

**XX Congreso Nacional
de la Sociedad Española de
Anatomía Patológica (Patología)**

Edición de carácter no venal

Copyright: Sociedad Española de Anatomía Patológica

Dep. Leg.: NA 1870/2001

Imprime: Imprenta Ainzúa, S.L. – Tafalla (Navarra)

ISBN: 84-699-5285-4

**XX Congreso Nacional
de la Sociedad Española de
Anatomía Patológica (Patología)**

Pamplona, 1-5 de julio de 2001

**Conferencias
Ponencias
Simposios
Cursos Cortos
Mesas Redondas
Talleres**

Editores: A. Puras
 F. García-Bragado
 C. de Miguel
 A. López Cousillas
 Y. Laplaza
 E. Urbiola

ÍNDICE

PRESENTACIÓN

A. Puras 12

CONFERENCIAS:

Aspectos de la Vida y la Obra de Miguel Servet.
Francisco Javier González 13

Conferencia inaugural: Avenidas de luz para la Patología española.
Alberto Anaya 23

Carcinoma de mama en mujeres jóvenes. ¿Una enfermedad diferente?.
María Merino 23

Aportación de la biopsia testicular al estudio de la infertilidad masculina.
Manuel Nistal 30

Conferencia Conmemorativa "Pío del Río Horteiga": Rol de la Histología como inspiradora, guía y celadora de la Biología
Juan Rosai 30

SESIÓN PLENARIA

LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA EN EL NUEVO MILENIO.

Patólogos y Oncólogos: Ante un objetivo común.
Pilar España 33

Patología Molecular; la integración de las alteraciones moleculares en la morfología
Xavier Matías Guíu 35

Patología Tumoral: Integración de datos clínicos, patológicos, inmunofenotípicos y moleculares.
Santiago Ramón y Cajal Agüera 37

Genómica y bancos de tumores.
Miguel Angel Piris 40

SESIONES PLENARIAS SATÉLITES

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LA MAMA.

Diez años de programa de diagnóstico precoz de cáncer de mama en Navarra.
Nieves Ascunce 44.

Actualización sobre factores pronósticos del cáncer de mama.
María Merino 46

El ganglio centinela y la búsqueda de micrometástasis.
Francisco Tresserra 51

Microchips y cáncer de mama.
Ginesa García Rostán 53

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS SUPERIORES E INFERIORES

Formas histológicas especiales del carcinoma de laringe.
Cosme Ereño 56

Nueva clasificación de las lesiones premalignas laríngeas.
Luisa Alós 59

Patología molecular del carcinoma de laringe.
Antonio Cardesa 61

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA OSTEOARTICULAR.

Avances en el diagnóstico de los tumores de los tejidos blandos. <i>Ricardo Gonzalez Cámpora.</i>	64
Valor diagnóstico de la Biología Molecular en el diagnóstico de los tumores de partes blandas. <i>Enrique de Alava.</i>	66
Avances en la Patología de los tumores óseos. <i>Franco Bertoni.</i>	70

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA GINECOLÓGICA.

Nuevos marcadores de receptividad endometrial. <i>Jaume Ordí.</i>	71
Valor predictivo pronóstico del la apoptosis y factores biológicos involucrados en la regulación del ciclo celular en las neoplasias ováricas de tipo epitelial. <i>Angel García.</i>	73
Patología Molecular en el cáncer endometrial. <i>José Palacios.</i>	77

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA UROLÓGICA.

Traslación de la investigación básica a la práctica médica. <i>Ferrán Algaba.</i>	80
Actual clasificación de los tumores renales. Bases morfológicas. <i>Fernando Val Bernal.</i>	81
Variantes clínicopatológicas del carcinoma urotelial. Sus fundamentos morfológicos. <i>Antonio López Beltrán.</i>	83
Historia natural del cáncer de próstata. Su relación con la morfolología del acino. <i>Ferrán Algaba.</i>	86

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA LINFOIDE.

Nuevas técnicas en citogenética. Del cariotipo a la matriz de expresión. <i>Juan Cruz Cigudosa.</i>	89
El impacto de la tecnología de los microchips de DNA en la comprensión de los procesos linfoproliferativos. <i>Andreas Rosenwald.</i>	94
Influencia del diagnóstico anatomopatológico en el manejo clínico de los linfomas y nuevas terapéuticas biológicas en el tratamiento de los linfomas. <i>Itziar Ezpeleta y A Elósegui.</i>	95

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DEL APARATO DIGESTIVO

Problemas diagnósticos en el esófago de Barrett. <i>Julio Torrado, Manuel Manrique y Jose María Martínez Peñuela.</i>	100
Biología molecular en el estudio de los tumores del estroma gastrointestinal. <i>Iosu Sola y Angel Panizo.</i>	106
Correlación entre ecografía endorrectal y anatomía patológica en la estadificación parietal y linfoganglionar del cáncer de recto. <i>Javier Ortego.</i>	111
Helicobacter y cáncer de estómago. <i>Ana Echarri y Jose María Martínez Peñuela.</i>	116

SIMPOSIOS

LESIONES DERMATOPATOLÓGICAS RELACIONADAS CON LA RADIACIÓN SOLAR.

Lesiones inflamatorias cutáneas. <i>Jesús Cuevas.</i>	121
Lesiones epiteliales cutáneas. <i>Jose Luís Rodríguez.</i>	124
Lesiones pigmentarias cutáneas. <i>Félix Contreras.</i>	126

NUEVAS TECNOLOGÍAS EN CITOPATOLOGÍA

Biología Molecular en Citología. <i>María Dolores Lozano.</i>	129
Citometría de flujo en PAAF y líquidos. <i>Pedro de Agustín.</i>	133
Detección de células malignas circulantes en sangre periférica. <i>Ernesto García Ureta.</i>	135
Automatización en el diagnóstico citopatológico. <i>Jose Antonio Gimenez Mas.</i>	141
Detección de HPV. <i>Enrique Lerma.</i>	142
Evaluación tecnológica en Citopatología. Aplicaciones prácticas. <i>Hugo Galera</i>	143

PATOLOGÍA AUTÓPSICA

Utilidad de un Registro de Autopsias. <i>Isabel Guerra.</i>	148
La Autopsia en el Nuevo Ciclo Formativo grado Superior de Anatomía Patológica y Citología. <i>Isabel Jáuregui Vicente</i>	152
Relación con la Patología Forense. <i>Hugo Argüello y Ernestina Cua</i>	155
Patología Forense e Institutos de Medicina Legal. Oportunidad para un reencuentro con la Patología Clínica. <i>José Aso y Rafael Teijeira.</i>	156

INMUNOPATOLOGÍA.

Determinación del perfil molecular en cáncer en un experimento único. Aplicaciones clínicas. <i>Gemma Moreno-Bueno</i>	158
---	-----

CURSOS CORTOS

NEUROPATOLOGÍA.

Aproximación al diagnóstico neuropatológico de las demencias. Amiloide β 4, taupatías, alfa-sinucleinopatías y prionopatías <i>Isidro Ferrer.</i>	161
Neuro y miopatías inflamatorias. Importancia de su diagnóstico para un tratamiento correcto. <i>Carmen Navarro.</i>	164
Encefalopatías espongiiformes. Criterios de diagnóstico y protocolos de actuación. <i>T. Muñón, I Amat, G Delgado.</i>	168
Gliomas. Factores pronósticos. <i>Miguel Idoate.</i>	174

PATOLOGÍA OSTEOARTICULAR NO NEOPLÁSICA.

Enfermedades metabólicas: estudio de los osteoblastos en pacientes con HIV-1. <i>Sergio Serrano.</i>	179
Enfermedades metabólicas: osteodistrofia renal. <i>Fernando López Barea.</i>	180
Osteonecrosis. <i>Juan Carlos Lorenzo Roldán</i>	183

Lesiones fibrosas y fibrohistiocíticas óseas no neoplásicas. <i>Imelda González Mediero.</i>	185
Enfermedades sistémicas. <i>José Vila Torres.</i>	188
Quistes óseos. <i>Javier Pérez Villanueva.</i>	189
Patología sinovial. <i>Juan María Loizaga Iriondo.</i>	191
Patología en relación con las prótesis articulares. <i>Fernando López Barea</i>	195
Enfermedades articulares. <i>Francisco J. Martínez Tello</i>	198

REGISTROS HOSPITALARIOS DE TUMORES (RHT).

Información general sobre cáncer. Situación de los registros de cáncer en España. <i>Teresa Cuchí.</i>	202
Métodos de trabajo. <i>M^a Victoria Folgueras.</i>	207
Control de calidad e información generada por los RHT. <i>Francisco Colina</i>	211
Presente y futuro de los RHT. <i>Alfredo Matilla.</i>	215

PATOLOGÍA HEPÁTICA

Valoración de la biopsia hepática post-reperfusión en el trasplante. <i>Helena Allende.</i>	218
Nódulos hepatocelulares :“Guía Diagnóstica”. <i>Francisco Colina.</i>	221
Patología en la pieza de retrasplante. <i>Clara Salas, Josefina Menéndez y Alberto .Anaya.</i>	226

PATOLOGÍA PEDIÁTRICA.

Hepatoblastoma. <i>Helena Allende.</i>	230
---	-----

MESAS REDONDAS

CODIFICACIÓN EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

La Codificación en los Sistemas de Información de Anatomía Patológica. <i>Marcial García Rojo</i>	234
El Impacto de las Nuevas Generaciones de SNOMED en la recolección y análisis de datos en Anatomía Patológica. <i>Alan March y Guillermo A. Reynoso</i>	238

LA PATOLOGÍA ANTE LAS TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN Y DE LA COMUNICACIÓN

Entornos virtuales en Formación continuada. <i>Andrés Sampedro.</i>	241
--	-----

HISTORIA DE LAS ENCEFALOPATÍAS TRANSMISIBLES EN PATOLOGÍA VETERINARIA Y HUMANA.

Perspectiva histórica de las ETT humanas: desde el kuru a la nueva variante. <i>Aurelio Ariza.</i>	246
Encefalopatías espongiiformes animales. <i>José Antonio García de Jalón</i>	247

TALLER DE GESTIÓN

NUEVOS PROFESIONALES Y NUEVAS TECNOLOGÍAS.

Contribución del Análisis de Imagen 3D al diagnóstico del Carcinoma Mamario.
Carlos Ortiz de Solórzano 252

Formación en Citología: metodología convencional.
José Viquer 257

EL PATÓLOGO Y EL HOSPITAL

Calidad en Sanidad.
Jorge Escandón. 258

Perspectivas profesionales. El subempleo y la carrera profesional.
José Angel Muniesa y Dr. Juan Enrique Serra. 260

PRESENTACION

ANA M^a PURAS GIL
PRESIDENTA DEL COMITÉ ORGANIZADOR
PRESIDENTA DE LA SEAP

El XX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica queremos que sea un foro de encuentro y comunicación entre los patólogos españoles. Vuestra participación será definitiva para el éxito del Congreso.

Aunque nos hubiese gustado que las actividades científicas simultáneas fueran escasas, llevarlo a cabo no ha sido posible dado el número cada vez mayor de Clubes y Grupos de trabajo que deben ser escuchados; esperamos que el contenido sea del agrado de todos y responda a las expectativas de transmitir y recibir conocimientos.

La Conferencia Inaugural correrá a cargo de Alberto Anaya, Fundador de nuestra Revista y persona clave en la incorporación de nuestra especialidad a todos los Hospitales. Maestro de varias generaciones, de sus reflexiones esperamos buenos augurios para las generaciones más jóvenes.

Queremos destacar la importancia que hemos dado a exponer nuestro relevante papel en el manejo del cáncer, no sólo desde el punto de vista diagnóstico, sino de la protocolización, pronóstico y respuesta a terapias. Así, en la Sesión Plenaria y en las Sesiones de Patología Oncológica especialmente dirigidas a las neoplasias con mayor impacto social, serán revisados todos esos puntos. El reconocimiento de nuestra especialidad como elemento clave en la lucha contra el Cáncer, debe afianzarse en la Sociedad médica e investigadora del siglo XXI.

En conjunto, en el Programa, se puede observar que contamos con ilustres Conferenciantes sobre temas de actualidad; tanto Clubes, como Ponentes, Coordinadores, o Moderadores de Conferencias o Seminarios, han contribuido a que podamos mostrar un Programa variado. Los Grupos de Trabajo han incorporando a sus debates temas sobre los nuevos modelos de Gestión, sobre la Docencia en la Universidad o sobre los Registros de Tumores, entre otros. Cerrando el Programa Científico, Juan Rosai; con la Lección Pío del Río Hortega y el Seminario de Patología Tumoral contribuirá a un final espléndido.

Además, hemos introducido en nuestro Congreso una novedad que esperamos tenga una buena acogida; se trata de las "Reuniones con el Experto", un breve encuentro a primera hora de la mañana, en la que un compañero expondrá de manera coloquial, un tema controvertido o de actualidad, que previamente se anunciará en los Carteles informativos.

Con el fin de que las Tecnologías de la Comunicación estén al alcance de todos, para un mejor intercambio de conocimientos, hemos pedido al Club Informático de la SEAP que a través de un Manual de Telepatología, nos informe acerca de los medios telemáticos a nuestro alcance. Otros dos Manuales, hechos también por expertos, serán entregados en el Congreso: uno sobre Interpretación de la Biopsia Testicular en la Infertilidad y otro sobre Protocolos en Uropatología. A todos ellos les agradecemos especialmente su esfuerzo, ilusión y colaboración.

Se van a difundir, vía Internet, las principales Conferencias, para que los que no puedan estar presentes tengan la oportunidad de sentirse partícipes, a pesar de la distancia.

Hemos puesto gran ilusión en el Programa social, pues creemos que es parte fundamental para estrechar lazos de colaboración y amistad; y lo hemos incluido en su totalidad en la cuota de inscripción. Hacemos un recorrido por Navarra, variada en tierras y costumbres y siempre acogedora. Pamplona, Sede del Congreso y ciudad habitualmente cuidada y tranquila, con tres Universidades, espera expectante el comienzo de sus Fiestas que la transformarán sustancialmente. Esperamos que de todo ello guardéis un grato recuerdo.

Nuestro agradecimiento, el del todo el Comité Organizador, a todos los participantes. También a la Agencia de Viajes que ha formado un equipo con nosotros; y a las Casas Comerciales y Entidades Colaboradoras diversas que han patrocinado, o han contribuido a que este Congreso se lleve a cabo. Les deseamos lo mejor, que la Exposición Comercial sea un éxito y que su estancia les resulte muy grata. A las Instituciones Navarras, Gobierno de Navarra y a su Departamento de Salud, Ayuntamientos de Pamplona y Tudela y de manera especial a la Universidad Pública de Navarra y a la Dirección de la U.N.E.D., y al Hospital Virgen del Camino, por su generoso apoyo a lo largo de la preparación del Congreso; y a Celia y Maite, por su esfuerzo en interpretar hasta nuestro pensamiento para que todo salga bien. Todos ellos nos han ayudado a elaborar este Programa.

Y a todos, BIENVENIDOS

CONFERENCIAS

ASPECTOS DE LA VIDA Y LA OBRA DE MIGUEL SERVET.

Francisco Javier González Echeverría y Teresa Ancín H. Reina Sofía. Tudela (Navarra)

Miguel Serveto (¿1511?- 1553) fue un gran humanista, que en muchos aspectos revolucionó los saberes, pues fue: médico, padre de la farmacología, geógrafo, astrólogo, matemático, exégeta y teólogo, traductor al español y corrector de imprenta, gramático y pedagogo, y en todos los campos del saber destacó y, creemos, que aún no hemos descubierto todas sus obras, ni la totalidad de su vida, en particular su infancia y juventud en aquella corte itinerante de Carlos V al que conoció. Generalmente se le conoce por ser el descubridor, para Occidente, de la circulación menor y que murió en Ginebra, quemado, en un juicio en el que estuvo Calvino.

Pocas personalidades tan complejas como la de Miguel Servet, y no sólo por su obra, sino también por su vida, que parece ser novelesca- tres condenas a la pena del fuego, quemado realmente por los protestantes pero en efígie por los católicos- y de la cual, todavía ahora no sabemos muchas cosas a ciencia cierta.

Comenzamos por su nombre, que, según la mayoría de sus biógrafos era: Miguel Serveto, alias Revés, Conesa Meller Zaporta; pero, aun, se debe de investigar más sobre su familia, pues existe muy poca documentación. Por influencia del francés y, en particular, de Calvino, se difundió su nombre sin la última vocal y, a pesar, de que era Serveto o *Servetus*, en latín, el nombre de "Miguel Servet" es el que ha llegado hasta nuestros días. Por ello nosotros utilizaremos, indistintamente, Servet o Serveto, y, aunque, preferimos la segunda, está muy difundido el nombre de Miguel Servet. De estos apellidos, Meller, -o Mellero-, y Zaporta- o Laporta, Porta, Lapuerta-, están muy extendidos en la Ribera, y muchas personas se apellidan así. Los tres últimos, de Serveto, es decir: Conesa, Meller y Zaporta son apellidos de conversos o "forzados" (*anussim*).

Pero es que, además, durante el período de 1532- 1555, se le conoció como también *Miguel de Villanueva* o *Miguel Villanueva*, es decir su nombre, Miguel, seguía siendo el mismo, y como "Villeneuve" o "Villanovanus", en definitiva, *Villanueva*, apareció por escrito en documentos oficiales, - siempre asociado al hecho de ser natural de Tudela - en matriculaciones universitarias y en el proceso de naturalización, además de los juicios de París de 1538 y de Viena del Delfinado de 1553-, y sobre la portadas de muchos libros.

En cambio, sólo en tres ocasiones afirmó ser aragonés, con el apellido Serveto, siempre peligrosas para él: en las dos portadas de sus dos primeras obras, en 1531 y 1532, y en el juicio de Ginebra, con Calvino como acusador, en 1553: En las dos primeras, su impresor a la sazón Hans Setzer, ante el peligro de persecución por su contenido teológico, no colocó su pie de imprenta en la portada del libro.

No existe documentación de que hubiese nacido en Aragón, en la villa de Sigena, al menos, exhibida por él.

Lo mismo sucedió, en el juicio de Ginebra, ya que así era conocido, como Servet, en general, por los reformados alemanes. Pero, en este juicio, por ejemplo, también afirmó que no tenía familia judía y no era verdad, tal y como hemos demostrado, recientemente, por su abuela Beatriz Zaporta, hermana de don Gabriel Zaporta, banquero de Carlos V. Las familias procedían de Sigena y de Barbastro o Monzón. Es claro, que su primer apellido, Serveto, no se encuentra en Navarra.

Nos referiremos, así, a nuestro genio como Servet, Serveto, alias Revés, o Miguel de Villanueva, indistintamente, tal y como, en determinados momentos de su vida se denominó.

La ciudad de Tudela, según Miguel Servet, en sus ediciones de "La Geografía de Ptolomeo" - del griego Claudio Ptolomeo (c.90-c.168)-, en la edición de Servet de 1535, la cita al hablar de la región Tarraconense: *Nauarra siue quos Vascos appellant*, es decir que ya el etnónimo "Vascos" lo asocia a "Navarra". Cita también, junto a los nombres que él identifica con los de Ptolomeo a las ciudades de Navarra, a seis de ellas: Pamplona, Viana, Sangüesa, Olite, Tafalla y Tudela, y así las cita: "Bianna", "Sanguessa", "Tafalla" "Olit" y "Pamplona" (según Servet en este Ptolomeo: *Pompelon, Martua dicta*) y prosigue en esta ciudad: *Pampilona hispanicè Pa[m]plona Pompeiopolis caput regni Navarrae*, es decir, "Pampilona, en español Pamplona, Pompeiopolis, cabeza del reino de Navarra." Por último cita a "Tudela" donde Ptolomeo pone "Teucris", también parece conocer bien, por las notas marginales, a las ciudades de Zaragoza y Lérida o *Lleida*. Servet, va a mencionar a Navarra y Tudela, en sus juicios, afirmando que "Tudela, es una ciudad que (en 1553) estaba bajo dominio del Emperador" ya que era "nativo de Tudela".

Su padre, según afirma en el juicio de Viena del Delfinado, sería Antón Serveto Meller, notario en Villanueva de Sigena (Huesca) y de su monasterio, desde 1496, según documentos del investigador Palacios, y Catalina Conesa Zaporta, sería su madre, pero Servet no afirma con documentación estos hechos. En un protocolo se afirma que pudieron casarse hacia 1504, pero la fecha no acaba de coincidir con las edades y profesiones de los hijos. Por otra parte, parece, Antón Serveto estaba soltero hacia 1503. Serveto afirmaba que había nacido en Tudela, en el Reino de Navarra, de padre- ¿o padres?- "hispanos". Vinculación paterna clara al monasterio

de Sigüenza de la orden de San Juan de Jerusalén. Casi nunca menciona a su madre y, casi podemos decir lo mismo, de su padre. Es seguro que, al menos, Servet es descendiente de judeoconversos, por la rama de los Zaporta, y alguno de sus miembros como su tío abuelo, fue famoso banquero del Emperador Carlos V. Tenía, al menos, dos hermanos más, Pedro, notario, que permanecerá en Sigüenza y Juan, clérigo, que, después de estar de secretario en Santiago de Compostela será parroco de Poleñino, una población cercana a Sigüenza. Tenía al menos, dos tías, Isabel y Beatriz de su madre; una tía paterna y de un hermanastro de su padre, abundante familia. Todos ellos aparecen en protocolos notariales, pero Miguel Serveto parece que se lo hubiese tragado la tierra.

No acaba aquí la polémica de Miguel Servet., pero insistimos que aporta pruebas de nacimiento navarro como lo hizo en la Facultad de Medicina de París en 1537 y en la naturalización francesa de 1549, con testigos, escribanos, etc., en la que se reafirma como “nativo de Tudela en el Reino de Navarra”. No lo hizo como aragonés en su vida con un documento oficial por delante., como si lo hizo como navarro. Volveremos a ello.

Tampoco se sabe bien la fecha de su nacimiento. Esto si que es más común en personajes del Renacimiento, y, en particular de la primera mitad del s. XVI. Se manejan tres fechas, aunque la fecha más admitida para su nacimiento sea 1511. Aunque hay otras muchas, entre las tres más citadas- 1506, 1509 y 1511, se suele admitir esta última. Particularmente nos parece interesante que Juan de Quintana, confesor de Carlos V, en una carta del nuncio Aleandre Sangal afirma la edad exacta y que conozca, por ello su nacimiento, que él sitúa en 1506. En definitiva si tiene importancia este periodo pues entre 1498, fecha de la expulsión de los judíos de Navarra y la conquista por Fernando el Católico, 1512, Tudela está llena de judeoconversos aragoneses o descendientes de ellos, y el afirmar que el era navarro, de Tudela, pero su padre no, de alguna manera era, en la Francia de esos años, afirmar que era un descendiente de judeoconversos. Eso lo hemos demostrado al exhumar protocolos de su tía Beatriz Conesa Zaporta, y demostrar, que por rama matrilineal era descendiente de “forzados”, y de una familia muy importante en el s. XVI. Las relaciones de los conversos tudelanos con Aragón en este periodo son especialmente intensas. Muchas veces, Tudela, es la ciudad refugio donde viven conversos que esperaban estar a salvo de la política que se seguía en Aragón. Muchos de ellos fueron, en secreto, circuncidados, según la Ley de Moisés. Muy posiblemente Serveto lo fue aquí por alusiones explícitas que parecen tomadas de su biográfica con respecto a la circuncisión. Esto explicaría mucho del dominio hebreo de Serveto, y el que fuese ayudado por comunidades de conversos franceses o de otras naciones en las que residió, además, de su pasión teológica. Durante el periodo entre 1511- 1526, apenas se sabe algo de su vida y todo son especulaciones. Unos opinan que pudo estudiar en Zaragoza, donde tenía numerosos parientes, o en otra ciudad que se desconoce. Otros señalan a Cataluña, quizás por el hecho de que el arzobispo Pierre Palmier afirmase que “hablaba primorosamente el catalán” pero Serveto dominaba muchas lenguas. No descartamos el que pudiese estudiar en Lérida, por ciertas referencias en su edición del *Ptolomeo* sobre esta ciudad, pero no deja de ser una opinión nuestra. Nos extraña mucho ese silencio en todas las biografías y documentación oficial. No hay ningún documento, aunque si aparecen sus parientes en protocolos notariales.

