### **4.4.- ESTUDIO DE LAS MUTACIONES GERMINALES EN LOS GENES SDHB, SDHC, SDHD, RET Y VHL**

#### *4.4.1. Análisis genético molecular.*

Se extrajo DNA genómico de 10 mL de sangre extraída y conservada en tubo EDTA mediante los métodos estándar de los 72 pacientes, y se analizaron las mutaciones mediante secuenciación directa por PCR en:

- Los ocho exones de SDHB;
- Los cuatro exones de SDHD;
- Los seis exones de SDHC;
- Los tres exones de VHL; y
- Los exones 10, 11, 13 y 16 de RET.

En la siguiente tabla III se muestran los primers empleados para el estudio de las distintas mutaciones en los genes VHL, RET y SDH en los PGLs de cabeza y cuello:

**Tabla III.**

Se describen los distintos cebadores empleados para el estudio de mutaciones en PGLs de cabeza y cuello.

VHL	exon	primer F	primer R	Temp	MgCl2	DMSO	ciclos
	1	82 (TCCGGCCCGGGTGGTCTGGAT)	83 (TGCTATCGTGCCAGACTTCGG)	60	2	2	35
	2	84 (ATTACAGGTGTGGCCAC)	85 (AACGGACTACAGTCCGTGCC)	62	2	0	30
	3	86 (GTTCTTGTACTGAGACCCTA)	87 (AATGTGACAAAGTAGAGTCG)	62	2	0	30

RET	10	524 (AGGAGGCTGAGTGGCTACG)	525 (GTGTAGACTCCAGGTTGTTC)	60	2	0	35
	11	107 (TACCCAGTGGTGCCAGCCT)	108 (TCGACGGAAGTCCCTCCCT)	62	2	0	35
	13	109 (CTTCCAGGAGCGATCGTTTG)	110 (GTCGGTGACGTGGGTCGGAC)	62	2	0	35
	16	115 (TCCTTCTAGAGATTAGAG)	116 (CCTCCAATGTCTTTGTGGGA)	58	2	0	35

SDHB	1	tgtaaaacgacggccagtgccgctactgcgctattg	caggaaacagctatgaccgcttctgactttccc	55	1,5	0	35
	2	tgtaaaacgacggccagttctgtgtgccagcaaaatg	caggaaacagctatgaccgcttcccaaggatgaaaa	55	1,5	0	35
	3	tgtaaaacgacggccagtcacatccagtgctccgatt	caggaaacagctatgaccgaagcctcttggagacca	55	1,5	0	35
	4	tgtaaaacgacggccagtttgggagcagctgattc	caggaaacagctatgaccgaatcctgcccgaaaac	55	1,5	0	35
	5	tgtaaaacgacggccagtaagctgaggtgatgaa	caggaaacagctatgaccacactctgcaatcatct	55	1,5	0	35
	6	tgtaaaacgacggccagtaagtaggcacttggctatg	caggaaacagctatgaccgctgcttacagcaatct	55	1,5	0	35
	7	tgtaaaacgacggccagtcacagagcttgaattgagc	caggaaacagctatgaccaggttgcctctgccaat	55	1,5	0	35
	8	tgtaaaacgacggccagtggtttcccttcagtttca	caggaaacagctatgaccgctgattcatgaaaccaa	55	1,5	0	35

SDHC	1	tgtaaaacgacggccagtgctacatgaccccccaac	caggaaacagctatgaccggcagcagataaacag	57	1,5	0	35
	2	tgtaaaacgacggccagttctatccctcaccctaaaaa	caggaaacagctatgaccgagactccgtcmeta	55	1,5	0	35
	3	tgtaaaacgacggccagtaaacggtatgcaaaatataaac	caggaaacagctatgaccctcagaacttccaccact	55	1,5	0	35
	4	tgtaaaacgacggccagtgccaagatagactctactatggtg	caggaaacagctatgaccctcaaggaggcagagacta	57	1,5	0	35
	5	tgtaaaacgacggccagtcaggggtcccagttttatgt	caggaaacagctatgaccgctcccactcccttcac	55	1,5	0	35
	6A	tgtaaaacgacggccagttttttgttccacagATG	caggaaacagctatgaccgaaggagaactttccaggc	55	1,5	0	35
	6B	tgtaaaacgacggccagtaaggtgggcataaagggtag	caggaaacagctatgaccGCCCATAGAGACAACACA	55	1,5	0	35

SDHD	1	tgtaaaacgacggccagttccaccagatttccctct	caggaaacagctatgaccgctgctgatttcggtatttc	55	1,5	0	35
	2	tgtaaaacgacggccagttatgattccctattttgtt	caggaaacagctatgaccctctgcccgaagggtgaaacta	55	1,5	0	35
	3	tgtaaaacgacggccagtcattgagataccctgttgcctaa	caggaaacagctatgaccctcaatcaacttcccata	55	1,5	0	35
	4	tgtaaaacgacggccagtggtgagtgccaatggagaca	caggaaacagctatgaccctgttatttccctattgtga	55	1,5	0	35

Las mutaciones se analizaron mediante secuenciación directa por PCR empleando el Analizador Genético “ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer” (Applied Biosystems, Perkin Elmer, USA). Se realizó una confirmación de las secuencias “sense” y “antisense”.

### *4.4.2.- MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)*

En paralelo, además se empleó un kit de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) para VHL, SDHB, SDHC y SDHD que se realiza según el protocolo de la MRC-Holland, que comercializa los reactivos empleados.

#### *4.4.2.1.- Fundamento de la técnica.*

La MLPA es una técnica de biología molecular descrita por Schouten<sup>104</sup> que permite amplificar en un único experimento, más de 40 secuencias distintas de ADN o ARNm. Para su realización es necesario disponer de una cantidad mínima del ácido nucleico a estudio (20 ng. son suficientes), un kit de oligonucleótidos complementarios a las secuencias diana del ADN problema, un termociclador para amplificar mediante PCR (Polimerasa Chain Reaction) las sondas hibridadas y un método de electroforesis en gel o capilar, para separar e identificar los productos amplificados en función de sus diferentes tamaños.

Destacan dos peculiaridades en el método:

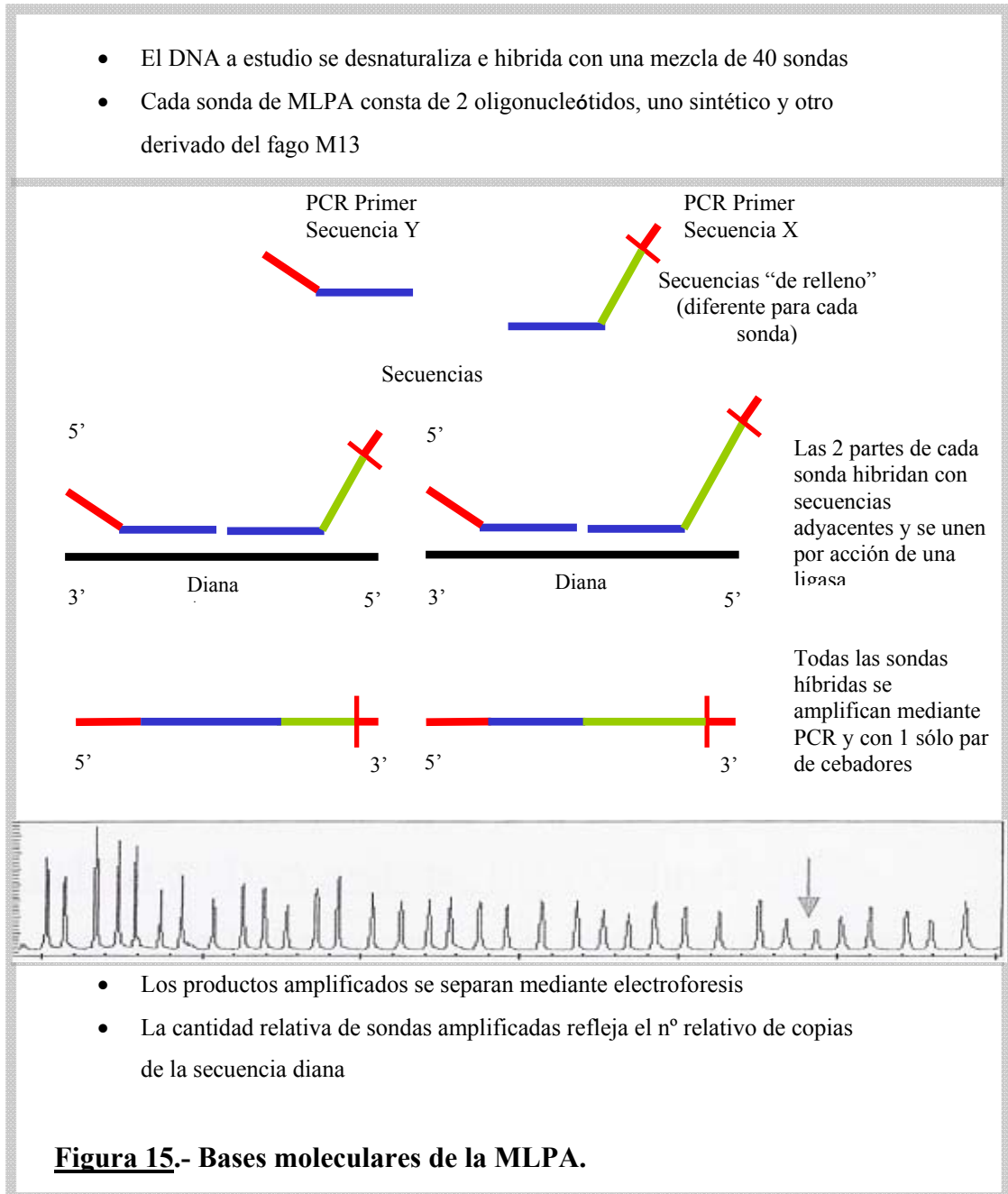
1. Para reconocer las secuencias diana del ADN a estudio, se emplean dos oligonucleótidos que hibridan en regiones inmediatamente adyacentes para posteriormente unirse por acción de un enzima específico (ligasa termoestable), formando una cadena única y pudiendo entonces ser amplificadas mediante PCR.
2. Como todas las sondas cuentan con secuencias idénticas de bases en sus extremos 3' y 5', basta una pareja única de “primers” para la amplificación simultánea de las mismas.

Hay que tener en cuenta que no se amplifican las secuencias diana del ADN a estudio, sino las sondas empleadas para su detección. Cada una de ellas está constituida por una secuencia de 50-70 nucleótidos, que es la que participa directamente en la hibridación y por otra “no hibridante”, de longitud variable, que es la que permite que los productos amplificados tengan distinto tamaño dentro de un rango entre 130-480 pares de bases y, de ese modo, separarse mediante técnicas de electroforesis (Figura 15).

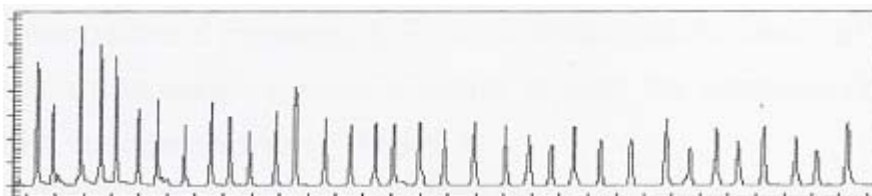
Finalmente, tras analizar los productos de la reacción mediante el software Genescan, se obtiene un perfil en el que cada producto amplificado genera un pico de fluorescencia, con área proporcional al número de copias de esa secuencia en el ADN estudio. Para relativizar los resultados, se divide el área de cada pico entre la suma de todas las áreas-pico del perfil y se compara el área-pico relativa de cada producto de amplificación con su homóloga dentro de un perfil de control, obtenido a partir de ADN de tejido sano. Las relaciones se consideran

## MATERIAL Y MÉTODOS

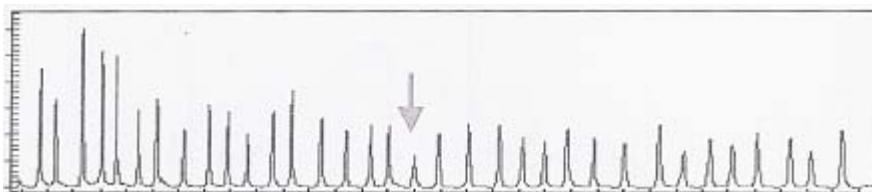
significativas cuando son inferiores a 0,7 o superiores a 1,30; interpretando las primeras como pérdidas y las segundas como ganancias de la secuencia correspondiente (Figura 16).



