

Marcadores biológicos en TNE-GEP: 5HIAA, Cromogranina sérica, Catecolaminas

Susana Belli

División Endocrinología del Hospital C Durand. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

Los tumores neuroendócrinos son aquellos que se originan en las células neuroendócrinas incluidas en glándulas como la hipófisis, la tiroides (células para-foliculares) o la médula suprarrenal, o bien dispersas en diversos órganos formando un sistema neuroendócrino difuso que incluye, entre otros, a las células neuroendócrinas de los islotes pancreáticos, del

hígado, del epitelio bronquial, del tubo digestivo, del timo, de la mama, de la próstata, de la vejiga, del cuello uterino y de la piel.

Las células neuroendócrinas localizadas a todo lo largo del tubo digestivo representan el grupo más grande de células hormono-productoras del organismo,¹ de allí que la mayoría de los tumores neuroen-

dócrinos se originen en el tracto gastrointestinal.¹ Estos tumores son infrecuentes, con una incidencia anual de 2,5-4,5 por 100.000 habitantes.²

Los tumores neuroendócrinos pueden ser esporádicos o formar parte de síndromes genéticos familiares que incluyen a la Neoplasia Endócrina Múltiple Tipo 1 (MEN-1) y Tipo2 (MEN-2), al Von Hippel Lindau, a la neurofibromatosis Tipo1, al Complejo de Carney y a los paragangliomas familiares.^{3,4}

Por su crecimiento lento e insidioso es frecuente que ya presenten metástasis al momento del diagnóstico especialmente en los ganglios regionales y/o en el hígado.⁵ La presentación clínica dependerá, entre otras variables, del tipo de secreción tumoral. En los tumores que secretan hormonas biológicamente activas (insulina, glucagon, ACTH, serotonina, polipéptido pancreático, gastrina, bombesina, histamina) el cuadro clínico específico orientará sobre la localización tumoral y, por consiguiente, influirá en el pronóstico. De esta manera, la hormona se convierte en un marcador tumoral de localización (por ejemplo, insulina) y para el seguimiento clínico. En otros casos el producto de secreción tumoral no tiene actividad biológica y no produce un cuadro clínico característico (por ejemplo, cromogranina A). Los marcadores hormonales bioquímicos pueden dividirse, de acuerdo a esto, en específicos e inespecíficos y son útiles para el diagnóstico y para el seguimiento tumoral.

Marcadores específicos

Los tumores carcinoides se originan en las células del sistema neuroendócrino difuso dispersas en el intestino y en el epitelio bronquial. Pueden sintetizar y secretar grandes cantidades de serotonina, taquiquininas, prostaglandinas, catecolaminas e histamina.^{6,7} Estas hormonas, particularmente la serotonina, son las causantes del síndrome carcinoide que frecuentemente presentan los pacientes con tumores carcinoides originados en el intestino delgado, el apéndice, el ciego y el colon proximal, pero es excepcional en los carcinoides del tracto respiratorio. Los tumores carcinoides del intestino alto (tracto respiratorio, estómago, tracto biliar, duodeno y páncreas) sintetizan menos serotonina que los del intestino medio y los del intestino bajo (colon distal y recto), excepcionalmente lo hacen, aunque sí pueden producir su precursor, el 5 hidroxitriptofano.^{8,10,11}

De la metabolización de la serotonina se origina el 5 hidroxindolacético (5 OHIA) que puede ser medido en una recolección de orina de 24hs. Es utilizado como marcador para el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes con síndrome carcinoide. La concentración urinaria de 5 OHIA se correlaciona con la severidad de la enfermedad cardíaca carcinoide y con el pronóstico clínico.⁹ Ciertas drogas y alimentos pueden modificar la excreción de 5 OHIA si éstos son ingeridos justo antes de la recolección de orina. Pueden causar falsos positivos la banana, la palta (aguacate), el ananá (piña), las arvejas (chícharos), las ciruelas, las nueces, paracetamol, fluoracilo, metisergide, naproxeno y la cafeína. En tanto que levodopa, aspirina, ACTH, metildopa y fenotiazinas pueden dar falsos negativos. La determinación plasmática o urinaria de la serotonina no se utiliza en forma rutinaria.

La enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) está presente tanto en la vía de síntesis de la serotonina (transforma al 5 hidroxitriptofano en serotonina) como en la vía de síntesis de las catecolaminas (transforma a la Dopa en dopamina). En los tumores carcinoides se han detectado por inmunohistoquímica otras enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas como la tirosina hidroxilasa, la dopamina beta hidroxilasa y la catecolometiltransferasa, estas dos últimas responsables de la síntesis de noradrenalina y de adrenalina, respectivamente. A su vez, en algunos pacientes con tumores carcinoides se ha detectado un incremento de la excreción urinaria de dopamina, noradrenalina y adrenalina.¹⁰ Esta capacidad de los tumores carcinoides de producir catecolaminas podría tener consecuencias clínicas dependiendo de la cantidad y del tipo de catecolamina sintetizada. Tendrían un rol en el *flushing* típico del síndrome carcinoide¹¹ y en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.¹² Las catecolaminas podrían estimular directamente la secreción de serotonina a través de los receptores β adrenérgicos tumorales y así desencadenar la crisis carcinoide. Confirmar la secreción de catecolaminas en un tumor carcinoide podría modificar la estrategia terapéutica, agregando α bloqueantes al tratamiento con análogos para evitar los riesgos de la hipovolemia post-resección tumoral.

Otros marcadores específicos permiten definir la identidad del tumor hallado como el polipéptido vasointestinal (VIP) en el vipoma y el glucagon en el glucagonoma.

Marcadores inespecíficos

Entre los marcadores no específicos el más importante es la cromogranina A. En las neuronas y en las células neuroendócrinas las hormonas peptídicas, las aminas biógenas y los neurotransmisores son acumulados en vesículas conjuntamente con proteínas acídicas solubles denominadas graninas. La familia de las "graninas" está formada por la cromogranina A (CgA), la cromogranina B y las secretograninas II a VI.

La CgA es una glicoproteína acídica de 439 aminoácidos con una masa molecular de 49 kilodalton. Contiene 10 pares de aminoácidos básicos, sitios potenciales de clivaje por proteasas endógenas específicas, lo que la convierte en una molécula precursora de péptidos activos.¹³ Los péptidos bioactivos generados en los tejidos actuarían en forma parácrina y/o autócrina regulando la función de la célula en la que residen, pero al ser liberados a la circulación también podrían cumplir una función endócrina.

Los tumores, como la célula normal, liberan a la circulación CgA intacta y fragmentos del clivaje.

La CgA está presente en el interior de los gránulos densos de secreción donde es coacumulada y cosecretada con las aminas y péptidos residentes en la célula neuroendócrina.¹⁴ Es detectable en los tejidos con inmunohistoquímica y es un marcador sensible y específico para develar la naturaleza neuroendócrina de una célula y, por lo tanto, de un tumor. La CgA es liberada en el proceso de exocitosis y, por lo tanto, puede ser medida en sangre, suero o plasma.

Fisiológicamente la CgA circulante proviene fundamentalmente de la médula suprarrenal donde es liberada conjuntamente con la adrenalina y noradrenalina. Durante la activación intensa del sistema simpatoadrenal, por ejemplo en la hipoglucemia insulínica o en el ejercicio extremo, la concentración plasmática de CgA aumenta menos de dos veces la concentración basal.¹³ Esta condición de ser una sustancia con una concentración estable la convierte en un marcador tumoral, ya que si se desarrolla un tumor neuroendócrino, éste se convierte en la fuente principal de la CgA circulante.^{14,15}

Desde mediados de la década del '80 la CgA ha demostrado ser un excelente marcador para el diagnóstico y el seguimiento de los tumores neuroendócrinos. Se han desarrollado diversos ensayos para la medición que utilizan anticuerpos capaces de detectar a la molécula intacta de CgA y a sus fragmentos circulantes.¹⁶ La separación cromatográfica de extractos de tejidos ha confirmado que la extensión

del procesamiento de la CgA es diferente en cada tejido neuroendócrino con un clivaje más extenso en los islotes pancreáticos que en la médula suprarrenal. Los tumores neuroendócrinos también liberan diversas formas moleculares de la CgA. Esta diversidad antigénica (cromogranina intacta y sus fragmentos) debe tomarse en cuenta en la construcción del ensayo de CgA y en la evaluación de los resultados obtenidos con los diferentes *kits* comerciales.¹⁷