Entra, hacia 1526, como paje o secretario de Juan de Quintana, agustino regular del que será confesor de Carlos V, al irse a Roma como cardenal García de Loaysa a Roma. Servet, pues, realizó estancias muy posibles en Toledo, Valladolid, Granada, Sevilla, la Alpujarra y Sevilla con la corte itinerante del Emperador.

Estudia Leyes, Derecho canónico muy probablemente, en Tolosa de Francia hacia 1528. Lee tratados de la Reforma, en especial a R. Sabonde y a P. Melancthon.

El confesor Juan de Quintana, con el que ya había estado en la corte, le llama para la doble coronación del Emperador Carlos V en Bolonia por el papa Clemente VII. Al menos está en Italia, con la corte imperial, desde el 26 de julio de 1529 hasta 25 de abril de 1530. Viajan con Servet, además de Juan de Quintana, Alonso de Valdés y Garcilaso de la Vega. Este último tendrá que ver con algunas de sus labores de corrección de poesías. El lujo y pompa de la coronación del Emperador dan un impacto muy negativo sobre el papado en Servet.

El día 25 de junio de 1530 comienza la Dieta de Ausburgo. Asisten Carlos V, Melancthon y Quintana. No se sabe si asistió Servet. En nuestra opinión sí. Busca a Erasmo en Basilea posteriormente, pero éste ha partido de allí, no hacía mucho. Erasmo de Rotterdam tendrá influencia en alguna de sus gramáticas vertidas al español, junto a otros autores.

Sabemos con certeza que el 25 de octubre de 1530, Servet ya reside en Basilea en la casa del reformador Ecolampadio. Se hospeda en su casa durante unos 10 meses. Pudo conocer a Hans Holbein el Joven, que por entonces reside en Basilea, entre sus viajes a Inglaterra. Tendrá influencia, este pintor, en las ilustraciones de algunas de sus obras.

Reside en Estrasburgo, a la sazón Alemania, y conoce, entre otros a Bucero y Capito, hacia 1531 así como a otros famosos reformadores. En Hagenau, ciudad cercana,, entonces alemana, en 1531, imprimirá su primera obra con Setzer " Acerca de los errores de la trinidad" (*De trinitatis Erroribus*) pero sin lugar ni fecha, por el

peligro para el impresor que hemos comentado, pero, sorprendentemente, con su nombre completo como Servet, aragonés. Los reformadores, incluyendo a Ecolampadio, Bucero, Capito, Zuinglio y Bullinger comienzan a mostrar su disentimiento con él. Causa escándalo esta obra en Alemania y así lo afirma desde Ratisbona Jerónimo Aleandro, nuncio apostólico en Alemania, mencionando a Juan de Quintana. Servet vuelve a Basilea a casa de Ecolampadio, ese mismo año. Envía ejemplares : uno a Erasmo, y otro al arzobispo de Zaragoza, muy probablemente, Juan II de Aragón, primo de Carlos V, pero éste nunca lo recibiría pues había fallecido a finales del año anterior, que pudo conocerlo personalmente en la corte itinerante.. Creemos que ambos gozaban de estima de Serveto.

Publica en Hagenau, a la sazón Alemania, de nuevo con el impresor Setzer, pero también sin que figure en la portada ni lugar ni fecha, su segunda obra: " Los diálogos de la Trinidad"(*Dialogorum de Trinitate*)en 1532. Se venden bien ambas obras en Alemania y causa escándalo como la anterior.

El 24 de mayo en Medina del Campo inicia el Consejo de la Inquisición su proceso contra Serveto. Se coloca un edicto en la Seo de Zaragoza, pues él había mandado un ejemplar al Arzobispo de esa ciudad . Sorprende que la Inquisición no sabe quien es ni de dónde es su familia o donde es natural. a pesar de que conocen que se llama Miguel Servet o Revés tal y como apareció en su primer libro y que había formado parte de la corte, y se había trasladado a Bolonia con el Emperador pues no localizan la población de su familia. Nos extraña mucho esta queja de la Inquisición .

El 17 de junio hay un decreto en Tolosa de Francia describiendo a cuarenta fugitivos entre ellos Servet, que encabeza la lista.

Al fin se localiza a la familia "Servet". El 24 de julio se envía a Alemania a su hermano Juan Serveto, excapellán del arzobispo de Santiago para que lo atraiga a España, para castigarlo. No lo consigue, aunque parece que si pudo contactar con él, y la Inquisición se reprocha el que se haya dejado este asunto así, incluso en una fecha tan tardía como 1538.

Miguel Servet se traslada a París. No aparece con la denominación de Servet, sino *Michel de Villeneuve*, de Tudela (Navarra) siempre en documentos oficiales. Estudia en el colegio de Calvi de París. Hacia 1533 es profesor de matemáticas en el colegio de "los Lombardos" de París. Posteriormente en el periodo 1533-34 consigue el título de "Maestro en Artes" y profesor, con amigos y protectores italianos en la Universidad de París.

Conoce a Juan Calvino, hacia 1534, y parece que tuvieron algunas disputas, pero Servet no acudirá a una proster cita en París con éste. Es casi imposible que no conociese a Ignacio de Loyola , o más todavía a Francisco de Javier, en París o a Nicolás de Bobadilla- compañero de Francisco de Javier-, profesor en el Colegio de Calvi, pues tanto Bobadilla como Francisco de Javier eran profesores, como él. Además, conoce el "Colegio de Beauvais" donde enseñaba Francisco de Javier como profesor y lo cita en una de sus obras. Leerá las obras de Maturino Cordier, profesor de la Universidad de París, quien tendrá influencia en algunas de sus gramáticas vertidas del latín al español.

Parte de París, hacia 1535 y viaja a Lyon, trabando amistad con: el médico y humanista Simphorien Champier(1472-1539); con el médico del cardenal de Tournon, Sebastián "Montuus" y con el exégeta , dominico, y famoso hebraísta, Santes Pagnini. Publica con los hermanos Trechsel, Melchor y Gaspar, la "Geografía de Ptolomeo", su primera edición. Es el primer español y el último que traduce del griego "La Geografía de Ptolomeo", del autor alejandrino del mismo nombre, y en el mundo se ha traducido, al menos, 57 veces, y sólo una por un español, que es Miguel Servet, y además en el extranjero. Sólo por esto merecería un puesto importantísimo en las ciencias de España. Frente a la ingente cantidad de alemanes, suizos, franceses e italianos, entre otros Mattioli y Sebastian Münster, es el único español que se atreve con esta magna obra.

Estudios en París, tal y como afirma en el prólogo de la edición de su obra y la edición de la " Apología contra Leonardo Fuchs", impresa en 1536, obra con secciones médicas y teológicas, impresa por Guilles Huguétan en Lyon. Su antiguo compañero, Andrés Laguna, amigo del decano Tagault, vuelve a España. Pudo conocer a Leonardo Fuchs- el botánico, inmortalizado con la flor "fuchsia", pero no consta. Jean Ruel profesor de la Universidad de París, junto a otros como Mateo d' Ory y Maturino Cordier , ya citado, que tendrán que ver en la vida y obra de Servet. Por esta fecha fallece Santes Pagnini, en Lyon, en 1536

Matriculado en la Facultad de Medicina en París el 25 de marzo de 1537 , era alumno de *Sylvio* "Jacques Dubois", *Gunterio* "Günter von Andernach" y Fernel, entre otros profesores ilustres, como afirmó Servet en Ginebra. Publica con el impresor Simon de Colines, padrastró del impresor Roberto Estienne I, la primera edición de "Tratado Universal de los Jarabes"(*Syruporum Universa Ratio*). Conoce en esos años a Junien Rabier ("Junius Rabibius"), corrector de Roberto Estienne quien tendrá influencia en algunas obras de "Villa-

nueva” que se citarán posteriormente, en particular las de Maturino Cordier. Sigue con practicas anatómicas y es compañero de , entre otros de Andrés Vesalio, y Conrado Gesner, y alumno de Günter von Andernach, *Gunterio* y Jacques Dubois o "*Sylvio*". Los cita a éstos últimos en su " Tratado Universal de los Jarabes" . En la misma imprenta y el mismo año se imprime el Dioscórides póstumo de Ruel, con notas de Dionisio Corronio, un raro ejemplar de esta edición , lleno de notas, es el "manuscrito de Madrid" o de la "Complutense" con notas manuscritas de Serveto, que es un compendio de toda su sabiduría. Servet conservará el epitafio de Corronio en todas sus ediciones del Dioscórides. Servet da clases de astrología, citando entre otros el "De divinatione " de Cicerón, con la asistencia entre otros de su compañero médico Perrel y del arzobispo primado de las Galias, Pierre Palmier. Compañero , además, de Guillermo Rondelet a quien citará en el Dioscórides. Rondelet, que residirá en Montpellier, será médico del cardenal de Tournon, y después de lograr un bachiller en Medicina, conseguirá el mismo año la licenciatura y el doctorado con el decano español Falcón, en 1537. Era un gran anatomista, pero no conocemos todavía esa gran obra, quizás con dibujos, que pudiera haber impreso. Todo París comprueba un eclipse de Marte por la Luna el 13 de febrero de 1538 predicho por “Villanueva” e imprime el libro " Discurso a favor de la Astrologia", en París, sin pie de imprenta, pero como navarro "Villeneuve". Su actividad astrológica no pasa desapercibida y el 18 de marzo de 1538, ante el parlamento de París, se ve el proceso del decano , y cirujano, Tagault y el rector de la Universidad contra Miguel Villeneuve. Podemos ver que afirman que “ Villanueva” realizaba disecciones de anatomía, en París, en dicho proceso universitario. Se da la primera condena a la pena del fuego de *Villeneuve*. En su defensa está el holandés Juan Thibault, amigo de Agripa, medico y astrólogo de Francisco I, que anteriormente, en 1531 lo había sido de Carlos V. Se le prohíbe, finalmente a Serveto, la enseñanza de astrología judiciaria y se le insta a retirar la edición de esta obra. Hay un detalle que nos indica que Serveto era el segundo anatomista de la Universidad de París y el primer galenista o “farmacólogo”. Así ,en la segunda edición de Günter von Andernach de "Institutiones Anatomicae" impresa en Basilea en 1538 cita como alumnos aventajados a Andrés Vesalio y a Miguel Villeneuve, ..."Vesalio un joven maravillosamente diligente en anatomía. Después de él, miguel Villanovano estuvo estrechamente unido a mí en la disección Un joven bien versado en todas las ramas de la literatura y segundo a nadie en la doctrina de Galeno. Con la ayuda de mis dos discípulos he examinado los músculos, venas y nervios de todo el organismo" . Sin embargo , importantísimo será , a la larga, este enfrentamiento con el Decano de Medicina Tagault y el rector de l Universidad de París, pues casi ya no parece su nombre nunca más, en nuevas obras, aunque existen contratos y pistas que el nos hablan de sus obras. Si parece en nuevas ediciones como la del "Tratado de los Jarabes" o en su "Ptolomeo", pero ya sólo figurará en un prólogo- no en la portada- de una de sus Biblias, la de 1542, en *folio*. Ese año de 1538, y su enfrentamiento con la Universidad de París, marcaran a nuestro genio en el anonimato casi a partir de entonces. Si, posteriormente, pudo tener alguno teológico, es comprensible que desde mediados de 1542 no firmase ninguna obra más.

Servet se trasladará a Montpellier y Avignon- esta dependía casi totalmente de la Universidad de Montpellier , donde habían cursado estudios los médicos Michel de Notre- Dame o " Nostradamus", François Rabelais, Simphorien Champier y su profesor de París, Jacques Dubois entre otros muchos conocidos de Servet. También forman parte el decano español, de medicina, Falcón y tiene de profesores a, descendiente de españoles, de forzados o conversos, los Saporta. Además reside su compañero Rondelet, el obispo Pellicier, etc. Pudo conseguirlo otorgado por el decano, descendiente de conversos, Juan Falcón en 1538, como le había sucedido a Rondelet, , en el año anterior, 1537, que consiguió las dos titulaciones. Servet tenía amigos en Montpellier ,o en Aviñón - que dependía de la Iglesia-, y no podemos olvidar la protección de Arzobispo Primado de las Galias , Pierre Palmier. Serveto citará a Montpellier en una ocasión en su *Dioscórides* y en otra entre sus recetas nuevas de su *Enchirion* o Recetario, su obra complementaria del “Dioscórides”. La facultad de Medicina de Avignon, en realidad, era un satélite de la de Montpellier, se caracterizaba por la facilidad, máxime si alguien tenía ya cursos aprobados de Medicina como Serveto, en la expedición de titulaciones, según Dulieu.

Hacia 1539, muere su gran amigo y mecenas Simforien Champier y por otro amigo Sebastian Montuus, médico del cardenal de Tournon, conoce a los Rivoire y consigue un trabajo en la población de Charlieu a unos 80 km de Lyon, donde ya figura como doctor en Medicina al principio de 1539 Además tuvo un incidente con otro medico en Charlieu, resultó herido, pero en su defensa, hirió a un atacante ; así pues, Serveto debía manejar bien la espada. Estuvo en prisión algún día por ello. Tenía una novia pero no se casó. Desconocemos si estaba circuncidado, aunque lo parece por los antecedentes judíos de su abuela, y por la descripción ,tan real, que realiza en la "Restitución del Cristianismo".

En un contrato del 14 de febrero de 1540 para realizar Biblias con la "Compañía de librereros" de Lyon figura ya como "Michel de Villeneuve, dict Villanovanus " (*Miguel de Villanueva, llamado Villanovano*)que entonces ya residía en la ciudad de Lyon". No creemos que residió tanto en Charlieu como él afirma en el juicio de Ginebra, sino que, al poco, se traslada a Lyon.

Se establece en Viena del Delfinado, localidad francesa próxima a Lyon, donde reside el primado de las Galias, Pierre Palmier, que tenía como médico a Perrel,compñero parisino de Serveto, y al hijo de Sebastian Mon-

tuus, Jerónimo. Publica la segunda edición de la " Geografía del Ptolomeo," en 1541 impresa en Viena del Delfinado por G. Treschel, con portada de Hugo de la Porta, con dedicatoria a Palmier, y cambia los comentarios de la primera edición. En el prólogo, además del agradecimiento al impresor , H. De la Porta, existen unos versos latinos en dicho prólogo, de Servet.

En la Biblia *de folio* de Servet, ya en 1542, sólo aparece en el prefacio o prólogo su nombre *Michel de Villeneuve*, pero no en la portada. Creemos que Villanueva tuvo un conflicto con los doctores en teología que aparecen en su Biblia o en sus contratos. El tal "Joannes Nicolaus Victorius" de dicha Biblia , o el caso de Claude Guillaud en la Biblia de siete volúmenes, que serían sus consejeros teológicos. Este último, canónigo de Autum y profesor de teología en París, que sabemos que aparecía en contratos con Serveto, aparecerá en otras ediciones en 1543, pero con otros impresores como *Griphius*, o "Grifo", en una obra sobre un comentario de san Pablo. ¿Tuvo problemas Villanueva con esos consejeros teológicos, por su heterodoxia? ¿Aprobaron, finalmente Nicolaus Victorius y Guillaud, sus ideas teológicas? Mucho nos tememos que arreciaron las críticas en esta labor de exegeta, a la muerte de Santes Pagnini, como había sucedido con la medicina . El conflicto de 1538 con el decano de medicina y el rector de París sirvieron para que nuestro Villanovano(Serveto) ya no apareciese más en ninguna obra nueva de medicina, y sólo figura en las reimpresiones de sus obras. Lo mismo sucedería con su primera Biblia de 1542. Así , en su segunda Biblia, la de tamaño *en octavo*, (tamaño reducido),impresa en 1542, que alcanzará numerosas ediciones y se editaran durante muchos años, según nuestros hallazgos, ya no figura su apellido, ni siquiera en el interior, como sucedía en la Biblia en folio del mismo año de Pagnini .Sin poder firmar ni obras médicas, ni teológicas, y decidió no imprimir su nombre, Villanueva, en ninguna otra obra, incluso en las bilingües españolas de tratados gramaticales. Con lo cual , *Villeneuve*, no aparece ya ,ni tampoco "Servet", por supuesto. Las Biblias en octavo, con ilustraciones, más resumida que la de folio, y la propia de folio fueron impresas por G. Treschel y H. De la Porte, pero en diferentes localidades, en Lyon la de folio y en Viena del Delfinado la ilustrada en octavo por el conflicto de los impresores lyoneses en esos años. Así vemos que son los mismos impresores, en dos ciudades próximas, con dos Biblias diferentes , realizadas por una misma persona, Servet, en el mismo año, 1542. Su autoría la conoceremos por contrato, declaración o similitud interna de comentarios impresos. También está edición de Biblia en octavo, según nuestros hallazgos, la realizó con el impresor Boullé.

En ese ambiente de impresores lyoneses entra de corrector con los Frellon en 1542 aproximadamente .o inicio de 1543, quizás con otro estudiante, quizás amigo de Serveto, que no alcanzará ninguna licenciatura, Antonio Stupa Retio, que no estará a gusto en el taller de los Frellon, quizás por no gozar de la estima que tenía Villanueva(Servet) entre los Trechsel y los Frellon y los abandonará hacia 1544, tal y como está documentado por cartas latinas, ya que no realizó, que sepamos, otro trabajo médico o farmacológico, que este de corrector. En 1543 sucede la doble aparición de dos obras complementarias y unidas, pues es la misma obra farmacológica de Servet desde los talleres de los hermanos Frellon:

1. el "*Dioscórides*" o tratado de "Sustancias Simples", y
- 2- el "*Enchiridion*," Recetario o Dispensario, o "Tratado de Sustancias Compuestas"; este añade al anterior- ya editado de T. Lespleigney, farmacéutico francés de Tours, y a F. Chappuys, medico lyonés corrector-, al menos, 230 nuevas recetas, incluidas 18 de su profesor *Sylvio* en París con anécdotas de París y de Montpellier. En el prólogo habla Servet de la relación entre ambas obras, del verdadero autor, Galeno ,del corrector Antonio y de los hermanos Frellon en dos ocasiones. Ambos libros tienen muchas de las frases del "Manuscrito de la Computense" *circa* 1538, y, además, 16 de los 20 comentarios interlineares del "Dioscórides" de Servet ya figuran en el manuscrito. Lo mismo sucede con el libro de los "Compuestos" y con el "Tratado de los Jarabes". No lo firma pues desde el juicio de la universidad de París y , en particular, con el decano Tagault, impediría su difusión en Francia de esta doble obra, que además estará compartida (*partagée*) con, con numerosos impresores lyoneses e incluso un veneciano, G. Lilio. Es creemos, el primer español que realiza una edición doble latina impresa de ambas obras, con comentarios propios, pero ya había publicado dos- una de ellas en sus dos tercios- obras medicas anteriormente en 1536("Apología contra Leonardo Fuchs") y 1537("Tratado Universal de los Jarabes") Y, si bien lo realiza posteriormente que el francés Lespleigney, Serveto le añade 230 nuevas recetas, siendo, eso sí, además anterior a muchos otros como el alemán Valerio Cordo o nuestro paisano López de Corella en su "Enchiridion" que son obras diferentes, aunque son unos "Manuales de Medicina", pero no tanto unos tratados prácticos de farmacología que es lo que realiza Serveto. Con esto, y su "Apología contra Leonardo Fuchs", su "Manuscrito de Madrid", *circa* 1538, y su "Tratado Universal de los Jarabes" debieran de bastar para colocarlo como uno de los fundadores de la farmacología moderna. Existen variantes de portada en el "Dioscórides" de su primera edición a las posteriores.Pensamos que todavía faltan obras médicas por descubrir . Pero la actividad de Serveto era imparable, pues, ese mismo año imprimió la primera edición española de la denominada "Resumen Español" (o "*Somme Espagnole*") que es las "Tablas o Retablos de las historias del Testamento Viejo..", breve tratado en verso, bilingüe, latino- español; pero, con obra propia en los resúmenes y en los versos, que era un resumen o compendio del Antiguo Testamento, ilus-

trado con 94 dibujos del alemán Hans Holbein, que se reeditarán en el mismo taller de Frellon en 1549 en esta edición española. Se atribuía, por los autores franceses, a Francisco Frellon, pero se olvida, incluso por Baderier, que un español ya muy famoso, trabaja en ese taller, nuestro Serveto -a la sazón- Villeneuve o Villanueva, que, además, no será la única obra española que realice en dicho taller de Frellon al español. Nunca más, antes o después, los Frellon, editaron en español, ninguna obra excepto en el período entre 1543-1553, que es cuando Villanueva realiza obras con los Frellon. Esta "Suma española" del latín al español, con fragmentos latinos de las Biblias de Serveto en la parte superior es la primera obra "española", a la que seguirán varias más, en las que intervino Serveto. Destaca el dominio perfecto del español y abundantes versificaciones con rimas en consonante, y ciertos vocablos españoles que no son castellanos. Es la famosa "Suma española", prontuario o compendio español, en verso, del Antiguo Testamento, sin el añadido "de Santo Tomás" que era imposible, por entonces, y durante muchos años después. Diferente la versificación española de la edición francesa, también en verso, de los Frellon y la latina de los Treschel, aunque común la parte latina servetiana y las ilustraciones de Holbein. Se consideraba "perdida".

Al año siguiente, Serveto siguió viviendo en la ciudad de Viena del Delfinado, cerca de Lyon y continuó con sus actividades correctoras, junto a los impresores lyoneses. Así, preparó la Biblia en siete volúmenes, con comentarios de Nicolás de Lyra, Pablo de Burgos y Matias Düring, en griego, hebreo y latín, con ilustraciones. Sigue practicando la medicina en Viena del Delfinado y realizará la primera edición de la maravillosa *Biblia Sacrosancta*, con Hugo de Laporte y los Frellon., continuación, a pesar de seguir a la "Vulgata" de la hebreo de 1542 de folio de Servet, sobre texto de Pagnini; Los dibujos en esta Biblia son de Holbein, los del "Resumen Español" de 1543 y existen fragmentos latinos idénticos en ambas.

Pero será en 1545, cuando aparecen, desde las prensas lyonesas por A. Vincent y G. Treschel la Biblia más extensa de Serveto, la de 7 volúmenes, con ilustraciones comunes del "Resumen Español" de Holbein de 1543 o de la Biblia de 1544. Conocerá, al menos, una reimpresión veneciana en 1588. Ese mismo año de 1545, se realizará la segunda edición del "Tratado universal de los jarabes", pero en Venecia, en casa del famoso Valgriso, donde A. Mattioli imprimirá varias ediciones de su *Dioscórides* italiano.

Servet continuaba en su mundo teológico, aunque era un gran médico y siguió ejerciendo su arte hasta su muerte en 1553. Las preocupaciones teológicas encuentran salida en un intercambio epistolar entre Servet y Calvino que ya residía, en Ginebra, a través del "amigo y hermano" de Servet, el impresor Juan Frellon. Así, hacia 1546, es la

datación aproximada del "Manuscrito de Paris", borrador de la futura obra "La restitución del Cristianismo". En ambas ya figura el descubrimiento de la circulación menor en la sección "sobre el Espíritu". Calvino le manda su obra denominada "Institución Cristiana" pero nuestro "Villanueva" (Servet) lo corregirá, como lo solía hacer, con abundantes notas interlineares y marginales. Calvino afirmara posteriormente que "Servet ha vomitado toda su rabia" y, finalmente, existe una carta de Calvino a Frellon, en la que expresa que ya no quiere saber nada más de Servet (o Villeneuve) y también, casi simultánea otra de Calvino a su ministro Farel donde ya afirma que si viene a Ginebra "no saldrá vivo a poco que valga mi autoridad". ¡Palabras proféticas!