ADN Control



Paciente con pérdida del exón 13 en *BRCA1*



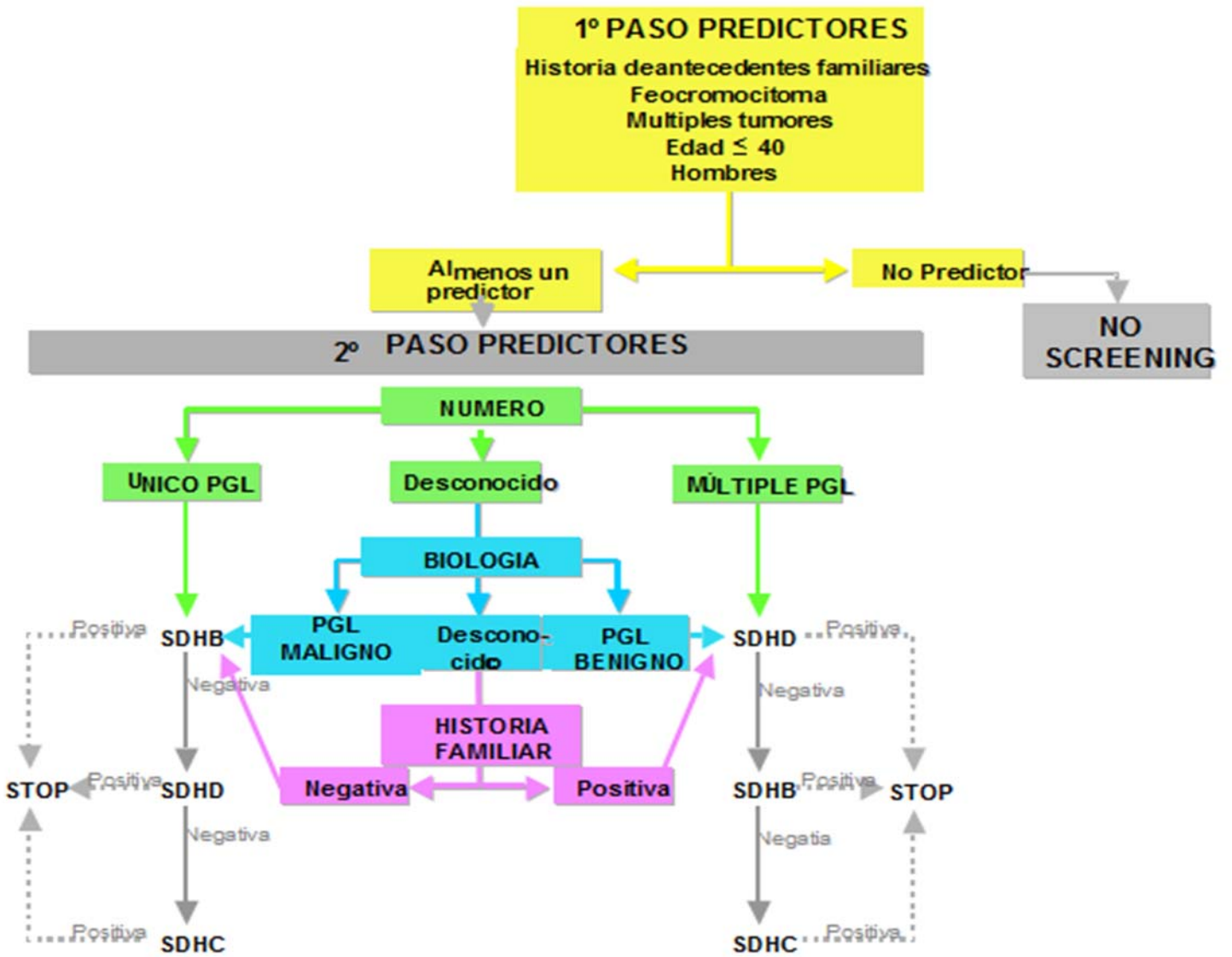
**Figura 16.**

**Perfiles de ADN control versus ADN problema tras el análisis mediante electroforesis capilar (pérdida del exón 13 en *BRCA1*)**

Para confirmar las deleciones que se objetivaron afectas se empleo de nuevo una PCR múltiple.

Como controles, se empleó sangre de 100 donantes voluntarios blancos sanos que eran originarios de del Centro Comunitario de Sangre de Asturias.

4.4.3.- Algoritmo empleado para priorizar el análisis de los genes SDHB, SDHC y SDHD.



**Figura 17.**

Algoritmo empleado para priorizar el análisis de los genes SDHB, SDHC y SDHD.



Una vez realizado el análisis mutacional de todos los genes implicados en los PGLs familiares y establecida la correlación con los datos clínicos, se estudió la secuencia ideal de análisis de los distintos genes con la finalidad de estudiar primero aquel gen que tuviera probabilidad de estar mutado de acuerdo con las características clínicas. De esta forma si el gen mutado aparece de primeras, sería innecesario continuar con el estudio de los restantes, ya que no se han descrito mutaciones dobles, lo que abarataría considerablemente los costes.

Para priorizar en la decisión de cual es el gen que debemos analizar primero y en que orden continuar se ha seguido el algoritmo sugerido por *Neumann et al*, en un estudio multiinstitucional actualmente en elaboración en el que participamos con nuestros casos (Fig. 16). Así, los tumores multifocales y con antecedentes de historia familiar son altamente predictivos para mutaciones en el gen SDHD. Igualmente, los tumores únicos y malignos se asocian con mutaciones en SDHB. El hecho de no presentar antecedentes de historia familiar es predictivo para mutaciones en SDHC. Finalmente, sólo en situaciones muy poco frecuentes, en el caso de no detectar mutaciones en el gen SDH, se debería considerar valorar el análisis de las mutaciones en los genes VHL y RET.

En la figura 16 se describe el algoritmo para realizar el estudio de las mutaciones en los genes SDHB, SDHC y SDHD, mediante el cual se consigue reducir el coste aproximadamente de un 60% manteniendo una sensibilidad de un 91.3% y un valor predictivo negativo de 94.2%, La proporción de casos “mal clasificados” entre los pacientes con mutación

## MATERIAL Y MÉTODOS

germinal fue de un total de 8.7% de todos los casos con mutación hereditaria.

## **5.- Resultados**



## 5. 1. RESULTADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.

### 5.1.1 *Características demográficas y clinico-patológicas.*

En la tabla que se muestra a continuación (Tabla IV) se analizan las diferentes características de los PGLs que presentaban los 72 pacientes de la serie.

Se trataba de 20 PGLs carotídeos, 29 yugulares, 14 timpánicos y 9 vagales.

Eran más prevalentes en mujeres (50:22) y 16 casos (fundamentalmente PGL yugulares en un 50%) pertenecían a pacientes con una edad igual o inferior a 40 años.

58 casos eran esporádicos y 14 familiares, de los cuales 43% eran carotídeos, 36% yugulares y 21% vagales.

Los 6 tumores que recidivan son todos ellos casos yugulares, PGLs grandes y en los cuales influyó la localización para conseguir un buen abordaje con exéresis completa.

Son de destacar los hallazgos en los PGLs timpánicos, benignos en su totalidad, de los que no recidivó ninguno y se manifestaron únicos en todos los casos, ocurriendo significativamente en mujeres fundamentalmente (12:2) y sin mutación germinal asociada.

**Tabla IV.**

**Características de los 72 pacientes de la serie con PGLs de cabeza y cuello.**

	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
	<b>Pgl carotídeos</b>	<b>Pgl yugulares</b>	<b>Pgl timpánicos</b>	<b>Pgl vagales</b>
<b>50 mujeres</b>	<b>13</b>	<b>19</b>	<b>12</b>	<b>6</b>
<b>22 hombres</b>	<b>7</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>16 &lt; 40a</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>2</b>	<b>4</b>
<b>56 &gt; 40a</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>12</b>	<b>5</b>
<b>70 benignos</b>	<b>20</b>	<b>27</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
<b>2 malignos</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>70 sin Feocromocitoma</b>	<b>19</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
<b>2 com Feocromocitoma</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>66 únicos</b>	<b>18</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>6</b>
<b>6 múltiples</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
<b>58 esporádicos</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>14</b>	<b>6</b>
<b>14 familiares</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
<b>66 no recidivan</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
<b>6 recidivan</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>68 No funcionantes</b>	<b>18</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>8</b>
<b>4 Funcionantes</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>46 Sin Mutación</b>	<b>11</b>	<b>17</b>	<b>14</b>	<b>4</b>
<b>26 Con Mutación</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>5</b>

*5.1.2. Tratamiento y evolución postoperatoria de los PGLs.*

Se empleó la radiocirugía como único tratamiento en 3 pacientes con PGL yugulares que presentaban PGL múltiple, para reducir los riesgos de la cirugía.

En 4 pacientes mayores de 60 años (3 casos con PGL yugular y 1 caso de PGL vagal) se optó por una conducta expectante con estudios de imagen seriados.

Pasamos a describir a continuación los abordajes quirúrgicos empleados según la localización del tumor fueron los siguientes (tabla V):

– Paragangliomas yugulares y timpánicos. En los PGL timpánicos se realizaron 14 abordajes otológicos exclusivamente, y el abordaje transmastoides (generalmente con timpanotomía posterior ampliada) fue la técnica más empleada (10 casos frente a 4 en que se realizó un abordaje endomeatal). En los pacientes con PGL yugulares se utilizó el abordaje infratemporal tipo A de Fisch, con o sin modificaciones. En un paciente se usó la radiocirugía como tratamiento postoperatorio al no conseguirse extirpar el tumor completamente por presentar un amplísimo crecimiento hacia la fosa craneal posterior. Con ello se logró la estabilización del tumor, sin que mostrara ningún signo de crecimiento durante el seguimiento ulterior inmediato a los 5 años.

– Paragangliomas carotídeos. En los 20 pacientes se realizó un abordaje cervical; 2 de ellos tenían tumores multicéntricos.

– Paragangliomas vagales. El abordaje empleado con mayor frecuencia fue el cervical principalmente y en el resto de los casos se utilizó además el abordaje infratemporal tipo A, al extenderse a la fosa yugular.

Tabla V.

**Tipo de abordaje quirúrgico realizado:**

TRATAMIENTO	TIPO DE TUMOR			
	PY	PT	PC	PV
- Abordaje Endomeatal .....	0	4	0	0
- Abordaje Transmastoideo.....	0	10	0	0
- Abordaje infratemporal Fisch tipo A clásico .....	15	0	0	0
- Abordaje infratemporal Fisch tipo A sin transposición del facial .....	7	0	0	2
- Abordaje infratemporal Fisch tipo A mediante receso facial ampliado.....	1	0	0	0
- Abordaje cervical.....	0	0	20	6
<b>TOTAL .....</b>	<b>23</b>	<b>14</b>	<b>20</b>	<b>8</b>

PT= Paraganglioma Timpánico. PY= Paraganglioma Yugular. PC= Paraganglioma Carotídeo. PV= Paraganglioma Vagal

Las complicaciones no neurológicas posquirúrgicas más relevantes fueron la infección (7 casos) y la fistula de líquido cefalorraquídeo (4 pacientes, de los que 2 precisaron intervención quirúrgica para cerrarla). Las complicaciones neurológicas posquirúrgicas más frecuentes fueron la parálisis facial y de los pares bajos.



## RESULTADOS

En la tabla VI se cuantifican dichas secuelas. Se encontró clínicamente afectado el nervio facial antes de la intervención en 2 pacientes con PGL múltiples. Se trataba en un caso de una paciente, previamente intervenida de un paraganglioma carotídeo, que presentaba además un PGL vagal y otro timpánico y mostraba parálisis facial grado IV de House-Brackmann que se mantuvo en el postoperatorio. La otra paciente tenía PGL carotídeos bilaterales y otro yugular, cuyos síntomas se iniciaron con parálisis facial.

Como resultado de la intervención, se objetivó algún grado de parálisis o paresia facial en el 81 % de los pacientes en el postoperatorio de los PGL yugulares y en un 21% de los pacientes con PGL vagales, que se recuperaron posteriormente. En los PGL yugulares se realizaron 18 transposiciones completas del nervio facial mediante un abordaje infratemporal de Fisch tipo A clásico, mientras que en 11 pacientes se llevó a cabo un abordaje infratemporal modificado sin transposición del nervio facial. En 3 pacientes con PGL yugulares se precisó un injerto del nervio facial por invasión de éste

Tabla VI.

**Las complicaciones neurológicas posquirúrgicas más frecuentes:**

Signos/síntoma	N° de Pacientes			
	PY	PT	PC	PV
Parálisis de Pares craneales en el postoperatorio:				
- VII .....	25	0	0	4
- IX.....	10	0	4	1
- X.....	9	0	3	6
- XI.....	8	0	1	1
- XII .....	10	0	3	3

PT= Paraganglioma timpánico. PY= Paraganglioma Yugular. PC= Paraganglioma carotídeo. PV= Paraganglioma Vagal

La función facial postoperatoria en los PGL yugulares intervenidos mediante transposición permanente fue de grado I-III de House-Brackmann en el 35 % de los pacientes y de grado IV-VI en el 65 %, y se recuperaron progresivamente en las revisiones posteriores. En los casos más afectados (grados IV-VI) se consiguió una mejoría en la funcionalidad del nervio hasta llegar a un grado III. Por el contrario, en los pacientes intervenidos sin transposición del nervio facial, la función facial postoperatoria fue de grado I-III de House-Brackmann en el 77 % de los casos y de grado IV-VI en el 23 % restante, y se recuperaron como en el caso anterior paulatinamente hasta llegar a un grado III en los casos más afectados. Además, una paciente intervenida por un paraganglioma yugular que presentó 10 años después una importante recurrencia tratada

con radiocirugía, desarrolló entonces una parálisis facial grado VI de House-Brackmann por invasión del nervio.