Los equipos comerciales disponibles difieren en el anticuerpo utilizado: monoclonal o policlonal; y en el método de lectura: sandwich ELISA, RIA competitivo¹⁸ o el IRMA de dos pasos.¹⁹ La estandarización de los ensayos también es diferente: CgA recombinante humana producida por la *Escherichia coli*, fragmentos de CgA humana (23kDaC-terminal), una fracción purificada de CgA extraída de la orina de pacientes con tumores carcinoides o anticuerpos policlonales obtenidos en conejo. Los resultados se expresan en diferentes unidades: ng/ml, U/l, nmol/l. Puesto que cada *kit* comercial utiliza fuentes diferentes para los *standards* y también difiere en la estandarización, en consecuencia cada laboratorio debe establecer el rango normal del inmunoen ensayo empleado. Esta ausencia de estándares internacionales dificultan los estudios multicéntricos y la comparación de los resultados.

El nivel circulante de CgA se halla en la mayoría de los tumores neuroendócrinos muy por encima del rango normal, por lo que falsos positivos y negativos no suelen ser un problema clínico.²⁰ La CgA es fisiológicamente metabolizada por el hígado y depurada por el riñón, por lo que en los pacientes con insuficiencia renal (creatinina > 4,5mg/%), enfermedad inflamatoria intestinal, insuficiencia hepática (bilirrubina 4,7mg/%), gastritis crónica atrofica o que ingieren crónicamente inhibidores de la bomba puede estar espúreamente elevada.¹⁷

La CgA es un marcador inespecífico que no diferencia el subtipo tumoral. Se ha convertido en el marcador tumoral en todos los pacientes con tumores neuroendócrinos tanto para el diagnóstico como para el seguimiento. En los tumores que producen hormonas (por ejemplo, insulina, gastrina) éstos son los marcadores específicos. La CgA tiene una indicación clínica particularmente importante en los tumores neuroendócrinos no funcionantes o que secretan productos que no están disponibles en el laboratorio de rutina.¹⁷ En los pacientes con MEN1 es necesaria la detección temprana del tumor pan-

creático porque influye significativamente en el pronóstico de vida. La CgA sería un marcador precoz y específico del tumor pancreático, puesto que aún en presencia de un tumor hipofisario o de hiperparatiroidismo los niveles serían normales^{20,21} o ligeramente elevados.²²

Con los equipos comerciales disponibles actualmente para la determinación de CgA la sensibilidad referida en la bibliografía está entre el 67 y el 93%,^{23,24,25} con una especificidad muy alta, entre el 80 y el 100%,^{17,24} lo que indica que la CgA tiene un gran valor diagnóstico para identificar la característica neuroendócrina de un tumor, especialmente cuando éste no secreta ninguna hormona específica.²⁶ Los niveles de CgA están aumentados en la mayoría de los pacientes con tumores metastásicos tanto en los carcinoides (de intestino alto y medio) como en los tumores del islote pancreático. Se observa una correlación positiva significativa entre la concentración plasmática de CgA y el volumen tumoral en la mayoría de los tumores neuroendócrinos, excepto en el gastrinoma en el cual la CgA está aumentada aunque el volumen tumoral sea pequeño. La concentración sérica de CgA habitualmente es normal en los pacientes con pequeños insulinomas. Estos tumores se diagnostican en etapas precoces de su evolución oncológica a causa de los síntomas secundarios a la secreción autónoma de insulina, que es el marcador de elección para el diagnóstico y el seguimiento.

Las determinaciones seriadas de CgA son indispensables para evaluar la respuesta terapéutica en el seguimiento a largo plazo. Durante la administración de análogos de somatostatina el incremento de CgA es un marcador de progresión de enfermedad.²⁶ La cromogranina es una molécula muy estable que soporta repetidas congelaciones y descongelaciones, lo cual es ventajoso para la medición en el laboratorio.

