

Expresión de las sintasas de óxido nítrico en tumores glómicos de cabeza y cuello

Mayor M.C. Moisés Albino **Pacheco-Ramírez,*** Tte. Cor. M.C. Marcos Antonio **Rodríguez-Perales,***
Tte. Cor. M.C. Adelaido **López-Chavira,*** Mayor M.C. Luis Pablo **Canul-Andrade,***
Biol. Claudia María **Martínez-Martínez,**** Mayor M.C. Dolores Javier **Sánchez-González ******

Hospital Central Militar-Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. Los tumores glómicos de la cabeza y el cuello son tumores raros del adulto, se originan del paraganglio o células glómicas, las cuales generalmente se encuentran en el cuerpo carotídeo, el nervio vago, el oído medio, o el foramen yugular. Estos tumores en su gran mayoría son benignos y de crecimiento lento muy vascularizados, en la mayoría de los casos son tumores únicos, pero hasta 10% llegan a ser múltiples y este porcentaje aumenta hasta 35 o 50% en los casos familiares.

Material y métodos. Se trata de un estudio experimental, retrospectivo y transversal, realizado en los servicios de Otorrinolaringología y Patología del Hospital Central Militar y en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar, con el objetivo de conocer el comportamiento de la expresión de las sintasas de óxido nítrico (NOS) en tumores glómicos y de manera secundaria conocer la epidemiología de éstos. Se revisaron los casos de tumores glómicos de cabeza y cuello tratados por el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar y se obtuvieron muestras de tejido tumoral, existe en el archivo del Servicio de Patología de éste, a los cuales se les realizaron tinciones de inmunohistoquímica para detectar las tres isoformas de NOS.

Resultados. Se obtuvo un total de 13 muestras de glomus carotídeos, siete izquierdos y cinco derechos, observándose una expresión mayor estadísticamente significativa, de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) en los tumores glómicos izquierdos, las isoforma endotelial (eNOS) no presentó diferencia y la inducible (iNOS) no se expresó, consideramos que la mayor cantidad de nNOS en los tumores izquierdos probablemente se deba a una diferencia anatómica en la cantidad de fibras que inervan al cuerpo carotídeo izquierdo.

Conclusiones. La epidemiología corroboró que son tumores raros y que el promedio de su incidencia anual fue del 0.019% por

Expression of nitric oxide synthases in glomus tumors of head and neck

SUMMARY

Introduction. Glomus tumors of head and neck are rare tumors in adults, originated of paraganglia or glomic cells, which are generally in carotid body, nervus vagus, middle ear, or foramen jugulare. These tumors are mainly benign and of slow growth very vascularized, in most of the cases are unique tumors, but up to 10% they get to be multiple and this percentage increases up to 35 or 50% in the familiar cases.

Material and methods. One is an experimental, retrospective study and cross-sectional, made in the services of Otolaryngology and Pathology of the Military Central Hospital and in the Department of Cellular and Tissue Biology of the Military Medical School, with the objective to know the behavior the expression nitric oxide synthases (NOS) in glomus tumors and of secondary way to know the epidemiologic these. The cases of glomus tumors of head and neck were reviewed treated by the service of Otolaryngology and Head and Neck Surgery of the Military Central Hospital and obtained tumor tissue samples, exists in the file of the service of Pathology of this, to which stain of the three immunohistochemistry were made to them to detect isoformas NOS.

Results. A total of 13 carotid samples of glomus was obtained, 7 left ones and 5 rights, being observed statistically significant a greater expression, of synthases of neuronal nitric oxide synthases (nNOS) in the left glómicos tumors, endothelial isoform (eNOS) do not present/display difference and the induced one (iNOS) was not expressed, we considered that the greater amount of nNOS in the left tumors probably must to an anatomical difference in the amount of fibers that innervating to the left carotid body.

Conclusion. The epidemiologic corroborate that they are rare tumors and that the average of its annual incidence was of the

*Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, Hospital Central Militar. **Departamento de Biología Celular y Tisular Escuela Médico Militar, México. Autor responsable de la publicación. ***Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, México.

Correspondencia:

Mayor M.C. Moisés Albino Pacheco-Ramírez

Escuela Médico Militar. Cerrada de Palomas y Batalla de Celaya 5/o. Piso Histología. Col. Lomas de San Isidro. C.P. 11200. Del. Miguel Hidalgo. México, D.F. Tel.: (55) 1831-8225. Fax: 5520-2121. Correo electrónico: moypacheco@latinmail.com o javiersglez@yahoo.com.

Recibido: Septiembre 4, 2006.

Aceptado: Octubre 27, 2006.

año en pacientes que presentan de primera vez al Servicio de Otorrinolaringología y una prevalencia de 0.020% en siete años con tres meses.

Palabras clave: sintasas de óxido nítrico, tumores glómicos, tumores del cuerpo carotídeo.

0.019% per year in patients who present/display of first time to the service of otolaryngology and a prevalence of 0.020% in 7 years with 3 months.

Key words: Nitric Oxide Synthases, glomus tumors, carotid body tumors.

Introducción

Los tumores glómicos de la cabeza y el cuello son tumores raros del adulto, que se originan de células del paraganglio o células glómicas, las cuales habitualmente se encuentran en el cuerpo carotídeo, el nervio vago, el oído medio o el foramen yugular.¹ Los sistemas paragangliónicos denotan una colección de células cromóafines derivadas del neuroectodermo en sitios extraadrenales. Estos sistemas son vitales como fuente de catecolaminas durante el desarrollo fetal hasta la médula adrenal.² El paraganglio normal contiene dos tipos de células: tipo I, células principales o células granulares; y tipo II, células de soporte o células sustentaculares. Las células tipo I contienen gránulos con centros densos llenos de catecolaminas, propiedad que las coloca en el sistema de precursoras de aminas y de captación de descarboxilasa. Las tipo II, o células sustentaculares, son alargadas y se asemejan mucho a las células de Schwann. Sus funciones no están totalmente claras.^{2,3} Los tumores del paraganglio, tales como el tumor de cuerpo carotídeo, contienen ambos tipos de células I y II. Las células tipo I son las que predominan y se ordenan un patrón de nidos organizados, conocidos como Zellballen, rodeados por células sustentaculares en un estroma fibroso. Las células principales tipo I tienden a ser de forma poligonal con abundante citoplasma granular eosinofílico. Ellas están rodeadas periféricamente por las células sustentaculares tipo II, que son difíciles de identificar por microscopía de luz y aparecen como células basófilas con forma de huso. El pleomorfismo nuclear e hiper cromatismo celular son comunes en los paragangliomas y no debe considerarse evidencia de malignidad.^{2,3} La inmunohistoquímica ayuda en el diagnóstico y diagnóstico diferencial de estas neoplasias. Las células tipo I se tiñen positivamente con enolasa neuroespecífica, cromogranina A, y sinaptofisina. Las células tipo II se tiñen con S-100 y focalmente con proteína glial ácido fibrilar.² Aproximadamente 90% de los tumores se originan del sistema paragangliónico de la glándula suprarrenal, y estos tumores se llaman feocromocitomas. El restante 10% se origina de sitios extraadrenales con 85% de origen en el abdomen, 12 en el tórax, y el restante 3% en el área de la cabeza y el cuello.² Estos tumores en su gran mayoría son benignos y de crecimiento lento muy vascularizados, en su mayoría son tumores únicos, pero hasta 10% llegan a ser múltiples y este porcentaje aumenta hasta 35 a 50% en los casos familiares.⁴⁻⁶ El paraganglioma más común de la cabeza y el cuello es el del cuerpo carotídeo, seguido por el paraganglioma yugulo-timpánico y el vagal. Otros sitios incluyen la laringe, cavidad nasal órbita, tráquea, cuerpo aórtico pulmones y mediastino. Se ha estimado que los