El X par craneal se encontraba afectado antes de la intervención en 10 (30 %) pacientes con PGL yugulares y en 4 (31 %) que presentaban PGL vagales. Además de estos pacientes, en el postoperatorio apareció una nueva parálisis en 9 (27 %) pacientes intervenidos de PGL yugulares y en 6 (46 %) de los vagales.

La parálisis vagal condicionó en el postoperatorio problemas deglutorios y de broncoaspiración, particularmente en los pacientes de mayor edad, y fue necesario realizar una tiroplastia en 7 de ellos.

De los 97 PGLs correspondientes a los 72 pacientes hubo 6 recurrencias, todas en pacientes con PGL yugulares, de los que 2 (33 %) eran casos familiares. En 4 pacientes se trató de una recurrencia pequeña y limitada, que se controló en dos de ellos mediante rescate quirúrgico y radioterapia postoperatoria; y en dos casos con Gamma Knife, mientras que en los pacientes restantes, que presentaron una recurrencia intracraneal pequeña, se adoptó una actitud expectante con estudios de imagen anuales; en todos los casos la recurrencia se mantenía estacionaria a los 5 años.

**5.2. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES GERMINALES EN LOS GENES SDHB, SDHD, SDHC, VHL Y RET.**

La tabla VII muestra las características demográficas y clínico-patológicas en los pacientes de la población a estudio, que son de características similares a las descritas previamente en otras publicaciones<sup>105,106</sup>.

**Tabla VII.** Características Demográficas y clínico-patológicas en pacientes con y sin mutación en *SDHB*, *SDHC* y *SDHD*.

Parámetros clínicos	Variables	Todos	Mutación negativa	Mutación positiva	SDHB	SDHC	SDHD
<b>SEXO</b>	<b>Mujeres</b>	50	36	14	6	0	8
	<b>Hombres</b>	22	10	12	8	0	4
<b>EDAD≤40</b>	<b>No</b>	56	39	17	8	0	9
	<b>Sí</b>	16	7	9	6	0	3
<b>MALIGNIDAD</b>	<b>Benigno</b>	70	44	26	14	0	12
	<b>Maligno</b>	2	2	0	0	0	0
<b>MÚLTIPLE</b>	<b>No</b>	66	46	20	14	0	6
	<b>Sí</b>	6	0	6	0	0	6
<b>FEOCROMOCITOMA</b>	<b>No</b>	70	45	25	14	0	11
	<b>Sí</b>	2	1	1	0	0	1
<b>HISTORIA FAMILIAR</b>	<b>No</b>	58	46	12	7	0	5
	<b>Sí</b>	14	0	14	7	0	7
<b>RECIDIVA</b>	<b>No</b>	66	42	24	13	0	11
	<b>Sí</b>	6	4	2	1	0	1
<b>FUNCIONALIDAD</b>	<b>No</b>	68	44	24	14	0	10
	<b>Sí</b>	4	2	2	0	0	2
<b>Total</b>		<b>72</b>	<b>46</b>	<b>26</b>	<b>14</b>	<b>0</b>	<b>12</b>

## RESULTADOS

De los 72 pacientes diagnosticados de PGLs de cabeza y cuello, 14 (19%) casos tenían historia familiar y 58 (81%) pacientes se consideraban casos esporádicos.

En general, 26 pacientes (36%) mostraron una mutación germinal patogénica en los genes SDHB o SDHD. En ningún caso se objetivó mutación en ambos genes de manera simultánea: 14 casos presentaban mutación en el gen SDHB y en 12 se hallaba mutado el gen SDHD.

No se objetivaron mutaciones o deleciones en exones de los genes SDHC, VHL o RET.

Se identificaron 12 casos “familiares ocultos” de entre los casos considerados esporádicos previamente, ya que presentaban mutación germinal en los genes SDHB/SDHD (7 / 5 respectivamente).

No se apreció diferencia en la distribución de las mutaciones SDHB y SDHD entre los PGLs familiares y esporádicos; y tampoco había diferencias significativas respecto a la edad al diagnóstico de los pacientes con mutación germinal SDHB y aquellos que tenían mutación SDHD. Así, la edad media al diagnóstico de los pacientes con mutación SDHB era de 43 años y en los pacientes con mutación SDHD de 44 años.

Además, la mutación SDHB se hallaba más frecuente en los casos yugulares (64%) y la mutación SDHD en los PGLs carotídeos (50%), pero esta asociación era estadísticamente no significativa. (Tabla VIII)

**Tabla VIII.**

**Relación de las mutaciones en SDHB, SDHC y SDHD con la variedad de PGL carotídeo, yugular, timpánico y vagal.**

	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
	<b>Pgl carotídeos</b>	<b>Pgl yugulares</b>	<b>Pgl timpánicos</b>	<b>Pgl vagales</b>
<b>MUTACIÓN SDHB</b>	<b>17</b>	<b>20</b>	<b>14</b>	<b>7</b>
<b>14 pacientes</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>MUTACIÓN SDHC</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>14</b>	<b>9</b>
<b>0 pacientes</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>MUTACIÓN SDHD</b>	<b>14</b>	<b>26</b>	<b>14</b>	<b>6</b>
<b>12 pacientes</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>

Se trataba de tumores principalmente benignos (70 casos) y únicamente dos casos fueron malignos, ambos esporádicos y sin mutación germinal (sólo en un caso se encontró un polimorfismo de SDHB).

Se hallaron 6 pacientes con PGL múltiples, todos ellos presentaban de manera estadísticamente significativa con una  $p=0,0092$  una mutación germinal en SDHD y además, dos pacientes del estudio (un caso familiar y otro esporádico) presentaban además un feocromocitoma abdominal.

## RESULTADOS

Dentro de toda la serie, en su mayoría eran tumores no funcionantes, salvo en 4 pacientes (en dos de los cuales se objetivó una mutación en SDHD) que presentaban niveles elevados de catecolaminas en orina.

Durante el seguimiento, se constató la recidiva tumoral en seis pacientes con PGLs yugulares (un caso familiar con mutación en SDHB y cinco esporádicos, donde únicamente en un caso se objetivó una mutación germinal del gen SDHD). Todos habían sido intervenidos previamente de un PGL yugular con una tamaño aproximado de 5 cm al diagnóstico.

Tan sólo se objetivaron metástasis locorregionales en un paciente con un tumor esporádico, en el cual no se halló ni mutación en la línea germinal ni alteraciones en el estudio de microarrays-CGH.

Como ya referimos con anterioridad, del total de 72 pacientes estudiados, únicamente se objetivó mutación germinal en los genes SDHB o SDHD en 26 casos: 14 casos (54%) con mutación en el gen SDHB, y 12 casos (46%) en el SDHD. El tipo de alteración, localización en intrón/exón, posición del nucleótido alterado, cambio del nucleótido específico y sustitución correspondiente de aminoácido se resumen en las tablas IX y X.

**Tabla IX.**

**Mutación germinal del gen SDHB.**

Tumor inicial	Sexo	Edad al diagnóstico	Caso familiar	Mutación (cDNA Nucleótido)	Consecuencia (codón y aminoácido)	Exón
Pgl yugular	M	61	No	c.166_170delCCTCA	pPro56fs (X5)	2
Pgl yugular	V	31	No	269G>A	p.Arg90Gln	3
Pgl yugular	M	32	Sí	c.277T>C	C93R	3
Pgl yugular	V	39	Sí	c.293G>A **	C98Y	4
Pgl yugular	V	16	Sí	c.312InsCACTGCA	p.Ile105fs (X15)	4
Pgl yugular	V	39	No	c.540G>A	p.Leu180Leu	5
Pgl vagal	M	29	Sí	c.557G>A	p.Cys186Tyr	6
Pgl carotídeo	V	70	Sí	c.589C>T	p.Pro197Ser	6
Pgl yugular	M	47	No	c.589C>T	p.Pro197Ser	6
Pgl yugular	V	43	No	c.688C>T	Arg230Cys	7
Pgl yugular	V	50	No	c.689G_A	p.Arg230His	7
Pgl carotídeo	M	54	No	c.725G>A	p.Arg242His	7
Pgl carotídeo	M	45	Sí	c.761C>T **	P254L	7
Pgl vagal	V	42	Sí	deletion Bex3 (mlpa)		3

Sexo: V, Varón. M: Mujer. \*\* Mutación no descrita previamente en la literatura.



**Tabla X.**

**Mutación germinal del gen SDHD.**

Tumor inicial	Sexo	Edad al diagnóstico	Caso familiar	Mutación (cDNA Nucleótido)	Consecuencia (codón y aminoácido)	Exón
Pgl carotídeo	V	43	Sí	c50G>T **	R17L	1
Pgl carotídeo	M	45	Sí	c14G>A	p.Trp5X	1
Pgl carotídeo	V	48	No	c.53-2 A>G		2
Pgl carotídeo	M	53	No	c.106C>T	p.Gln36X	2
Pgl yugular	M	46	Sí	c.120- 127DelCCCAGAAT	p.Ile40fs(X25)	2
Pgl yugular	M	46	No	c.230T>G	p.Leu77Arg	3
Pgl Vagal	M	60	No	c.234_243delTCTGCTT CCG	p.Gly78fs(X3)	3
Pgl Vagal	M	24	No	c.337_340DelGACT	p.Asp113fs(X3)	4
Pgl carotídeo	V	44	Sí	c.337-340DelGACT **	p.Asp113fs(X20)	4
Pgl Vagal	V	40	Sí	c.337-340DelGACT **	p.Asp113fs(X20)	4
Pgl yugular	M	50	No	c.367G>A	p.Ala123Thr	4
Pgl carotídeo	M	22	Sí	c.386dupT	p.Leu129fs	4

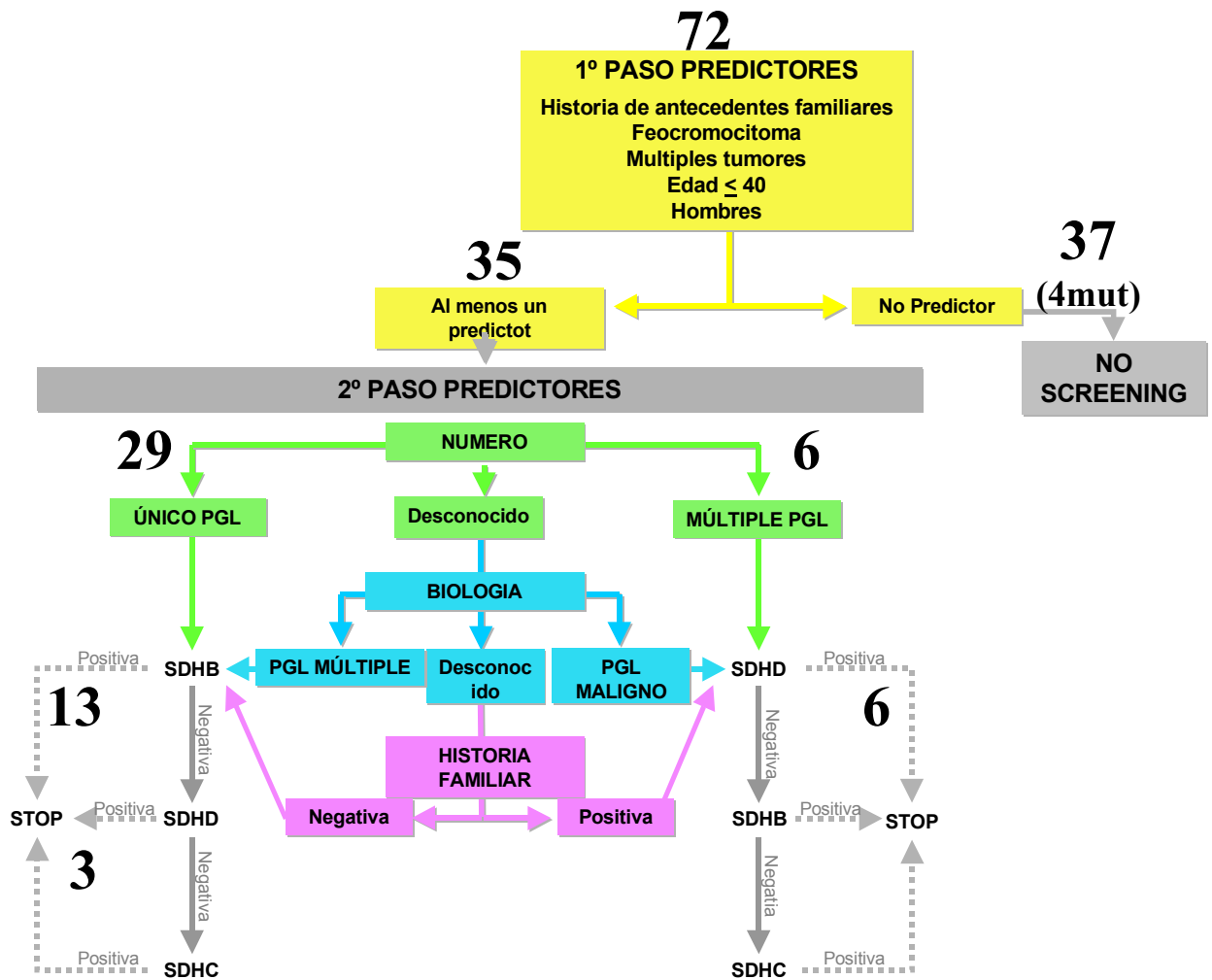
Sexo: V, Varón. M: Mujer. \*\* Mutación no descrita previamente en la literatura.