Otro marcador neuroendócrino inespecífico es la Enolasa Neuronal Específica (NSE), un isómero de la enzima glicolítica enolasa (2 fosfo-D-glicerato hidroxilasa). Está presente en las neuronas, en las células neuroendócrinas y en los tumores que se originan en ellas, por lo que podría ser un marcador útil en el seguimiento de los tumores que derivan de estas células. Es menos sensible que la CgA ya que sólo está elevada en el 17 al 47% de los pacientes. Niveles muy elevados de NSE se observan exclusivamente en tumores pobremente diferenciados.^{21,23} Las taquiquininas, como la neuroquinina A y la sustancia P, estarían involucradas en el aumento de la motilidad intestinal, en la vaso-

dilatación y el *flushing* que caracteriza a los tumores carcinoides del intestino medio. Los niveles de neuroquinina A están aumentados aproximadamente en la mitad de los pacientes con tumores de intestino medio. Existiría una correlación estrecha entre la concentración plasmática de neuroquinina A, la agresividad y el pronóstico tumoral. Con determinaciones seriadas podría seleccionarse a aquellos pacientes con tumores más agresivos y, por ende, pasibles de tratamientos más enérgicos.²⁴

La gonadotropina coriónica humana (HCG) es una glicoproteína sintetizada durante el embarazo por las células trofoblásticas placentarias. Está formada por dos subunidades, β que le da la especificidad de acción y α que comparte con otras hormonas glicoproteicas (FSH, LH, TSH). La HCG sólo está presente en la circulación durante el embarazo y en el curso de un tumor que deriva del trofoblasto (mola, coriocarcinoma). Una pequeña proporción de los tumores neuroendócrinos no funcionantes secretan HCG (α/β) particularmente en tumores a células pequeñas del pulmón y tumores de recto, aunque en concentraciones significativamente menores que en los tumores trofoblásticos.²⁵

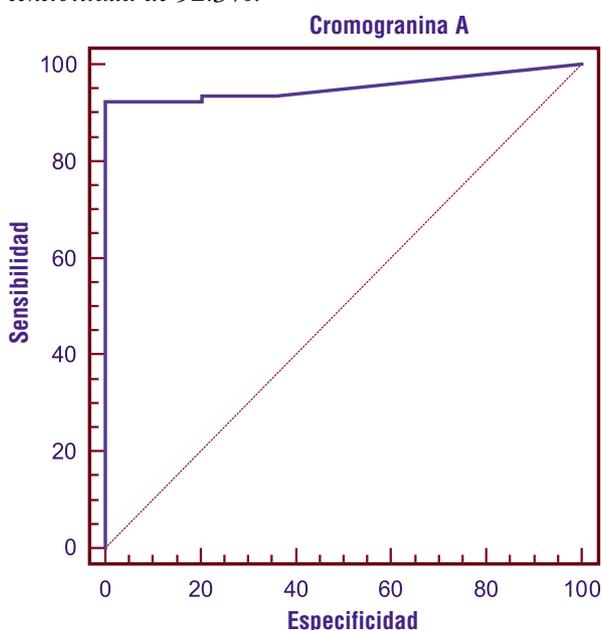
Se ha publicado sobre el uso diversos marcadores bioquímicos que aún no forman parte de la rutina diagnóstica, pero que son prometedores para continuar investigando con mayor número de casos: el polipéptido pancreático (PP), que está aumentado aproximadamente en el 80% de los tumores pancreáticos y en la mitad de los pacientes con tumores carcinoides,²¹ la ghrelina, una hormona gastrointestinal que también está aumentada en pacientes con tumores neuroendócrinos,²⁶ la adrenomedulina, una hormona polipeptídica involucrada en la angiogénesis y la vasodilatación que podría llegar a constituirse en un marcador de progresión tumoral.²⁷

En nuestra condición de miembros del grupo ARGENTUM realizamos un estudio multicéntrico para la medición de CgA en tumores neuroendócrinos, para ello recibimos muestras de seis centros de la Capital y de la Ciudad de La Plata desde agosto del 2006 hasta diciembre del 2007. Las determinaciones fueron realizadas por la Dra Adriana Oneto en la División Laboratorio del *Hospital Carlos Durand*.