paragangliomas constituyen uno de cada 30,000 tumores de cabeza y cuello. Sin embargo, la verdadera incidencia de éstos se desconoce.² El cuerpo carotídeo es uno de los sitios principales de origen de los tumores glómicos, y éste es el principal quimiorreceptor arterial, el cual responde a la presión parcial de oxígeno, a la de dióxido de carbono y al pH. La unidad funcional del cuerpo carotídeo es el glo-moide, que está formada por grupos de células quimiorreceptores (células glómicas) localizadas alrededor de los capilares. El cuerpo carotídeo tiene un flujo sanguíneo alto y un metabolismo muy alto, lo cual correlaciona con su función de monitorizar los niveles de oxígeno sanguíneo, las moléculas vasoactivas producidas en el cuerpo carotídeo, controlan el flujo sanguíneo del mismo y la evidencia reciente soporta la idea de que las endotelinas y el óxido nítrico, modulan la función del cuerpo carotídeo actuando sobre las células quimiorreceptoras y neuronas quimiosensibles, o mediante la regulación del flujo sanguíneo, a través del parénquima del cuerpo carotídeo.⁷ Se desconoce la causa de estos tumores, pero el tipo familiar tiene un patrón autosómico dominante en los hijos de padres afectados, pero los hijos de madres afectadas casi nunca desarrollan la enfermedad, el gen afectado parece estar confinado a una banda del cromosoma 11q23.^{4,8} Su gran vascularidad e invasión con destrucción local, contribuyen a la dificultad y morbilidad que ocasiona el manejo de estas lesiones tan complejas, siendo la resección quirúrgica la única modalidad de tratamiento que ofrece curar al paciente.⁹ Los paragangliomas vagales son tumores derivados del tejido paragangliónico asociado con uno de los gangliones del nervio vago. Éste se origina más comúnmente del ganglion vagal inferior, también referido como el ganglio nodoso. Los tumores que se originan del ganglion superior, o ganglion yugular, pueden tener forma de reloj de arena y extenderse del cuello a la región intracraneal a través del foramen yugular.² Los paragangliomas yugulares pueden presentarse como uno de dos tipos, el tradicionalmente referido como glomus timpánico y el glomus yugular. El glomus timpánico se origina típicamente de uno de dos nervios, el nervio glossofaríngeo (rama timpánica de Jacobson) o el nervio vago (rama aurículo posterior de Arnold). El glomus yugular se origina del bulbo yugular. Es la neoplasia que más comúnmente involucra al oído medio, muy a menudo los pacientes se presentan en la 5a. o 6a. décadas de la vida, con pérdida auditiva unilateral (conductiva, neurossensorial o mixta), tinnitus pulsátil y al menos con un nervio craneal paralizado.^{2,10} Su tratamiento puede ser particularmente difícil por su localización en el bulbo yugular, por lo cual puede involucrar el oído medio, los pares craneales bajos, la vena yugular, la arteria carótida y estructuras intracra-

neales.^{2,11} El NO (también llamado monóxido de nitrógeno) es un gas ligeramente soluble en algunos solventes y puede difundir relativamente fácil en membranas biológicas, pero su solubilidad en agua es baja.¹² El NO se forma por la conversión enzimática del aminoácido L-arginina (isómero levógiro) a L-citrulina mediante la acción de las sintasas de óxido nítrico (NOS), aunque puede formarse a partir de nitritos en agua oxigenada. El NO producido por el endotelio o las plaquetas también inhibe la agregación y adhesión plaquetaria, la adhesión de leucocitos y modula la proliferación del músculo liso vascular.¹² El NO se sintetiza en neuronas del sistema nervioso central, donde actúa como neurotransmisor con funciones como la formación de la memoria, coordinación entre actividad neuronal y flujo sanguíneo y modulación del dolor. En el sistema nervioso periférico, el NO es un mediador liberado por una amplia red de nervios previamente conocidos como no adrenérgicos y no colinérgicos. Estos nervios median algunas formas de vasodilatación neurogénica y regulan ciertas funciones gastrointestinales, respiratorias y genitourinarias. Se les conoce como nervios nitrérgicos.¹³ El NO, también se genera en grandes cantidades durante los mecanismos de defensa del hospedero en reacciones inmunológicas. Tal generación de NO fue observada primero en macrófagos activados,¹⁴ donde contribuye a su toxicidad contra células tumorales y microorganismos invasores. Las acciones citostáticas/citotóxicas del NO, resultan de sus acciones inhibitorias sobre enzimas de la cadena respiratoria y de la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células blanco. El NO también puede reaccionar con el radical superóxido (O_2^-) para producir peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual a su vez puede nitrar tirosina y formar 3-nitrotirosina.^{15,16} La NOS es una enzima que contiene un grupo hemo con secuencia similar a la citocromo P-450 reductasa.¹⁷ Según el banco de datos de las enzimas, la NOS se tipifica como E.C.1.14.13.39, donde E.C. significa clasificación de enzimas; E.C. 1 corresponde a oxidoreductasas o deshidrogenasas; E.C.1.14. Indica las enzimas que actúan en donantes pares con incorporación de oxígeno molecular; E.C.1.14.13. Son las enzimas que utilizan nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como donador, e incorporan un átomo.¹⁸ Bredt DS y cols. en 1991 clonaron una copia (cDNA) del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para la nNOS, y estudiaron su expresión. El ARNm de la nNOS humana contiene 7,124 pares de bases (pb) y codifica para una proteína de 1,434 aminoácidos (aa) (Moncada S, 1997). El locus donde se localiza este gen en el humano es en el cromosoma 12q24.2-q24.31.^{13,19} En 1992, Lowenstein y cols. clonaron el cDNA de la iNOS de riñón humano y descubrieron que tenía 50% de identidad con la secuencia de la nNOS. El ARNm de la iNOS humana contiene 3,444 pb. y codifica para una proteína de 1,147 aminoácidos (aa).^{20,21} En el humano existen a su vez, tres isoformas de iNOS localizadas en el cromosoma 17, la NOS2A se encuentra en la región 17cen-q11.2, la NOS2B y NOS2C se localizan en la región 17p13.1-q25.²² En 1992, Janssens SP y cols. clonaron el cDNA de la eNOS de vasculatura humana y descubrieron que compartía