## RESULTADOS

En el gen SDHB, las mutaciones ocurrían en los exones del 2 al 7, pero no en el 8, mientras que en el gen SDHD las mutaciones se distribuyeron en todos los 4 exones, siendo más frecuentes en los exones 4 y 2.

En ambos genes, se hallaron mutaciones missense, nonsense, frameshift y splice. Las mutaciones en SDHD eran fundamentalmente frameshift (50%), el resto consistían en: 3 mutaciones missense, 1 splice y en 2 casos se desconocía el tipo de mutación. Sin embargo, las mutaciones en SDHB eran básicamente missense (71%), y en 2 pacientes se objetivó una mutación frameshift, otro caso era portador de una mutación splice y en otro paciente, un caso familiar que presentaba un PGL vaginal, se objetivó una delección del exón 3 del gen SDHB mediante MLPA.

5.2.1.-Algoritmo empleado para priorizar el análisis de los genes SDHB, SDHC y SDHD.



**Figura 17.**

Algoritmo empleado para priorizar el análisis de los genes SDH con los resultados de nuestra serie.

Tras realizar un análisis de las mutaciones germinales en relación a los síntomas clínicos obtenemos los parámetros clínicos que pueden ayudar a predecir las mutaciones y son de utilidad para priorizar el análisis de las mutaciones en los genes SDH y reducir los costes en el estudio de los pacientes con PGLs, que son los siguientes: una edad al diagnóstico  $< 40$  años, ( $p=0.0012$ ), varones ( $p=0.05$ ), PGLs carotídeos ( $p=0.015$ ) y el hecho de presentar PGLs múltiples ( $p=0.0092$ ).

En nuestra serie de 72 pacientes con PGLs de cabeza y cuello, únicamente 35 casos tenían por lo menos un parámetro de las características clínicas predictoras para presentar PGLs (“*predictores del primer paso*”).

Así, aplicando el Algoritmo para priorizar el estudio genético de mutaciones SDH, sólo 22 pacientes tenían un estudio genético positivo.

No se objetivaron características predictoras en 37 casos; sin embargo, en 4 (15%) de estos pacientes había una mutación germinal de SDHB/SDHD.

Con este modelo, en el que se analizaron únicamente los pacientes que presentaban al menos una de las características predictoras, se consiguió una sensibilidad del 85%, con un valor predictivo negativo del 89%, así como una especificidad del 72% y un valor predictivo positivo del 89%.

Se clasificó mal a 4 pacientes que presentaban mutación, y que sin embargo se hallaban presentes en el grupo de “sin factores predictoros de riesgo”.

**5.3. ESTUDIO MEDIANTE MICROARRAY-CGH.**

Como se aprecia en la Tabla XI, los 8 casos familiares y los 7 esporádicos (que representan casos familiares ocultos) eran portadores de mutaciones germinales en SDHB (n=8) o SDHD (n=7). La distribución de las mutaciones en SDHB y SDHD no era significativamente diferente entre los casos esporádicos y familiares. Además, debemos reseñar que los 5 pacientes con PGLs múltiples tenían mutación en SDHD.

No se objetivaron mutaciones y deleciones de exones en los genes SDHC, VHL o RET.

**Tabla XI.**

**Características demográficas y clinico-patológicas de los pacientes con mutación positiva/negativa en los genes SDHB, SDHC y SDHD.**

Características clínicas	Variables	Todos	Mutacion negativa	Mutacion positiva	SDHB	SDHC	SDHD
SEXO	Mujeres	14	6	8	3		5
	Hombres	10	3	7	5		2
EDAD≤40	No	18	8	10	5		5
	Sí	6	1	5	3		2
BIOLOGIA TUMORAL	Benigna	23	8	15	8		7
	Maligna	1	1	0	0		0
MULTIPLE	No	19	9	10	8		2
	Sí	5	0	5	0		5
FEOCROMOCITOMA	No	23	9	14	8		6
	Sí	1	0	1	0		1

## RESULTADOS

<b>HISTORIA FAMILIAR</b>	<b>No</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>7</b>	<b>3</b>		<b>4</b>
	<b>Sí</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>5</b>		<b>3</b>
<b>RECIDIVA</b>	<b>No</b>	<b>22</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>7</b>		<b>6</b>
	<b>Sí</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>1</b>		<b>1</b>
<b>FUNCIONAL</b>	<b>No</b>	<b>22</b>	<b>8</b>	<b>14</b>	<b>8</b>		<b>6</b>
	<b>Sí</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>9</b>	<b>15</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>7</b>

En la tabla XII se reflejan los resultados del estudio de manera detallada mediante los microarrays-CGH.

Esta técnica falló en 6 muestras tumorales procesadas en parafina y se detectaron anomalías en 10 de los 18 casos. Se consideró que la técnica había fracasado porque los patrones de ganancias y pérdidas eran casi idénticas y, por tanto, no fiables. Estos casos se trataban de PGLs yugulares (2 casos familiares, 2 “familiares ocultos” y 2 esporádicos).

Generalmente, los PGLs presentaban pocas alteraciones cromosómicas y éstas usualmente concernían al cromosoma completo. Eran más frecuentes las pérdidas cromosómicas (84%) que las ganancias (16%).

Los cromosomas completos que presentaban pérdidas o deleciones con mayor frecuencia eran: el 1 (3 casos), el 11 (3 casos), el 22 (3 casos) y el 21 (2 casos). Un caso esporádico de PGL vaginal benigno presentó pérdida completa de los siguientes cromosomas: 1, 2, 3, 9, 13, 14, 15, 17, 18, 21 y 22; finalmente, en un caso se halló asociada la pérdida del cromosoma X completo. Los cromosomas completos que

presentaban ganancia eran el 19 y 20; estas alteraciones cromosómicas formaban parte del caso esporádico que presentaba la pérdida completa de los numerosos cromosomas descritos.

Los tumores que presentaban mutación germinal en los genes SDH tenían más alteraciones cromosómicas ( $p=0.088$ ). Así, de los 10 casos con aberraciones cromosómicas, 8 casos tenían mutación germinal y, de los 8 casos sin alteraciones únicamente 3 tenían mutación. Asimismo, las alteraciones cromosómicas no variaban en función al tipo de mutación SHD o al hecho de presentar o no mutación germinal.

Las deleciones más frecuentes eran aquellas que exactamente correspondían con las regiones donde los genes SDHB, SDHC y SDHD estaban localizados: 1p (8 de 10), 1q (6 de 10), y 11q (3 de 10).

3 casos mostraron simultáneamente una mutación germinal en el gen SDHB con la pérdida somática de 1p y en 2 casos la mutación germinal en SDHD coincidió con la pérdida somática de 11q. Por otro lado, ocho casos mostraron bien una mutación germinal o bien una deleción somática (3 casos con mutación germinal en SDHB, 3 casos con mutación en SDHD, 1 caso con pérdida de 1p, otro con pérdida en 1p y 11q) y, en cinco casos no se halló ni mutación germinal ni alteración cromosómica.

**Tabla XII.**

**Resultados del análisis mediante microarrays-CGH de los 24 pacientes.**

	mut	cgh	1	2	3	5	7	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20	21	22	X	
1*	Bex3	no																			
2*	Bex3del	si	1	2p24.2-q33.1	3q12.1-qter															22	
3*	Bex6	si	1pter-q42.13																		
4*	Bex6	si	1pter-q42.13																		
5	Bex7	si			3pter-p21.1																
6	Bex7	no																			
7*	Bex4	falla																			
8	Bex7	falla																			
9	Dex2	si	1p						11												
10	Dex3	si	1p36.12-qter				7q11.22-q21.3														X
11	Dex4	si	1p36.22-q23.1			5pter-q12.3				12q21.31-qter	13										
12*	Dex4	si			3pter-p21.1				11								20q11.23-qter	21	22		
13*	Dex4	no																			
14*	Dex2	falla																			
15	Dex3	falla																			
16		si	1						11												
17		si	1	2	3			9			13	14	15	17	18	19	20	21	22		
18		no																			
19		no																			
20		no																			
21		no																			
22		no																			
23		falla																			
24		falla																			

\*: Paciente con antecedentes familiares de PGLs de cabeza y cuello.

Mut: Mutación. CGH: presencia de alteraciones cromosómicas en el estudio mediante microarrays-CGH.

En *color naranja* las pérdidas cromosómicas y en verde se reflejan las ganancias.

En la tabla XIII quedan reflejadas las alteraciones cromosómicas entre los casos familiares y esporádicos.

Los casos familiares y esporádicos con mutaciones en la línea germinal tenían ambos más alteraciones cromosómicas (mediana de 1.00



y 2.00 respectivamente) comparados con los casos esporádicos sin mutación (mediana 0,0).

Además, todos los casos familiares tenían mutaciones germinales en los genes SDH y se hallaron mutaciones también en estos genes en 7 casos supuestamente esporádicos (“familiares ocultos”).

**Tabla XIII.**

**Comparación de cambios en los Microarrays-CGH entre los casos familiares y esporádicos.**

<b>Casos Familiares (8)</b>	<b>Casos Esporádicos (7=familiares ocultos)</b>	<b>Casos Esporádicos (9)</b>
8/8 tienen mutación	7/7 tienen mutación	9/9 no tienen mutación
4/8 UV-III, 4/8 pat	2/7 UV-II, 1/7 UV-III, 4/7 pat	X
5/8 sdhB, 3/8 sdhD	3/7 sdhB, 4/7 sdhD	X
6 array CGHs: 2 casos con 0 cambios 2 casos con 1 cambio 1 caso con 4 cambios 1 caso con 5 cambios	5 array CGHs: 1 caso con 0 cambios 1 caso con 1 cambio 1 caso con 2 cambios 1 caso con 3 cambios 1 caso con 4 cambios	7 array CGHs: 5 casos con 0 cambios 1 caso con 2 cambios 1 caso con 13 cambios
media 1,83 CGH cambios mediana 1,0	media 4,14 CGH cambios mediana 2,0	media 2,14 CGH cambios mediana 0,0

UV: Variante de Mutación No clasificada (II desconocida, III: Variante de mutación probablemente patogénica). Pat: Mutación Patogénica.

## RESULTADOS

## **6.-Discusión**



## 6.1. JUSTIFICACIÓN.

Los motivos que impulsaron este trabajo de investigación son varios. Por un lado, un factor decisivo era el gran número de casos de PGLs recopilados en el Hospital Central de Asturias, a pesar de la rareza de este tumor (0.012% de todos los tumores del cuerpo humano, 0.6% de los tumores de cabeza y cuello). Esta amplia casuística se debe a que este hospital es centro de referencia nacional para la cirugía de base de cráneo. Por otra parte, hasta el momento, en la literatura había muy poco trabajos de genética en los PGLs/PCC que estudiaran el genoma mediante microarrays-CGH. Estos estudios analizan únicamente un cromosoma, y así concretamente Aarts et al<sup>107</sup> estudian la pérdida del brazo 1p y Jarbo et al<sup>108</sup> las aberraciones en el cromosoma 22, habiendo sido realizados ambos en PCC.

No obstante, no hemos encontrado publicaciones que estudien las alteraciones cromosómicas en todo el genoma mediante la técnica de microarrays-CGH en los PGLs, siendo esto un impulso decisivo para realizar nuestra investigación. Además, disponer de la técnica de microarrays-CGH hizo que fuese ineludible plantear el proyecto.