Al mismo tiempo, se realizaban numerosas ediciones de otras obras suyas: la tercera edición- después de las dos impresas por Boullé y Treschel en el colofón de la de 1542- de la "Biblia Sagrada según los últimos comentarios...", en octavo, por los impresores Giunta y Paganus; la segunda edición del *Dioscórides* y del "Enchiridion", "Dispensario" o "Recetario" impresos por los hermanos Frellon, son, como decimos dos libros que forman una unidad farmacológica de, respectivamente, los "Simples" y los "Compuestos"; la tercera edición del "Tratado de los Jarabes" en Lyon, y la primera edición de "Las Obras de Boscán y algunas de Garcilaso de la Vega, Repartidas en quatro libros. A de mas que ay muchas añadidas van mejor corregidas y ampliadas..." según la inmediata edición anterior "ampliada" con 14 versos más, impresa en Amberes de 1544, de Nucio.

Los años van pasando plácidamente para nuestro Miguel y, sin la impresión de "La restitución del Cristianismo", y los juicios de Viena del Delfinado y de Ginebra en 1543, nuestro médico, hubiese acabado sus días, recordado como un médico, que a la vera del Primado de las Galias, Pierre Palmier, ejerce la medicina y satisfacía sus múltiples inquietudes con pulcras ediciones de sus obras. Así, en 1547, verá imprimirse: la cuarta edición del "Tratado Universal de los Jarabes"; la tercera y cuarta del "Dioscórides", de los impresores Juan Frellon y Teobaldo Paganus (*Payen*) respectivamente. y la tercera del *Enchiridion* o "Recetario", por Teobaldo Paganus;

"Las obras de Boscán y Garcilaso..", segunda reimpresión por Juan Frellon con sus variantes "ampliadas"; "Nuevos testamentos de la edición vulgata", ilustrados, impresos por Frellon, en latín y en francés, con los comentarios de Serveto, de sus Biblias, y, posteriormente impresos por Arnoullet, en francés también, que, además, en 1545, ya habían sido impresos por G. Rovilio también, en latin y francés. Tanto las ediciones latinas como las francesas se realizarán hasta su muerte por estos impresores. Es decir, nuestro "Villanueva", tendrá que ver en varias obras bíblicas totales o parciales, que aparecen entre 1545-1554, por los mencionados

impresores lyoneses, vertidas al francés, con la importancia que da el que así parte de sus obras se vertieron a los idiomas vulgares de su patria nativa, español, y la adoptiva, francés .

Serveto seguía editando en 1548 la quinta edición del "Tratado Universal de los Jarabes", en Lyon, y existe una probable sexta edición veneciana del "Tratado Universal de los Jarabes" que, hasta el momento, no se ha podido confirmar. Además, se imprimió la tercera edición de su "Biblia Sagrada según los últimos comentarios" en los talleres de Giunta y Paganus.

El 15 de febrero de 1548, figura como un notable de la ciudad de Viena del Delfinado, para aconsejar a los técnicos sobre un puente en el río Gère, afluente del Ródano. Aconseja realizarlo con dos arcos, como así, finalmente, se hizo Extraña que, además, Serveto conociese bien estos cálculos, siendo médico del arzobispo de Viena del Delfinado, pero no debemos de olvidar que había sido profesor de matemáticas. Se extiende carta de naturalización francesa en octubre de 1548. En el documento oficial afirma ser natural de Tudela (Navarra), y llamarse Miguel de Villanueva, y haber residido en Montpellier, Paris , Lyon así como en Viena del Delfinado. Creemos que este documento oficial nos indica su naturaleza claramente. Serveto, desde su embarque para Italia, para la coronación de Carlos V, será la última vez que vea España. No volverá a su nación, y no sabemos si tuvo intercambio epistolar con su familia, pero va a adoptar otra nacionalidad : la francesa. Y así afirma su naturaleza tudelana y en 1549, jurará la nacionalidad francesa el 19 de junio y abonará los derechos de naturalización francesa el 5 de julio, según documentación oficial.

Ese mismo año realizara la impresión de su primera edición española realizada en Lovaina de *Cuaderno de notas de los niños sobre la gracia y variada erudición del idioma latino*, impresa por Servando Sasseno y la viuda de A. Byrcmann. Además de la primera edición española lyonesa en los talleres de Jean Frellon de *Obrita sobre la estructura de las ocho partes de la oración* y la segunda edición española de los "Retablos o tablas de las historias del Testamento Viejo" en los talleres de Jean Frellon, junto con la tercera reimpresión de " Las obras de Boscán y Garcilaso ahora nuevamente ampliadas" impresa por Jean Frellon. Estas obras forman parte de su "obra española" y eran obras "perdidas" pero aportadas por nosotros en Congresos Internacionales muy recientemente. Pero además, aparecerá la cuarta edición de la Biblia en octavo " Biblia Sagrada con los últimos comentarios" impresa por Giunta y Paganus en Lyon.

Serveto seguía en contacto con médicos, pues , no en vano, estudio en París y en Montpellier y Avignon, por ello creemos que todavía nos faltan obras médicas , pues el era el mejor galenista de la Universidad de París, y , también creemos que pudo realizar alguna otra obra anatómica. Entre estos creemos que conocería a Bruyerinus Champier (que firmaba como B.H.P. , medicus) , sobrino de Sinforien Champier y que imprimió su primera edición de su Dioscórides en 1550 y la segunda será en 1552. Es un Dioscórides muy diferente al de Serveto, pues sigue a otro gran médico de entonces, Mattioli.

El 18 de octubre de 1550. "Villeneuve" fue elegido prior médico de la " cofradía de san Lucas" en Viena del Delfinado, ya que desde 1541 ejerce la medicina en compañía de otros médicos, cirujanos y farmacéuticos bajo la protección de arzobispo Palmier como hemos comentado, pero Serveto, seguía con las ediciones de sus obras. Así, ese año, se realiza : la 5ª edición del "Dioscórides" impresa en Venecia por Domingo Lilio; por Jean Frellon; 4ª edición lyonesa del "Enchiridion " o "Recetario".

Ese mismo año aparecen, además, la 5ª y 6ª ediciones de la "Biblia Sagrada según los últimos comentarios", impresa en Lyon por los herederos de Giunta y Paganus y, además, por Guillermo de Millis y Poullon.

Entre febrero y marzo de 1550 preside , como prior de la cofradía de San Lucas un examen para una plaza de apotecario: se elige un "Electuario de jugo de rosas", pero finalmente realizará un "Diamargariton" el candidato. Para él, que había conocido tan bien la farmacopea, era muy sencillo poner cualquier examen así.

El 27 de diciembre de ese año , en una asamblea numerosa a la que asiste Villeneuve se valora la petición de poner una imprenta por parte de Baltasar Arnoullet en Viena del Delfinado. Ya lo conocía anteriormente, pues había impreso algunos de sus " Nuevos Testamentos" por lo que demostramos por primera vez, que Villanueva quiso salvar a Arnoullet, afirmando que casi no lo conocía, en el juicio de Ginebra en 1553, pero no era la verdad. Servet prefirió no delatarle.

Durante el año de 1551 apareció la 2ª edición lyonesa impresa por Frellon, con alguna variante de portada por A. Vincent y Frellon, de *Cuaderno de notas de los niños sobre la gracia y variada erudición del idioma latino* además de la primera edición , impresa por Frellon, de la traducción de " Los Disticos morales de Ca-ton" de Erasmo, con comentarios de Maturino Cordier, traducida al español, pues Serveto no olvida el español o castellano, tal y como afirmo, Jean Frellon, en sus contratos , y son obras bilingües, es decir, latino-españolas. Tendrá mucha difusión y el español, a pesar de llevar tantos años en Francia, es muy rico. Es una

obra bilingüe muy hermosa. Así, Serveto, participa de los humanistas, al entender que debe de verter sus obras a las lenguas vulgares, y así lo hará, tanto en español, como algunas en francés. Pero sigue no olvidándose de la teología y aparece la 2ª edición de la "Biblia Sacrosancta" de Frelon, idéntica a la de 1544 (La porte/ hermanos Frelon) de Servet, con ilustraciones de Holbein entre otros.

En el año de 1552, Serveto intenta, pero no puede imprimir la obra de "La Restitución del Cristianismo" en Basilea. Existen cartas de intercambio con eruditos de dicha ciudad, entre otros Martin Borrhaus, pero no se realiza, por temor. Cerca estaba uno de sus enemigos, Bullinger. Serveto no se arredró y comenzó el 29 de septiembre de 1552 en una imprenta clandestina, alejada de la ciudad de Viena del Delfinado la impresión de "La restitución del Cristianismo" en los talleres de Baltasar Arnoullet bajo el cuidado de su corrector, y cuñado, G. Gerault. El día de San Lucas de 1552, es decir, el 18 de octubre de ese año, finalizará sus cuidados como prior de San Lucas, pero seguirá como médico por "caridad y limosna" a los pobres del hospital de Viena del Delfinado. Le siguen consultando, como en 1548, sobre el Puente sobre el Gère. "Villeneuve" da su parecer el 4 de julio, y da ciertos consejos sobre los niveles de agua y para la construcción de albañilería, que además de médico, permite su capacidad de cierto conocimiento de ingeniería de obras públicas y matemáticas, indicándonos como Serveto abarcaba muchos saberes simultáneamente.

El tres de enero de 1553, acaba la impresión por B. Arnoullet de la obra "La restitución del Cristianismo" en Viena del Delfinado. Son 800 ejemplares, pero, actualmente sólo quedan tres ejemplares. Se distribuye en rama, es decir, no se encuaderna. No hay ninguna firma de "Villeneuve" ni de Servet, pero Servet en el interior coloca, en un diálogo un "Servet" y escribe sus tres iniciales en la última página: "M.S.V.", es decir, Miguel Servet Villanueva, ni en esta su última obra, que con tantas precauciones había impreso, se desprendió de ese "Villanueva" que, oficialmente, era navarro. Se distribuyen en tres lotes: uno para Lyon, otro para Ginebra, muy probablemente- y afirmado por diferentes autores- a Roberto Estienne I, que entonces residía en Ginebra y el tercero, por Juan Frelon a la feria de Francfort. Parece que Frelon le remitió, además, un ejemplar a Calvino.

Se imprime, sorprendentemente, también en Viena del Delfinado, y en los talleres de B. Arnoullet, la primera traducción francesa del Dioscórides por el médico Martin Mathèe ese mismo año de 1553 ¿Pensó Servet en editar, en español, el Dioscórides y hubiese sido el primero, antes que Laguna? Es muy posible. Andrés Laguna imprimirá sus "Annotationes in Dioscoridem" en 1554 en Lyon, con un impresor amigo de Serveto, Rovilio, pero Serveto, va a tener otras preocupaciones judiciales, y con el impresor Arnoullet, irá a la cárcel, a causa de una carta, remitida desde Ginebra de De Trie, testafarro de Calvino, para su primo de Viena del Delfinado denunciando a Miguel Villanueva (o Servet) el 26 de febrero de 1553. El 4 de abril el inquisidor de Francia, el dominico Mateo d'Ory, por desgracia conocido por Ignacio de Loyola, y que ya había quemado a Dolet, comunica al cardenal de Tournon las pruebas contra Villeneuve. Durante marzo y abril se siguen los interrogatorios en un juicio de Viena y el 4 de abril prisión de Servet y de su último impresor, Arnoullet. Guillome Gueroult, el corrector, huye a Ginebra, pero una vez allí, entrará en prisión. El día 7 de abril Servet se evade de la prisión de Viena. El 23 de mayo se llama al impresor lyonés Juan Frelon, fundamental en todas nuestras investigaciones, y declara que Servet le ha realizado varias obras, entre ellas un "Resumen Español", obra propia de la que ha realizado los resúmenes o extractos- encontrada, finalmente, por nosotros -, y diversas tratados gramaticales del latín al español, también "perdidos" y encontrado por nosotros. Es el único impresor, Frelon, de los múltiples con los que trabajó Servet en Lyon, además de Arnoullet que permanecía en prisión, que se le llama a declarar a un juicio en Viena del Delfinado. El 17 de junio sentencia del tribunal civil de Viena del Delfinado y ese mismo día Servet es quemado, en efígie, en Viena del Delfinado ya que había huido y se desconocía su paradero. Servet, como hemos comentado, puede pasar a la historia por varias cosas que el hizo el primero; pero es, además, la única persona quemada en efígie por los católicos y, realmente, por los protestantes. Servet huyó de Viena, con la complicidad de algunos de sus cuidadores, quizás por orden de Palmier. Finalmente aparece en Ginebra, donde está su gran enemigo Calvino.

Es detenido el 13 de agosto en Ginebra (Suiza), y parece que había entrado en Ginebra el día anterior. Del 14 de agosto al 26 de octubre proceso de Ginebra. Los síndicos de Ginebra lo condenan a muerte, finalmente, con influencia de Calvino en esta sentencia, el 27 de octubre de 1553, Miguel Servet es quemado vivo en Champel (Ginebra). Ante Farel, ministro de Calvino, y los síndicos, muere, abrasándose, durante dos horas, con una corona de paja y azufre en la cabeza, con varias vueltas de cuerda al cuello, y una cadena de hierro, quemado con leña verde, y afirmando su fe: "Jesucristo, Hijo del Dios Eterno, ten piedad de mí". Servet es condenado por: su particular idea de la Trinidad, en la que al Dios Padre, el lo denomina "El Eterno" y por el bautismo, que el creía que sólo lo debían de recibir los adultos de más de 20 años. No por lo que, erróneamente se afirma, por descubrir la circulación menor. Servet la encuentra por conocer la anatomía perfectamente y buscar el "espíritu" de Dios en la sangre. Aunque el médico Ibn an Nafis ya la había descrito, y es el primero, Serveto lo será en un libro impreso, y para Occidente. No conoció Serveto el texto de Ibn an Nafis, médico árabe del s. XIII y el texto de Serveto es superior, y más extenso, que el de la descripción del de Nafis. De ello no men-

cional nada Calvino, pues, entre otras cosas desconocía la anatomía. Calvino tuvo miedo de un médico, que además, dominaba la teología y conocía el hebreo con mucha soltura e intuyó que pudiera socavar su dominio en Ginebra.

Póstumamente, ya el día 23 de diciembre de ese año, en Viena del Delfinado, condena del tribunal eclesiástico, muchos de ellos habían sido sus amigos, pero: "...declaramos herético al dicho Miguel de Villeneuve, confiscamos sus bienes para los condes de Viena, ordenamos que todos y cada uno de los libros compuestos por el llamado Villeneuve, además de los ya quemados(j) sean entregados a las llamas... y que los procesos de Villeneuve y de Baltasar Arnoullet, atendiendo a la conexión de la causa, sean vistos en conjunto..."

A la muerte de Serveto se escucharon críticas contra Calvino. Jean Calvino se dirigió al Consejo de Ginebra para que le autoricen la publicación de un libro impugnando las opiniones de Serveto (sin posibilidad de replica por parte de éste, evidentemente).

Así, a principios de año Calvino publica en Ginebra, una obra contra el ya difunto Servet, primero en latín, sorprendentemente impreso por el impresor conocido, quizás amigo anteriormente de Servet, ¡paradojas de la vida! el famoso Roberto Estienne I, a quien derivó el confiado Servet una parte de su última obra. Poco después, imprimió Calvino, en francés, la misma obra pero impresa por el impresor Lyonés, aunque residente ahora en Ginebra, Jean Crespin. Ambos impresores abrazaron la causa calvinista.

El amigo de Melanchthon, Alexander Alesius, imprime contra Miguel Servet denominándolo "el hereje de los herejes", en Leipzig, en 1554 su *Contra horrendas Serveti blasphemias*. Es decir, por el bando luterano también se ataca a Servet póstumamente, uniéndose al calvinismo. Melanchthon ya había escrito dos obras contra él. Así pues, tanto los católicos, como los luteranos y los calvinistas deseaban su muerte, y se felicitan por carta de la suerte de Serveto al poco de su muerte.

Sin embargo, los impresores no lo olvidan y podemos ver la 6ª edición integra del "Dioscorides" de Servet, por los impresores lyoneses Gabianoy Faure. Pero quizás la edición más rara y el libro impreso más extraño sea la denominada por nosotros "Edición homenaje de los cuatro impresores" impresa por B. Arnoullet, pero también con portadas de G. Rovilio, A. Vincent y Juan Frellon. Los cuatro tenían contrato con Servet. Sólo aparece el médico Andrea Mattioli en la portada, pero los impresores introducen los comentarios de Servet, que no sirven para identificarlo y, mutilando cualquier referencia geográfica o de cita personal de compañeros médicos de Servet, como Rondelet o Corronio, nos imprimen una única edición y la más rara de las consultadas lyonesas por nosotros. Así como el "Manuscrito de Madrid", (circa 1538) es el manuscrito más interesante de Servet que los autores han encontrado, esta edición impresa de 1554, quizás sea el libro impreso Lyonés más raro de los consultados, que han sido, muchos. Sólo se imprimirá ese año, en 1554, al año siguiente de la muerte de Servet. La denominamos "Edición homenaje de los cuatro impresores lyoneses", pues pensamos en que los cuatro realizaron un acertijo para burlar la inquisición.

Juan Frellon, a partir de la muerte de Servet, y aunque vivirá todavía muchos años hasta 1568, no aparece ya en ningún colofón como impresor, sino sólo como librero. Creemos que tuvo que ver la muerte de su "amigo y hermano Villeneuve" en esta decisión. Pierre Palmier, primado de las Galias y Arzobispo de Viena del Delfinado, su protector murió también ese año de 1554. Sebastian Castalión o *Castellone* (1515-1563) publicará en 1554 en defensa de Serveto "De hereticis", de manera anónima, contra Calvino, quien le replicará, y Castalión realizará posteriormente su

"Contra libellum Calvini". Teodoro de Beza, íntimo y sucesor de Calvino, replicará a *Castellone* o Castalión durante varios años, en nombre de Calvino.

Durante el siglo XVI, después de su muerte, todavía se imprimirán, obras de Servet, como diversas ediciones de sus Biblias; del *Enchiridion* o "Recetario" y de "Los dísticos de Catón", en Países Bajos. Su madre y hermano erigirán un retablo en Sigena en 1558, destruido en la última guerra civil española, pero llama la atención el silencio después de las obras de Calvino, y de su condena a la hoguera. Un silencio aterrador sobre este personaje, que nunca tuvo ningún poder, al contrario que sus enemigos.

Dos de las tres grandes ramas de la iglesia reformada (protestante), no vuelven a mencionarlo y sólo la anglicana se libró de sus críticas en vida; la de los luteranos y la de los calvinistas, se habían caracterizado por su ataque, en vida, a Servet, y silencian su obra. Lo mismo sucede con los católicos, por lo que aparece en la mayoría de los catálogos de libros prohibidos. Tanto reformados como católicos coinciden en su silencio de este "hereje de los herejes" como algún autor ha mencionado, que estaba prohibido citar ni en ambientes eclesiásticos ni, en general, universitarios.

Encontramos a defensores de Servet, pero no podemos incluir a todos. Mencionaremos al filósofo Leibniz, a nuestro Feijoo, a Voltaire, entre otros muchos, pero destaquemos al clérigo reformado Henri Tollin, que en el siglo XIX, ya que él sólo realizó más de setenta y cinco trabajos sobre Serveto. Muchos de los servetistas del siglo XX le son deudores de hallazgos de este clérigo protestante.

Aunque las ideas anabaptistas de Servet, es decir, sus ideas sobre "volver a bautizarse" ya en la edad adulta, como lo realizó Jesús en el Jordán, le van a dar un lugar dentro de la historia de las iglesias reformadas baptistas y del "Bautismo", no figura más que en su aspecto histórico en esta iglesia reformada, que seguirá a otros reformadores, posteriormente. En cambio, sí que figura como uno de los fundadores en el Unitarianismo, es decir, en sus ideas de la concepción de la Trinidad, como emanaciones del Dios Eterno. Dichas concepciones teológicas de Servet se extendieron por Europa, casi al poco tiempo de su muerte. Su influencia teológica actual en la iglesia Universalista Unitaria, sobretodo en Estados Unidos y Canadá, que no veneran santos, y consideran las orientaciones más decisivas del cristianismo y el judaísmo, y tienen reuniones periódicas, donde estudian y meditan obras del cristianismo, entre otras obras "la Restitución del Cristianismo". Así parece una imagen de Servet en las vidrieras de la Iglesia Unitariana de Nueva York. Comentar que, al menos, en dos localidades estadounidenses, Friedley y Vancouver, la "Iglesia Unitaria Universalista" local lleva el nombre de "Miguel Servet".

Numerosas calles, plazas, hospitales, tanto en España, como en Francia y Suiza, llevan su nombre. La última lección de Serveto, que como hemos visto sucintamente fue el primero en varias obras, y no sólo en la circulación pulmonar, como hemos comentado, y nos demostró, en su vida perseguida y en su muerte, condenado por todos, hasta dónde se llega cuando hay intolerancia.

CONFERENCIA INAUGURAL: AVENIDAS DE LUZ PARA LA PATOLOGÍA ESPAÑOLA.

Alberto Anaya

Clínica Puerta de Hierro. Madrid

El texto de esta conferencia aparecerá en el próximo número de la Revista Patología

CARCINOMA DE MAMA EN MUJERES JÓVENES. ¿UNA ENFERMEDAD DIFERENTE?

MARÍA MERINO.

DEPARTMENT OF PATHOLOGY NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. BETHESDA. USA

Breast cancer in women under 40 years of age accounts for less than 12% of all breast malignancies (1). The prognosis of breast cancer occurring in young women has been and still remains the subject of much controversy. Many reports have addressed the relationship between age and breast cancer outcome but so far there has not been any definite conclusion, despite the common belief that breast cancer in young women behaves poorly (2). Some reports found no difference of prognosis in younger patients with BC (3,4, 5,6,7,) while others showed a worse prognosis in the younger groups (8,9,10,11,12,13,14,15,16). Yet every physician who deals with breast cancer has in mind a good number of young patients who developed early recurrences and followed an aggressive course.

This study was aimed to investigate the clinico-pathologic characteristics of a group of young women with breast cancer. Our results were compared with those previously reported in young and older patients.

STUDY

One hundred ninety-one cases of breast cancer in patients under 40 years of age were obtained from the Laboratory of Pathology of the National Cancer Institute (NCI) between 1980 and 1992. One hundred eighty-eight cases had at least one surgical specimen for review, and when a patient underwent two or more surgical diagnostic procedures in a short period of time without intervening radiotherapy or chemotherapy, all samples were reviewed. Trucut biopsies were the only available samples of primary tumors in 3 cases.

Two pathologists (PB, MJM) reviewed all the hematoxylin-eosin sections available and assessed subtypes of tumor, invasive and *in situ* components, nuclear grade (1 to 3) histologic grade (1 to 3) (17), mitotic activity, vascular invasion, necrosis, inflammatory infiltrate, fibrosis, and microcalcifications. Quantitative criteria was assessed as follows: 0 absent, 1 slight, 2 moderate, 3 strong. Adjacent non-tumoral breast tissue was available in 161 cases and was evaluated for the presence of fibrocystic changes and other types of benign and atypical lesions.

The median age was 35, including 31 patients under 30, 62 patients between 30 and 35, and 98 patients between 35 and 40. Ninety-seven patients had been referred to our institution at the time of diagnosis for primary adjuvant therapy. Sixty-eight patients were seen at the time of breast cancer relapse, primary treatment having been done in another institution. Twenty-six patients had histologic evaluation of their tumor at NCI without subsequent treatment.