Para la medición utilizamos un *kit* comercial RIA (Biosource- Bélgica) con un anticuerpo policlonal que reconoce CgA intacta y sus fragmentos (AA116-439), que no cruza con ningún otro pépti-

do intestinal ni con la somatostatina. El coeficiente de variación intraensayo fue del 9,1% y el límite de detección fue de 0,4nmol/l. Establecimos el valor de corte que separaba adecuadamente la población enferma de la sana construyendo una curva ROC (*Receiver-Operating Characteristic*) con 39 sujetos normales (20 hombres, 19 mujeres edad media 32 años, rango 16-75). El valor de corte era de 2,8 nmoles/l, con una sensibilidad de 92,5% y una especificidad del 100% (Figura 1).

Figura 1. Curva ROC (*Receiver-Operating Characteristic*), un valor de corte de 2,8 nmol/l es capaz de discriminar entre los sujetos control y los pacientes con enfermedad activa con un 100% de especificidad y una sensibilidad de 92.3%.

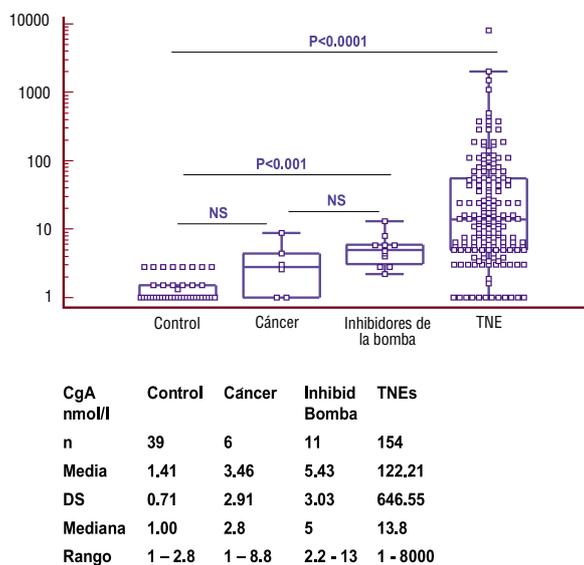


Determinamos la CgA en 154 sujetos con una edad media de 53 años (13-78), 119 pacientes con tumores gastroenteropancreáticos (TNE-GEP), 8 pacientes con carcinoma medular de tiroides y 27 pacientes con tumores neuroendócrinos diversos (pulmón, próstata, ovario, feocromocitoma, Merckeloma).

Para evaluar si nuestra metodología podía identificar a los pacientes portadores de tumores neuroendócrinos tomamos muestras de la población control, de pacientes con cáncer no neuroendócrino de cualquier localización, pacientes que estaban bajo tratamiento con inhibidores de la bomba de protones y pacientes con tumores neuroendócrinos de reciente diagnóstico y en seguimiento crónico. Observamos que en los pacientes con TNE-GEP la

concentración de CgA era significativamente más alta que en el resto de las poblaciones pese a la gran dispersión en la concentración, con un rango entre 1y 8000 nmol/l y una distribución no normal. Como era de esperar no hubo diferencia entre la población control y los pacientes con cáncer no neuroendócrino. Los inhibidores de la bomba aumentaban significativamente la CgA, pero los valores eran sensiblemente más bajos que en los pacientes con tumores neuroendócrinos (Figura 2).

Figura 2. Concentración plasmática de la CgA en la población de sujetos control, pacientes con cáncer no neuroendócrino, pacientes bajo tratamiento con inhibidores de la bomba de protones y pacientes con TNE-GEP.



Pudimos verificar, tal como estaba referido, que la concentración de CgA estaba relacionada con el volumen de enfermedad, ya que los pacientes metastáticos tenían valores significativamente más altos que aquellos que tenían la enfermedad localizada (Figura 3).

En contraposición con lo referido por la bibliografía, no observamos diferencias en el nivel de CgA cuando el paciente tenía una enfermedad gastrointestinal respecto de aquel con enfermedad de localización pancreática (Figura 4).

Los pacientes con tumores funcionantes tenían mayor concentración de CgA que los pacientes con tumores no funcionantes. Cuando se analizó esta condición en relación con la extensión de la enfer-

Figura 3. Concentración plasmática de la CgA en pacientes con TNE-GEP de acuerdo a la extensión de la enfermedad.