Asimismo, se analizaron las mutaciones en los genes SDHB, SDHC y SDHD, junto a los genes VHL y RET en los 72 pacientes con PGLs de cabeza y cuello, tanto en los casos esporádicos como en los familiares por secuenciación directa. Con este trabajo pretendemos mejorar el conocimiento actual sobre la base genética y la tumorigénesis de los PGLs a través de un análisis de los nuevos cromosomas o loci en los cromosomas

con genes implicados en los PGLs junto con los efectos biológicos de las mutaciones identificadas en los PGLs.

### **6.2. ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.**

La localización más frecuente de los PGL de cabeza y cuello es, por orden descendente: carotídeos, yugulares, timpánicos y vagales<sup>14,16,17</sup>. En nuestro caso, los más frecuentes fueron los PGLs yugulares. Este sesgo se achaca a que dado que somos centro de referencia, se remiten proporcionalmente mayor número de estos tumores por su dificultad en el tratamiento quirúrgico.

Las formas múltiples se ven en, aproximadamente, el 10 % de los casos, y los yugulares y vagales son los que tienen más tendencia a la multicentricidad<sup>16,17,19</sup>. En nuestra población de estudio se presentan resultados equiparables, con una frecuencia del 8 % de casos múltiples (el 66 % corresponde a PGL yugulares y vagales).

Un examen otorrinolaringológico completo es esencial en la valoración inicial de los PGL, y en los pacientes con clínica de tumor funcionante se debe solicitar una determinación de catecolaminas en orina<sup>32,41</sup>.

Se realizó además una TAC/RMN ya que la piedra angular en la valoración de los PGLs es la TC de cortes finos (1 mm) utilizando un algoritmo óseo<sup>32</sup>. La RMN proporciona detalles sobre la afección de las

partes blandas por el tumor y puede detectar la oclusión carotídea y de la vena yugular. El estudio ultrasonográfico con Doppler tiene una función limitada en los PGL, y son de utilidad únicamente en la valoración y el seguimiento de tumores del cuerpo carotídeo.

Además, en los PGLs yugulares/vagales se realizó una arteriografía con objetivo de identificar el pedículo vascular que nutre al tumor para embolizarlo, con la consiguiente disminución de la hemorragia intraoperatoria. El procedimiento se realiza comúnmente 1 ó 2 días antes de la cirugía. Si se espera mucho tiempo para realizar la cirugía, pueden producirse fenómenos inflamatorios o incluso la revascularización del tumor.

Es importante tener en cuenta el hecho de que los estudios de imagen deben valorarse bilateralmente para descartar la existencia de tumores multicéntricos, aunque la RMN igualmente puede detectarlos<sup>16,17,19,41</sup>.

Los síntomas y signos clínicos que presentaban los pacientes al diagnóstico variaban según la localización del tumor.<sup>16,41,109</sup> El comportamiento de este tipo de tumores es en general benigno y de crecimiento lento con una media de aumento de tamaño de 1 mm por año, causando progresivamente compresión de estructuras vecinas<sup>14,16,17</sup>. La malignidad se define por la presencia de metástasis, con una frecuencia que varía entre un 6-9%<sup>37,38</sup>, cifra superior a la encontrada en nuestra serie, ya que únicamente se observaron 2 casos (3%). Durante el seguimiento se constató recidiva tumoral en seis pacientes con PGLs yugulares. Revisando la evidencia científica actual<sup>37,38,39</sup>, se comprueba que hasta un tercio de los pacientes que presenta un PGL yugular o vagal muestran un comportamiento más agresivo, con un crecimiento más rápido y con

extensión hacia la base de cráneo junto con afectación de pares craneales bajos.

Se estima que hasta un 40% de los PGLs de cabeza y cuello representan casos familiares<sup>42</sup>, hecho que supone una de las más altas frecuencias entre los tumores humanos. En nuestra serie 14 (19%) pacientes tenían historia familiar, y 58 (81%) de los pacientes se podían considerar casos esporádicos. Aunque la mayor parte de los PGLs esporádicos de cabeza y cuello se presentan como una única masa altamente vascularizada, que no suele ser funcionante (el 99% no tienen producción de catecolaminas), los tumores multicéntricos o bilaterales pueden presentar hipersecreción de catecolaminas con una frecuencia de aproximadamente el 10% de los casos<sup>41,42</sup>. En nuestra serie, se objetivaron 6 (8%) casos de PGLs múltiples, todos ellos casos familiares, siendo tumores funcionantes 4 casos (un caso familiar y los otros 3 esporádicos).

### **6.3. ASPECTOS GENÉTICOS.**

#### *6.3.1. Estudio de las mutaciones en los genes SDHB, SDHC, SDHD, VHL y RET.*

La identificación de los genes implicados en los PGLs y PCCs han mejorado nuestro conocimiento de la patogénesis de estos tumores y servido como punto de partida para descubrir los mecanismos patogénicos que subyacen en la tumorigénesis de los casos esporádicos y familiares.



Hasta el momento, se sabe que un oncogen (RET) y cinco genes supresores (VHL, NF1, SDHB, SDHC y SDHD) están implicados en la susceptibilidad de padecer PCCs y/o PGL<sup>40,41,42,60</sup>. Sin embargo, aunque las mutaciones germinales se hallan en la inmensa mayoría de los casos familiares y en una proporción considerable de casos aparentemente esporádicos, las mutaciones somáticas en estos genes son relativamente poco comunes en los casos verdaderamente esporádicos (entre 0 y aproximadamente el 15%)<sup>41,42,110</sup>.

Los resultados de este estudio refuerzan el papel de las mutaciones germinales en el gen de la SDH en la etiología de un número significativo de casos de PGLs aparentemente esporádicos. Así, de los 58 casos esporádicos, se hallaron 12 pacientes (21%) que presentaban una mutación germinal en los genes SDHB/SDHD (7/5 respectivamente), que es una proporción más alta que la tasa objetivada en series Europeas y Norteamericanas<sup>61,62,63</sup>. Un estudio realizado en 23 casos de PGLs esporádicos de Australia mostró un porcentaje similar (17%) de casos “familiares ocultos”<sup>110</sup>.

En nuestro estudio, no se objetivaron en ningún caso esporádico ni familiar mutaciones o deleciones en exones de los genes SDHC, VHL o RET.

Se han realizado múltiples estudios para detectar mutaciones en VHL, RET y SDH en PCCs y PGLs esporádicos con resultados dispares<sup>42,114</sup>. Las discrepancias en los resultados podrían ser debidas a las diferencias en la población examinada, la extensión del cribaje a los familiares y la duración del seguimiento de los pacientes. En general, todos

llegan a la conclusión de que las mutaciones germinales que afectan a VHL, RET, SDHB, SDHC y SDHD son responsables de una proporción variable de casos aparentemente esporádicos de PGLs/PCCs de cabeza y cuello, aunque la verdadera frecuencia de tales mutaciones es aún desconocida<sup>114</sup>.

Por otra parte en nuestra serie, 14 casos (19%) tenían antecedentes de historia familiar y todos estos pacientes (100%) mostraron mutación germinal patogénica en los genes SDHB o SDHD. Aunque las mutaciones en los PGLs de cabeza y cuello son estadísticamente más prevalentes en el gen SDHD comparadas con las mutaciones en el gen SDHB<sup>42,61,114</sup>, en nuestro estudio ambas mutaciones se hallaron en igual proporción: 7 casos con mutación en la SDHB y 7 casos en la SDHD.

Al igual que se ha citado con anterioridad en revisiones de la literatura<sup>42,114</sup>, las mutaciones en el gen SHDB se hallan distribuidas en todos los exones, pero no en el 8, mientras que las del SDHD se distribuyen en todos los 4 exones, pero con mayor frecuencia en el exón 4 y 2. Se hallaron asimismo, cuatro mutaciones nuevas todavía no descritas en la literatura (50% afectan a SDHB y 50% a SDHD).

Además, en nuestro estudio se corrobora el hecho de que los PGLs con mutaciones en el gen SDHD presentan mayor tendencia a tener múltiples tumores, puesto que el 100% de los PGLs múltiples presentan una mutación en este gen.

En nuestra serie se presentan 2 casos de PGLs malignos uno con extensión intracraneal y otro con metástasis cerebrales. Estos tumores malignos son significativamente más frecuentes en los PGLs con una

mutación en el gen SDHB que en aquellos que presentan una mutación en el gen SDHD, en los PGLs vagales y en los tumores funcionantes<sup>37,38,39</sup>. Los PGLs malignos que se analizan en el presente estudio pertenecen, sin embargo, a casos esporádicos, ambos a PGLs yugulares no funcionantes y en los que no se halló ninguna mutación germinal (aunque un paciente presentó un polimorfismo del gen SDHB).

### *6.3.2. Algoritmo empleado para priorizar el análisis de los genes SDHB, SDHC y SDHD.*

Empleamos en nuestro estudio el algoritmo propuesto por Neumann et al en un estudio pendiente de publicar, para detectar la presencia de mutaciones germinales en la serie de 72 PGLs de cabeza y cuello a fin de priorizar cuál es el gen que primero debemos analizar y en que orden debemos continuar. Ello es de especial importancia para conseguir mejorar la relación coste-efectividad y también debido al hecho de que los recursos son limitados.

En conjunto, las mutaciones germinales en riesgo de presentar mutación descubiertas hasta ahora y que pueden potencialmente ser origen de PGLs/PCC se hallan en 5 genes con un total de 25 exones. En una situación ideal, se deberían analizar todos los genes, pero el coste de esto por el momento sería muy elevado. Por este motivo, es muy útil aplicar un algoritmo para detectar las mutaciones germinales en los genes más probables en función de algunas características clínicas de los pacientes con PGLs/PCCs.

Nuestros datos sugieren, al igual que en otras revisiones de la literatura<sup>42,44,45</sup>, que los tumores múltiples y con historia familiar positiva son altamente predictivos para mutaciones en el gen SDHD. De igual modo, y aunque en esta serie eso no se demuestra, los tumores únicos y malignos se asocian significativamente con mutaciones en el gen SDHB<sup>37,38</sup>. Por otra parte, el hecho de presentar una historia familiar negativa es altamente predictivo de la presencia de mutaciones en el gen SDHC<sup>42,44,45</sup>, aunque en nuestra serie ningún paciente mostró una mutación en este gen.

Desde que se comprobó el hecho de que únicamente se encuentra una mutación patogénica en un gen, hipotéticamente el análisis podría ser secuencial y debería de pararse en el momento en el que se encontrara aquella, con el consiguiente ahorro de recursos<sup>42,110</sup>. Bien es verdad que nuevas y más completas técnicas moleculares diagnósticas pueden hacer que en un futuro quizás no muy lejano esta aseveración puede quedar obsoleta.

Nuestra serie pertenece a un área geográfica (al igual que Holanda, la Toscana o Trentino en Italia) donde existen mutaciones “fundadoras, de novo” que podrían aumentar la frecuencia en la herencia de los PGLs<sup>111,112,113</sup>. A todos estos pacientes se les recomendó también primero el cribaje de la mutación “fundadora”, antes de aplicar el algoritmo. Así pues, el cribaje de un único gen, resulta más específico para una única mutación con un óptimo resultado coste-efectividad.

Un hallazgo importante a tener en cuenta en el estudio de Neumann et al es la cifra de un 8% de pacientes (15% en nuestra serie) que presentan mutaciones germinales, y se diagnostican como “falsos negativos”. La

estrategia que se puede plantear para minimizar esta cifra podría ser considerar como candidatos para realizar el análisis genético a todos los pacientes que desarrollen durante el seguimiento alguna característica de “los predictores del Primer paso” del Algoritmo.

Finalmente, y sólo en raras ocasiones, si no se detectan mutaciones en algún gen de la SDH, debe considerarse el análisis de los genes VHL y RET<sup>42</sup>. Se debe recoger en la historia clínica los antecedentes de tumores de tiroides, renales, sistema nervioso central y oculares<sup>41,42</sup>. Ningún paciente de nuestra serie presentaba mutación en estos genes.

En consecuencia, es de utilidad emplear el Algoritmo descrito por Neumann para priorizar el análisis de los genes SDHB, SDHC y SDHD adaptado a cada área geográfica específica, y valorando en el paciente la presencia de las características predictoras del primer paso del cribaje durante todo el seguimiento, para así disminuir el porcentaje de falsos negativos a menos del 8% de los casos y reducir asimismo el coste del cribaje a un 60% manteniendo la sensibilidad del estudio y su valor predictivo negativo.

No obstante, dado que el avance de la técnica molecular es muy rápido, y se trata además de una patología poco prevalente con un número de exones muy inferior al presente en otros genes -como por ejemplo en el cáncer de mama, el BRCA1 y BRCA2 (con 24 y 27 exones respectivamente)- sería de utilidad, en mi opinión, el diseño de sondas tipo MLPA u oncochips que estudiaran todos los genes (y variantes) de una vez y así ahorrar estos pasos para dar un diagnóstico más ágil y eficaz.