Clinical records were available for 167 patients and were reviewed for family history, staging (according to the American Joint Committee on Cancer, 1992, (18), estrogen and progesteron receptors (ER/PR), axillary lymph node status, treatment, and outcome. Relapse was defined as the occurrence of either loco-regional recurrence or distant metastasis. Cases already metastatic at the time of diagnosis were considered as cases with immediate relapse. Of 191 patients, 21 had no follow-up and 20 others had a follow-up shorter than 1 year. The follow-up for the remaining patients ranged from 1 to 13 years.

For statistical analysis, contingency tables were analyzed using chi-squared test or Fisher's exact test. Overall survival and disease-free survival were calculated from time of diagnosis until date of death, recurrence,

or last follow-up if appropriate. The probability of survival was calculated using the Kaplan-Meier method (19), and the significance of the difference between pairs of Kaplan-Meier curves was calculated using the Mantel-Haenszel procedure (20). All p-values are two-sided.

RESULTS

CLINICAL DATA AND OUTCOME

(CLINICAL DATA IS SUMMARIZED IN TABLE 1).

One hundred and two patients (54%) relapsed (10 cases with only local recurrence, 71 cases with distant metastases, and 21 cases with both). Fifty-four of those patients relapsed within the first 2 years after diagnosis (12 local recurrences, 35 distant metastases, and 7 cases with both). Thirty patients with invasive carcinomas did not relapse during the first 5 years of follow-up. The 5-year disease-free survival (DFS) for the whole group of 191 patients was 29.6% and the 5-year overall survival (OS) was 72.3%.

Cases of pregnancy-associated breast carcinoma had a poor outcome with three relapsing within the first 2 years and another three relapsing in the third year (the other 3 cases did not relapse, but the follow-up was less than 2 years).

Hormonal receptors

ER positivity was associated with a longer DFS ($p = 0.02$) and a longer OS ($p = 0.001$).

Lymph node status

When comparing the outcome for stage I-II patients with or without axillary lymph node metastases there was a trend towards a shorter DFS and a statistically significantly shorter OS in patients with positive lymph nodes ($p = 0.04$).

Treatment

Table 2 shows a cross tabulation of the treatments undergone by the patients according to their clinical stage. Stage 0 patients underwent surgery in most cases or sometimes radiation therapy alone. Stages I and II patients underwent surgery with axillary dissection followed by adjuvant chemotherapy when axillary lymph nodes were positive and radiotherapy when lumpectomy was performed. Most stages III-IV patients were first treated by chemotherapy after the initial diagnostic biopsy.

PATHOLOGY

The histologic features of invasive tumors is summarized in Table 3

The group of 180 patients with invasive cancers had the following distribution of histologic subtypes of tumors: 83% ductal type, 11% lobular type, and 6% carcinomas of special types.

We found no cases of medullary carcinoma. Among infiltrating lobular carcinomas, three were classified as pleomorphic variant, two as solid-alveolar variant, and two showed numerous signet ring cells though not enough to be classified as signet ring cell carcinoma.

Histologically, the tumors were characterized by their high nuclear and histologic grades and marked vascular invasion (respectively 68%, 60% and 67%). Among the thirty patients with invasive carcinomas that did not relapse during the first 5 years of follow-up, high nuclear grade, high histologic grades and vascular invasion were frequent as well (respectively 61%, 50% and 60%).

About 30% of the 180 invasive tumors exhibited at least some necrosis in the invasive component, more than 40% showed abnormal mitoses, and about 15% had skin involvement. Inflammatory infiltrates and fibrosis were commonly found.

In situ component

Eleven patients had *in situ* carcinomas with no invasive component. Comedocarcinoma was the most frequent type but was usually associated with other architectural patterns.

The survival analysis showed that presence of comedocarcinoma in invasive tumors was associated with reduced DFS ($p = 0.003$). Reduction of metastasis-free survival when comedocarcinoma was present was more significant ($p = 0.001$) than reduction of recurrence-free survival ($p = 0.06$). Presence of comedocarcinoma was not associated with reduced OS.

Non-tumoral adjacent breast (Table 4)

Histologic features of adjacent normal breast are detailed in Table 5. About 50% of patients had fibrocystic changes at the time of diagnosis. Mild, moderate, or florid ductal hyperplasia was present in 14% of cases, but atypical ductal hyperplasia was present in only 2% of cases.

CLINICO-HISTOLOGIC CORRELATIONS :

No association was found between nuclear or histologic grade and lymph node status. There was a statistical association between the presence of vascular invasion and the presence of lymph node metastases (p = 0.02). ER and PR negativity was strongly associated with high nuclear or histologic grades (p<=0.002). No correlation between histological criteria and outcome was demonstrated.

DISCUSSION

Whether breast cancer in young women has a worse, identical, or better outcome than in older women has been and still remains a source of controversy (2,3,8,9). We identified a group of young women, many of whom initially presented with advanced stage disease or had early relapses. We studied their histologic characteristics to determine if they are different from that of older age groups. The distribution of most clinical and pathologic features among young women was similar to that observed in older patients in the literature. However, high grade tumors were more frequent in our group of young women as well as in a subgroup of patients with a better outcome.

In this study, we have examined the outcomes of a group of 191 young women with breast cancer treated at the National Cancer Institute of the NIH. Comparisons made between patients in this study and those in the literature are meant to suggest possible similarities or differences in the groups, but, due to the nature of the study, must be considered tentative until confirmed in other settings, preferably prospectively.

Similarities

Twelve percent of patients in this series had a positive family history of breast cancer in at least one first degree relative. Positive family history in the literature, often not restricted to first degree relatives, ranges from 7% to 38% of young women (21,22,23,24,25,26,27). Early-onset familial breast cancer are now well recognized and frequently due to BRCA1 or BRCA2 mutations (28,29).

Pregnancy-associated breast carcinoma (PABC) is defined clinically as a carcinoma diagnosed simultaneously or within 1 year after pregnancy (30). There were 9 cases in our group of patients, and they all behaved

TABLE I
DISTRIBUTION OF CLINICAL CHARACTERISTICS
(N=191)

Characteristics	n [%]
AGE	
20-24	8[4]
25-29	23[12]
30-34	62[33]
35-40	98[51]
BC 1ST DEG REL	
yes	19[12]
no	139[88]
RACE	
white	141[88]
black	19[12]
PREG/LACT	
yes	9[5]
no	157[95]
CLINICAL STAGE	
0	11[7]
I	21[12]
II	94[55]
III	38[22]
IV	6[4]
ER	
pos	73[57]
neg	54[43]
PR	
pos	63[57]
neg	48[43]
ALN at diagnosis	
pos	85[65]
neg	45[35]

* : numbers and percentages are given for available data; BC 1st deg rel: BC in first degree relative; Preg/Lact: diagnosis made during pregnancy or lactation; ALN: axillary lymph nodes.

TABLE II
DISTRIBUTION OF TREATMENTS BY CLINICAL STAGES IN THE WHOLE GROUP OF 191 PATIENTS.

STAGE	N TREATMENTS							
	LUMP	MRM	Ax Diss	Adj Chem	Rad	Chem 1st	?	
0	11 4(30)	1(10)	4(30)	0(0)	5(40)	0(0)	4(40)	
I	21 7(36)	13(59)	19(91)	4(18)	7(36)	0(0)	1(5)	
II	94 26(28)	63(67)	88(94)	70(74)	28(30)	3(3)	2(2)	
III	38 0(0)	8(21)	8(21)	8(21)	1(3)	30(79)	0(0)	
IV	6 0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	6(100)	0(0)	
?	21 0(0)	11(52)	11(52)	4(19)	0(0)	0(0)	10(48)	

lump: lumpectomy; MRM: modified radical mastectomy; Ax Diss: axillary dissection; adj Chem: adjuvant chemotherapy; Rad: radiotherapy; Chem 1st: chemotherapy as the 1st treatment (without previous excisional surgery); ?: unknown. Numbers inside brackets are percentages of patients having had the treatment in a given stage-group.

poorly (relapse within 3 years after diagnosis for 6 of them). The prognosis of PABC often has been found to be worse compared to non-pregnancy associated cancers (31).

Approximately 55% to 65% of primary breast cancer at any age have been found to be ER+ and 45% to 60% are PR+ (30). In young women, results varied from 56% to 69% (7,12,14,32). Association of ER/PR positivity with better prognosis has been previously reported in young women (32). Contesso *et al.* (33) already reported a close association between hormonal receptors negativity and high histologic grade.

The distribution of histologic types of invasive carcinomas was not significantly different from that in older women (22,34,35,36) or from other series of young women (16,24,37,38,39,40; (~80% ductal, ~10% lobular, and ~10% special types). Some studies have reported a higher incidence of medullary carcinomas (MC) in young women than in older women (22,25,41,42,43,44,45); the proportion reaching 13% in some series (41). Those findings are in contrast with our results in which no case of MC was observed, as well as to other series (37,38). This discrepancy might be explained by a trend now to limit the diagnosis of MC to tumors with strict criteria (46), excluding the previously called atypical MC from this group (47).

We found that the presence of at least some comedo-type *in situ* carcinoma in invasive tumors was associated with a reduced DFS, recurrence-free survival, and metastasis-free survival. Further studies in young breast cancer patients with assessment of comedo-type *in situ* component are required before drawing conclusions in terms of prognostic value.

Miller *et al.* (39) and Hulman *et al.* (38) reported the distribution of several benign histopathologic features in adjacent non-tumoral breast. Both studies found high rates of fibrocystic disease (respectively 42% and 35%) as well as our study (50%).

Hulman *et al.* found a 25% rate of ductal hyperplasia and a 4% rate of atypical ductal hyperplasia (ADH). In Miller *et al.*'s study, ductal hyperplasia was observed in 25% but presence of ADH was not mentioned. We found in our series only 14% of cases with ductal hyperplasia and 2% with ADH. Atypical Ductal Hyperplasia seems to be a rare lesion in young women (48), and it is possible, that most breast carcinoma in young females may arise *de novo* in an otherwise non-atypical breast, and not following the cascade of tumor progression and metastases proposed for the elderly patients.

DIFFERENCES

Many reports have shown an association between breast carcinoma at young age and high histologic or nuclear grade (8,12,27,36,37,39,49,50,51, 52,53). BRCA1 breast cancers account for

approximately 12% of cases in young women (29) and are often high grade tumors (28). In groups of women of any age, proportions of high grade tumors are usually lower with as little as 29% histologic grade III (54) or 46% in the study of Elston *et al.* (55).

**TABLE III
DISTRIBUTION OF THE HISTOLOGIC FEATURES OF THE
INVASIVE TUMORS**

istics	N [%]
All patients	180
TUMOR SIZE (CM)	
<=2	45[39]
2 to 5	46[40]
>5	24[21]
mean tumor size	3.6
IC TYPE	
Ductal	150[83]
Lobular	19[11]
mixed d+l	3[2]
Tubular	1[0,5]
Mucinous	1[0,5]
Medullary	0[0]
Metaplastic	1[0,5]
clear cells	1[0,5]
SR cells	1[0,5]
Lipoid	2[1]
poorly diff	a1[0,5]
Nuclear grade	
1	1[1]
2	49[31]
3	109[68]
Histologic grade	
1	16[10]
2	48[30]
3	95[60]
Atypical mitoses	
present	74[47]
absent	83[53]
Vascular invasion	
0	60[33]
1	80[44]
2	25[14]
3	15[9]
Necrosis	
0	123[69]
1	41[23]
2	10[5]
3	5[3]
Skin involvement	
yes	24[13]
no	156[87]
Micro-calcification	
yes	41[23]
no	139[77]
Lymphoid infiltrate	
0	51[28]
1	90[50]
2	26[15]
3	13[7]
Stromal (fibrosis)	
0	8[5]
1	82[45]
2	76[42]
3	14[8]

* : numbers and percentages are given for available data; Tumor size: size measured during pathologic examination; mixed d+l: mixed ductal+lobular; SR cells: signet ring cells; Micro-calcifications: micro-calcifications in the tumor.

TABLE IV**DISTRIBUTION OF HISTOLOGIC FEATURES IN NON TUMORAL ADJACENT BREAST TISSUE.**

Characteristics	n [%]*
all patients	191
non evaluable	30
normal	37[23]
cysts	82[51]
fibrosis	83[52]
apocrine metaplasia	36[22]
sclerosing adenosis	13[8]
blunt duct adenosis	16[10]
duct ectasia	3[2]
radial scar	5[3]
ductal hyperpl ^a	23[14]
atypical ductal hyperpl	4[2]
atypical lobular hyperp	12[1]
papilloma	6[3]
fibroadenoma	7[4]
adenomyoepithelioma ^b	5[3]
lactating changes	9[6]
microcalcifications	42[26]

* : numbers and percentages are given for available data;

^a ductal hyperplasia included mild, moderate and florid cases without atypia.

^b 5 cases of infiltrating carcinomas arising in adenomyoepithelioma.

Tumors with high nuclear grade or high histologic grade were more frequent in our group of young women (respectively 76%, 67%) as well as in a subgroup of patients who remained disease-free at least five years after diagnosis (respectively 61%, 50%). Atypical mitoses and vascular invasion were also frequent in both groups. All those features are usually associated with very aggressive tumors. Many of our patients had indeed early relapses but there was no correlation between histological criteria and outcome. Moreover, it was surprising to find so many bad histologic features in the subgroup of women with a better outcome. Despite the heterogeneity of our group of patients that included metastatic and non metastatic cases, those findings might be explained by a true higher incidence of high grade tumors in young women, regardless of the prognosis.

This raises the question whether breast cancer in the youngest women has some biological specificity. Several recent reports have addressed that question. High incidence of p53 positivity using immunohistochemistry has been reported in young patients and may indicate genetic instability (49). We have previously reported that the prognostic value of c-erbB-2 and p53 immunostainings in breast cancer seems to be strongly associated to the age of the patient (56). Our results were confirmed by the study of Xing *et al.*, (57) who showed that amplification of c-erbB-2 is the strongest independent indicator of recurrence of breast cancer in young women.

All those studies bring new insight into what may be a specific disease but so far have not brought the answer to the most important question : Is BC in young women a different disease?

REFERENCES

1. Haagensen CD. Diseases of the breast. Philadelphia: WB Saunders, 1986.
2. Epstein R. Analysis of natural history of breast cancer in young women [Letter]. *Lancet* 1992; 340:1287.
3. Holli K, Isola J. Effect of age on the survival of breast cancer patients. *European Journal of Cancer* 1997; 33(3):425-428.
4. Sariego J, Zrada S, Byrd M, Matsumoto T. Breast cancer in young patients. *Am J Surg* 1995; 170(3):243-5.
5. Cascinelli N, Singletary E, Greco M, et al. Long-term survival and prognostic factors for 2170 breast cancer patients treated at two cancer centers (Milan and Houston). *Tumori* 1989; 75(2):123-131.
6. Ciatto S, Cecchini S, Iossa A, Grazzini G. "T" category and operable breast cancer prognosis. *Tumori* 1989; 75(1):18-22.
7. Kurtz JM, Spitalier JM, Amalric R, et al. Mammary recurrences in women younger than forty. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988; 15:271-276.
8. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson J, Blamey RW. Early-onset breast cancer - histopathological and prognostic considerations. *British Journal of Cancer* 1997; 75(9):1318-1323.

9. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The national cancer data base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer* 1996; 78(8):1838-1843.
10. Peer PG, Verbeek AL, Mravunac M, Hendriks JH, Holland R. Prognosis of younger and older patients with early breast cancer. *Br J Cancer* 1996; 73(3):382-5.
11. Chung M, Chang HR, Bland KI, Wanebo HJ. Younger women with breast carcinoma have a poorer prognosis than older women. *Cancer* 1996; 77(1):97-103.
12. Bonnier P, Romain S, Charpin C, et al. Age as a prognostic factor in breast cancer: relationship to pathologic and biologic features. *Int J Cancer* 1995; 62(2):138-44.
13. Fowble BL, Schultz DJ, Overmoyer B, et al. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 30(1):23-33.
14. Rochefordiere AD, Asselain B, Campana F, et al. Age as prognostic factor in premenopausal breast carcinoma. *Lancet* 1993; 341(8852):1039-1043.
15. Adami HO, Malker B, Holmberg L, Persson I, Stone B. The relation between survival and age at diagnosis in breast cancer. *N Engl J Med* 1986; 315:559-563.
16. Noyes RD, Spanos WJ, Montague ED. Breast cancer in women aged 30 and under. *Cancer* 1982; 49:1302-1307.
17. Elston CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In: Page DL, Anderson TJ, eds. Diagnostic histopathology of the breast. New York: Churchill Livingstone, 1987; 303-307.
18. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ. Manual for staging of cancer. 4th edition. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992.
19. Kaplan E, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53:457-481.
20. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chem Rep* 1966; 50:163-170.
21. Malone KE, Daling JR, Weiss NS, Mcknight B, White E, Voigt LF. Family history and survival of young women with invasive breast carcinoma. *Cancer* 1996; 78(7):1417-1425.
22. Claus EB, Risch N, Thompson D, Carter D. Relationship between breast histopathology and family history of breast cancer. *Cancer* 1993; 71:147-153.
23. Charreau I, Plu-Bureau G, Bachelot A, Contesso G, Guinebretiere JM, Le MG. Oral contraceptive use and risk of benign breast disease in a French case-control study of young women. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2:147-154.
24. Backhouse CM, Lloyd-Davies ERV, Shousha S, Burn JI. Carcinoma of the breast in women aged 35 or less. *Br J Surg* 1987; 74:591-593.
25. Erdreich LS, Asal NR, Hoge AF. Morphologic types of breast cancer: age, bilaterality, and family history. *South Med J* 1980; 73(1):28-32.
26. Birks DM, Crawford GM, Ellison LG, Johnstone FRC. Carcinoma of the breast in women 30 years of age or less. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 137:21-25.
27. Brightmore TGJ, Greening WP, Hamlin I. An analysis of clinical and histopathological features in 101 cases of carcinoma of breast in women under 35 years of age. *Br J Cancer* 1970; 24:644-669.
28. Lakhani SR, Easton DF, Stratton MR, et al. Pathology of familial breast cancer - differences between breast cancers in carriers of *brca1* or *brca2* mutations and sporadic cases. *Lancet* 1997; 349(9064):1505-1510.
29. Krainer M, Silvaarrieta S, Fitzgerald MG, et al. Differential contributions of *brca1* and *brca2* to early-onset breast cancer. *New England Journal of Medicine* 1997; 336(20):1416-1421.
30. Tavassoli FA. Pathology of the breast. Norwalk, Connecticut: Appleton and Lange, 1992.
31. Haagensen CD. The treatment of breast cancer occurring during pregnancy or lactation. In: Saunders W, ed. Diseases of the breast. Philadelphia, 1986; 927-928.
32. Stål O, Carstensen J, Hatschek T, Nordenskjold B. Significance of S-phase fraction and hormone receptor content in the management of young breast cancer patients. *Br J Cancer* 1992; 66(4):706-711.
33. Contesso G, Delarue JC, Mouriesse H, May-Levin F, Garnier H. Anatomopathologie du cancer du sein et récepteurs hormonaux. *Pathol Biol* 1983; 31(9):747-754.
34. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1992; 20:479-489.
35. Stalsberg H, Thomas DB, Noonan EA. Histologic types of breast carcinoma in relation to international variation and breast cancer risk factors. *Int J Cancer* 1989; 44:399-409.
36. Fisher ER, Gregorio RM, Fisher B. The pathology of invasive breast cancer. A syllabus derived from findings of the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol N. 4). *Cancer* 1975; 36:1-78.

37. Fisher CJ, Egan MK, Smith P, Wicks K, Millis RR, Fentiman IS. Histopathology of breast cancer in relation to age. *British Journal of Cancer* 1997; 75(4):593-596.
38. Hulman G, Trowbridge P, Taylor CN, Chilvers CE, Sloane JP. Oral contraceptive use and histopathology of cancerous breasts in young women. *J Pathol* 1992; 167:407-411.
39. Miller N, McPherson K, Jones L, Vessey M. Histopathology of breast cancer in young women in relation to use of oral contraceptives. *J Clin Pathol* 1989; 42:387-390.
40. Tepas JJ, Carr RE, Mullen JT. Breast cancer in young women. *Am J Surg* 1975; 129:289-291.
41. Von Rosen A, Fallenius A, Sundelin B, Auer G. Nuclear DNA content in mammary carcinomas in women aged 35 or younger. *Am J Clin Oncol* 1986; 9(5):382-386.
42. Rosen PP, Lesser ML, Kinne DW, Beattie EJ. Breast carcinoma in women 35 years of age or younger. *Ann Surg* 1984; 199(2):133-142.
43. Mueller CB, Ames F, Anderson GD. Breast cancer in 3558 women: age as a significant determinant in the rate of dying and causes of death. *Surgery* 1978; 83(2):123-132.
44. Gogas J, Skalkeas G. Prognosis of mammary carcinoma in young women. *Surgery* 1975; 78(3):339-342.
45. Norris HJ, Taylor HB. Carcinoma of the breast in women less than thirty years old. *Cancer* 1970; 26:953-959.
46. Ridolfi RL, Rosen PP, Port A, Kinne D, Mike V. Medullary carcinoma of the breast. A clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer* 1977; 40:1365-1385.
47. Rapin V, Contesso G, Mouriesse H, et al. A reevaluation of 95 cases of breast cancer with inflammatory stroma. *Cancer* 1988; 61:2503-2510.
48. Eliassen CA, Cranor ML, Rosen PP. Atypical duct hyperplasia of the breast in young females. *Am J Surg Pathol* 1992; 16(3):246-251.
49. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (<35 years) are different. *Br J Cancer* 1996; 74(11):1796-1800.
50. Bennett IC, Freitas R, Fentiman IS. Diagnosis of breast cancer in young women. *Aust N Z J Surg* 1991; 61:284-289.
51. Ashley S, Royle GT, Corder A, et al. Clinical, radiological and cytological diagnosis of breast cancer in young women. *Br J Surg* 1989; 76:835-837.
52. Wallgren A, Silfverswärd C, Hultborn A. Carcinoma of the breast in women under 30 years of age. A clinical and histopathological study of all cases reported as carcinoma to the Swedish Cancer Registry, 1958-1968. *Cancer* 1977; 40:916-923.
53. Rouessé J, Contesso G, Génin J, Sarrazin D, Weiler J, May-Levin F. Les adénocarcinomes du sein chez les femmes de moins de trente ans. *Bull Cancer* 1972; 59(1):41-60.
54. Contesso G, Mouriesse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouesse J. The importance of histologic grade in long-term prognosis of breast cancer: a study of 1010 patients, uniformly treated at the Institut Gustave-Roussy. *J Clin Oncol* 1987; 5:1378-1386.
55. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; 19:403-410.
56. Bertheau P, Steinberg SM, Merino MJ. c-erbB-2, p53 and nm23 gene product expression in breast cancer in young women: immunohistochemical analysis and clinicopathologic correlation. *Hum Pathol* 1998; 29(4):323-9.
57. Xing WR, Gilchrist KW, Harris CP, Samson W, Meisner LF. FISH detection of HER-2/neu oncogene amplification in early onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 39(2):203-212.

APORTACIÓN DE LA BIOPSIA TESTICULAR AL ESTUDIO DE LA INFERTILIDAD MASCULINA.

Manuel Nistal

H. La Paz, Universidad Autónoma de Madrid.

El texto de esta conferencia figura en la monografía adjunta en la documentación del congreso.

CONFERENCIA CONMEMORATIVA "PÍO DEL RÍO HORTEGA"

Juan Rosai, M.D.