52% de identidad con la secuencia de la nNOS; en el mismo año, Marsden PA y cols. clonaron y seriaron otra secuencia de eNOS que compartía 60% de identidad con la nNOS. El ARNm de la eNOS humana contiene 3,612 pb. y codifica para una proteína de 1,203 aminoácidos (aa).²³ El locus donde se localiza este gen en el humano es en el cromosoma 7q36.^{13,24} Las isoformas constitutivas (cNOS) nNOS y eNOS son reguladas por concentraciones de calcio entre 70-100 nanomolar, mientras que la iNOS solamente requiere concentraciones de calcio entre 30-70 nanomolar porque está unida constitutivamente a calmodulina, a diferencia de las otras isoformas.²⁵ Las NOSs forman homodímeros que catalizan la formación de L-citrulina y NO a partir de L-arginina utilizando oxígeno y NADPH como cosubstratos y flavín adenín mononucleótido (FMN), flavín adenín dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (H_4B), hemo, calcio²⁺/calmodulina y Zinc²⁺ como cofactores.^{26,27} Las NOSs se expresan en casi todas las células de mamíferos, tanto normales como neoplásicas.^{27,28} También se pueden comportar como constitutivas o inducibles dependiendo del tejido donde se expresan.²⁹ La iNOS además de que se induce por lipopolisacárido (LPS) y citocinas como $INF\gamma$, $FNT\alpha$ e IL-1,³⁰ está presente constitutivamente en el epitelio bronquial, riñón y algunos tejidos fetales.³¹ La eNOS se regula constitutivamente en endotelio por la tensión que ejerce el flujo sanguíneo sobre la pared vascular (tensión de fricción o "*shear stress*"), pero puede inducirse durante el ejercicio crónico o el embarazo.¹³ Se ha postulado la existencia de otra isoenzima; la llamada NOS mitocondrial (mtNOS).³² En realidad no se sabe si esta enzima es producto de un gen independiente o si es el resultado de cambios postranscripcionales de la nNOS traslocada a mitocondria; aunque también se han encontrado eNOS e iNOS dentro de la mitocondria, además de otra isoforma aparentemente diferente de las tres descritas.³³ La regulación de la expresión de las NOSs es controlada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional.³⁴ Estas enzimas son fosforiladas por una variedad de proteincinasas (PK) incluyendo PK dependientes de AMPc, GMPc, proteincinasa C (CPK), y PK dependientes de Ca^{2+} /calmodulina²⁹ y por H_4B .³⁵ La eNOS es doblemente acilada por los ácidos grasos saturados miristato (irreversible) y palmitato (reversible), contiene un sitio consenso de miristoilación y palmitoilación en su extremo N-terminal que facilita su anclaje a la membrana.³⁶ La nNOS citosólica no tiene estas modificaciones postranscripcionales, sin embargo, una isoforma de mtNOS con secuencia similar a nNOS sí la tiene.³³ A nivel transcripcional, las NOSs tienen la secuencia consenso 5'GGGACTTTCC-3', que sirve como sitio de unión al factor de transcripción NF- κ B. La activación de este factor ocurre en respuesta a gran variedad de estímulos como estrés oxidativo, LPS, factores de crecimiento, citocinas, linfocinas, radiación ultravioleta (UV), agentes farmacológicos, etc.²⁹ El transductor de señal y activador de transcripción 1 (Stat 1) favorece la sobreexpresión de NF- κ B para que active al promotor de la iNOS. En el humano, el complejo promotor NF- κ B de la iNOS, se ha identificado entre 5.2 y 6.1, y a 8.3 kilobases (Kb).³⁷ Se refiere a la propor-

ción de personas dentro de una población que tienen un evento o una enfermedad en un momento determinado. Por ejemplo: en una encuesta se relevan los casos de tabaquismo de una población de 1,000 personas. De ellas 320 contestan que actualmente fuman. La prevalencia de tabaquismo en esta población es de $320/1,000 = 32\%$. El objetivo de esta investigación fue conocer la expresión e inmunolocalización de las NOSs en tumores glómicos, tratados en el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, en los últimos siete años.

Material y métodos

Tipo de estudio

Se realizó un estudio experimental, retrospectivo y transversal en los servicios de Patología y Otorrinolaringología del Hospital Central Militar y en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar. Se revisaron los expedientes clínicos de pacientes con diagnóstico de tumor glómico de cabeza y cuello, tratados por el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar, en los últimos siete años. Se capturaron las muestras de tejidos de pacientes con diagnóstico de tumor glómico de cabeza y cuello, tratados por el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar, en los últimos siete años, de las cuales existiera muestras del tumor, en el archivo de bloques de parafina del Servicio de Patología. Se incluyeron los datos clínicos y muestras de tejidos de pacientes con diagnóstico de tumor glómico de cabeza y cuello, tratados por el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar, en los últimos siete años, que tuvieran su expediente completo y de los cuales existiera muestras del tumor, en el archivo de bloques de parafina del Servicio de Patología.

Inmunohistoquímica

De los bloques se obtuvieron cortes montados en portaobjetos recubiertos con Poli-L-Lisina (*Sigma*) para realizar inmunohistoquímica, los cuales fueron desparafinados y rehidratados con Declere (*Cell Marque, USA*). La peroxidasa endógena se inhibió por incubación con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 30% (34 mL de metanol y 6 mL de H_2O_2), (*Merck, Darmstadt, Germany*) durante dos horas en un vaso de *Coplin*. Luego de lavar con alcohol de 96°, agua y buffer salino de fosfatos (PBS) se bloquearon los sitios libres antigénicos con suero de cabra al 3% (Santa Cruz *Biotechnology, USA*) en PBS/Triton 0.3% por 30 minutos. Posteriormente se decantó el exceso y se aplicaron los anticuerpos primarios: monoclonal IgG₁ de ratón anti-nNOS (A-11: sc-5302 Santa Cruz *Biotechnology, USA*) que reconoce a los aminoácidos 2-300 de la enzima, a una dilución 1:25 en la solución de bloqueo; monoclonal IgG₁ de ratón anti-iNOS (C-11: sc-7271 Santa Cruz *Biotechnology, USA*) que reconoce el extremo carboxilo terminal de la enzi-