### 6.3.3. Estudio de las alteraciones cromosómicas mediante microarrays-CGH.

Debido a las limitaciones que presenta el análisis completo del genoma mediante LOH o mediante CGH<sup>42</sup>, realizamos un estudio del genoma completo mediante microarrays-CGH para detectar aberraciones cromosómicas en el genoma de 24 pacientes con PGLs seleccionados al azar de la serie de 72 casos previamente descrita. Este análisis representa como novedad el hecho de que con anterioridad únicamente se había analizado en PGLs mediante esta técnica unos cuantos genes, sin realizarse un análisis completo del genoma de estos tumores<sup>64,109</sup>.

Las características clinicopatológicas de estos pacientes no diferían de aquellos descritos en series mayores<sup>51,61,62</sup>. Los 8 casos familiares (100%) presentaban mutación en los genes SDHB o SDHD; asimismo, alrededor de un 44% de los casos esporádicos de PGLs eran portadores de una mutación germinal en el gen SDHB o SDHD. La distribución de las mutaciones en los genes SDHB y SDHD no diferían entre los casos esporádicos y familiares, siendo similares a los revisados en la literatura y a la serie global nuestra<sup>41,42,51,61,62</sup>.

No obstante, a pesar de que las mutaciones germinales de los genes SDHB y SDHD se encuentran en todos los casos familiares y en una considerable proporción de casos aparentemente esporádicos (“familiares ocultos”). Las mutaciones somáticas de estos genes SDH y otros genes eran relativamente poco comunes en los casos esporádicos (mediana de 0.0 cambios genéticos frente a una mediana de 1.0 y 2.0 en los casos familiares y casos familiares ocultos, respectivamente).

Se realizó la técnica de microarray-CGH en un total de 24 casos y falló en 6 casos más debido a la mala calidad del DNA (complicación que ocurre con relativa frecuencia cuando se emplean muestras en parafina y generalmente relacionado con el tiempo de almacenamiento<sup>114,115</sup>). Del total de casos analizados, 10 mostraron alteraciones cromosómicas y en 8 pacientes el cariotipo era normal, hecho que se corrobora también con los objetivados en revisiones de la literatura<sup>42,64,108</sup>.

Globalmente, los PGLs de nuestra serie presentaron pocas aberraciones cromosómicas y estas alteraciones usualmente implicaban cambios en todo un cromosoma. No se objetivaron diferencias significativas en dichas alteraciones en relación al tipo de mutación o la presencia o ausencia de mutación.

Los estudios previos realizados mediante LOH y CGH<sup>64,65,108,116</sup> corroboran también el hecho de que los PGLs y PCCs son tumores en los que son infrecuentes las alteraciones cromosómicas. Estos estudios revelan además la importancia en la tumorigénesis de la frecuente pérdida de los cromosomas 1 y 11. En nuestro análisis, junto con la pérdida del cromosoma 22, las pérdidas de los cromosomas 1 y 11 fueron las aberraciones cromosómicas más frecuentes.

Las ganancias fueron hallazgos poco comunes (16%). Encontramos ganancias de dos cromosomas completos (el 19 y el 20) en un caso esporádico con múltiples pérdidas cromosómicas completas asociadas, objetivándose asimismo pequeñas ganancias aisladas de segmentos cromosómicos: 2p24.2-q33.1 (en un caso), 3pter-p21.1 (en dos pacientes) y 7q11.22-q21.3 (en un caso). Esta última ganancia en 7q11.22 ha sido

descrita también en pacientes con adenocarcinoma de pulmón, sobre todo en los que presentan metástasis cerebrales, pero esta situación no se da en nuestros pacientes, y en este caso se trataba de un caso familiar, benigno y con PGL múltiples<sup>117,118</sup>.

Por otro lado, los tumores con mutación germinal en los genes SDHB/SDHD tenían con mayor frecuencia cambios cromosómicos: 8 casos de los 10 con mutación SDH tenían alteraciones cromosómicas frente a 3 de los 8 casos sin mutación (aunque esta observación no tuvo una significación estadística ( $p=0.088$ )).

Es preciso reseñar el hecho de que tres casos mostraron simultáneamente una mutación germinal en el gen SDHB (localizado en 1p36) junto con la pérdida cromosómica de 1p en el DNA del tumor; y 2 casos mostraron una mutación germinal en el gen SDHD (que se halla en 11q23) y pérdida de 11q en el tumor. Todo esto iría a favor del modelo tumoral de “doble hit” en el que la pérdida de estos cromosomas en el tumor conseguirían la inactivación de la actividad de la enzima SDH, ya que son genes supresores de tumores que juegan un papel crítico en la tumorigénesis de los PGLs familiares.

Sin embargo, en 8 casos únicamente encontramos una sola mutación o alteración cromosómica (3 casos con mutación germinal en el gen SDHD, 3 mutaciones en SDHB, 1 caso con pérdida de 1p y 1 caso con pérdida conjunta de 1p y 1q) y en 5 casos no se hallaba presente ni mutación ni cambio genético. Además, se ha encontrado la ausencia de mutación en los genes SDHD y SDHB en pacientes con pérdida de actividad en SDH<sup>119</sup>. Así, Braun et al<sup>120</sup> y Hensen et al<sup>55</sup>, en sendos estudios, demostraron la



frecuente pérdida de regiones del cromosoma 11q y la importancia de la región 11p15.5 en la génesis de los PGLs. Este locus cromosómico, 11p15.5, estaría implicado en la transmisión paterna de la enfermedad mediante un mecanismo genético somático junto con alteraciones del gen SHD en el locus 11q23.

En nuestra serie se detectaron tres casos con deleciones en el segmento 22,<sup>109</sup> donde se han descubierto al menos 2 regiones distintas implicadas en la tumorigénesis. En estudios previos<sup>120,121,122</sup> en otro tipo de tumores (meningiomas, tumores de ovario y de colon) se ha hallado con frecuencia una deleción de un segmento de aproximadamente 11 Mb en la vecindad del telómero del segmento 22q, donde se detectaron varios loci de tumores supresores implicados en la patogénesis de estos tumores.

#### **6.4. PERSPECTIVAS FUTURAS.**

Ante estos hallazgos, debemos plantearnos estudiar otros genes y mecanismos adicionales para comprender la patogenia de estos tumores y comparando las diferencias entre los casos esporádicos y familiares.

Ya se han iniciado nuevas estrategias para investigar su biología molecular, que pasamos a relatar a continuación:

Se han comenzado a emplear modelos genéticos murinos para estudiar los mecanismos implicados en la carcinogénesis de estos tumores. Así pues, algunos ratones “knockout” y modelos transgénicos que

representan síndromes hereditarios relacionados con los PCCs en humanos comienzan a revelar nuevos puntos clave en la biología del desarrollo de los PCCs/PGLs en humanos que nos ayudarán a descubrir la patogénesis de estos tumores neuroendocrinos<sup>123, 124</sup>.

Asimismo, nuestra comprensión sobre los mecanismos implicados en la tumorigénesis de los PGLs y los PCCs puede mejorar sobremanera a través de la caracterización de la expresión génica y el conocimiento de las vías genéticas implicadas en la patogénesis del tumor. Igualmente, nos sería particularmente útil la comparación de los casos benignos frente a los malignos y el descubrimiento de los genes responsables del comportamiento maligno. A pesar del problema que supone la obtención de estos raros tumores

Además, al igual que ocurre en otros tumores endocrinos<sup>125</sup>, el crecimiento de los PGLs y de los PCCs puede hallarse modulado probablemente por la actividad hormonal normal a nivel adrenal/paraganglios, y también podría estar influenciado por otros factores de crecimiento implicados en el desarrollo fetal normal de la médula adrenal y los paraganglios. Sería necesario pues estudiar y analizar estos factores y su influencia en la patogénesis de estos tumores.

# **7. Conclusiones**

## CONCLUSIONES

De la interpretación de nuestros resultados y de su discusión obtenemos las siguientes conclusiones:

1. Del total de 72 pacientes estudiados con PGL se objetivó mutación germinal en los genes SDHB o SDHD en 26 casos: 14 casos (54%) con mutación en el gen SDHB, y 12 casos (46%) en el SDHD. No se objetivaron mutaciones o deleciones en ningún exon de los genes SDHC, VHL o RET.
2. En nuestra serie, 14 casos (19%) tenían antecedentes de historia familiar y todos ellos (el 100%) mostraron mutación germinal en los genes SDHB o SDHD.
3. Se identificaron 12 casos “familiares ocultos” (21%) de entre los casos considerados esporádicos previamente, ya que presentaban una mutación germinal en los genes SDHB (7 casos) y SDHD (5 casos).
4. La frecuencia de las mutaciones germinales en los genes SDHB y SDHD no difiere entre los casos esporádicos y familiares.
5. Se encontraron 4 mutaciones no descritas aún en la literatura. Dos (50%) afectan al SDHB y 2 (50%) al SDHD.
6. El 100% de los PGLs múltiples presentan mutación en el gen SDHD.
7. Los parámetros clínicos que presentaban una relación estadísticamente significativa con el hecho de presentar mutación en los genes SDHD/SDHB eran los siguientes: una edad al diagnóstico menor de 40 años ( $p=0.0012$ ), ser varón ( $p=0.05$ ), tener PGLs carotídeos ( $p=0.015$ ) y el hecho de presentar PGLs múltiples ( $p=0.0092$ ).
8. Los PGLs de cabeza y cuello presentan pocas aberraciones cromosómicas, que suelen implicar a todo el cromosoma y no presentan diferencias significativas en relación al tipo, o la presencia o ausencia de mutación (aunque los pacientes con mutación germinal en los genes SDHB/SDHD tenían con mayor frecuencia cambios cromosómicos).
9. En general, las alteraciones cromosómicas más frecuentes fueron pérdidas cromosómicas frente a las ganancias. Junto con la pérdida del cromosoma 22 (8%), las pérdidas más frecuentes fueron las de los cromosomas 1 y 11.

## CONCLUSIONES

10. La pérdida de los dos alelos del gen SHD por mutación germinal y somática no se dio en todos los casos por lo que no se pudo demostrar el modelo tumoral de “doble hit” para la inactivación de la actividad de la enzima SDH.

## **8. Acrónimos**





## ACRONÓNIMOS

BAC o PAC: Cromosomas artificiales bacterianos o plasmídicos  
EDTA: Etilendiaminotetraacético  
FMTC: Carcinoma medular de tiroides familiar  
HGC: Hibridación genómica comparativa  
HIF: Factor inducible por hipoxia  
IMAO: Inhibidores de la monoaminooxidasa  
LCR: Líquido cefalorraquídeo  
LOH: “Loss of heterogosity” (pérdida de heterogocidad”)  
mRNA: Acido Ribonucleico –RNA- mensajero  
MEN: Neoplasia Endocrina Múltiple (síndrome)  
MLPA: “Multiple ligation dependent probe amplification”  
NF : Neurofibromatosis  
PBS: Medio fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PCCs: Feocromocitomas  
PET: Tomografía por emisión de positrones  
PD-EGF: El factor de crecimiento epidérmico que derivado de plaquetas  
PGLs: Paragangliomas  
RET: “Rearranged during transfection”, oncogen  
RMN: Resonancia Magnética Nuclear  
ROS: Especies reactivas de oxígeno  
RPM: Revoluciones por minuto  
SDH: Succinodeshidrogenasa  
SDHB: Subunidad B de la enzima Succinodeshidrogenasa  
SDHC: Subunidad C de la enzima Succinodeshidrogenasa  
SDHD: Subunidad D de la enzima Succinodeshidrogenasa  
SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms  
TAC: Tomografía Axial Computerizada