National Cancer Institute, Milan, Italy

BREVE RESEÑA BIOGRAFICA DEL AUTOR

Juan Rosai nació en 1940 en Poppi, una pequeña aldea de Toscana (Italia). Tres meses después de su nacimiento su padre, fontanero de profesión, partió para Rusia como soldado del ejército italiano; afortunadamente fue uno de los pocos que regresó. La economía italiana en la postguerra estaba muy deteriorada, motivo por el que, en 1948, la familia emigró a Buenos Aires (Argentina). Sin conocimiento alguno de español, Juan Rosai tuvo que comenzar nuevamente la enseñanza primaria, pero rápidamente recuperó el tiempo perdido y fue capaz a los 15 años de graduarse en la Escuela Secundaria. Comenzó entonces los estudios de Medicina, graduándose con sólo 21 años en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Bajo la tutela del Dr. Eduardo F. Lascano comenzó su instrucción en patología, en el Hospital Regional de Mar del Plata, donde era el único residente. Su extraordinario talento para la Patología fue tan evidente, que se vio estimulado para continuar su formación en Estados Unidos. Durante esta época contactó con el Dr. Lauren Ackerman, que asistía a un congreso en Buenos Aires, dando una charla sobre miositis osificante. Se conocieron, y le fue ofrecida al Dr. Rosai la oportunidad de trabajar en San Luis. Esta decisión le pareció al Dr. Lascano un tanto atrevida por lo que le expresó: ¿Cómo puede ponerse en manos de alguien que ha viajado tantos kilómetros, para hablar de algo tan insignificante?. El Dr. Rosai perseveró y fue a Washington, en 1965, marcando el comienzo de una larga y productiva relación con el Dr. Ackerman.

Durante los primeros años en el Barnes Hospital escribió artículos sobre el uso de la microscopía electrónica en el diagnóstico tumoral. En colaboración con el Dr. Dorfman, definió la entidad linfadenopatía masiva con histiocitosis sinusal (Enfermedad de Rosai-Dorfman). Describió el carcinóide tímico y su relación con la neoplasia endocrina múltiple tipo 1. El Dr. Ackerman percibió que Juan Rosai era uno de sus más brillantes Residentes y, en más de una ocasión, se le oyó decir, viendo un caso: "No se lo que es, enséñaselo a Juan". Cuando el Dr. Ackerman precisó de alguien que continuase el legado del clásico libro *Surgical Pathology*, eligió al Dr. Rosai; fue coautor de la quinta edición (1974) y, cuando apareció la sexta edición, en 1981, ahora titulada *Ackerman's Surgical Pathology*, el Dr. Rosai era el único autor. Este libro, ahora en su octava edición, constituye la piedra angular de las librerías de la mayor parte de los patólogos quirúrgicos.

En 1974 el Dr. Rosai se trasladó a la Universidad de Minnesota como Profesor de Patología y Director de Anatomía Patológica, asumiendo el método Ackerman-Barnes, de formación de jóvenes patólogos quirúrgicos. En la década siguiente, su interés investigador incluyó neoplasias vasculares y tiroideas, además de su continuada afición por la patología del timo. Además, en colaboración con el Dr. Gerald Levine, escribió el fascículo de tumores del timo de la 2ª serie del AFIP. Posteriormente aparece en la patología más contemporánea como un explorador precoz del uso de la inmunohistoquímica como método diagnóstico. Durante los años 1983 y 1984 pasó un periodo sabático en su recordada Italia, donde conoció a su esposa, María Luisa Carcangiu, también patóloga. Dejó Minnesota en 1985, para incorporarse en Yale como Jefe del Departamento de Patología. Fue nombrado Editor Jefe de los fascículos de la 3ª serie del AFIP en 1987, y en 1991 se trasladó a Nueva York para convertirse en "James Ewing Professor" y Jefe del Departamento de Patología del Memorial Sloan Kettering. Aquí fue capaz de continuar con sus dos grandes pasiones en la vida: la patología quirúrgica y la ópera. En 1992 apareció el fascículo de los tumores del tiroides de la 3ª serie del AFIP, que escribió en colaboración con la Dra. Carcangiu y el Dr. DeLellis. Siempre en la vanguardia de los nuevos métodos diagnósticos, el Dr. Rosai ha escrito artículos sobre el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de micrometástasis. También ha puesto sus manos en la historia con la publicación de: *"Guiando la mano del cirujano: la historia de la Patología Quirúrgica Americana"* (1997). El perfil del "hombre renacentista" parece reflejarse en su personalidad. Recientemente, quizás atraído por el reclamo de La Scala, el Dr. Rosai ha regresado a su Italia natal como Director del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional del Cáncer, en Milán, un traslado al

rector del Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional del Cáncer, en Milán, un traslado al que algunos amigos del Dr. Rosai han aludido como “esta locura italiana”. El explica que “... durante años ha sentido una fuerte, casi biológica atracción, por este país que de hecho es el mío, a pesar de que viví aquí sólo hasta los ocho años ...”. Ahora se cierra el círculo de un viaje de 60 años por tres continentes.

En esta época de creciente subespecialización, el Dr. Juan Rosai puede ser el último de los grandes patólogos quirúrgicos generales. El ha influenciado nuestra práctica de la patología quirúrgica de forma fundamental, como científico básico, profesor y autor inigualable.

ROL DE LA HISTOLOGIA COMO INSPIRADORA GUIA Y CELADORA DE LA BIOLOGIA

(The Continuing Role of Morphology in the Molecular Age)

The discussion of the role that morphology plays and in all likelihood will continue to play for long time to come in “the molecular age” can be divided into two separate categories, *i.e.*, those of diagnostic pathology and investigative pathology. Regarding the former, it is my contention that as of today there is no technique in all of medicine that provides so much information so quickly and for such little cost as the H&E technique. Before too many eyebrows are raised, let me back up this statement with two examples. The first is a biopsy of a cervical lymph node in a 25 year-old woman that shows a papillary carcinoma featuring nuclear pseudoinclusions and psammoma bodies. The pathologist examining that section will be able to tell the clinician: *“This patient has a metastatic tumor in this lymph node. The primary tumor is located in the thyroid gland, most likely in the homolateral lobe. It may be very small and not detectable by clinical or radiographic means but, trust me, it is there. It is made up of epithelial, more specifically glandular, and even more specifically thyroidal follicular cells. It is likely to be accompanied by multicentric microscopic foci throughout the gland. If radiation had been administered to the neck of this patient during infancy, you should assume a causal relationship with the tumor. Other cervical lymph nodes are likely to be involved, particularly those in the central compartment. The lung is the other site you should look at for additional metastases, but other organs are not likely to be affected at this point. These tumor cells have the capacity to incorporate iodine. This means that if there are any additional tumor foci in this patient, they are likely to show up with a small dose of radioactive iodine, and to regress if a larger dose were to be administered. Most notably, despite the presence of a malignant tumor that has spread out beyond its original site, I can confidently tell you that 10 years from now this patient will probably be alive and well.”* The second example is a biopsy from a rapidly growing large mass centered in the thyroid gland of a 72 year-old man showing a malignant spindle cell tumor featuring numerous mitoses, extensive necrosis, and blood vessel invasion. After looking at an H&E section of this tumor, the pathologist will be able to tell his clinical colleague: *“Although this tumor looks very similar to a spindle cell sarcoma of soft tissues and it may be called such by the unwary, it is in reality an undifferentiated carcinoma with a sarcoma-like appearance. It is composed of follicular cells, but has not arisen de novo from normal cells. Rather, it represents the end-of-the-line progression of a pre-existing, well-differentiated tumor that had been there for a long time and that, in all likelihood, was a papillary carcinoma, even if I see no trace of it at present. This anaplastic carcinoma is probably all over the thyroid, has extended beyond the gland, and is accompanied by lymph node and distant metastases. No matter what treatment you will institute, I am sorry to tell you that this patient will die of this tumor within 2 years and probably in the course of the next few months.”*

I hope the reader will agree that the amount of information that the examination of these samples has provided is staggering. The fact that this is the case should not be too surprising. After all, the morphologic appearance of a tumor as seen in an H&E slide represents the grand synthesis of thousands of genes working in concert and sometimes in opposition, and there is probably not a single gene that plays an important role in the neoplastic process whose expression is not manifested in one way or another in a morphologic change that can be detected by those with the training and ability to do it. Therefore, from a practical medical standpoint, the challenge of any new technique, whether molecular-based or not, is to show that it can provide information of prognostic or therapeutic significance that goes above and beyond that already provided by the standard technique. It is my impression that this does not happen as often as some people claim it does. Actually, out of the hundreds of “markers” that have been described as being statistically associated with a clinically important feature of solid tumors (such as survival), no more than a handful will retain their alleged predictive value once these tumors have been segregated into the appropriate categories based on morphologic parameters. That fact rarely comes across in the articles one reads on these markers. The most benevolent explanation is that the authors did not think about it, perhaps because they did not have an anatomic pathologist in the study who should have raised and evaluated

the issue. A more cynical interpretation is that they have made a conscious or unconscious effort to suppress that aspect of the study from their minds and from the paper.

Viewed from this angle, morphology remains the gold standard against which any claim based on new technology needs to be measured. Gonzalez-Crussi expressed this feeling very well when stating that, “*as pathologists, we subscribe to the belief that the time-honored interpretation of histopathology is preeminent in tumor diagnosis. Yes: However sophisticated and ‘modern,’ a novel diagnostic technique ought to be suspect if it does violence to a universally agreed upon diagnosis arrived at by more traditional means*” (Am J Surg Pathol 1987; 11: 491).

From the point of view of the causes and mechanisms of tumor formation, *i.e.*, tumor etiology and pathogenesis, morphology is also in a position to play a vital role, although unfortunately not too many people realize it. Many examples can be quoted in support of this claim the history of desmoplastic small cell tumor being a good (and close to the heart) example. It was through morphology that the entity was first identified, a process that led to the discovery of a specific chromosomal translocation and in turn to a specific gene fusion. One wonders how long would it have taken for the molecular techniques to detect by themselves the uniqueness of the change and from there the existence of an entity. Actually, if one thinks about the major advances that have been made in the field in recent years, one realizes that most of them (at least in the field of solid tumors) have occurred as a result of the symbiosis of pathologists and molecular biologists, rather than each of them working in isolation. The Director of the NCI issued last year a much publicized “Director Challenge” for a new classification of tumors based on molecular parameters that will replace the existing morphology based classification and that will provide clinically more meaningful information. This high aim would greatly benefit from a slight modification to the premise. I think that the new classification will derive from a blending of the information derived from morphology and molecular biology *rather* than the substitution of one set of information for another. Even if one were to accept that eventually the molecular-based information will be self-sufficient, I seriously doubt whether this will occur without morphology having contributed mightily to every step of the process. Perhaps I may be allowed to conclude this diatribe by sharing some preliminary and probably hopelessly naive conclusions I have drawn from some of the tumor molecular alterations that have been described recently. ² A clearcut correlation exists between some cytogenetic/ molecular alterations and the tumor morphology/phenotypes. Well-known examples are synovial sarcoma, Ewing sarcoma/ PNET, alveolar rhabdomyosarcoma, and extraskeletal myxoid chondrosarcoma. ² This correlation sometimes also operates at the level of the microscopic subtype or variety of the tumor, as in the various forms of adipose tissue neoplasms or the two major forms of synovial sarcoma. ² The level of some of these correlations is impressive, but few if any of them reach the 100% level. Contradictory results are being documented, and it is likely that many more will be recorded in the near future. This should not come as a big surprise because it is exactly what has happened with all other techniques in pathology, including electron microscopy and immunohistochemistry. ² Correlations between specific molecular alterations and the fundamental biologic properties of the tumor (such as the capability to metastasize or the overall prognosis) are less numerous and impressive, particularly when one takes into account the factors stated in the introduction. ² It is difficult to believe that any of the single genetic alterations found in the various types of solid tumors are sufficient by themselves to confer to cells all of the behavioral properties of the tumors in which they occur. The evidence suggests instead that those alterations can be present in otherwise normal cells, while still accepting the possibility of those changes predisposing the cells that contain them to evolve into fully neoplastic elements and/or displaying the phenotypical features associated with those molecular alterations when becoming neoplastic. ² It may be premature to assume that the presence in two separate tumor nodules of one or more identical molecular alterations indicates that those two tumors arose from the same cell, and that therefore one is a metastasis from the other (or, alternatively, that both of them are metastases from a third source). It seems just as logical to assume that a given carcinogenic stimulus can induce independently the same molecular alterations in two or more cells. When the genes truly responsible for the neoplastic behavior will be identified, it is likely that they will be found to cross the conventional “histogenetic” lines into which tumors have been compartmentalized. It is through this route that the new “molecular classification” of tumors asked for in the NCI Director Challenge may come to fruition. ² It is likely that the ultimate mechanism for the behavior of cancer cells will be found not to be the result of the grand total of genetic alterations but rather one or more key events that reactivate mechanisms already present in the cells, which fulfilled sometime in the past (whether ontogenetically or phylogenetically speaking) a crucial biologic task.

Copyright © 2001 by The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.

SESION PLENARIA

PATÓLOGOS Y ONCÓLOGOS: ANTE UN OBJETIVO COMÚN.

Pilar España Saz
Jefe del Servicio de Oncología Médica
Hospital Universitario Clínica Puerta de Hierro.
Universidad Autónoma de Madrid

La especialidad de **Oncología Médica**, es una de las más jóvenes en el grupo de las especialidades médicas y en la estructura de los hospitales; pero desde siempre la relación con los patólogos ha sido incuestionable

Si hay una premisa que todo oncólogo debe cumplir, es la de no poner tratamiento oncológico a ningún enfermo del que no se disponga de un **informe de Patología** completo. Los Oncólogos dependemos de los patólogos para elaborar nuestros pronósticos, para decidir el tratamiento, para confirmar sospechas evolutivas y en general, basamos en la Anatomía Patológica gran parte de nuestra actividad clínica, incluida la valoración de factores pronósticos fundamentales cuando informamos a los enfermos y sus familiares.

Hoy por hoy, el **diagnóstico histopatológico** mediante el microscopio de luz, la microscopía electrónica, la inmunohistoquímica y las nuevas técnicas de genética molecular, citogenética, o análisis del ADN, son la **base del diagnóstico del cáncer**, sobre la cual trabajamos los especialistas en Oncología. Un Oncólogo necesita siempre el diagnóstico de seguridad de que el enfermo padece un tumor maligno, antes de aconsejar un tratamiento. El único diagnóstico que nos permite estar seguros, es el basado en el estudio microscópico del tejido o de las células del tejido que se estudia.

En nuestra labor clínica, el contacto con los patólogos es diario, unas veces por la necesidad de recoger información con la máxima rapidez posible, otras para aportar más información que pudiera ser útil al Patólogo en el momento de realizar el diagnóstico; en otras ocasiones el contacto es en las sesiones conjuntas de revisión de casos, en las que el intercambio de información por ambas partes puede pormenorizarse más que en una hoja de petición de pruebas.

Los Oncólogos esperamos mucho de los Patólogos, pero conocemos las limitaciones de los métodos de diagnóstico disponibles. La citología y histopatología pueden ser insuficientes para hacer un diagnóstico de benignidad vs malignidad, o para aclarar el tipo histológico de un determinado tumor, que sí puede ser precisado por la inmunohistoquímica. Las nuevas técnicas y posibilidades de estudio y de diagnóstico diferencial, que se han abierto como consecuencia del enorme desarrollo de la Biología Molecular hacen que esperemos cada día más de los Patólogos. Quizá nuestro deseo de más y mejor información sobrepase, en ocasiones, lo que sensatamente cabe esperar de la Patología en el momento actual.

Diagnóstico.

A pesar del adelanto en medios diagnósticos de imagen, TAC, RM, PET, SPECT etc, nada ha podido reemplazar al diagnóstico histológico en el campo de la Oncología.

Los Oncólogos esperamos que el Patólogo nos dé información, lo más precisa posible sobre la naturaleza de la lesión del enfermo. Pero la descripción benigno / maligno es hoy notablemente insuficiente, porque también en el mundo de la Oncología han mejorado las posibilidades terapéuticas en situaciones específicas, que nos obligan a intentar conocer múltiples aspectos de las características patológicas del tumor, que pueden modificar tanto el pronóstico como el enfoque terapéutico.

Clásicamente un **Oncólogo espera que el Patólogo** le informe sobre una serie de datos básicos como: Tipo histológico, grado de diferenciación del tumor, tamaño tumoral, invasión tumoral en los capilares del tumor, afectación tumoral de los bordes de resección quirúrgica, necrosis, afectación ganglionar, número afectado, localización. etc. Estos datos nos informan sobre el tejido de origen y el probable comportamiento posterior, especialmente la tendencia a recaídas locales o distantes. Con todo ello elaboramos un **pronóstico y una orientación terapéutica**. No proponemos el mismo enfoque en un carcinoma epidermoide de que en uno de células pequeñas. No solamente la quimioterapia va a ser diferente, también la posibilidad quirúrgica se decidirá según este tipo histológico e incluso la batería de los estudios de extensión van a ser distintos. En el momento actual cabe exigir al Patólogo que nos asegure la malignidad de la lesión, incluso si para ello es necesario realizar técnicas muy nuevas en la asistencia médica, como la de FISH, o la búsqueda de reordenamientos que permiten asegurar o no la clonalidad de las células estudiadas. En algunos tumores, el conjunto de alteraciones que pueden estudiarse mediante técnicas de inmunohistoquímica pueden definir una entidad clínica, claramente diferenciada tanto en su terapéutica como en su evolución. Puede ser el caso del neuroblastoma, en el que la amplificación de N-MYC, la expresión de TRK-A, la

ploidía y la pérdida del cromosoma 1p, conforman un diagnóstico que puede ser informativo aún en los casos con tumor más indiferenciado.

Las técnicas de inmunohistoquímica no constituyen un lujo asistencial o un parámetro para investigadores. Actualmente necesitamos conocer algunos datos, que no puede ofrecer la microscopía óptica, como el estado de algunos antígenos tumorales más o menos específicos como es el caso de CD20 en los linfomas de bajo grado o el estado her-2/neu en los cánceres de mama. Existen productos terapéuticos, como los anticuerpos monoclonales cuya eficacia está ligada a la presencia o ausencia de dichos antígenos, por lo que conocer su estado es imprescindible a la hora de decidir un tratamiento.

Gracias a las **nuevas técnicas aplicadas al campo de la Anatomía Patológica**, se están desglosando **entidades clínicas**, por ejemplo los tumores desmoplásicos intestinales, c-KIT positivos, englobados previamente en el confuso grupo de los sarcomas de partes blandas. Estos tumores tienen un comportamiento natural peor que el de otros sarcomas abdominales, pero tienen la ventaja de responder bien a tratamientos quimioterápicos específicos. Un diagnóstico de certeza en estos casos no es una futilidad a académica, es una necesidad asistencial y debe poder realizarse en todos los enfermos en los que se sospeche su existencia.

Es probable que la exigencia clínica, oncológica, se amplíe en los años próximos porque las necesidades diagnósticas se modifican conforme aparecen nuevas opciones terapéuticas. Dos de los campos en los que los Oncólogos vamos a incidir y presionar a los Patólogos van a ser en el de la detección de la enfermedad residual mínima y en la distinción entre recaída o metástasis de un tumor conocido o presencia de un segundo tumor primario.

Segundas opiniones

Es uno de los terrenos más polémicos en la relación con los Patólogos.

En la asistencia oncológica es habitual la demanda de una segunda opinión por parte de los enfermos diagnosticados de cáncer. Las segundas opiniones tienen dos vertientes, por una parte hay enfermos vistos y diagnosticados en un determinado centro hospitalario que solicitan las pruebas diagnósticas que se les han hecho, entre ellas la Anatomía Patológica, para consultar en otro hospital. También ocurre el caso inverso que es la nueva consulta en un Servicio de Oncología de un enfermo visto y diagnosticado en otro centro y que puede acudir con o sin pruebas diagnósticas.

Es evidente que una segunda opinión no puede realizarse sobre los informes clínicos realizados por otros médicos. Una segunda opinión requiere la revisión individual de cada una de las pruebas diagnósticas y el informe de otro médico especialista. Una segunda opinión en Oncología no puede hacerse sobre la base de un informe escrito, sin revisar las preparaciones histológicas del caso. Debería ser práctica médica habitual adjuntar preparaciones histológicas demostrativas del diagnóstico al hospital donde el enfermo solicita una segunda opinión y debería ser imprescindible que se disponga de las preparaciones histológicas en las que se ha basado el diagnóstico en el hospital donde va ser tratado el enfermo. Nadie duda de la capacidad y preparación de los especialistas en Anatomía Patológica. Partimos de la base de que menos de un 5% de los diagnósticos histopatológicos tienen discrepancias diagnósticas de importancia clínica. Pero esa cifra es suficiente como para que el médico responsable de decidir y llevar a cabo un tratamiento con considerables efectos secundarios, necesite tanto la confirmación diagnóstica como la posibilidad de reconsiderar el caso, junto con el Patólogo, las veces que sea preciso, de comparar con otras muestras que se puedan obtener a lo largo de la evolución o de reconsiderar el caso tras años de evolución, a la luz de nuevos conocimientos.

Como Oncóloga y conociendo bien la extraordinaria calidad de la Anatomía Patológica en España, me siento más cómoda cuando pueden disponer los patólogos del Hospital en el que trabajo, de los bloques de parafina o de las preparaciones histológicas de los casos de los enfermos que trato y puedo consultarles cada vez que es necesario, por dudas en la evolución, comportamiento atípico del tumor, recaídas etc. **Aún la patología tumoral más banal debería ser revisada y confirmada en el Centro donde se va a tratar** al enfermo. Estoy convencida de que si esta fuese la práctica habitual, los Patólogos dejarían de sentirse examinados cada vez que se solicita el material histopatológico para enviarlo a otro hospital y lo llegarían a considerar tan normal como el envío de las radiografías o de los análisis del enfermo.

Autopsias

Las autopsias son la mejor fuente de información para el médico clínico. El Oncólogo busca en las autopsias no tanto el diagnóstico de seguridad sobre el tumor primario, que en un altísimo porcentaje de los casos ya es conocido, sino **la explicación a la evolución que ha seguido la enfermedad**, como ha respondido al tratamiento y si es posible cual ha sido la causa de la muerte: si esta era previsible, tratable, potencialmente curable etc. Se busca la comprobación de lesiones vistas en la autopsia con las diagnosticadas con otras técnicas, especialmente radiológicas como TAC o RM, o averiguar si hay correspondencia entre alteraciones de parámetros bioquímicos y alteraciones macro o microscópicas de determinados órganos. En resumen, pretendemos estudiar en el propio terreno, si lo que sospechábamos clínicamente está en relación con lo encontrado, si podríamos haber llegado a otros diagnósticos con los datos que teníamos o que otras posibilidades podríamos tener en cuenta cuando nos encontramos con datos semejantes a los del sujeto en estudio.

Quizá en Oncología tengamos menos problemas que en otras especialidades en conseguir las autopsias. La relación que se establece entre el enfermo oncológico y sus médicos es la de un enfermo crónico o semicrónico. Existe un contacto prolongado y se establece mayor confianza que en otras especialidades, que puede ser beneficioso a la hora de solicitar la autorización de autopsia. Podemos encontrar la situación contraria, consistente en la reacción de algunos familiares que consideran que ya sabemos todo lo referente a su familiar porque se le han hecho múltiples pruebas en vida; o los que curiosamente justifican la negativa con un incongruente “bastante ha sufrido ya”.

Quizá una de las razones que explican el relativo alto número de autopsias en los enfermos oncológicos es el menor miedo a errores diagnósticos en nuestra especialidad, en la que los enfermos necesitan obligatoriamente un diagnóstico histopatológico previo. Por el contrario puede verse perjudicado por el hecho de que el gran número de pruebas radiológicas, bioquímicas, cirugías previas etc hace que creamos que ya sabemos todo sobre el enfermo y no necesitamos la información de la autopsia.

Sería un grave error creer que podemos llegar a prescindir de los datos histopatológicos en Oncología. Probablemente nos vamos a hacer más y más dependientes conforme los conocimientos de biología molecular y las técnicas sobre tejidos nos permitan individualizar las características de cada caso y estos datos puedan repercutir en el pronóstico, tratamiento y en la evolución de los enfermos con cáncer.