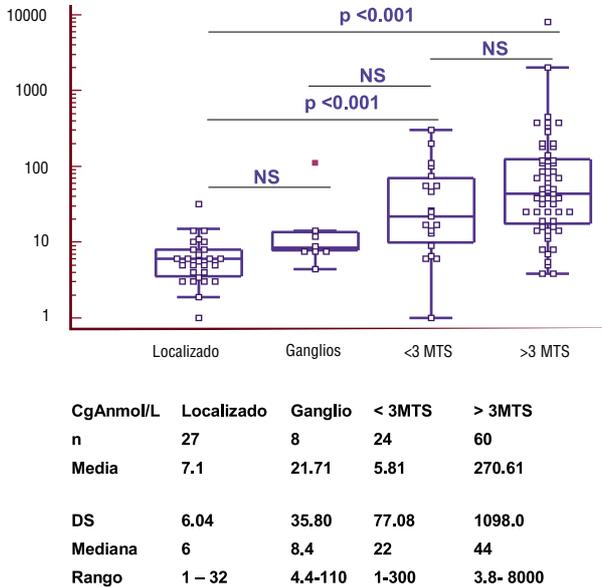
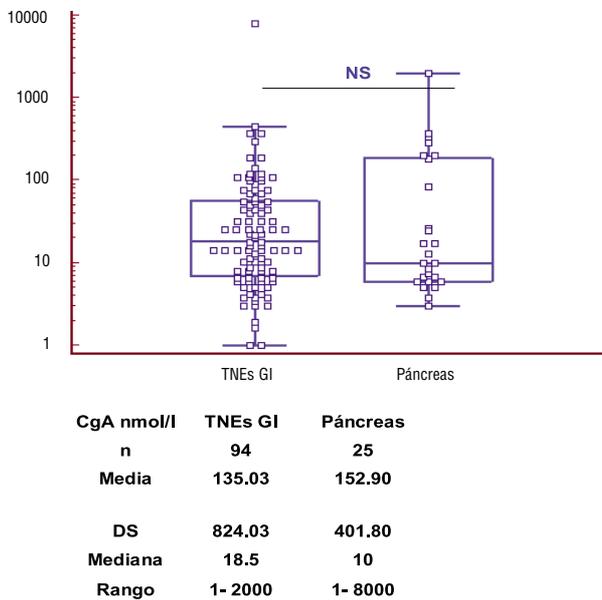


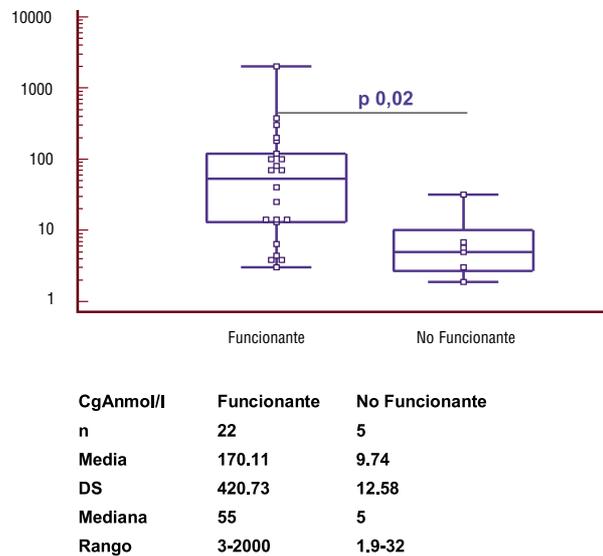
Figura 4. Concentración plasmática de la CgA en pacientes con TNE del tracto gastrointestinal (TNEs GI) y del páncreas.



medad, observamos que la CgA era más elevada cuanto más extenso era el volumen, independientemente de la condición funcional (Figura 5).

En conclusión, hasta el momento la CgA debe ser considerada como el mejor marcador tumoral inespecífico para el diagnóstico y seguimiento de los tumores neuroendócrinos.

Figura 5. Concentración plasmática de la CgA en relación con la condición funcional del TNE-GEP.