ma, a una dilución 1:25 en la solución de bloqueo; policlonal IgG de conejo anti-eNOS (C-20: sc-654 Santa Cruz *Biotechnology, USA*) que reconoce la región carboxilo terminal de la enzima, a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo y el anticuerpo IgG purificado de conejo antinitrotirosina (*Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY*) a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo. Se incubó toda la noche en cámara húmeda a 4°C. Terminado este tiempo, las laminillas se lavaron dos veces en agitación de 100 rpm con PBS y se agregaron los anticuerpos secundarios: antirrátón (para nNOS e iNOS) biotinilado (*Jackson ImmunoResearch, USA*) a una dilución 1:500 y anticonejo (para eNOS y NT) biotinilado (*Jackson ImmunoResearch, USA*) a una dilución 1:100 en la solución de bloqueo y se dejaron incubar por 1 hora a temperatura ambiente en agitación de 20 rpm; luego se lavó nuevamente dos veces en agitación de 100 rpm con PBS. Las preparaciones se colocaron nuevamente 30 minutos en la cámara húmeda en contacto con el complejo avidina-biotina

Cuadro 1. Muestra el número total y por año de tumores glómicos de cabeza y cuello, tratados por el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar en los últimos siete años.

Año	Casos de tumores glómicos
1999	1
2000	1
2001	1
2002	0
2003	1
2004	4
2005	6
2006	1
Total	15

Cuadro 2. Incidencia de los tumores glómicos de cabeza y cuello en la Consulta Externa de Otorrinolaringología.

Año	Número de consulta de 1/a. vez en ORL Y C.C.C.	Incidencia (expresada en %)
1999	10,357	1/10,357 (0.009%)
2000	7,750	1/1,750 (0.012%)
2001	11,490	1/11,490 (0.008%)
2002	9,198	0 (0%)
2003	6,455	1/6,455 (0.015%)
2004	7,805	4/7,805 (0.051%)
2005	14,631	6/14,631 (0.041%)
2006	4,480	1/4,480 (0.022%)
	Total de consultas de 1/a. vez 72,166	Media de la incidencia 0.019% por año

Cuadro 3. Prevalencia de los tumores glómicos de cabeza y cuello de enero de 1999 a abril del 2006.

Total de consultas de 1/a. vez en ORL Y CCC. (1999-abr 2006)	Total de casos de tumores glómicos (1999-abr 2006)	Prevalencia de tumores glómicos (1999-abr 2006)
72,166	15	15/72,166 0.020%

(VECTASTAIN ABC) al 0.05% del reactivo A, y 0.05% del reactivo B (*VECTOR Laboratories*) en PBS. La reacción antígeno anticuerpo fue detectada empleando una solución que contiene 40 μ L de H_2O_2 al 30%, (*Merck, Darmstadt, Germany*), ya que es el sustrato de la enzima peroxidasa, 1 mg del cromógeno diaminobencidina (*SIGMA, St. Louis, MO, USA*), (que funciona como aceptor de electrones), disueltos en 1 mL de PBS. Después de 15 minutos de exposición a esta solución las laminillas se lavaron con agua corriente, se contrataron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron y se montaron con resina sintética (*Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA*) y cubreobjetos de 25 x 25 mm del número 1 (*VWR International, USA*). Posteriormente, se observaron en el invertoscopio Axiovert 200 M (*Carl Zeiss Germany*), se tomaron fotografías digitales con la *Axiocam HRC* (*Carl Zeiss Germany*). Las imágenes se capturaron y analizaron mediante el software KS-300 versión 3.0 (*Carl Zeiss Germany*).³⁸ Se utilizó el método no paramétrico de U de Mann Whitney para comparar la expresión de las NOSs entre los tumores glómicos derechos e izquierdos. La significancia estadística fue de $p < 0.05$.

Resultados

Epidemiología de tumores glómicos

El *cuadro 1* nos permite observar el número de casos por año y número total de tumores glómicos, incluidos carotídeos, yugulares, timpánicos y vagales, tratados por el Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Central Militar, del año 1999 a 2006, en total se trataron y diagnosticaron 15 tumores glómicos en los últimos siete años.

En el *cuadro 2* se puede observar el año y el número de consultas de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello de primera vez, así como la incidencia de los tumores glómicos de cabeza y cuello calculada en la extrema derecha.

En el *cuadro 3* podemos observar la prevalencia de los tumores glómicos de cabeza y cuello, en la columna de la derecha tenemos el total de pacientes de primera vez vistos en la Consulta Externa de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello, de enero 1999 a abril de 2006, en la columna central observamos el total de casos de tumores glómicos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en este mismo periodo de tiempo, y en la extrema derecha está la prevalencia de los tumores glómicos en el periodo ya mencionado.

Fueron un total de 15 casos de tumores glómicos de cabeza y cuello, de los cuales dos fueron glomus timpánicos, uno fue un glomus vagal y 15 fueron glomus carotídeos, por diferentes causas sólo se logró obtener muestra de 13 especímenes, para poder ser procesados y estudiados; 12 glomus de cuerpo carotídeo o también llamados glomus carotídeos y un glomus timpánico. Todos los pacientes recibieron tratamiento quirúrgico, lográndose la resección total en todos los casos, sólo una paciente rechazó el tratamiento y decidió la conducta expectante, la cual abandonó finalmente y actualmente no se sabe de ella.

En la *figura 1* podemos observar la distribución de glomus carotídeos, por lado afectado, ya sea derecho o izquierdo.

nNOS y tumores glómicos

En esta investigación se encontró que la nNOS se expresa de manera constitutiva en la capa muscular de arterias y venas, como se muestra en la *figura 2*, en donde se observa la expresión e inmunolocalización de nNOS en tumores glómicos, las flechas marcan zonas de expresión de la enzima en color café. La fotografía A es representativa de la expresión de nNOS en tumores glómicos derechos, se observa una expresión tenue en la túnica muscular vascular. La fotografía B es representativa de la expresión de nNOS en tumores glómicos izquierdos, se observa un aumento en la expresión en la túnica muscular vascular, el color café tabaco es más intenso y más generalizado en el tejido.