PATOLOGIA MOLECULAR: LA INTEGRACION DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN LA PATOLOGIA

Xavier Matias-Guiu,

Servicio de Anatomía Patológica.

Hospital de la Sta Creu i St Pau, Barcelona.

Durante décadas, los patólogos hemos empleado la morfología para efectuar nuestros diagnósticos, mediante la valoración de las características macro y microscópicas de una lesión, en su adecuado contexto clínico. En los últimos veinte años hemos asistido a una creciente aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas en nuestra actividad diagnóstica. La inmunohistoquímica nos ha permitido identificar proteínas en las células y los tejidos; proteínas que distinguen distintas estirpes celulares, reflejan actividad proliferativa o identifican la síntesis de productos de secreción. La utilización racional de la morfología y las técnicas inmunohistoquímicas permite el diagnóstico de la inmensa mayor parte de nuestra labor asistencial.

La patología molecular no es más que la utilización de unas nuevas herramientas (las de la identificación de alteraciones en el DNA o RNA) en el diagnóstico patológico. No deben ser vistas como una amenaza a nuestros métodos tradicionales, sino como unas técnicas complementarias de indudable valor; las técnicas patológicas tradicionales seguirán siendo por muchos años nuestras herramientas predominantes, ya que son más rápidas y eficientes. Además, las técnicas moleculares requieren de una adecuada valoración patológica tradicional de la lesión. Como discutiremos más adelante, la identificación de una determinada alteración molecular puede carecer de significado biológico cuando se interpreta de espaldas a las características clínicas y patológicas. Sin embargo, no es aventurado afirmar que la patología molecular nos va a permitir ser más exactos al realizar nuestro trabajo diagnóstico (1).

La utilidad actual de las técnicas moleculares se centra en: a) el diagnóstico; b) el pronóstico; y c) la prevención de las enfermedades, aunque, como veremos más adelante, sus aplicaciones pueden extenderse hasta abarcar aspectos relativos al control de calidad de nuestros departamentos de Anatomía Patológica.

Aplicación de la Patología Molecular en el Diagnóstico

Aunque el diagnóstico de las enfermedades infecciosas recae frecuentemente en los servicios de microbiología, es evidente que, en ciertos casos, el patólogo tiene un papel predominante. Existen ciertas enfermedades infecciosas que dejan una huella morfológica específica, mientras que en otras, las características microscópicas reducen el diagnóstico diferencial. La utilización de técnicas moleculares en las biopsias, en su contexto morfológico, puede permitir un diagnóstico de certeza en muchas ocasiones (2,3).

Conocemos en la actualidad la base molecular de gran cantidad de tumores. En muchos de ellos, como en algunos sarcomas, la identificación de la alteración molecular es diagnóstica de un tipo histológico específico (4,5). Estas herramientas pueden ser de utilidad en la confirmación del diagnóstico patológico, pero también en la valoración de la enfermedad residual (6,7), ya que tienen una sensibilidad mayor a la de los métodos morfológicos tradicionales.

Con frecuencia, los patólogos nos enfrentamos a la evaluación de un tumor, en un paciente que ha presentado otra neoplasia de forma sincrónica o metacrónica (8,9,10). La distinción entre una metástasis del tumor de una localización en la otra de la posibilidad de dos tumores independientes es muy importante en el pronóstico. Sin duda, la identificación de alteraciones moleculares comunes en ambos tumores es una herramienta eficaz, que, sin embargo, no esta exenta de riesgos, especialmente cuando la valoración se hace de espaldas a las características clínico-patológicas del paciente.

Aplicación de la Patología Molecular en el Pronóstico

Otra de las posibilidades de la patología molecular es la de identificar alteraciones moleculares asociadas con una mayor agresividad biológica. Aunque a priori, se trata de un campo de gran interés, su utilidad se ve amenazada por el problema de la heterogeneidad tumoral (11). En otras palabras, como los tumores están constituídos por múltiples subclonas celulares de distinta agresividad, la no identificación de ciertas alteraciones en una muestra de un tumor no garantiza que estas no se encuentren en otras áreas de la neoplasia. La posible identificación de alteraciones moleculares que sean indicadoras de respuesta a ciertas terapias antineoplásicas hace aún más atractivo este campo (12).

Aplicación de la Patología Molecular en la Prevención

En este apartado se podrían incluir los cánceres familiares.

El diagnóstico molecular del cáncer familiar ofrece dos prespectivas:

1) el diagnóstico precoz de afectación en miembros de familias, en las que se conoce la alteración molecular responsable. En estos casos, el estudio molecular se suele hacer a partir de DNA obtenido de sangre periférica. En síndromes de gran penetrancia, como en MEN-II, el diagnóstico molecular conlleva la tiroidectomía profiláctica, con lo que se evita el desarrollo ulterior del tumor(13,14).

2) el diagnóstico de cáncer familiar en pacientes, cuyos antecedentes familiares no son conocidos, o claros, o bien, que no cumplen exactamente los criterios clínicos (15,16). En este caso, la identificación de la mutación germinal (presente en tejido tumoral y en tejido normal) en DNA obtenido de las biopsias y piezas quirúrgicas que se estudian en los servicios de Patología, permite efectuar el diagnóstico de cáncer familiar al mismo tiempo que se efectúa el diagnóstico patológico.

Otras aplicaciones

Por su versatilidad, las técnicas moleculares pueden ser de utilidad en el control de calidad de los departamentos de Anatomía Patológica. Como ejemplo de esta situación está la identificación de muestras mal etiquetadas o de fragmentos tumorales erróneamente mezclados en el procesamiento de biopsias (17). Aunque en todos nuestros laboratorios, extremamos los controles para que estas eventualidades ocurran, es importante contar con estas técnicas que, en casos de dudas, pueden evitar problemas médicos o incluso judiciales de importancia.

REFERENCIAS

1. Jones D, Fletcher CDM: How shall we apply the new biology to diagnostics in Surgical Pathology. J Pathol 1999 187:147-154
2. Margall N, Matias-Guiu X, Chillón M, Coll P, Alejo M, Nunes V, Quilez M, Rabella N, Prats G, Prat J: Detection of human papillomavirus 16 and 18 DNA in epithelial lesions of the lower genital tract by in situ hybridization and polymerase chain reaction: Cervical Scrapes are not substitutes for biopsies. J Clin Microbiol 1993 31:924-930.
3. Gras E, Matias-Guiu X, García A, Argüelles R, Espinosa I, Sancho FJ, Sola R, Martínez-Araque MJ, Conde J, Teruel A, Prat J. PCR analysis in the pathologic diagnosis of Whipple's disease. emphasis on extraintestinal involvement or atypical morphological features. J Pathol 1999 188:318-321

4. Ladanyi M: The emerging molecular genetics of sarcoma translocations. *Diagn Mol Pathol* 1995 4:162-174
5. de Alava E, Gerald WL: Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000 18:204-13
6. Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S: Polymerase chain reaction detection of micrometastases and circulating tumor cells: Application to melanoma, prostate, and thyroid carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 1999 8:165-175
7. de Alava E, Lozano MD, Patino A, Sierrasesumaga L, Pardo-Mindan FJ: Ewing family tumors: potential prognostic value of reverse-transcriptase polymerase chain reaction detection of minimal residual disease in peripheral blood samples. *Diagn Mol Pathol* 1998 7:152-7
8. Cuatrecasas M, Matias-Guiu X, Prat J: Synchronous mucinous tumors of the ovary and appendix. A comparative clinicopathologic study of six cases with analysis of k-ras mutations. *Am J Surg Pathol* 1996 20:739-746
9. Matias-Guiu X, Bussaglia E, Catusus LI, Lagarda H, Gras E, Machin P, Prat J: PTEN mutations are not helpful in the differential diagnosis of simultaneous carcinomas involving the endometrium and the ovaries. *Clin Cancer Res* 2000 6:1598-600
10. Matias-Guiu X, Garcia A, Curell R, Prat J: Renal cell carcinoma metastatic to the thyroid gland. A comparative molecular study between the primary and the metastatic tumor. *Endocrine Pathol* 1998 9:255-260
11. Matias-Guiu X, Villanueva A, Cuatrecasas M, Capella G, DeLeiva A, Prat J: p53 in a thyroid follicular carcinoma with foci of poorly differentiated and anaplastic carcinoma. *Path Res Pract* 1996; 192:1242-1249.
12. Mato A, Matias-Guiu X, Chico A, Webb S, Cabezas R, Berna LI, de Leiva A. Somatostatin and somatostatin receptor subtypes gene expression in medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocr Metab* 1998; 83:2417-2420.
13. Komminoth P, Kunz EK, Matias-Guiu X, Hiort O, Colomer A, Roth J, Heitz PhU: Analysis of ret proto-oncogene point mutations allows for the discrimination of sporadic and inherited medullary thyroid carcinoma. *Cancer* 1995 76:479-89
14. Komminoth P, Muletta-Feurer S, Saremaslani P, Kunz EK, Matias-Guiu X, Hiort O, Schroder S, Seelentag W, Roth J, Heitz PhU: Molecular diagnosis of multiple endocrine neoplasia (MEN) in paraffin-embedded specimens. *Endocrine Pathol* 1995 4:267-278
15. García A, Matias-Guiu X, Cabezas R, Chico A, Prat J, Baiget M, Leiva A: Molecular diagnosis of von Hippel-Lindau disease in a kindred with a predominance of familiar pheochromocytoma. *Clin Endocrinol* 1997; 46:359-363.
16. Martín-Campos JM, Catusus LI, Chico A, Mayoral C, Lagarda E, Gallart LI, Mato E, Rodríguez J, Matias-Guiu X, de Leiva A, Blanco F: Molecular pathology of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): report of two novel germline mutations and updated classification of mutations affecting the MEN 1 gene. *Diagn Mol Pathol* 1999, 8:195-204
17. Gras E, Matias-Guiu X, Catusus LI, Arguelles R, Cardona D, Prat J: Application of microsatellite PCR techniques in the identification of mixed-up tissue specimens in surgical pathology. *J Clin Pathol* 2000 53:238-240

PATOLOGÍA TUMORAL: INTEGRACIÓN DE DATOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS, INMUNOFENOTÍPICOS Y MOLECULARES.

Santiago Ramon y Cajal Agüeras.
Departamento de Patología, Clínica Puerta de Hierro, Madrid.

La **patología y la clínica oncológica** engloban un enorme espectro de tumores con una marcada heterogeneidad patológica, molecular y clínica. El diagnóstico de malignidad y la detección de factores pronósticos se basa fundamentalmente en el **estudio histológico** en más del 90% de los tumores malignos. **El estudio inmunofenotípico y molecular** es relevante en determinados grupos de tumores para confirmar y diagnosticar diversas entidades histopatológicas y se perfila como trascendental en la valoración de factores pronósticos y de parámetros relacionados con el tratamiento clínico. En cualquier caso, es básica la integración de datos clínicos, como la localización del tumor, la edad y el estudio de diseminación para completar la información pronóstica. Con todo ello, se pueden ir delineando una serie de premisas básicas en patología tumoral e ir integrando la información histológica, molecular y clínica que va a permitir la elaboración de factores pronósticos y su relación con pautas terapéuticas posteriores más precisas e individualizadas.

Desde el punto de vista **histológico**, se admite como básico que:

A) En primer lugar, el tamaño del tumor, el grado de atipia citológica, la diferenciación celular, la necrosis y la actividad proliferativa, siguen siendo los pilares esenciales pronósticos en la mayoría de los tumores. En este sentido, con la HE se pueden distinguir neoplasias de bajo y alto grado de malignidad histológica, lo que tiene corre-

lación pronóstica en gran número de tumores. Esta distinción es básica en lesiones como adenomas, tumores gliales, diversos grupos de tumores mesenquimales, en muchos procesos linfoproliferativos y en la mayoría de los carcinomas. Asimismo, en las lesiones pre-tumorales e invasivas, se puede considerar de indudable valor pronóstico la distinción de lesiones de bajo y alto grado de malignidad histológica: dicha distinción es clave en lesiones displásicas e hiperplasias con/sin atipia citológica en mama, endometrio y otras localizaciones. En el caso de los sarcomas dicha gradación, en tumores de bajo y alto grado de malignidad, puede tener significado pronóstico en Histiocitomas fibrosos malignos, liposarcomas, leiomiomas, angiosarcomas, sarcomas sinoviales, hemangiopericitomas, mixofibrosarcomas y fibrosarcomas. Por el contrario, con sólo los datos morfológicos no se puede establecer correlación pronóstica en el caso de tumores malignos de nervio periférico, sarcomas epitelioides, sarcomas de células claras, sarcomas de Ewing/PNET, rhabdomyosarcomas alveolar y embrionario, tumores desmoplásicos de células redondas y pequeñas, condrosarcomas mesenquimales y mixoides, sarcoma alveolar de partes blandas, hemangiopericitomas epitelioides, mesenquimomas malignos y osteosarcomas.

B) En segundo lugar, que en diversos grupos de tumores es imposible concluir histológicamente un diagnóstico de malignidad y que va a ser el tamaño del tumor, la localización y los datos estadísticos clínicos los que van a establecer un pronóstico de la presunta evolución clínica maligna. Por ejemplo: tumores renales de pequeño tamaño, tumores endocrinos, tumores de músculo liso, tumores condroides centrales ó periféricos, tumores adiposos y fibrohistiocitarios superficiales ó profundos. Asimismo, se han descrito diversas entidades de tumores de partes blandas de bajo grado de malignidad clínica ó de conducta biológica indeterminada, por ejemplo: Fibrosarcoma infantil, sarcoma fibromixoide de bajo grado, liposarcoma fusocelular, tumor fibromixoide osificante atípico, tumor angiectático hialinizante pleomorfo, mioepitelioma de partes blandas, histiocitomas fibrosos maligno angiomatoides. Por el contrario, también hay tumores con muy escasa atipia citológica y comportamiento clínico agresivo como el fibrosarcoma esclerosante epiteliode.

C) En tercer lugar, dada la gran heterogeneidad tumoral existente, especialmente, en tumores estromales y la tendencia a formar patrones morfológicos "semejantes", independientemente de las células de origen, es razonable pensar/proponer que el amplio grupo de tumores mixoides, fusocelulares, de células redondas, de patrón rabdoide, de pseudotumores, de hemangiomas histiocitoides,... tengan denominadores comunes moleculares que permitan agrupar dichas entidades anatomopatológicas en entidades clinicopatológicas. Un ejemplo son los más de 60 tumores mixoides ó predominantemente mixoides descritos. Obviamente, no todos tienen un pronóstico clínico semejante pero sí va ser posible agruparlos en 7-8 subentidades con características semejantes clínicas y presumiblemente moleculares. Este esfuerzo de síntesis histopatológica, clínica y molecular, con antecedentes ya aceptados en grupos tumorales como las lesiones glioneuronales, los tumores del grupo de hemangiomas epitelioides ó los pseudotumores, pensamos que va a ser esencial para definir la patología de las próximas décadas. Dicho esfuerzo de síntesis no conlleva la eliminación de entidades descritas sino que pretende encarrilar los datos y características tumorales con las mejores alternativas terapéuticas posibles.

En relación con el **estudio inmunofenotípico** hay que valorar y asumir que: A) es esencial para la correcta tipificación de los procesos linfoproliferativos, y en el diagnóstico y pronóstico de leucemias, síndromes mieloproliferativos y mielodisplásicos, B) en el diagnóstico de tumores neuroendocrinos, endocrinos, neuroectodérmicos, C) en el estudio de las metástasis de origen desconocido y clasificación de neoplasias indiferenciadas, establecimiento de la estirpe celular de neoplasias de histogénesis incierta (ej: hemangioma esclerosante pulmonar, tumor bronquioloalveolar intravascular, granulomatosis linfomatoide...), D) en la distinción de tumores estromales, E) en las definiciones de familias de tumores (ej: tumores de células epitelioides perivasculares: "sugar tumors" de pulmón, páncreas y útero, angiomiolipomas renales y extrarrenales, linfangioleiomiomatosis y tumores miomelanocíticos de células claras del ligamento falciforme y del ligamento redondo hepáticos), F) en la distinción de adenocarcinomas y mesoteliomas, G) en el establecimiento de índices proliferativos H) en la valoración de la angiogénesis y en la identificación de invasiones vasculares neoplásicas con marcadores endoteliales I) en el estudio de marcadores diagnósticos y pronósticos (receptores de estrógenos y progesterona, Neu, p53, Ciclina D1, p27, topoisomerasa II,... J) para contribuir al diagnóstico diferencial del melanoma con simuladores melanocíticos benignos (nevus desmoplásico, nevus penetrante profundo...) y del nevus melanocítico compuesto con el melanoma con maduración: por el patrón de distribución del HMB45 y el ki67, K) en estudios de carcinomas mixtos exocrinos/endocrinos (digestivos, pulmonares...), L) en la determinación de microinvasión (ej: mama con ausencia de células mioepiteliales),..

Desde la perspectiva **molecular**, hay muy pocos tumores con alteraciones moleculares claramente distintivas y específicas. Dentro de la enorme heterogeneidad existente y de las más de 120 alteraciones oncogénicas que ya se han descrito, se tiende a agrupar dichos datos en al menos 6 grandes acontecimientos moleculares y bioquímicos, que condicionan el fenotipo maligno histológico y la evolución clínica agresiva. Dichas alteraciones incluyen: A) la autosuficiencia celular en señales de crecimiento (generalmente por activación de oncogenes: ras,...), b) la capacidad replicativa "sin limite" (generalmente por inactivación de genes supresores, y por actividad telomerasa), c) la insensibilidad a factores inhibidores del crecimiento celular, d) la disminución ó bloqueo de la apoptosis fisiológica, e) la capacidad de inducir angiogenesis y d) la capacidad de invadir tejidos y de metastatizar (Weinberg, 2000). Asimismo, y dentro de este abanico de alteraciones bioquímicas es importante resaltar que la mayor parte de los tumores tienen alteraciones en cuatro importantes vías celulares de activación: 1) estado fun-

cional pRb (p16-, mpRb, activación ciclina D1,...); 2) alteración funcional p53 (mp53, activación mdm2, inactivación de p14ARF, de caspase 9,...); 3) activación de vías de supervivencia (ras, AKT, PI3K,...); 4) activación de la ruta B-catenina (inactivación APC, mB-catenina, TCF-4).

En relación con el estudio molecular ya está establecido que es fundamental para: A) estudios de clonalidad en procesos linfoproliferativos, B) la identificación de translocaciones tumorales específicas: en el tumor de Ewing (con importancia diagnóstica y pronóstica según el tipo de translocación EWS-FLI1 detectada), en el rabdomiosarcoma alveolar, sarcoma sinovial, linfomas, tumor desmoplásico infantil, desmoplásico de células redondas (tiene el peor pronóstico de los tumores de células redondas...), C) el estudio de pérdidas alélicas del cromosoma 18q y de inestabilidad de microsátélites en tumores de colon, D) el tipaje del serotipo de virus del papiloma humano en lesiones cervicales, que se asocia a pronóstico y ya está orientando actitudes terapéuticas y protocolos clínicos muy dirigidos, E) en el estudio de genes asociados a cánceres familiares (>20 identificados), F) en la tipificación de tumores endocrinos (síndromes MEN y tumores esporádicos endocrinos), de tumores renales, J) identificación de DNA circulante y la detección de enfermedad mínima residual y de micrometástasis, M) en la identificación de secuencias virales en tumores...

No obstante, la integración real de los datos disponibles y su aplicación práctica diaria asistencial tiene que ser muy cauta y basarse en las directrices marcadas y consensuadas por los diversos grupos internacionales de trabajo incluyendo el American Joint Committee on Cancer, la Internacional Union against Cancer y el College of American Pathologists. En dichos comités, se están revisando continuamente los factores "reales", basados en la "evidencia", pronósticos ó predictores de respuesta al tratamiento y aquellos factores que se van describiendo y que todavía no han sido formalmente aceptados como determinantes pronósticos "per se".

Por último queda indicar el papel trascendente que el **diagnóstico histopatológico-molecular** puede tener en la elaboración de protocolos terapéuticos más individualizados. El estudio por microchips puede a medio plazo ayudar a delimitar subgrupos de tumores con mejor o peor respuesta a la quimio y radioterapia y permitir realizar tratamientos clínicos más individualizados. En este sentido ya se están estudiando en ensayos clínicos inhibidores selectivos de la actividad de determinados oncogenes como ras, de quinasas dependientes del ciclo celular, de receptores tirosinquinasa como el oncogen neu, de serintreoninquinasa, de la ruta APC-cateninas, de la angiogénesis tumoral... Asimismo, es muy prometedor: a) la aplicación de adenovirus de replicación selectiva en células tumorales con alteración en p53 o en la proteína del retinoblastoma. b) el empleo de vectores con genes suicidas que matan a las células independientemente de las alteraciones moleculares involucradas y que tras la progresiva identificación de promotores tisulares y tumorales específicos pueden suponer un gran avance en el tratamiento oncológico, c) la relación entre genes de susceptibilidad y respuesta a la quimioterapia. En este sentido, la identificación y diagnóstico de aquellos genes ó factores relacionados con dichas aproximaciones terapéuticas como parte del estudio histopatológico va a ser imprescindible para la correcta indicación de los nuevos agentes terapéuticos.

Referencias

- 1: Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. Cell 2000 Jan 7;100(1):57-70
2. McCormick F. Signalling networks that cause cancer. Trends Cell Biol 1999 Dec;9(12):M53-6
3. Allen PW. Myxoma is not a single entity: a review of the concept of myxoma. Ann Diagn Pathol 2000 Apr;4(2):99-123
4. Kilpatrick SE. Histologic prognostication in soft tissue sarcomas: grading versus subtyping or both? A comprehensive review of the literature with proposed practical guidelines. Ann Diagn Pathol 1999 Feb;3(1):48-61
5. Dei Tos AP. Liposarcoma: new entities and evolving concepts. Ann Diagn Pathol 2000 Aug;4(4):252-66
6. C. Missero; S. Ramón y Cajal; P. Dotto. A Escape from transforming growth factor B control and oncogene cooperation in skin tumor development. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991; 88: 1295-1300.
7. S. Ramón y Cajal; S. Suster; R. Halaban; E. Filvaroff; P. Dotto. Induction of different morphological patterns of malignant melanoma in mice after transformation with bFGF, H-ras, myc, neu and E1a oncogenes. Am. J. Pathology. 1991; 138: 349-358.
8. R. Sánchez-Prieto; J.A. Vargas; A. Carnero; E. Marchetti; J. Romero; A. Durantez; J.C. Lacal; S. Ramón y Cajal. Modulation of cellular chemoresistance in keratinocytes by activation of different oncogenes. International Journal of Cancer. 1995; 60: 235-243.

9. S. Ramón y Cajal, R. Sánchez-Prieto; A. Anaya. A genetic model for undifferentiated cell tumor formation: similar tumors formed by different cell lines transformed by the E1a oncogene. *Histology and Histopathology*. 1995;10:811-820
10. R. Sánchez-Prieto; M. Quintanilla; A. Cano; M. Lleonart; P. Martín; A. Anaya; S. Ramón y Cajal. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1a gene. *Oncogene* 1996; 13:1083-1092.
11. P. Martín; C. Alonso; R. Sanchez-Prieto; M. Lleonart; C. Martínez; G. Gonzalez; A. Cano; M. Quintanilla and S. Ramón y Cajal. Adenovirus lacking the 19K- and 55K-E1B genes exert a marked cytotoxic effect in human malignant cells. *Cancer Gene Therapy* 6:554-563, 1999.
12. R. Sanchez-Prieto; E. De Alava; M. T Palomino, J Guinea, V Fernandez, S Cebrian, Lleonart; P. Cabello; P. Martín C. SanRoman; R. Borstein; J Pardo.; A. Martínez; F. Diaz Espada; Yve Barrios and S. Ramon y Cajal. An association between viral genes and human oncogenic alterations. The adenovirus E1a induces the Ewing 's sarcoma fusion transcript. *Nature Medicine* ,5: 1076-1081, 1999.
13. M. Lleonart, R. Sánchez, A. Moreno, P. Martín, S, Cebrian and S. Ramón y Cajal. Tumor heterogeneity. A morphological, molecular and clinical overview. *Histology and Histopathology*. Invited review, 15: 881-898, 2000

PATOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER PARA EL SIGLO XXI. PAPEL DE LA GENÓMICA Y LOS BANCOS DE TUMORES.