## ACRONÓNIMOS

VEGF: El factor de crecimiento endotelial vascular

VHL: Von Hippel-Lindau

YT: Paraganglioma Yugulotimpánicos

# **9. Bibliografía**

## BIBLIOGRAFIA

- 
- 1 Pellitteri PK, Rinaldo A, Myssiorek D, Gary Jackson C, Bradley PJ, Devaney KO, Shaha AR, Nettekville JL, Manni JJ, Ferlito A. Paragangliomas of the head and neck. *Oral Oncol* 2004;40:563-75.
  - 2 Perrin C, Plenat JF, Mariel P, Floquet J, Leroux. Chemodectomes du X. Valeur et intérêt du concept de système paraganglionaire diffus. *Ann Otolaryngol Paris* 1984 ;101 :627-30.
  - 3 Rao AB, Koeller KK, Adair CF. From the archives of the AFIP. Paragangliomas of the head and neck: radiologic-pathologic correlation. *Armed Forces Institute of Pathology* 1999;19:1605-32.
  - 4 Myssiorek D. Head and neck paragangliomas: An overview. *Otolaryngol Clin North Am* 2001; 34: 829-36.
  - 5 Rosenwasser H. Glomus jugulare tumors. I. Historical background. *Arch Otolaryngol* 1968;88:1-40.
  - 6 Yates WD, Lester SJ, Mills JH. Chemoreceptor tumors diagnosed at the Western College of Veterinary Medicine 1967-1979. *Can Vet J* 1980;21:124-29.
  - 7 Ruben RJ. The history of the glomus tumors - nonchromaffin chemodectoma: a glimpse of biomedical Camelot. *Acta Otolaryngol* 2007;127:411-16.
  - 8 Isik AC, Imamoglu M, Erem C, Sari A. Paragangliomas of the head and neck. *Med Princ Pract* 2007;16:209-14.
  - 9 Heymans C, Bouckaert JJ. Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol* 1930;69:254-66.
  - 10 Lopez-Barneo J, del Toro R, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Saenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol* 2004;96:1187-95.
  - 11 Del Toro R, Levitsky KL, Lopez-Barneo J, Chiara MD. Induction of T-type calcium channel gene expression by chronic hypoxia. *J Biol Chem* 2003;278:22316-24.
  - 12 Lopez-Barneo J, Pardal R, Ortega-Saenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 2001;63:259-87.
  - 13 Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:11715-20.
  - 14 Schwaber MK, Glasscock ME, Nissen AJ, Jackson CG, Smith PG. Diagnosis and management of catecholamine secreting glomus tumors. *Laryngoscope* 1984 ;94:1008-15.
  - 15 Gulya AJ. The Glomus tumor and its biology. *Laryngoscope* 1993;103:7-15.
  - 16 Tischler AS. Molecular and cellular biology of pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. *Endocr Pathol* 2006;17:321-28.
  - 17 Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F, Hotton GR, Toledo-Aral JJ, Ortega-Moreno A, Méndez-Ferrer S, Martín-Linares JM, Katati MJ, Mir P, Villadiego J, Meersmans M, Pérez-García M, Brooks DJ, Arjona V, López-Barneo J. Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:825-31.
  - 18 Arjona V, Mínguez-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, Pardal R, Mendez-Ferrer S, Martín JM, Perez M, Katati MJ, Valencia E, Garcia T, Lopez-Barneo J. Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 2003;53:321-28.

- 
- <sup>19</sup> Luquin MR, Montoro RJ, Guillen J, Saldise L, Insausti R, Del Rio J, Lopez-Barneo J. Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron* 1999;22:743-50.
- <sup>20</sup> Espejo EF, Montoro RJ, Armengol JA, Lopez-Barneo J. Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron* 1998;20:197-06.
- <sup>21</sup> Chetan S, Gujrathi CS, Donald PJ. Current trends in the diagnosis and management of head and neck paragangliomas. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;13:339-42.
- <sup>22</sup> Biller HF, Lawson W, Som P, Rosenfeld R. Glomus vagale tumors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1989; 98:21-26.
- <sup>23</sup> Jackson CG, McGrew BM, Forest JA, Netterville JL, Hampf CF, Glasscock ME 3rd. Lateral skull base surgery for glomus tumors: long-term control. *Otol Neurotol* 2001;22:377-82.
- <sup>24</sup> Hayes WS, Davidson AJ, Grimley PM, Hartman DS. Extraadrenal retroperitoneal paraganglioma: clinical, pathologic, and CT findings. *AJR Am J Roentgenol* 1990;155:1247-50.
- <sup>25</sup> Sclafani LM, Woodruff JM, Brennan MF. Extraadrenal retroperitoneal paragangliomas: natural history and response to treatment. *Surgery* 1990;108:1124-29.
- <sup>26</sup> Manolidis S, Shohet JA, Jackson CG, Glasscock ME 3rd. Malignant glomus tumors. *Laryngoscope* 1999;109:30-34.
- <sup>27</sup> Rinaldo A, Myssiorek D, Devaney KO, Ferlito A. Which paragangliomas of the head and neck have a higher rate of malignancy?. *Oral Oncol* 2004;40:458-60.
- <sup>28</sup> Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I, Grossman AB. The diagnosis and management of malignant pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Relat Cancer* 2007;14:569-85.
- <sup>29</sup> Kuruba R, Gallagher SF. Current management of adrenal tumors. *Curr Opin Oncol* 2008;20:34-46.
- <sup>30</sup> Al-Mefty O, Teixeira A. Complex tumors of the glomus jugulare: Criteria, treatment, and outcome. *J Neurosurg* 2002;97:1356-66.
- <sup>31</sup> Leonetti JP, Brackmann DE, Prass RL. Improved preservation of facial nerve function in the infratemporal approach to the skull base. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;101:74-78.
- <sup>32</sup> Pensak ML, Jackler RK. Removal of jugular foramen tumors: the Fallopiian bridge technique. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:586-91.
- <sup>33</sup> Foote RL, Pollock BE, Gorman DA, Schomberg PJ, Stafford SL, Link MJ, Kline RW, Strome SE, Kasperbauer JL, Olsen KD. Glomus jugulare tumor: tumor control and complications after stereotactic radiosurgery. *Head Neck* 2002; 24:332-38.
- <sup>34</sup> Blackburn W, Leung G, Morash C. Brain Tumour Foundation Award 2007. Glomus jugulare tumours: are they really so benign?. *Can J Neurosci Nurs* 2007;29:21-8.
- <sup>35</sup> Sanna M, Jain Y, De Donato G, Rohit, Lauda L, Taibah A. Management of jugular paragangliomas: the Gruppo Otologico experience. *Otol Neurotol* 2004;25:797-04.
- <sup>36</sup> Tran Ba Huy P, Chao PZ, Benmansour F, George B. Long-term oncological results in 47 cases of jugular paraganglioma surgery with special emphasis on the facial nerve issue. *J Laryngol Otol* 2001;115:981-87.
- <sup>37</sup> Sheehan J, Kondziolka D, Flickinger J, Lunsford LD. Gamma knife surgery for glomus jugulare tumors: an intermediate report on efficacy and safety. *J Neurosurg* 2005;102 Suppl:241-46.

- <sup>38</sup> Poznanovic SA, Cass SP, Kavanagh BD. Short-term tumor control and acute toxicity after stereotactic radiosurgery for glomus jugulare tumors. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006;134:437-42.
- <sup>39</sup> Mendenhall WM, Hinerman RW, Amdur RJ, Stringer SP, Antonelli PJ, Singleton GT, Cassisi NJ. Treatment of paragangliomas with radiation therapy. *Otolaryngol Clin North Am* 2001; 34:1007-20.
- <sup>40</sup> Sharma MS, Gupta A, Kale SS, Agrawal D, Mahapatra AK, Sharma BS. Gamma knife radiosurgery for glomus jugulare tumors: Therapeutic advantages of minimalism in the skull base. *Neurol India* 2008;56:57-61.
- <sup>41</sup> Shea MC, Robertson JT. Acoustic neuroma removal: a comparative study of translabyrinthine and suboccipital approaches. *Am J Otol* 1979;1:94-99.
- <sup>42</sup> Jackson CG, Netterville JL, Glasscock ME 3rd, Hampf CR, Carrasco VN, Haynes DS, Strasnick B, Fisher J. Defect reconstruction and cerebrospinal fluid management in neurotologic skull base tumors with intracranial extension. *Laryngoscope* 1992;102:1205-14.
- <sup>43</sup> Álvarez Zapico MJ, Llorente Pendas JL, Suárez Nieto C, Carreño Villarreal M, Moro Melón M. Paragangliomas de cabeza y cuello. Nuestra experiencia. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1998;49:177-82.
- <sup>44</sup> Martin TP, Irving RM, Maher ER. The genetics of paragangliomas: a review. *Clin Otolaryngol* 2007;32:7-11.
- <sup>45</sup> Suárez C, Rodrigo JP, Ferlito A, Cabanillas R, Saha AR, Rinaldo A. Tumours of familial origin in the head and neck. *Oral Oncol* 2006;42:965-78.
- <sup>46</sup> Gimenez-Roqueplo AP, Burnichon N, Amar L, Favier J, Jeunemaitre X, Plouin PF. Recent advances in the genetics of pheochromocytoma and functional paraganglioma. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35:376-79.
- <sup>47</sup> Dannenberg H, Komminoth P, Dinjens WN, Speel EJ, de Krijger RR. Molecular genetic alterations in adrenal and extra-adrenal pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Pathol* 2003;14:329-50.
- <sup>48</sup> Gimenez-Roqueplo AP. New advances in the genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1073: 112-21.
- <sup>49</sup> Baysal BE. Genetics of familial paragangliomas: Past, present, and future. *Otolaryngol Clin North Am* 2001; 34: 863-79.
- <sup>50</sup> Petropoulos AE, Luetje CM, Camarata PJ, Whittaker CK, Lee G, Baysal BE. Genetic analysis in the diagnosis of familial paragangliomas. *Laryngoscope* 2000;110:1225-29.
- <sup>51</sup> Drovdic CM, Myers EN, Peters JA, Baysal BE, Brackmann DE, Slattery WH 3rd, Rubinstein WS. Proportion of heritable paraganglioma cases and associated clinical characteristics. *Laryngoscope* 2001;111: 1822-27.
- <sup>52</sup> Jung RW, LeClair EE, Bernat RA, Kang TS, Ung F, McKenna MJ, Tuan RS. Expression of angiogenic growth factors in paragangliomas. *Laryngoscope* 2000; 110: 161-67.
- <sup>53</sup> Astrom K, Cohen JE, Willett-Brozick JE, Aston CE, Baysal BE. Altitude is a phenotypic modifier in hereditary paraganglioma type 1: evidence for an oxygen-sensing defect. *Hum Genet* 2003;13:228-37.
- <sup>54</sup> Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Péquignot E, Munnich A, Rötig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995;11:144-49.
- <sup>55</sup> Horváth R, Abicht A, Holinski-Feder E, Laner A, Gempel K, Prokisch H, Lochmüller H, Klopstock T, Jaksch M. Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein

- (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77:74-6.
- <sup>56</sup> Pawlu C, Bausch B, Neumann HP. Mutations of the SDHB and SDHD genes. *Fam Cancer* 2005;4:49-54.
- <sup>57</sup> Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 2005;7:77-85.
- <sup>58</sup> Baysal BE. On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:453-59.
- <sup>59</sup> Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW 3rd, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B. Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 2000;287:848-51.
- <sup>60</sup> Pigny P, Vincent A, Bauters CC, Bertrand M, de Montpreville VT, Crepin M, Porchet N, Caron P. Paraganglioma after maternal transmission of a succinate dehydrogenase gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 Jan 22.
- <sup>61</sup> Hensen EF, Jordanova ES, van Minderhout IJ, Hogendoorn PC, Taschner PE, van der Mey AG, Devilee P, Cornelisse CJ. Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-origin-dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and pheochromocytoma families. *Oncogene* 2004 ;23:4076-83.
- <sup>62</sup> Pigny P, Vincent A, Cardot Bauters C, Bertrand M, Thomas de Montreuil V, Crepin M, Porchet N, Caron P. Paraganglioma after maternal transmission of a succinate dehydrogenase gene mutation. *J Clin Endocrin Metab* 2008. Jan 22.
- <sup>63</sup> Fernández-Ballester G, Serrano L. Prediction of protein interaction based on structure. *Methods Mol Biol* 2006. 340:207-34.
- <sup>64</sup> Baysal BE. Genomic imprinting and environment in hereditary paraganglioma. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004;129:85-90.
- <sup>65</sup> Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer* 2003;3:193-02.
- <sup>66</sup> Boedeker CC, Neumann HP, Maier W, Bausch B, Schipper J, Ridder GJ. Malignant head and neck paragangliomas in SDHB mutation carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:126-29.
- <sup>67</sup> Mhatre AN, Li Y, Feng L, Gasperin A, Lalwani AK. SDHB, SDHC, and SDHD mutation screen in sporadic and familial head and neck paragangliomas. *Clin Genet* 2004;66:461-66.
- <sup>68</sup> Baysal BE. Hereditary paraganglioma targets diverse paraganglia. *J Med Genet* 2002;39:617-22.
- <sup>69</sup> Bayley JP, van Minderhout I, Weiss MM, Jansen JC, Oomen PH, Menko FH, Pasini B, Ferrando B, Wong N, Alpert LC, Williams R, Blair E, Devilee P, Taschner PE. Mutation analysis of SDHB and SDHC: novel germline mutations in sporadic head and neck paraganglioma and familial paraganglioma and/or pheochromocytoma. *BMC Med Genet* 2006;7:1-8.
- <sup>70</sup> Badenhop RF, Jansen JC, Fagan PA, Lord RS, Wang ZG, Foster WJ, Schofield PR. The prevalence of SDHB, SDHC, and SDHD mutations in patients with head and neck paraganglioma and association of mutations with clinical features. *J Med Genet* 2004;41:99-104.
- <sup>71</sup> Schiavi F, Boedeker CC, Bausch B, Peczkowska M, Gomez CF, Strassburg T, Pawlu C, Buchta M, Salzmann M, Hoffmann MM, Berlis A, Brink I, Cybulla M, Muresan M,