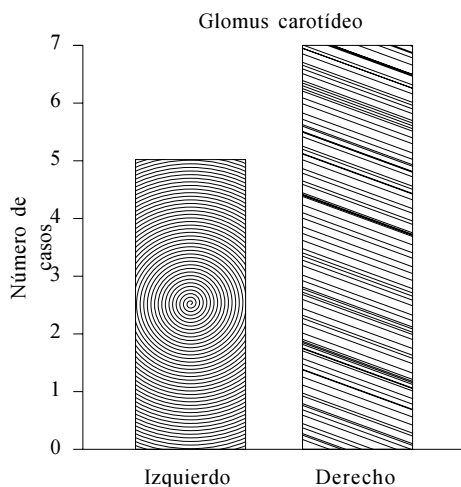


Figura 1. Gráfica que muestra la distribución de glomus carotídeos, por lado afectado.

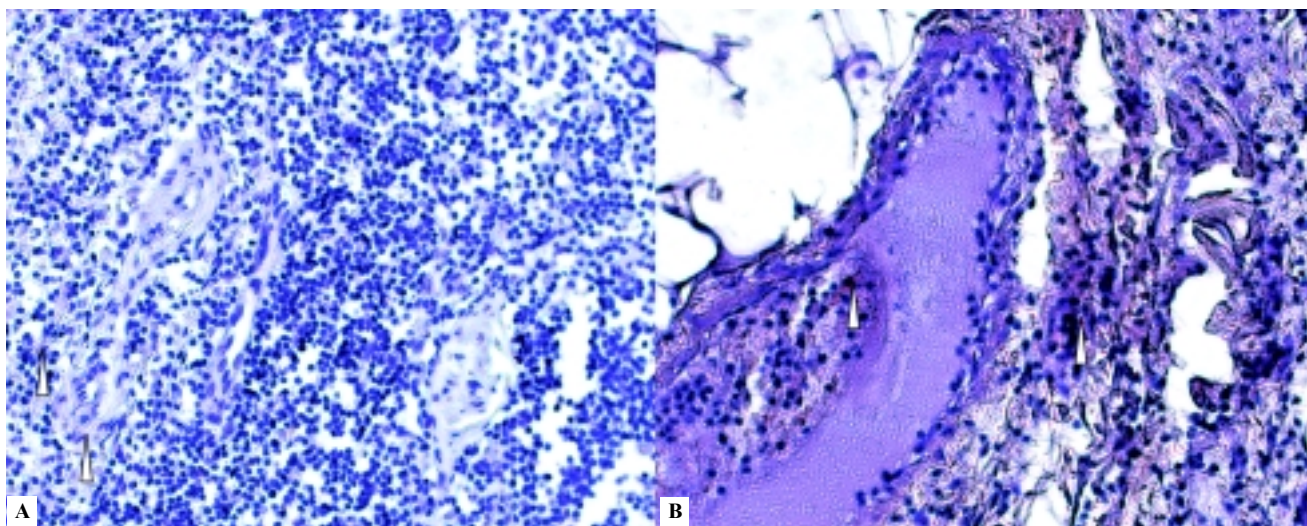


Figura 2. Fotografía **A** representativa de la expresión de nNOS en tumores glómicos derechos, se observa una expresión tenue en la túnica muscular vascular. Fotografía **B** representativa de la expresión de nNOS en tumores glómicos izquierdos, se observa un aumento en la expresión en la túnica muscular vascular, el color café tabaco es más intenso y más generalizado en el tejido. IHC para nNOS 400X. Las flechas marcan zonas de expresión de la enzima en color café.

En la *figura 3* se observa la expresión de la nNOS en los tumores glómicos derechos e izquierdos. Se observa claramente una tendencia mayor en la expresión de la nNOS en los tumores glómicos izquierdos. Hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre estos dos grupos de tumores. $P < 0.05$, ($p = 0.0317$).

iNOS y tumores glómicos

En esta investigación se encontró que la iNOS no se expresa de manera constitutiva ni inducible por factores externos o concomitantes, se muestra en la *figura 4* un macrófago en estallido respiratorio positivo a iNOS encontrado de manera incidental, que no representa expresión de ésta por el tumor. La fotografía A es representativa de la expresión de iNOS en tumores glómicos derechos, donde se observa ausencia de expresión de esta enzima. La fotografía B es representativa de la expresión de iNOS en tumores glómicos izquierdos, la flecha marca un macrófago activado en estallido respiratorio positivo para esta enzima en color café, previamente mencionado.

En la *figura 5* se grafica la expresión de la iNOS en los tumores glómicos derechos e izquierdos, la cual se encontró sólo de manera incidental en macrófagos activados. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre estos dos grupos de tumores. $P > 0.05$, ($p = 0.6905$).

eNOS y tumores glómicos

En esta investigación se encontró que la eNOS se expresa de manera constitutiva en endotelio vascular, como se muestra en la *figura 6*. La expresión e inmunolocalización de eNOS en tumores glómicos están marcados por las flechas que marcan el endotelio vascular en color café donde se expresa esta enzima. La fotografía es representativa de la expresión

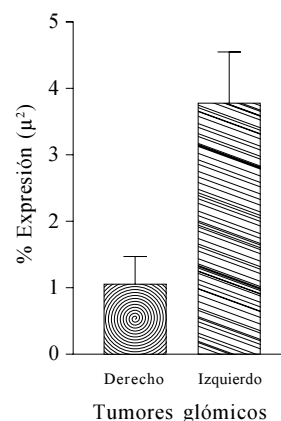


Figura 3. Sintasa neuronal de óxido nítrico (nNOS). Expresión de la nNOS en los tumores glómicos derechos e izquierdos. Existe una diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre estos dos grupos de tumores, siendo mayor la expresión en los tumores del lado izquierdo. $P < 0.05$ ($p = 0.0317$).

de eNOS en tumores glómicos derechos, se observa una expresión basal en endotelio vascular. La fotografía B es representativa de la expresión de eNOS en tumores glómicos izquierdos, de la misma forma antes descrita se observa una expresión basal en endotelio vascular.

En la *figura 7* se grafica la expresión de la eNOS en los tumores glómicos derechos e izquierdos. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre estos dos grupos de tumores. $P > 0.05$ ($p = 0.8413$).