Miguel A Piris, Programa de Patología Molecular, CNIO; Madrid

La agresividad y respuesta al tratamiento de una neoplasia es un surrogado del conjunto de las alteraciones génicas en las células tumorales, dependiente también de las relaciones de estas con el estroma y el sistema inmune, y del estado general del paciente.

El Cáncer es una enfermedad social y multigénica, así las células tumorales desarrollan múltiples capacidades, como

- Invasión tisular y metástasis (inactivación de Cadherina E o β -catenina).
- Promoción de angiogénesis (VEGF-FGF1/2)
- Replicación ilimitada (telomerasa, ALT)
- Escape de apoptosis (PI3 k-AKT/PKB)
- Producción de señales de crecimiento autónomas (SOS-Ras-Raf-MAP kinase)
- Insensibilidad a señales de control del ciclo (P16-Cyclin D-CDK4-Rb)
- Inestabilidad genómica (reparación de DNA , p53-p53R2)

Objetivos de la Patología Molecular son, en consecuencia, el establecer las últimas tecnologías en genómica y proteómica, capaces de analizar la diversidad y complejidad de cada tipo de cáncer, enfocadas hacia el diagnóstico molecular de tumores, adecuando la terapia a cada paciente, y contribuyendo a la identificación de genes relevantes en cáncer esporádico y familiar. Para ello se pretende la creación de una Red de Bancos de Tumores que permita una aplicación masiva de estas técnicas moleculares en series de pacientes diagnosticados y tratados usando protocolos estandarizados.

Bancos de Tumores

Los Bancos Hospitalarios de Tumores promueven la creación de protocolos de captación tisular, tanto para tejido neoplásico y no neoplásico, que permitan el almacenamiento de tejido congelado y fijado, con garantías ético-deontológicas e instrumentales. Para ello han elaborado unos protocolos de manipulación tisulares idóneos, simples y homogéneos.

El desarrollo de los bancos de tumores optimizará los protocolos de manipulación del tejido, con trascendencia diagnóstica, investigadora, docente y legal; facilitando la realización de proyectos de investigación de excelencia científica; complementando la orientación de ensayos clínicos y posibilitando la realización de estudios moleculares como parte del proceso diagnóstico inicial y para revisiones retrospectivas.

Los Bancos de Tumores, en la red promovida actualmente, se apoyan en los siguientes principios:

- Los hospitales e instituciones asociadas mantienen sus propios bancos de tumores,
- Se comprometen al uso y desarrollo de protocolos homogéneos de manipulación y conservación de tejidos,
- ponen a disposición de toda la red sus fondos tisulares,
- tienen acceso a todos los fondos de toda la red.
- participan de la gestión de la red

El funcionamiento de los Bancos de Tejidos está sometido a diversas garantías, así

- En ningún caso podrá verse comprometido el correcto diagnóstico de una muestra por motivo de la recogida de material para el BT. Para ello, las muestras son centralizadas en los Servicios de Patología, que asumen esta responsabilidad.
- La base central de datos no contiene información que permita identificar directamente a los pacientes, observándose el mayor nivel de seguridad contemplado en la LORTAD
- Los Hospitales asociados deben incluir en sus protocolos de consentimiento informado quirúrgico la posible utilización de los excedentes tisulares para dinámicas de investigación
- Los protocolos de actuación de la RBT han sido estudiados y aprobados por los correspondientes Comités de Ética e Investigación Clínica de los Hospitales asociados.

Una Red de BT con protocolos homogéneos permitirá evitar sesgos en estudios multihospitalarios, funcionando como un sistema de control de calidad global, permitiendo acceso a series amplias de enfermos tratados de forma homogénea, ampliando los objetivos de los ensayos clínicos y finalmente contribuir a instaurar protocolos prospectivos “a la medida”.

Sistemas de análisis molecular masivo.

Matrices tisulares (tissue arrays)

Permite expandir a bloques parafinados sistemas de análisis masivo. Para ello crea un nuevo bloque de parafina en el que se insertan en posiciones predefinidas hasta 800 cilindros de 600 μ , procedentes de biopsias de aguja efectuadas sobre bloques de parafina preexistentes.

Es un sistema adaptado para investigar un marcador simple en una serie amplia de muestras, útil en IHQ, FISH, HIS; complementario a cDNA arrays. Indicaciones típicas de esta técnica son control de calidad, análisis de nuevos anticuerpos, estudio molecular de Cáncer de próstata y Cáncer de mama NO.

SNPs

Variaciones naturales de la secuencia entre dos copias del genoma (sustituciones de una base). Hay actualmente descritos 1.420.000 en todo el genoma (SNP Consortium (TSC) & Human Genome Project (HGP) , con una densidad de 1 SNP/1.9 kb. De ellos, hay 60.000 SNPs en exones, lo que refleja una mayor densidad de los mismos en regiones exónicas, más investigadas, hasta una densidad de 1 SNP/1.08 kb.

El 85% exones está a una distancia inferior a 5 kb de un SNP, así como el 98% de los genes.

El uso de SNPs permite realizar estudios de genética de poblaciones, estudio de genes candidatos para asociación con enfermedades, análisis de resistencia a fármacos, sensibilidad/toxicidad a drogas, así como predisposición a contraer enfermedades.

BACs

Cromosomas artificiales humanos conteniendo secuencias de DNA de longitud variable entre 100 a 200 kb.

Hay actualmente 8.484 clones disponibles, que cubren el genoma con una densidad de 2.6 BAC/1 Mb (rango 5-0.3). Su uso permite el diagnóstico preciso de deleciones, duplicaciones, inserciones y reordenamientos.

La disponibilidad de miles de BACs ha permitido el desarrollo de chips de BACs, que permiten detectar duplicaciones y deleciones con una sensibilidad de 100 kb. Para ello se realiza hibridación comparativa entre DNA de un paciente/DNA sujeto sano, o DNA tumoral/DNA constitucional.

35000 BACs solapados cubrirían todo el genoma, lo que permitirá en un plazo razonable incluir esta técnica rutinariamente en el análisis citogenético, borrando así la división entre citogenética y biología molecular.

Matrices de cDNA

El CNIO ha trabajado y puesto a punto un Oncochip conteniendo 6700 clonas correspondientes a genes de cáncer y tejido-específicos, para su uso en análisis de expresión orientados a clasificación molecular del cáncer. Aunque es una técnica novedosa, estudios realizados en linfoma B de células grandes, melanoma y cáncer de mama han mostrado que la técnica es reproducible y relativamente sencilla. Así cada tumor tiene un patrón de expresión propio, huella genética del mismo. Estos patrones se pueden agrupar mediante técnicas bioinformáticas. Los grupos así definidos permiten una correlación con el pronóstico clínico, diseminación tumoral, respuesta a fármacos precisos, más allá de la disponible actualmente con técnicas basadas en la exploración clínica o análisis molecular limitado a genes precisos.

Las matrices de cDNA permiten establecer el llamado PERFIL GENÓMICO DE UN FARMACO. La resistencia a un fármaco depende de múltiples factores, incluyendo sobreexpresión de genes de resistencia a drogas, incremento en la reparación de DNA, alteraciones en la sensibilidad celular a quimioterapia afectando a genes supresores, oncogenes, genes reguladores del ciclo, factores de transcripción, receptores para factores de crecimiento, reguladores de reparación de DNA y apoptosis.

El tratamiento con un fármaco específico de una línea celular permite identificar el conjunto de genes inducidos en respuesta a ese fármaco. Estos genes muestran variabilidad en función de la droga, estirpe celular, alteraciones génicas precisas e intervalo de tiempo transcurrido hasta el análisis.

Este perfil del fármaco se complementa con la descripción de los genes inducidos en líneas resistentes. Para ello concentraciones progresivamente mayores de la droga seleccionan una clona resistente en la línea celular problema. Este conjunto de genes es multifactorial, involucra múltiples vías, mostrando variabilidad entre modelos y variabilidad temporal.

Finalmente es preciso analizar la relevancia clínica de los genes así identificados en series de pacientes tratados de forma randomizada.

Con este objetivo, el CNIO ha diseñado el CNIO-ONCOCHIP, incluyendo todos los genes descritos como involucrados en los siguientes fenómenos:

- Adhesion Molecules (e.g. ICAM, CEACAM etc)
- Angiogenesis (e.g. FGF, thrombospondin, angiotensin, VEGF)
- Apoptosis (Caspases, Bcl2 family, TNF family, cytochrome p450s)
- Cell Cycle Control (Cyclins, CDKs, CDKIs, helicases, topoisomerases, CDCs, telomerase)
- Cell Structure and Cytoskeleton (tubulin, Collagenase, Lamins)
- Differentiation and Development (homeobox genes, Development genes with Drosophila Homologues e.g. WNT)
- DNA repair and replication genes, ligases, mismatch repair genes, excision repair genes.
- Genes implicated in Hereditary Cancer (BRCA1 and 2)
- Genes implicated in Drug Response (JAK/STAT pathway genes, multi-drug resistance genes)
- Growth factors and receptors (TGFB, FGF, VEGF)
- Hormones and Interleukins (FSH, GHR)
- Kinases and Phosphatases (MAPK)
- Metastasis and Tumour invasion (MMPs, cadherin, catenins, integrins)
- Necrosis (TNF, cytokines, nitric oxide synthase, NFkB, chemokines)
- Oncogenes (Ras family, c-myc and its family)
- Ribosomal protein Genes associated with Cancer (RPL37, RPL37A)
- Stress response (heat shock proteins, Hypoxia genes e.g. aldolases, NO synthase)
- Transcription Factors (E2F family, POU family)
- Tumour Suppressor genes (p53 family, MADH4, RB family)
- Ubiquitin degradation pathway (Chaperonins, USPs)
- Viral genes involved in cancer (EBV genes)

Esto se ha completado con genes relevantes en los diversos proyectos en curso, así como genes específicos de tejido y tipo celular.

Este biochip está destinado a contribuir al análisis molecular más profundo de tumores, y está disponible a través de acuerdos de colaboración. Algunos de los proyectos en curso incluyen

- Resistencia a quimioterapia en cáncer de mama (taxol), CTCL, CML, Melanoma (α -IF), analizando también genes involucrados en resistencia a otras drogas, como antraciclinas, fludarabina, ó STI571.
- Detección de genes sobreexpresados o perdidos en determinadas regiones cromosómicas identificadas por CGH.
- Análisis de rutas supresoras del ciclo.

SESIONES PLENARIAS SATELITES

PATOLOGIA ONCOLOGICA DE LA MAMA

PROGRAMA DE PREVENCIÓN DE CÁNCER DE MAMA. 10 AÑOS DE ANDADURA

Nieves Ascunce
Instituto de Salud Pública de Navarra

El Programa de Prevención de Cáncer de Mama se inició, a efectos de realización de exploraciones, el 3 de marzo de 1990, aunque hasta septiembre de ese mismo año no se comenzó a trabajar de forma sistemática. En septiembre de este año 2000 ha comenzado la sexta vuelta del programa, en este caso tomando como población objetivo a todas las mujeres entre 45 y 69 años de edad (en total 76.549 mujeres)

A todas las mujeres que acuden por primera vez se les realizan dos proyecciones mamográficas (desde la tercera vuelta) y a las que ya han sido exploradas con anterioridad una sola.

En esta sexta vuelta, a fin de aumentar la sensibilidad del proceso, se ha incorporado la doble lectura de todas las mamografías de screening.

RESULTADOS

A efectos del presente informe se han agrupado todos los datos procedentes de exploraciones realizadas desde el comienzo del Programa hasta el 31 de diciembre de 1997.

1.- Participación

Durante este periodo han sido convocadas para realizarse la exploración 80.126 mujeres residentes en Navarra con edades comprendidas entre 45 y 65 años, de las que un 88,97% (71.286 mujeres) han acudido al menos una vez a las unidades de detección. 1.206 mujeres aportaron información válida sobre una mamografía anterior que permitió posponer la primera exploración a la vuelta siguiente.

Sobre 129.586 situaciones en las que la mujer había sido explorada en la vuelta anterior, se ha repetido la exploración en su intervalo en el 96,26% de los casos, lo que traduce la gran adherencia que se produce. En 1.360 de 2.824 (48,16%) casos se realizó la mamografía con un intervalo igual o superior a 4 años respecto a la exploración anterior.

2.- Resultados del test de screening

La lectura del test de screening ha permitido descartar la sospecha del tumor en un 86,6 % de los casos. El resto de las mujeres han vuelto a ser citadas para la realización de nuevas pruebas (desde mamografía en la propia unidad hasta biopsia en la unidad hospitalaria correspondiente)

El porcentaje de mujeres que precisan valoración adicional varía en relación al tipo de exploración, entre un 9,84 en las mujeres que han tenido una exploración en la vuelta anterior y un 19,07 en las mujeres que se exploran por primera vez.

3.- Resultados del proceso completo (detección-diagnóstico)

Prácticamente en todos los casos (99,92%) se ha logrado completar el proceso de detección-diagnóstico y obtener un resultado de la exploración.

En el 90,6% de los casos se obtiene un resultado negativo; la mujer vuelve a ser citada los 2 años para realizarse una nueva exploración. A algo más del 9% de las mujeres se les cita al año o 6 meses para realizarse una revisión intermedia. En 3,4 de cada 1000 exploraciones se ha confirmado un tumor maligno

4.- Tasas de detección

Las tasas de detección más altas se obtienen en el grupo de mujeres exploradas por primera vez pero que no habían acudido en su primera citación (8,75 por 1000 mujeres exploradas), seguidas del grupo de mujeres que se exploran por primera vez acudiendo en la primera cita (5,40)

En las exploraciones sucesivas, la tasa de detección baja más o menos a la mitad con escasa diferencia entre los dos subgrupos (3,14 y 2,95), aunque dado el bajo número de mujeres con exploración irregular es poco valorable

5.- Tipo de tumores detectados

Se analizan las características de 785 tumores malignos detectados en el periodo estudiado. 19,35% se confirman como intraductales y 24,8% invasivos pero menores de 1 cm, lo cual da idea del cambio significativo en la presentación de tumores respecto al periodo anterior a la puesta en marcha del Programa

De los tumores invasivos, 66,61% no presentan infiltración ganglionar

IMPACTO DEL PROGRAMA

1.- Incidencia de Cáncer de Mama

Según los datos del registro de tumores se ha producido un incremento de la incidencia del 40% entre el quinquenio 85-89 y el 90-94, periodo en el que se completa la primera vuelta del programa, siendo mucho más acusado el aumento en el año 1991.

Comparando los tumores que se han diagnosticado a través del programa con los que se han diagnosticado por otros medios se observa una clara diferencia a favor de los primeros. 16% frente a 4% son In situ, 70% frente a 36% son invasivos menores de 2 centímetros; De todos los invasivos, 51% tienen invasión ganglionar frente a un 67% en los que no proceden del Programa

2.- Supervivencia

La supervivencia relativa a 5 años ha pasado de 71,3 en los tumores diagnosticados en el quinquenio 85-89 a 81,8 en los del periodo 90-94 (aumento de 14,72%), con un incremento significativamente mayor en el grupo de 45 a 65 años.

3.- Mortalidad

Se constata una estabilización de las tasas de mortalidad por cáncer de mama.

Hay que tener en cuenta que el último periodo analizado, 95-97 está muy cercano al comienzo del programa y por tanto es difícil demostrar un cambio de tendencia significativo. Según el análisis coste-efectividad realizado, hasta el año 2005 no se podrá obtener un descenso mantenido y significativo, que se estima se situará en el 20%.

PROGNOSTIC FACTORS IN BREAST CANCER: AN UPDATE

Maria J Merino
Chief, Surgical Pathology, NCI

Prognostic factors should be used to provide an estimate of risk of recurrence in women with early stage breast cancer. Although the majority of women will be cured with local/regional therapy, no individual patient can be assured that she has no risk of recurrence.

A useful prognostic factor has the following characteristics:

- It has significant and independent predictive value which has been validated by clinical testing.
- Its determination must be feasible, reproducible, and widely available, with quality control.
- It must be readily interpretable by the clinician and have therapeutic implications.

To try to uniform the way many of these prognostic factors are used, the College of American Pathologist has issued a Consensus Statement. A copy of this Consensus is enclosed.

Prognostic Factors

Tumor Size

There is a strong correlation between tumor size and risk of relapse. Even within the T₁ category there is variation in risk. Tumors less than or equal to 1 cm have a particularly good prognosis (e.g., greater than 10 percent recurrence at 10 years) relative to tumors 1.1 to 2 cm in diameter. In general, the risk of recurrence increases with increasing tumor size.

Nuclear Grade

This is a well-documented factor. When determined by experienced pathologists, it discriminates between favorable and unfavorable prognostic groups. High nuclear grade is associated with a higher rate of relapse. Nuclear grade is not currently part of the routine pathologic review of breast cancer specimens. The pathology community should standardize and utilize this discriminant.

Histologic Type

Several well-characterized histologic subtypes impart a favorable prognosis, although they are a distinct minority of all breast cancer cases. These subtypes include tubular, colloid (mucinous), and papillary types.

Hormone Receptors

Patients with receptor-positive tumors have a better prognosis than those with receptor-negative tumors. However, the difference in recurrence rates at 5 years is only 8 to 10 percent.

Determination of the presence of the number of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) in breast biopsies has become standard practice in the evaluation of breast cancer patients. There is an excellent correlation between ER positivity and future response to hormonal therapy. More than half of the ER (+) tumors will respond to hormonal therapy, compared to less than 10% of ER (-) tumors. The presence of both ER and PR increases the likelihood of response to hormonal therapy. ER (+) tumors are also generally better differentiated. Many studies have confirmed that the disease-free period and overall survival are longer in patients with ER (+)/PR(+) cancers.

The traditional method used to determine breast tissue receptors has been a standard biochemical binding assay. This is a quantitative method with two major disadvantages; it requires fresh tissue, and positive results can be due to adjacent normal or stromal cells present in the tissue processed for the assay.

Recently, antibodies have been developed for immunohistochemical evaluation of receptors in frozen or paraffin embedded tissues. These permit a semiquantitative in-situ method, with a remarkably constant correlation to the cytosolic binding assay, especially if both the proportion of (+) cells, as well as the intensity of immunochemical positivity are considered.⁶ Identification of tumor cell positivity, as well as recognition of tumor cell heterogeneity is possible with this method. However, fixative choices and fixation times may affect the receptor detection when immunohistochemistry techniques are used. Best results are obtained using buffered formalin (3.6%), for less than 24 hours with the present normal or stromal cells present in the tissue processed for the assay.

Recently, antibodies have been developed for immunohistochemical evaluation of receptors in frozen or paraffin embedded tissues. These permit a semiquantitative in-situ method, with a remarkably constant correlation to the cytosolic binding assay, especially if both the proportion of (+) cells, as well as the intensity of immunochemical positivity are considered.⁶ Identification of tumor cell positivity, as well as recognition of tumor cell heterogeneity is possible with this method. However, fixative choices and fixation times may affect the receptor detection when immunohistochemistry techniques are used. Best results are obtained using buffered formalin (3.6%), for less than 24 hours with the present commercial reagents kits.

Proliferative Rate.

Measurements of cellular proliferation in breast cancer specimens using a variety of techniques have shown a strong correlation with outcome. DNA flow cytometry has become widely available for the determination of S-phase fraction as well as ploidy status. S-phase fraction does correlate with prognosis, but ploidy status alone is not of clear prognostic value. As many as 25 percent of specimens are not evaluable

The clinical stage of the disease together with careful examination of morphologic features, such as tumor type, size, grade, presence of invasion, vascular permeation, and nodal status remain essential to determine the prognosis for and appropriate treatment of patients with breast cancer. However, new factors such as estrogen/progesterone receptor determination, cell proliferation index, and genetic analysis are now also available and can provide valuable information for determining a patient's prognosis, and play a role in selecting the best therapy.

Tumor Cell Proliferation (TCP)

Classic morphologic parameters of tumor growth are mitotic index and histologic grade; both correlate positively with clinical outcome. More objective methods of measuring TCP, are tritiated thymidine incorporation into DNA, or analysis of the fraction of cells in the synthetic phase (S fraction) with flow cytometry. More recently, antibodies against proteins expressed during cell proliferation have been developed and applied to quantitate proliferation in tissues by immunohistochemical methods.

- ◇ **Ki67** is a nuclear antigen present in the active phases of the cell cycle (G, S, G2, M), and absent in resting cells (G0). The Ki67 antibody test works well only on frozen tissues; however, antibodies that recognize Ki67 in paraffin embedded tissue have been developed (MIB-1, MIB-3).
- ◇ **PCNA** is a protein that plays a role in the initiation of proliferation by augmenting DNA polymerase, with highest levels expressed in the S-G2 and M phases. There is a high correlation of positive staining with these antibodies and S fraction determination by flow cytometry, as well as with mitotic index and nuclear grade. There is a negative correlation between the expression of these proteins and ER/PR. Some studies have shown a correlation of Ki67/PCNA positivity and lymph node metastasis.⁶
- The advantages of immunohistochemical markers of TCP are clear: they can often be used in archival tissues, and the positive or negative status of cells can be evaluated with preservation of histology.

Oncogenes and Anti-Oncogenes

- **Her-2/neu (c-erb B-2)** and p53 are currently the most common genes examined in breast carcinomas to provide prognostic information. Her-2/neu (c-erb B-2) is a gene that codes for a protein with major homology to the epidermal growth factor receptor (EGFR). Her-2/neu has been shown to be amplified in breast cancers and other tumors. Slamon et al (4) first reported that breast carcinomas with Her-2/neu amplification and lymph node metastasis have an increased rate of recurrence and decreased survival. In node (-)patients no such correlation was found. Amplification is usually accompanied by high protein levels, which can be detected in immunostains. However, 10% of cases with immunohistochemical reactivity for the protein product do not show amplification, presumably they are due to overexpression (mRNA) of the gene. Sometimes loss of antigen after formalin/paraffin processing of the tissues can be minimized by using antigen retrieval techniques.

Recent studies have suggested that determination of Her-2/neu expression in breast cancer can be used as a tool to predict response to chemotherapy. Determination of Her 2 Neu expression is also important for acceptance for treatment with Herceptin.

- **p53** is an anti-oncogene whose alterations appear to be the most common genetic changes identified in tumors. The half-life of the wild type (normal) protein is short (6-30 min), without reaching high enough levels to be immunohistochemically detected. Mutant protein, by contrast, has an extended half-life, and its accumulation permits its detection by immunostains. A large number of antibodies have been developed that react with the wild-type protein, mutant form, or both. Most studies show a correlation between p53 positivity and gene alterations on chromosome 17p13.1. p53 expression has been positively correlated with:
 - ◇ ER (-) tumors,
 - ◇ high proliferative index,
 - ◇ high histologic grades,
 - ◇ shorter disease-free interval and poorer overall survival.
 - ◇ No correlation has been shown with lymph node status.