Referencias

1. Rehfeld JF. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev* 1998;78:1087-1108.
2. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003;15:97:934-959.
3. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:1-18.
4. Thakker RV. Genetics of non-gastro-entero-pancreatic (GEP). Neuroendocrine tumors (NETs) in Modlin IM, Obérg K eds in neuroendocrine tumor biology and treatment. 1st ed Felsenstein 2007;192-199.
5. Granberg D, Obérg K. Neuroendocrine tumours. Update on Cancer Therapeutics 2006;1:75-84.
6. Caplin ME, Buscombe JR, Hilsen AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK. Carcinoid tumour. *Lancet* 1998;352:799-805.
7. Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumours. *N Engl J Med* 1999;340:858-868.
8. de Herder WW. Tumours of the midgut (jejunum, ileum and ascending colon, including carcinoid syndrome). *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:705-715.
9. Zuetenhorst JM, Bonfrer JM, Korse CM, Bakker R, van Tinteren H, Taal BG. Carcinoid heart disease: the role of urinary 5-hydroxyindoleacetic acid excretion and plasma levels of atrial natriuretic peptide, transforming growth factor-beta and fibroblast growth factor. *Cancer* 2003;97: 1609-1615.
10. Meijer WG, Copray SC, Hollema H, Kema IP, Zwart N, Mantingh-Otter I, Links TP, Willemsse PH, de Vries EG. Catecholamine-synthesizing enzymes in carcinoid tumors and pheochromocytomas. *Clin Chem* 2003;49:586-593.
11. Matuchansky C, Launay JM. Serotonin, catecholamines, and spontaneous midgut carcinoid flush: plasma studies from flushing and nonflushing sites. *Gastroenterology* 1995;108:743-751.

12. Hoffmann J, Grimm W, Menz V, Wied M, Sprenger A, Arnold R, Maisch B. Prognostic value of heart rate variability analysis in patients with carcinoid syndrome. *Digestion* 2001;63:35-42.
13. Deftos LJ. Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev* 1991;12:181-187.
14. O'Connor DT, Deftos LJ. Secretion of chromogranin A by peptide-producing endocrine neoplasms. *N Engl J Med* 1986;314:1145-1151.
15. Eriksson B, Oberg K, Stridsberg M. Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion* 2000;62(Suppl 1):S33-S38.
16. Stridsberg M. Measurements of chromogranins and chromogranin-related peptides by immunological methods. *Adv Exp Med Biol* 2000;482:319-327.
17. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *J Endocrinol* 2003;177:337-341.
18. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *J Endocrinol* 2003;177:337-341.
19. Zatelli MC, Torta M, Leon A, Ambrosio MR, Gion M, Tomassetti P, De Braud F, Delle Fave G, Dogliotti L, degli Uberti EC; Italian CromaNet Working Group. Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:473-482.
20. Nehar D, Lombard-Bohas C, Olivieri S, Claustrat B, Chayvialle JA, Penes MC, Sassolas G, Borson-Chazot F. Interest of Chromogranin A for diagnosis and follow-up of endocrine tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;60:644-552.
21. Gussi IL, Young J, Baudin E, Bidart JM, Chanson P. Chromogranin A as serum marker of pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59:644-648.
22. Peracchi M, Conte D, Gebbia C, Penati C, Pizzinelli S, Arosio M, Corbetta S, Spada A. Plasma chromogranin A in patients with sporadic gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors or multiple endocrine neoplasia type 1. *Eur J Endocrinol* 2003;148:39-43.
23. Baudin E, Gigliotti A, Ducreux M, Ropers J, Comoy E, Sabourin JC, Bidart JM, Cailleux AF, Bonacci R, Ruffié P, Schlumberger M. Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 1998;78:1102-1107.
24. Turner GB, Johnston BT, McCance DR, McGinty A, Watson RG, Patterson CC, Ardiff JE. Circulating markers of prognosis and response to treatment in patients with midgut carcinoid tumours. *Gut* 2006;55:1586-1591.
25. Öberg K. Carcinoid Tumors: Current Concepts in Diagnosis and Treatment. *Oncologist* 1998;3:339-345.
26. Corbetta S, Peracchi M, Cappiello V, Lania A, Lauri E, Vago L, Beck-Peccoz P, Spada A. Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3117-3120.
27. Pavel ME, Hoppe S, Papadopoulos T, Linder V, Mohr B, Hahn EG, Lohmann T, Schuppan D. Adrenomedullin is a novel marker of tumor progression in neuroendocrine carcinomas. *Horm Metab Res* 2006;38:112-118.