Discusión

Epidemiología de tumores glómicos

La incidencia de los tumores glómicos de nuestro estudio es muy baja con una media de 0.019%/año, como era de es-

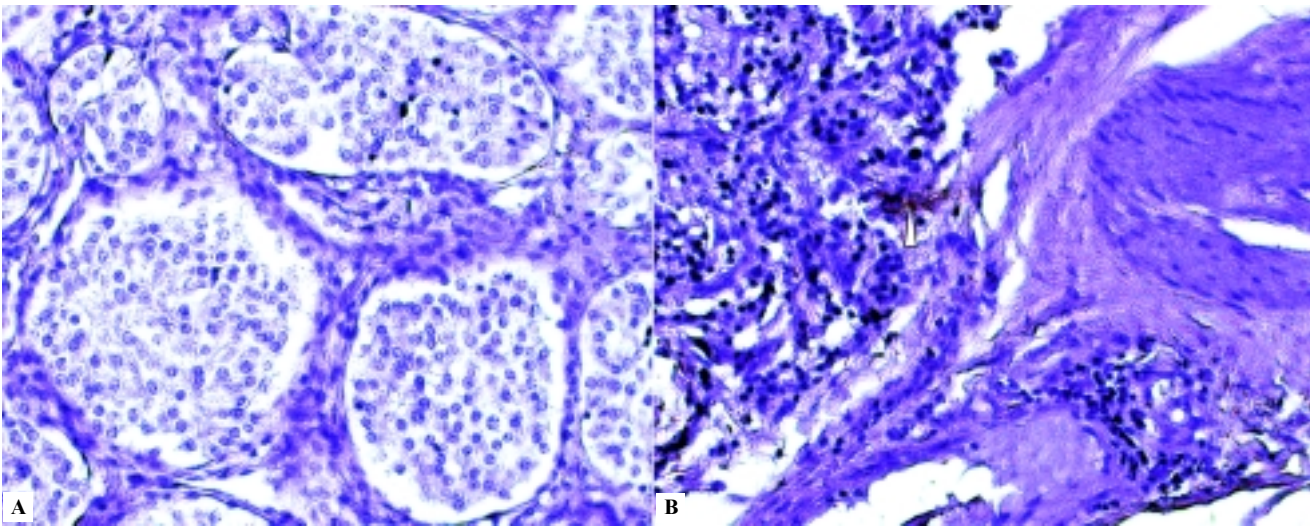


Figura 4. La fotografía A es representativa de la ausencia de expresión de iNOS en tumores glómicos derechos. La fotografía B es representativa de la expresión de iNOS en tumores glómicos izquierdos, la flecha marca un macrófago activado en estallido respiratorio positivo para esta enzima en color café, encontrado de manera incidental. IHC para iNOS 400X.

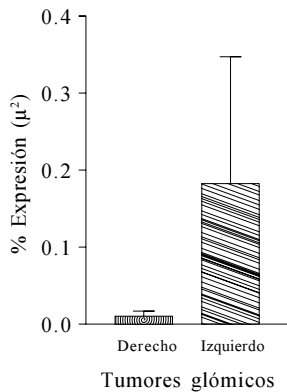


Figura 5. Sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS). Se grafica la expresión de la iNOS en los tumores glómicos derechos e izquierdos, la cual se encontró sólo de manera incidental en macrófagos activados. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre estos dos grupos de tumores. $P > 0.05$ ($p = 0.6905$).

perarse, pues es bien sabido que estos tumores son raros y su incidencia verdadera se desconoce, pero se ha calculado que constituyen uno de cada 30,000 tumores de cabeza y cuello,^{2,39} del mismo modo su prevalencia es bajo, pues sólo fue de 0.020% en siete años con cuatro meses que fue el periodo de revisión de nuestro estudio. Por lo que respecta a los tumores carotídeos, el lado izquierdo se vio mas afectado con siete casos por sólo cinco del lado derecho, sin que exista una diferencia estadísticamente significativa.

Es necesario comentar que aunque no incluimos en nuestros resultados la altitud a la que radicaban los pacientes, sólo una paciente radicaba por debajo de 1,500 metros sobre el nivel del mar, la cual presentó un glomus carotídeo derecho, esto es importante, ya que la hipoxia sostenida puede propiciar el desarrollo del tumor además de que se ha com-

probado que ocasiona crecimiento del cuerpo carotídeo de animales de laboratorio.^{3,40}

nNOS y tumores glómicos

En este estudio se logró evidenciar de manera fehaciente que la expresión de la nNOS en tumores glómicos izquierdos fue mayor que la que presentaron los tumores glómicos derechos, pues el porcentaje de expresión de aquella tuvo una media de 3.764%, mientras que la media para los tumores glómicos izquierdos fue de 1.044%, lo cual tuvo significancia estadística ($p = 0.0317$), no se nos hace raro encontrar la expresión de la nNOS en estos tumores, pues las NOS se expresan en casi todas las células de mamíferos tanto normales como neoplásicas^{27,28} y dado que la totalidad de los tumores estudiados fueron glomus del cuerpo carotídeo, pues la muestra de los dos tumores timpánicos y uno vagal no estuvieron disponibles y no fueron incluidos en nuestro estudio, era de esperar la presencia de nNOS en ellos, pues desde 1993 existen artículos que reportan la presencia de NOS constitutivas en los cuerpos carotídeo de animales de laboratorio, pues se logró comprobar que las fibras nerviosas que inervan al cuerpo carotídeo eran una fuente primaria de NO en gatos (Prabhakar NR, 1993); en este mismo año otros autores encontraron plexos extensos de fibras nerviosas que producían óxido nítrico, y éstas se encuentran en estrecha relación con las células tipo I o principales del cuerpo carotídeo.⁴¹ Pero lo que en realidad llama nuestra atención es la diferencia que existe entre la expresión de nNOS entre tumores derechos e izquierdos, actualmente no existe un trabajo similar al nuestro, en el que se haya comparado la expresión de NOS en tumores del cuerpo carotídeo, por lo que resulta difícil explicar tal diferencia, pues teóricamente no debería existir, ya que no encontramos diferencias reportadas en la literatura en cuanto a la fisiología de cuerpo carotídeo de un