- Walter MA, Forrer F, Valimaki M, Kawecki A, Szutkowski Z, Schipper J, Walz MK, Pigny P, Bauters C, Willet-Brozick JE, Baysal BE, Januszewicz A, Eng C, Opocher G, Neumann HP; European-American Paraganglioma Study Group. Predictors and prevalence of paraganglioma syndrome associated with mutations of the SDHC gene. *JAMA* 2005;294:2057-63.
- <sup>72</sup> Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, Love DR, Mole SE, Moore JK, Papi L. Germ-line mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature* 1993;363:458-60.
- <sup>73</sup> Takaya K, Yoshimasa T, Arai H, Tamura N, Miyamoto Y, Itoh H, Nakao K. Expression of the RET proto-oncogene in normal human tissues, pheochromocytomas, and other tumors of neural crest origin. *J Mol Med* 1996;74:617-21.
- <sup>74</sup> Nakamura T, Ishizaka Y, Nagao M, Hara M, Ishikawa T. Expression of the ret protooncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. *J Pathol* 1994;172:255-60.
- <sup>75</sup> Schuchardt A, D'Agati V, Larsson-Blomberg L, Costantini F, Pachnis V. Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature* 1994;367:380-83.
- <sup>76</sup> Beldjord C, Desclaux-Arramond F, Raffin-Sanson M, Corvol JC, De Keyzer Y, Luton JP, Plouin PF, Bertagna X. The RET protooncogene in sporadic pheochromocytomas: frequent MEN 2-like mutations and new molecular defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2063-68.
- <sup>77</sup> Komminoth P, Roth J, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Seelentag WK, Heitz PU. RET proto-oncogene point mutations in sporadic neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2041-46.
- <sup>78</sup> Van Der Harst E, de Krijger RR, Bruining HA, Bonjer HJ, Lambers SW, Van Den Meiradier AH, Stijnen TH, Boomsa F. Prognostic value of RET protooncogene point mutations in malignant and benign, sporadic phaeochromocytomas. *Int J Cancer* 1998;79:537-40.
- <sup>79</sup> Stolle C, Glenn G, Zbar B, Humphrey JS, Choyke P, Walther M, Pack S, Hurley K, Andrey C, Klausner R, Linehan WM. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 1998;12:417-23.
- <sup>80</sup> Gross DJ, Avishai N, Meiner V, Filon D, Zbar B, Abeliovich D. Familial pheochromocytoma associated with a novel mutation in the von Hippel-Lindau gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:147-49.
- <sup>81</sup> Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJ, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BA, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA Jr, Marx SJ. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5658-71.
- <sup>82</sup> Stolle C, Glenn G, Zbar B, Humphrey JS, Choyke P, Walther M, Pack S, Hurley K, Andrey C, Klausner R, Linehan WM. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 1998;12:417-23.
- <sup>83</sup> Walther MM, Herring J, Enquist E, Keiser HR, Linehan WM. von Recklinghausen's disease and pheochromocytomas. *J Urol* 1999;162:1582-86.
- <sup>84</sup> Gutmann DH, Geist RT, Rose K, Wallin G, Moley JF. Loss of neurofibromatosis type I (NF1) gene expression in pheochromocytomas from patients without NF1. *Genes Chromosomes Cancer* 1995;13:104-09.

- <sup>85</sup> Cascón A, Ruiz-Llorente S, Rodríguez-Perales S, Honrado E, Martínez-Ramírez A, Letón R, Montero-Conde C, Benítez J, Dopazo J, Cigudosa JC, Robledo M. A novel candidate region linked to development of both pheochromocytoma and head/neck paraganglioma. *Genes Chromosomes Cancer* 2005 Mar;42:260-68.
- <sup>86</sup> Dannenberg H, de Krijger RR, Zhao J, Speel EJ, Saremaslani P, Dinjens WN, Mooi WJ, Roth J, Heitz PU, Komminoth P. Differential loss of chromosome 11q in familial and sporadic parasympathetic paragangliomas detected by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 2001;158:1937-42.
- <sup>87</sup> Myssiorek D, Ferlito A, Silver CE, Rodrigo JP, Baysal BE, Fagan JJ, Suárez C, Rinaldo A. Screening for familial paragangliomas. *Oral Oncology* 2007; 10:1016-21.
- <sup>88</sup> Neumann HP, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, et al. European-American Paraganglioma Study Group. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 2004; 292: 943-51.
- <sup>89</sup> Greenblatt DY, Shenker Y, Chen H. The utility of metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy in patients with pheochromocytoma. *Ann Surg Oncol* 2008;15:900-5.
- <sup>90</sup> Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, Virta SK, Peczkowska M, Morrison CD, Lhetonen R, Januszewicz A, Jarvinen H, Juhola M, Mecklin JP, Pukhala E. Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet* 2004;74:153-59.
- <sup>91</sup> Renard L, Godfraind C, Boon LM, Vikkula M. A novel mutation in the SDHD gene in a family with inherited paragangliomas- implications of genetic diagnosis for follow up and treatment. *Head Neck* 2003;25:146-51.
- <sup>92</sup> Boveri T. The origin of malignant tumors by Theodor Boveri. Baltimore: Williams & Wilkins 1929.
- <sup>93</sup> Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia. *Science* 1960;132:1497.
- <sup>94</sup> Paris Conference. Standardization in human cytogenetics. *Cytogenetics* 1972;11:313-62.
- <sup>95</sup> Caspersson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970;60:315-19.
- <sup>96</sup> Landegent JE, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Baas F, van der Ploeg M. Use of whole cosmid cloned genomic séquences for chromosomal localization by nonradioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 1987;77:366-70.
- <sup>97</sup> Houldsworth J, Chaganti RSK. Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol* 1994;145:1253-60.
- <sup>98</sup> Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* 2001;23:238-53.
- <sup>99</sup> Abdullah-Sayani A, Bueno-de-Mesquita JM, van de Vijver MJ. Technology Insight: tuning into the genetic orchestra using microarrays--limitations of DNA microarrays in clinical practice. *Nat Clin Pract Oncol* 2006;3:501-16.
- <sup>100</sup> Van den Ijssel P, Tijssen M, Chin SF, Eijk P, Carvalho B, Hopmans E, Holstege H, Bangarusamy DK, Jonkers J, Meijer GA, Caldas C, Ylstra B. Human and mouse oligonucleotide-based array CGH. *Nucleic Acids Res* 2005;33:192-98.
- <sup>101</sup> Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG. High resolution

---

analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998;20:207-11.

<sup>102</sup> Snijders AM, Nowak N, Segreaves R, Blackwood S, Brown N, Conroy J, Hamilton G, Hindle AK, Huey B, Kimura K, Law S, Myambo K, Palmer J, Ylstra B, Yue JP, Gray JW, Jain AN, Pinkel D, Albertson DG. Assembly of microarrays for genome-wide measurement of DNA copy number. *Nat Genet* 2001;29:263-64.

<sup>103</sup> Carvalho B, Ouwerkerk E, Meijer GA, Ylstra B. High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 2004;57:644-46.

<sup>104</sup> Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acid Res* 2002;30:e57.

<sup>105</sup> DeLellis RA, Lloyd RA, Heitz PU, Eng C. Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs in WHO Classification of Tumours 2004. IARC Press, Lyon, France.

<sup>106</sup> Lack EE. Tumors of the Adrenal Gland and Extra-Adrenal paraganglia 1992. In Atlas of Tumor Pathology, series 3, fascicle 19 ed. Armed Forces Institute of Pathology. Washington DC.

<sup>107</sup> Aarts M, Dannenberg H, DeLeeuw RJ, Van Nederveen FH, Verhofstad AA, Lenders JW, Dinjens WN, Speel EJM, Lam WL, De Krijger RR. Microarray-Based CGH of Sporadic and Syndrome-Related Pheochromocytomas Using a 0.1–0.2 Mb Bacterial Artificial Chromosome Array Spanning Chromosome Arm 1p. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2006;45:83–93.

<sup>108</sup> Jarbo C, Buckley PG, Piotrowski A, Mantripragada KK, Benetkiewicz M, Diaz de Ståhl T, Langford CF, Gregory SG, Dralle H, Gimm O, Bäckdahl M, Geli J, Larsson C, Westin G, Akerström G, Dumanski JP. Detailed assessment of chromosome 22 aberrations in sporadic pheochromocytoma using array-CGH. *Int J Cancer* 2006;118:1159-64.

<sup>109</sup> Suárez C, Sevilla MA, Llorente JL. Temporal paraganglioma. *Eur arch Otorhinolaryngol* 2007;264:719-31

<sup>110</sup> Nakamura E, Kaelin WG. Recent insights into the molecular pathogenesis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Pathol* 2006;17:97-06.

<sup>111</sup> Simi L, Sestini R, Ferruzzi P, Gaglianò MS, Gensini F, Mascalchi M, Guerrini L, Pratesi C, Pinzani P, Nesi G, Ercolino T, Genuardi M, Mannelli M. Phenotype variability of neural crest derived tumours in six Italian families segregating the same founder SDHD mutation Q109X. *J Med Genet* 2005;42:e52.

<sup>112</sup> Taschner PE, Jansen JC, Baysal BE, Bosch A, Rosenberg EH, Bröcker-Vriends AH, van Der Mey AG, van Ommen GJ, Cornelisse CJ, Devilee P. Nearly all hereditary paragangliomas in the Netherlands are caused by two founder mutations in the SDHD gene. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;31:274-81.

<sup>113</sup> Schiavi F, Savvoukidis T, Trabalzini F, Grego F, Piazza M, Amistà P, Demattè S, Del Piano A, Cecchini ME, Erlic Z, De Lazzari P, Mantero F, Opocher G. A founder mutation in the SDHD gene as the cause of the high prevalence of Head and Neck Paraganglioma in Trentino, Italy. *J Hypertens* 2006;24:S327-S327.

<sup>114</sup> Prince ME, Ubell ML, Castro J, Ogawa H, Ogawa T, Narayan A, Paulino A, Cole A, Wolf G, Rubin MA, Lyons RH, Bradford CR, Carey TE. Tissue-preserving approach to extracting DNA from paraffin-embedded specimens using tissue microarray technology. *Head Neck* 2007;29:465-71.

- 
- <sup>115</sup> Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, Liu L, Pearson DM, Collins VP, Du MQ. Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest* 2006 ;86:968-78.
- <sup>116</sup> Edström E, Mahlamäki E, Nord B, Kjellman M, Karhu R, Höög A, Goncharov N, Teh BT, Bäckdahl M, Larsson C. Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology. *Am J Pathol* 2000;156:651-59.
- <sup>117</sup> Petersen I, Hidalgo A, Petersen S, Schlüns K, Schewe C, Pacyna-Gengelbach M, Goeze A, Krebber B, Knösel T, Kaufmann O, Szymas J, von Deimling A. Chromosomal imbalances in brain metastases of solid tumors. *Brain Pathol* 2000;10:395-401.
- <sup>118</sup> Goeze A, Schlüns K, Wolf G, Thäsler Z, Petersen S, Petersen I. Chromosomal imbalances of primary and metastatic lung adenocarcinomas. *J Pathol* 2002;196:8-16.
- <sup>119</sup> Braun S, Riemann K, Kupka S, Leistenschneider P, Sotlar K, Schmid H, Blin N. Active succinate dehydrogenase (SDH) and lack of SDHD mutations in sporadic paragangliomas. *Anticancer Res* 2005;25:2809-14.
- <sup>120</sup> Akagi K, Kurahashi H, Arita N, Hayakawa T, Monden M, Mori T, Takai S, Nishisho I. Deletion mapping of the long arm of chromosome 22 in human meningiomas. *Int J Cancer* 1995;60:178-82.
- <sup>121</sup> Bryan EJ, Thomas NA, Palmer K, Dawson E, Englefield P, Campbell IG. Refinement of an ovarian cancer tumour suppressor gene locus on chromosome arm 22q and mutation analysis of CYP2D6, SREBP2 and NAGA. *Int J Cancer* 2000;87:798-802.
- <sup>122</sup> Zhou CZ, Peng ZH, Zhang F, Qiu GQ, He L. Loss of heterozygosity on long arm of chromosome 22 in sporadic colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:668-73.
- <sup>123</sup> Crabtree JS, Scacheri PC, Ward JM, Garrett-Beal L, Emmert-Buck MR, Edgemon KA, Lorang D, Libutti SK, Chandrasekharappa SC, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS. A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:1118-23.
- <sup>124</sup> Powers JF, Schelling K, Brachold JM, Tsokas P, Schayek H, Friedman E, Tischler AS. High-level expression of receptor tyrosine kinase Ret and responsiveness to Ret-activating ligands in pheochromocytoma cell lines from neurofibromatosis knockout mice. *Mol Cell Neurosci* 2002;20:382-89.
- <sup>125</sup> Asa SL, Ezzar S. The pathogenesis of pituitary tumours. *Nat Rev Cancer* 2002;2:836-49.