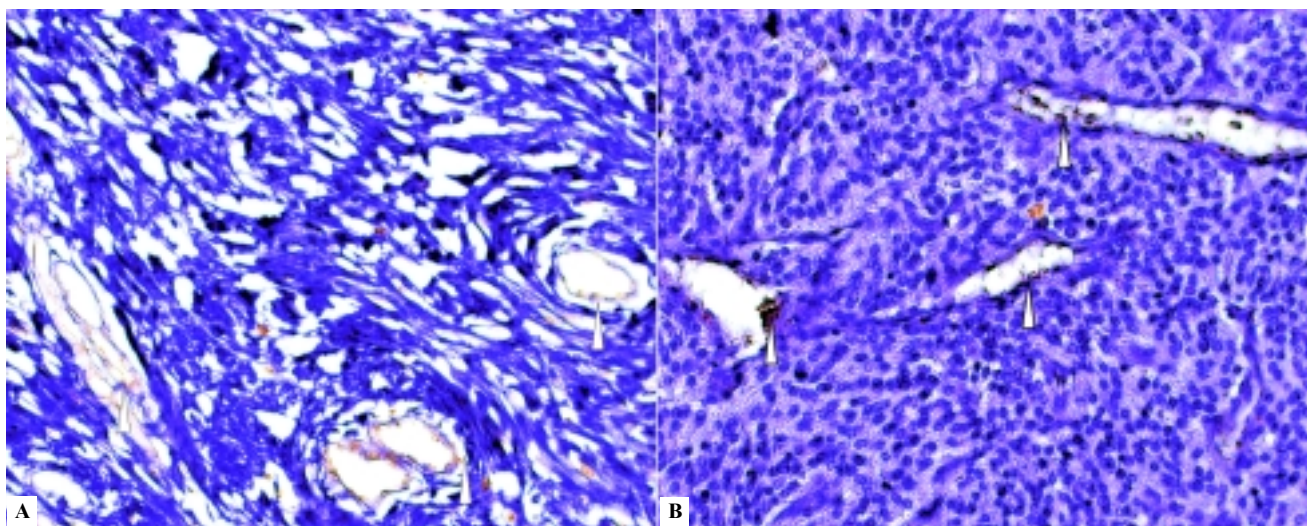


Figura 6. La fotografía A es representativa de la expresión de eNOS en tumores glómicos derechos, se observa una expresión basal en endotelio vascular. La fotografía B es representativa de la expresión de eNOS en tumores glómicos izquierdos, Expresión e inmunolocalización de eNOS en tumores glómicos, las flechas marcan endotelio vascular en color café donde se expresa esta enzima. IHC para eNOS 400X.

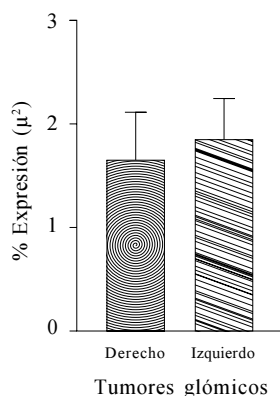


Figura 7. Sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS). La gráfica muestra la expresión de la eNOS en los tumores glómicos derechos e izquierdos. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre estos dos grupos de tumores. $P > 0.05$ ($p = 0.8413$).

lado con el otro, la única diferencia tangible que nosotros detectamos es que la carótida común izquierda nace en el tórax, directamente de la aorta en la porción horizontal de su arco, y la derecha en la base del cuello de la bifurcación del tronco braquicefálico, lo cual aunque no existe diferencia en sus calibres (Rouviere), esta condición pudiera hacer que el cuerpo carotideo izquierdo tenga un flujo sanguíneo diferente al derecho y de alguna manera esté afectando nuestros resultados, pero nosotros no encontramos evidencia previa, de que exista una cantidad de fibras nerviosas o una innervación mayor del cuerpo carotideo izquierdo, ya que la nNOS se ha detectado principalmente en las terminaciones nerviosas de los cuerpos carotídeos, tal vez nuestro resultado nos indique que tal diferencia existe y que el cuerpo carotideo del lado izquierdo esta más innervado que el derecho.

iNOS y tumores glómicos

Es de llamar la atención que la sintasa de óxido nítrico inducible prácticamente se encontrara ausente en las muestras de tejido de nuestra investigación, pues esta enzima es la que se eleva en situaciones patológicas, como en las situaciones donde están presente los lipopolisacáridos y citoquinas como $IFN\gamma$, $FNT\alpha$, e $IL-1$,³⁰ pues como es evidente en nuestros resultados en los tumores del lado derecho sólo su media del porcentaje de expresión fue 0.01% y el lado izquierdo 0.18% y prácticamente sólo se encontró en algunos macrófagos activados y no en las células constitutivas del tumor. Nosotros esperamos encontrar una mayor expresión de estas enzimas pues existe reportes de que la hipoxia crónica modula las NOS en los cuerpos carotídeos de ratas hipóxicas, y existe evidencia de que tanto la hipoxia aguda como la crónica ocasionan aumento de la síntesis de NO ^{42,43} y más aún los cuerpos carotídeos de que previamente han estado expuestos a hipoxia crónica y son sometidos a hipoxia aguda generan una mayor cantidad de NO , que los cuerpos carotídeos normo-oxémicos, pero lo más importante es que en esta diferencia en la cantidad de NO producida están involucradas no sólo las NOS constitutivas, sino la iNOS también en forma importante,⁴⁴ y tomamos en cuenta que unos de los factores considerados en la génesis de los tumores del cuerpo carotideo es la hipoxia prolongada, pues ésta ocasiona aumento de tamaño del cuerpo carotideo y la gran mayoría de los pacientes que los presentan son adultos y viven a más de 2000 metros sobre el nivel del mar,^{3,40} podríamos inferir que la producción de óxido nítrico debería estar aumentada en los tumores glómicos y que este aumento podría estar mediado por la iNOSM, pero no fue así, tal vez porque los experimentos hechos en animales de laboratorio son realizados después de someter a éstos a algunas semanas de hipoxia, y los paciente que presentan los tumores de cuerpo

carotídeo estuvieron expuestos a la hipoxia durante muchos años, y esto les permite adaptarse y no presentar incrementos en la expresión de las NOS tanto constitutivas con la inducible.

eNOS y tumores glómicos

En nuestros resultados no existió diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de expresión de los tumores derechos e izquierdos, pues la media para los primeros fue de 1.64% y para los segundos de 1.83%, su presencia no es de extrañar, pues la eNOS se encuentra en el tejido de los cuerpos carotídeos normales y que produce óxido nítrico que tiene probablemente un papel modulador diferente al del óxido nítrico producido por la nNOS, pues en ratones con cuerpos carotídeos deficientes en eNOS que son sometidos a hipoxia, éstos presentan un aumento significativo en la respuesta ventilatoria, comparados con ratones normales, y cuando los ratones son deficientes en nNOS y se les somete a la misma prueba no observa este aumento de la respuesta ventilatoria con respecto a ratones normales.⁴⁵

Conclusiones

De nuestras investigaciones podemos concluir, que existe una diferencia significativa entre el porcentaje de expresión de nNOS entre los tumores glómicos derechos e izquierdos, siendo mayor la expresión en estos últimos. La razón de la diferencia no está clara y podría estar en relación con la cantidad de fibras nerviosas que inervan cada cuerpo carotídeo. Es necesario realizar más estudios para comparar el tejido glómico normal con el tumoral y que una probable fuente de tejido glómico normal podría ser el que se obtenga de producto de necropsias de nuestro hospital, ya que no existen estudios similares con el nuestro. Si consideramos que la terapia génica es el futuro de la terapéutica, es indispensable conocer el comportamiento bioquímico de los tumores, para poder actuar en consecuencia, y esto sólo se consigue al aplicar la investigación básica a nuestros casos clínicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Departamento de Patología del Hospital Central Militar, el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea y la Fundación Gonzalo Río Arronte IAP.

Referencias

1. Axmann C, Dorenbeck U, Reith W. Glomus tumors of the head-neck-region. *Radiologe* 2004; 44(4): 389-99.
2. Cummings CW, Flint PW, Harker LA. Cummings Otolaryngology Head and Neck Surgery. 4th Ed. Vol. 3. Philadelphia, USA: Elsevier Mosby; 2005, p. 2554-62.

3. Torres-Patino F, Gomez-Acosta F, Guzman-Patraca C, Mendoza-Parada J, Labastida-Almedaro S. Tumor de cuerpo carotídeo. Análisis de 96 casos. *Rev Invest Clin* 1991; 43: 119-23.
4. Baysal BE, van Schothorst EM, Farr JE, Grashof P, et al. Repositioning the hereditary paraganglioma critical region on chromosome band 11q23, 3rd. *Hum Genet* 1999; 104(3): 219-25.
5. Milunsky J, DeStefano AL, Huang XL, et al. Familial paragangliomas: linkage to chromosome 11q23 and clinical implications. *Am J Med Genet* 1997; 72(1): 66-70.
6. Magliulo G, Zardo F, Varacalli S, et al. Multiple paragangliomas of the head and neck. *An Otorrinolaringol Ibero Am* 2003; 30(1): 31-8.
7. Rey S, Iturriaga R. Endothelins and nitric oxide: vasoactive modulators of carotid body chemoreception. *Curr Neurovasc Res* 2004; 1(5): 465-73.
8. van Schothorst EM, Beekman M, Torremans P, et al. Paragangliomas of the head and neck region show complete loss of heterozygosity at 11q22-q23 in chief cells and the flow-sorted DNA aneuploid fraction. *Hum Pathol* 1998; 29(10): 1045-9.
9. Whitfield PC, Grey P, Hardy DG, et al. The surgical management of patients with glomus tumours of the skull base. *Br J Neurosurg* 1996; 10(4): 343-50.
10. Holden PK, Linthicum FH. Glomus jugulare tumor. *Otol Neurotol* 2005; 26: 312-13.
11. Willen SN, Einstein DB, Maciunas RJ, Megerian CA. Treatment of glomus jugulare in patients with advance age: planned limited surgical resection followed by staged gamma knife radiosurgery: a preliminary report. *Otol Neurotol* 2005; 26: 1229-34.
12. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329: 2002-12.
13. Moncada S, Higgs A, Furchgott R. XIV International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 137-42.
14. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 10043-7.
15. Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 17-43.
16. van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga MK, Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract: epiphenomena or a pathobiologic mechanism of disease? *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 1-9.
17. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-18.
18. Bairoch A. The enzyme database in 2000. *Nuc Ac Res* 2000; 28: 45-8.
19. Batista CM, Carneiro K, De Bittencourt-Navarrete RE, Soares-Mota M, Cavalcante LA, Mendez-Otero R. Nitroergic dendrites in the superficial layers of the rat superior colliculus: retinal afferents and alternatively spliced isoforms in normal and deafferented animals. *J Neurosci Res* 2003; 71: 455-61.
20. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S. Cloning, characterization and expression of cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-23.
21. Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J. Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines. *J Biol Chem* 1996; 271: 27184-7.
22. Bloch KD, Wolfram JR, Brown DM, Roberts JD, Zapol DG, Lepore JJ, Filippov G, Thomas JE, Jacob HJ and Bloch DB. Three members of the nitric oxide synthase II gene family (NOS2A, NOS2B, and NOS2C) colocalize to human chromosome 17. *Genomics* 1995; 27: 526-30.
23. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1992; 307: 287-93.

24. Hubner N, Kreutz R, Rubattu S, Lee YA, Ganten D, Allen PD and Lindpaintner K. The gene encoding endothelial nitric oxide synthase, Nos3, maps to rat chromosome 4. *Mamm Genome* 1995; 6: 758-9.
25. Hanafy KA, Krumenacker JS, Murad F. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. *Med Sci Monit* 2001; 7: 801-19.
26. Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S. Constitutive and inducible nitric oxide synthase incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991; 266: 23790-5.
27. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
28. Xu W, Liu LZ, Loizidou M, Ahmed M, Charles IG. The role of nitric oxide in cancer. *Cell Res* 2002; 12: 311-20.
29. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12: 773-90.
30. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-33.
31. Guo FH, et al. Interferon γ and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest* 1997; 100: 829-38.
32. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273: 11038-43.
33. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2002; 277: 38079-86.
34. Guo FH, Comhair SA, Zheng S, Dweik RA, Eissa NT, Thomassen MJ, Calhoun W, Erzurum SC. Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. *J Immunol* 2000; 164: 5970-80.
35. Giovannelli J, Campos KL, Kulman S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase, does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7071-93.
36. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997; 100: 2146-52.
37. Ganster RW, Taylor BS, Shao L, David A. Geller. complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kB complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8638-43.
38. Sánchez-González DJ, Moro MA, Castillo-Henkel C, Hernández-Pando R, Medina-Santillán R, Larios FJ, Herrera-González N, Cobilt R, Blanco JA, Villanueva C. Ozone exposure induces iNOS expression and tyrosine nitration in rat aorta. *Environ Toxicol Pharmacol* 2004; 17: 1-7.
39. Mark D, Williams, Phillips MJ, Nelson WR, Rainer WG. Carotid body tumors. *Arch Surg* 1992; 127: 963-8.
40. Kusakabe T, Matsuda H, Harada Y, Hayashida Y, Gono Y, Kawakami T, Takenaka T: Changes in the distribution of nitric oxide synthase immunoreactive nerve fibers in the chronically hypoxic rat carotid body. *Brain Res* 1998; 795(1-2): 292-6.
41. Wang ZZ, Bredt DS, Fidone SJ, Stensaas LJ: Neurons synthesizing nitric oxide innervate the mammalian carotid body. *J Comp Neurol* 1993; 336 (3): 419-32.
42. Fung ML, Ye JS, Fung PC: Acute hypoxia elevates nitric oxide generation in rat carotid body in vitro. *Pflugers Arch* 2001; 442(6): 903-9.
43. Di Giulio C, Grilli A, De Lutiis MA, Di Natale F, Sabatino G, Felaco M: Does chronic hypoxia increase rat carotid body nitric oxide? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998; 120(2): 243-7.
44. Ye JS, Tipoe GL, Fung PC, Fung ML. Augmentation of hypoxia-induced nitric oxide generation in the rat carotid body adapted to chronic hypoxia: an involvement of constitutive and inducible nitric oxide synthases. *Pflugers Arch* 2002; 444(1-2): 178-85.
45. Kline DD, Prabhakar NR. Peripheral chemosensitivity in mutant mice deficient in nitric oxide synthase. *Adv Exp Med Biol* 2000; 475: 571-9.