- Other genes whose prognostic significance has been examined for breast cancers are:
 - ◇ **EGFR:** Approximately 30% of breast carcinomas express EGFR, with this group having a shorter disease-free period and overall survival.
 - ◇ **Rb:** This gene, located on chromosome 13q14, is the first tumor suppressor gene directly shown to suppress tumor function. Rb alterations occur in 7-25% of breast cancers, and is related to higher tumor grades and clinical stages of the disease.
 - ◇ **nm23:** The gene, located on chromosome 17q is abundantly expressed in normal tissue as well as in tumor cells with decreased metastatic potential. Decreased expression of the gene is correlated with higher histologic grades, lower receptor levels, and presence of lymph node metastasis.
 - ◇ **P-Glycoprotein (MDR):** The gene codes for a transmembrane protein associated with intrinsic and acquired resistance to certain chemotherapeutic agents, such as anthracyclines and zinc alkaloids. These breast cancers which tend to be responsive to chemotherapy have a low expression of this protein; higher P-glycoprotein expression correlates with poorer response to chemotherapeutic agents.

B. ENZYMES

- **Cathepsin D:** It is an acidic lysosomal protease, secreted by breast cancer cells, with a growth-promoting and extracellular proteolytic activity. Some studies using methods other than immunohistochemical techniques have shown reduced disease-free survival in cases with overexpression

of the protein. Reports using immunohistochemical detection of the protein have not confirmed this correlation.⁶

- **Laminin Receptor and Type IV Collagenase:** Immunohistochemical detection of both proteins has been correlated with higher metastatic potential in breast and other cancers.

APPLICATION OF TISSUE MICRODISSECTION AND GENETIC ANALYSIS IN BREAST CANCER

Recent studies have shown that dissection of tissue sections under microscopic visualization can provide suitable samples for DNA analysis using the polymerase chain reaction (PCR) techniques.⁸ DNA of pure cell populations (i.e., atypical hyperplasia, in situ carcinoma, invasive carcinoma) microdissected from the same tissue section can be analyzed separately and compared to DNA from normal cells microdissected from the same tissue. This technique has facilitated the detection of genetic deletions in tumors and found new suppressor genes. Detection of genetic loci at known genes, such as the BRCA-1 gene linked to familiar susceptibility to breast and ovarian cancer³, is also possible using microdissection of tissues.

REFERENCES

1. College of American Pathologists Consensus Statement. Arch Pathol Lab Med Vol 124, July 2000.
2. Pauletti G., Dandekar S., et al: Assessment of methods for tissue based detection of the Her-2/neu alteration in human breast Cancer: A direct comparison of fluorescence In situ Hybridization and immunohistochemistry. J Clin Oncol 18:3651-3664. 2000
3. Andersen J, Thorpe SM, King WJ, et al. The Prognostic Value of Immunohistochemical Estrogen Receptor Analysis in Paraffin-Embedded and Frozen Sections Versus that of Steroid-Binding Assays. Eur J. Cancer 1990, 26:442-449.
4. Hilf R, Feldstein ML, Savlov ED, et al. The Lack of Relationship Between Estrogen Receptor Status and Response to Chemotherapy. Cancer 1980, 46:2797-2800.
5. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. Science 1994, 266:66-71.
6. Slamon D, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification of the HER-2/neu Oncogene. Science 1987, 235:177-182.
7. Tavassoli FA. General Considerations. In: Tavassoli FA (ed). Pathology of the Breast, Norwalk, Appleton & Lange 1992, 2:25-62.
8. Taylor CR, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist, Philadelphia, WB Saunders Company, 2nd ed., 1994.
9. Wittliff JL. Steroid Hormone Receptors in Breast Cancer. Cancer 1984, 53:630-643.
10. Zhuang Z, Merino MJ, Chuaqui R, Liotta L, Emmert-Buck MR. Identical Allelic Loss on Chromosome 11q13 in Microdissected In Situ and Invasive Human Breast Cancer. Cancer Res 1995, 55:467-471.

EL GANGLIO CENTINELA Y LA BUSQUEDA DE MICROMETASTASIS

Francisco Tresserra.
Servicio de Anatomía Patológica.
Instituto Universitario Dexeus.

El estatus ganglionar es un factor pronóstico importante en el cáncer de mama y determina la terapéutica a seguir (1). Se ha demostrado que el hallazgo de metástasis en los ganglios linfáticos esta en relación con la técnica que se utiliza para su estudio histológico, de forma que cuando se hacen cortes seriados el porcentaje de casos que eran negativos con el estudio histológico rutinario que se positivizan oscila entre el 22 y el 33%. Si se utilizan técnicas inmunohistoquímicas para la detección de células epiteliales en el ganglio, este porcentaje aumenta sensiblemente (2). El empleo de estas técnicas en la totalidad de los ganglios aislados en una linfadenectomía axilar no esta al abasto de un laboratorio de Anatomía Patológica convencional, es por ello que es necesario determinar en cual o cuales ganglios deben aplicarse. La técnica del ganglio centinela se basa en que las células que se desprenden del tumor primario llegan al primer ganglio que recibe la linfa del área mamaria afectada. Si se logra identificar ese ganglio y el examen histopatológico descarta la presencia de metástasis, el resto de ganglios linfáticos axilares estarán libres de metástasis (3). De esta forma puede ahorrarse el efectuar una linfadenectomía completa la cual no se halla exenta de complicaciones (1). La detección del ganglio centinela puede efectuarse por medio de métodos isotópicos, colorantes vitales o por ambos métodos de forma combinada y la técnica requiere de un aprendizaje por parte del equipo quirúrgico (1,4).

El estudio histológico del ganglio centinela no esta estandarizado por el momento, aconsejándose efectuar cortes seriados (sin especificarse su número) y la utilización de técnicas inmunohistoquímicas para detectar la expresión de citoqueratinas (5-9). Con la utilización de estas técnicas se ha incrementado el diagnóstico de metástasis de pequeño tamaño que antes pasaban desapercibidas, apareciendo el concepto de células tumorales aisladas en el ganglio linfático cuando se observan células sueltas o en grupos, generalmente en la región subcapsular, sin mostrar contacto con la pared de los senos y sin reacción estromal circundante (10). Hay quien define el término de colonias tumorales a aquellos grupos de 10 o 20 células en la región subcapsular o en el intersticio fácilmente identificables a 40 aumentos o células aisladas a cúmulos de 1 a 10 células que requieren de grandes aumentos para su identificación (11). Todo ello ha comportado también un cambio en la estadificación del estatus ganglionar de forma que la presencia de células tumorales aisladas detectadas con métodos morfológicos (cortes seriados, inmunohistoquímica...) deben catalogarse como pN0 (i+) y las diagnosticadas con métodos no morfológicos (PCR, citometría de flujo...) como pN0 (mol+), cuando estos métodos no logran identificar metástasis se clasifican como pN0(i-) y pN0(mol-) respectivamente (10). Este sistema es válido tanto para ganglio axilares como para los de la mamaria interna.

Para su estudio histopatológico, en primera instancia, el ganglio debe de seccionarse por la mitad pues en la línea media es donde se encuentra el mayor número de linfáticos aferentes y por tanto los primeros depósitos de células tumorales (5). Ante la variabilidad del tamaño de los ganglios hemos diseñado un protocolo que tiene en cuenta el número de láminas que se estudian en lugar del número de cortes, entendiéndose que en cada lámina se coloca el número máximo de cortes puede llegar a ser de 12. En primer lugar se efectúa un corte teñido con H&E, si es positivo se emite el diagnóstico, si no se cortan 20 láminas adicionales numeradas consecutivamente, de las cuales las número 3,6,9,12,15 y 18 se reservan y las láminas 2,4,5,7,8,10,11,13,14, 16,17,19,20,21 se tiñen con H&E, si alguna es positiva se emite un diagnóstico y las láminas restantes también se tiñen con H&E, si no, las láminas número 3,6,9,12, y 15 se tiñen con inmunohistoquímica para la detección de citoqueratinas (la lámina 18 se utiliza como control), si son positivas se diagnostica metástasis, si no, se concluye que el ganglio centinela es negativo. En el informe anatomopatológico debe constar la procedencia del ganglio centinela (axilar, mamaria interna...), su tamaño, el número de cortes estudiados con H&E y si son positivos, el número de cortes estudiados con inmunohistoquímica y si son positivos. En caso de un ganglio centinela metastásico debe indicarse si se trata de células tumorales aisladas detectadas por inmunohistoquímica, una micrometástasis o una metástasis. El diagnóstico del o de los ganglios centinela se especifica aparte del resto de la linfadenectomía.

De acuerdo con este protocolo de un total de 100 ganglios centinelas estudiados en 65 pacientes en un periodo de 2,5 años (media de 1,5 ganglios por paciente con un rango entre 1 y 4), hemos encontrado metástasis en 32 de ellos (32%), de estos, 25 (78%) eran micrometástasis (12 de ellos correspondían a células tumorales aisladas y 13 a metástasis de menos de 2 mm). Los 7 ganglios restantes (22%) mostraron metástasis de un tamaño promedio de 5,7 mm. En 20 (62%) ganglios, el efectuar cortes seriados con H&E fue suficiente para detectar la metástasis, precisándose 1 lámina para diagnosticar 14 casos (70%), 3 láminas para 17 casos (85%), 7 láminas para 19 casos (95%) y 19 láminas para la totalidad de los casos. La inmunohistoquímica diagnosticó los 12 casos restantes (38%), precisándose una sola lámina en 8 casos (67%), 3 láminas para 10 casos (83%) y 4 láminas para los 12 casos.

El tamaño promedio de los ganglios centinela osciló entre $0,9 \pm 0,6$ cm ($0,3 - 3,5$ cm), el de los ganglios centinela negativos fue de $0,9 \pm 0,6$ cm ($0,3 - 3$) y el de los metastásico $1,1 \pm 0,6$ cm ($0,4 - 3,5$), no obstante esta diferencia no es estadísticamente significativa. El porcentaje de ganglios centinela positivos respecto al número de ganglios centinela aislados fue del 100% en 19 casos. En los 7 casos restantes esta cifra osciló entre el 33 y el 66%.

De las 65 pacientes estudiadas, 26 (40%) presentaron metástasis en el ganglio centinela, en 19 (73%) de éstas, la metástasis era de menos de 2 mm (15 pN0(i+) y 4 pN1a) y en 20 (77%) el o los ganglios centinelas fueron los únicos ganglios metastásicos. En los 6 casos restantes, el número de ganglios metastásicos, además del centinela, oscilaba entre 1 y 4.

En nuestra experiencia el porcentaje de pacientes con micrometástasis en ganglios linfáticos ha pasado de ser 8.5 % antes de efectuar la técnica del ganglio centinela al 73 % efectuando esta técnica. Este incremento es francamente significativo y en concordancia con el que encuentran otros autores que pasan de un 10 % a un 38% (12). En nuestra casuística, la alta incidencia de micrometástasis se explica por los criterios de inclusión de las pacientes en la técnica de ganglio centinela pues antes de la cirugía se efectúa un estudio ecográfico de la axila, y en caso de detectarse signos ecográfico sospechosos (13) se procede a una punción aspiración con aguja fina de la adenopatía y de resultar metastásico, la paciente queda excluida del protocolo del ganglio centinela. Con ello se excluyen muchas pacientes que presentan metástasis de más de 2 mm.

La técnica del ganglio centinela es de particular interés en aquellas pacientes en estadios iniciales pues en éstas acostumbra a ser el único ganglio con metástasis (1). Así mismo la incidencia de metástasis en el ganglio centinela es superior a la incidencia de metástasis de los ganglios no centinela (14).

En cuanto a la técnica que debe seguirse para la detección de micrometástasis existen muchas variaciones acerca del número de cortes a examinar y a las técnicas histopatológicas a utilizar (5-9). En aproximadamente un 12% de casos la metástasis se diagnostica sólo con una lámina teñida con H&E (11), y el 64% de los casos en las dos primeras secciones efectuadas (15). Entre un 11 y un 36 % de ganglios centinela positivos se identifican sólo con técnicas inmunohistoquímicas (16).

En cuanto a la necesidad de efectuar estudio intraoperatorio del ganglio centinela no hay acuerdo en la literatura. Ello es debido al alto número de falsos negativos (3), a la presencia de ocasionales falsos positivos (17) y también al hecho de que tanto el efectuar cortes seriados, como la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas durante el acto quirúrgico, son técnicas que consumen mucho tiempo (15,17). Hay autores que aconsejan que el ideal del estudio intraoperatorio del ganglio centinela requiere agotar el bloque durante el proceso o en su defecto recomiendan un mínimo de 30 secciones (15). Parece ser que una buena opción en el diagnóstico de metástasis en el ganglio centinela pasa por la evaluación percutánea del mismo después de su localización y marcaje mediante una aguja metálica (16).

La utilización de nuevas técnicas de biología molecular como son la PCR y la transcriptasa inversa, con una alta sensibilidad para detectar citoqueratinas, incrementa el número de casos con micrometástasis (18).

El dilema se plantea en la conducta a seguir en aquellas pacientes en las que se han detectado micrometástasis por métodos no convencionales. Se aconseja que estas técnicas (por tratarse de estudios de investigación) no deben de utilizarse para sobreestimar a las pacientes a menos que sus hallazgos se confirmen por medio de la H&E (19).

La técnica del ganglio centinela requiere de un equipo multidisciplinario en el que estén perfectamente coordinados el especialista en medicina nuclear, el cirujano y el patólogo. El cirujano requiere de un periodo de aprendizaje para la correcta aplicación de la técnica. En el terreno de la anatomía patológica se requiere todavía de una estandarización de la técnica a utilizar para el correcto manejo de estos especímenes.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Miltenburg DM, Miller C, Karamlou TB, et al. Meta-analysis of sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *J Surg Res* 1999;84:138-142.
- 2- Dowlatshahi K, Fan M, Snider HC, et al. Lymph node micrometastases from breast carcinoma. Reviewing the dilemma. *Cancer* 1997;80:1188-1197.
- 3- Gilamberti V, Zurrida S, Zucali P, et al. Can sentinel node biopsy avoid axillary dissection in clinically node-negative breast cancer patients? *The Breast* 1998;7:8-10.
- 4- Meyer JS. Sentinel lymph node biopsy: strategies for pathologic examination of the specimens. *J Surg Oncol* 1998;69:212-218.
- 5- Turner RR, Ollila DW, Stern S, et al. Optimal histopathologic examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging. *Am J Surg Pathol* 1999;23:263-267.
- 6- Chu KU, Turner RR, Hansen NM, et al. Do all patients with sentinel node metastasis from breast carcinoma need complete axillary node dissection?. *Ann Surg* 1999;229:536-541.
- 7- Jannink I, Fan M, Nagy S, et al. Serial sectioning of sentinel nodes in patients with breast cancer: a pilot study. *Ann Surg Oncol* 1998;5:310-314.
- 8- Haigh PL, Brennan MB, Giuliano A. Presentation highlights. Surgery for diagnosis and treatment: sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Cancer Control* 1999;6:301-306.
- 9- Weaver DL. Sentinel lymph node biopsies: what pathologist need to know. ASCP, Orlando (Fl), Abr., 1999.

- 10- Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, et al. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999;86:2668-2673.
- 11- Dwlatshahi K, Fan M, Bloom KJ, et al. Occult metastases in the sentinel lymph nodes of patients with early stage breast carcinoma. A preliminary study. *Cancer* 1999;86:990-996.
- 12- Giuliano EA, Dale PS, Turner RR, et al. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 1995;222:394-399.
- 13- Feu J, Tresserra F, Fábregas R, et al. Metastatic breast carcinoma in axillary lymph nodes: In vitro US detection. *Radiology* 1997; 205:831-835.
- 14- Albertini JJ, Lyman GH, Cox C, et al. Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* 1996;276:1818-1822.
- 15- Viale G, Bosari S, Mazzarol G, et al. Intraoperative examination of axillary sentinel lymph nodes in breast carcinoma patients. *Cancer* 1999;85:2433-2438.
- 16- Liberman L, Cody HS, Hill AD, et al. Sentinel lymph node biopsy after percutaneous diagnosis of nonpalpable breast cancer. *Radiology* 1999;211:835-844.
- 17- Vidal N, Azpeitia D, Benito E, et al. Frozen sections and cytoqueratin stain in intraoperative evaluation of sentinel node in breast cancer. *Virch Arch* 1999;435: 202 (P-040)
- 18- Steinhoff MM. Axillary node micrometastases: detection and biologic significance. *The breast J* 1999;5:325-329.
- 19- Page DL, Anderson TJ, Carter BA. Minimal solid tumor involvement of regional and distant sites. When is a metastasis not a metastasis?. *Cancer* 1999;86:2589-2592.

BIOCHIPS DE CDNA Y CANCER DE MAMA

G. García-Rostán, G. Moreno-Bueno, O. Domínguez, J. Palacios. Programa de Patología Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Instituto de Salud Carlos III. Madrid

Un *biochip* por analogía con el término de *microchip* electrónico (dispositivo con una alta densidad de circuitos electrónicos) se caracteriza por la integración e inmovilización, ordenada y conocida, de una alta densidad de material biológico (*bio*) sobre una superficie de cristal (porta microscópico) o una membrana de nylon o nitrocelulosa de pequeño tamaño (*chip*). En el campo de la Biología Molecular aplicada al cáncer una de las principales aportaciones de la tecnología de los *biochips* de cDNA es el análisis simultáneo, en un mismo experimento, del perfil de expresión de miles de genes en un tumor. Variaciones en los programas de transcripción celular justifican en gran medida la diversidad biológica y/o fenotípica de los tumores. La hipo o hiperexpresión de determinados genes en un *biochip* nos permitirá, pues, determinar aquellos oncogenes y/o genes supresores tumorales que al sufrir una perturbación genética durante el proceso tumorogénico van a jugar un papel relevante en el desarrollo y/o progresión tumoral. La investigación sistemática mediante *biochips* de patrones de expresión génica en distintos tumores puede además aportar la información necesaria para: 1) una mejor caracterización nosológica de los tumores, 2) predecir la respuesta tumoral a un determinado quimioterápico, 3) establecer los mecanismos implicados en la resistencia a drogas y diseñar estrategias terapéuticas más efectivas.

La metodología de trabajo incluye una serie de etapas bien definidas: diseño, impresión, hibridación, escaneado y “clustering” o análisis de resultados [1,2]. En el diseño del *biochip* se seleccionan los clones a estudiar a partir de bases de datos (GenBank [3], dbEST [4], UniGene [5], librerías de cDNAs), se determina la densidad de integración (número de sondas / unidad de superficie) y se escogen los standars o controles internos. En la impresión se utiliza alguno de los diferentes “arrayers” (robots) disponibles en el mercado, que difieren básicamente en la densidad de integración de las sondas y forma de dispensación de la sonda (inyección o mecanismo piezoeléctrico) en la membrana o porta. Estos últimos están recubiertos con polilisina y aminosilanos que aumentan la hidrofobicidad y favorecen la adhesión de la sonda sin extenderse en vecindad. Durante la fase de hibridación del *biochip*, para poder comparar el perfil de expresión génica de líneas celulares o tejidos biológica y/o fenotípicamente distintos (por ejemplo tumor o metástasis versus tejido normal; tumor pobremente diferenciado o indiferenciado versus tumor bien diferenciado; tumor resistente versus tumor sensible a quimioterapia) las sondas se hibridan consecutivamente con cDNAs obtenidos a partir de pools de RNA total (50-200 µg) extraído de la línea celular o tejido problema y del control interno, marcados con Cy5-dUTP (fluorescencia roja) y Cy3-dUTP (fluorescencia verde) respectivamente. La relación entre ambas señales de hibridación (ratio de intensidad de fluorescencia roja/verde) representa el porcentaje de moléculas de RNA de la muestra problema y del standard que han hibridado con las sondas impresas en el *biochip* y por lo tanto nos

informa del nivel de expresión de cada gen en la línea celular o tejido problema. El escaneado del *biochip*, cuando los cDNAs se han marcado con fluorocromos, se realiza en un microscopio scan-laser generándose una matriz de puntos de hibridación que requiere un meticuloso procesamiento informático. Es preciso detectar y eliminar el fondo, limitar el tamaño de los puntos observados, asignar intensidades a cada punto de hibridación y establecer ratios de expresión. El análisis de los resultados se lleva a cabo por el método de “clustering” o agrupamiento jerárquico algorítmico de los genes incluidos en el *biochip* y de las muestras problema en base a un patrón de expresión similar [1,2].

En los últimos 18 meses se han publicado diferentes trabajos en los que mediante *biochips* de cDNA se ha analizado el perfil de expresión de miles de genes y ESTs en líneas celulares de cáncer de mama y tumores primarios de mama [6-10] :

- *Perou* y colaboradores han investigado el patrón de expresión de 5531 [6] y 8102 [8] genes en tumores primarios de mama comparándolo, bien con el nivel de expresión observado en células en cultivo de epitelio mamario sometidas a diferentes condiciones hormonales [6], bien con un pool de líneas celulares de distinto origen (endotelial, linfocitario etc) [8]. Aunque en ninguno de los dos estudios de *Perou* se realizó microdissección con laser para analizar únicamente poblaciones de células tumorales puras dentro de tumores de reconocida heterogeneidad histológica, en ambos *biochips* [6,8] se llegaron a identificar “clusters” de genes relacionados con alteraciones biológicas puntuales en las células tumorales (por ejemplo variaciones en la proliferación celular y activación de la vía de señalización regulada por interferón), así como “clusters” de genes asociados a tipos celulares específicos dentro del tumor (células estromales y linfocitos). Estos últimos se establecieron por comparación con el patrón de expresión observado en líneas celulares de distinto origen o mediante estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos frente a proteínas codificadas por un determinado gen dentro del “cluster”. Por otro lado, *Perou* y colaboradores observaron estudiando muestras distintas espacial y/o temporalmente de un mismo tumor (biopsia antes y después del tratamiento con doxorubicina, o bien primario versus metástasis ganglionar) que el perfil de expresión génica de los tumores tiende a ser estable, homogéneo y único pues se mantiene el patrón “global” de expresión [8].

- *Sgroi* y colaboradores [7] a diferencia de *Perou* y colaboradores [6,8] combinan la microdissección con laser y los *biochips* de cDNA para comparar los niveles de expresión de 8000 genes en epitelio mamario no tumoral con el perfil de expresión en células invasivas de carcinoma de mama y células metastásicas de carcinoma de mama. El objetivo de *Sgroi*, al hibridar en el *biochip* cDNAs obtenidos a partir de poblaciones tumorales y no tumorales puras, es establecer “clusters” de genes asociados a células en diferentes estadios de progresión tumoral y de esa forma llegar a conocer las alteraciones genéticas subyacentes al desarrollo y/o progresión de los carcinomas de mama. Con este enfoque los autores de este estudio intentan además evitar: 1) las limitaciones inherentes a la hibridación con cDNA obtenido a partir de líneas celulares cultivadas *in vitro*, pues la información genética derivada de las mismas no refleja con exactitud las alteraciones moleculares que tienen lugar en el tejido a partir del cual se originaron; 2) las limitaciones asociadas a la hibridación con cDNA obtenido a partir de carcinomas de mama *in vivo*, que no han sido microdisseccionados para extraer el RNA, pues al ser tumores muy heterogéneos en su composición celular algunos “cluster” de expresión se podrían atribuir a células no carcinomatosas contenidas en el tumor (células epiteliales no tumorales, células endoteliales, células adiposas, linfocitos etc). En total *Sgroi* y colaboradores encontraron 202 genes que estaban hipo o hiperexpresados en células invasivas y metastásicas de carcinoma de mama, de los cuales 83 resultaron ser ESTs y 29 se coexpresaban en las células invasivas y metastásicas. Algunos de los genes que mostraban diferente nivel de expresión respecto al epitelio mamario no tumoral ya se habían asociado con cáncer de mama en otro tipo de estudios : Apolipoproteína D, Anexina I, Factor Tisular, RANTES y BRCA1. Con el fin de validar los datos generados en el *biochip* y evaluar la fiabilidad de la técnica, *Sgroi* analiza por PCR cuantitativa 5 de los 202 genes que mostraban un perfil alterado en células invasivas y metastásicas, encontrando niveles muy similares. Además, la determinación por inmunohistoquímica de Apolipoproteína D en secciones tisulares adyacentes a las utilizadas para la extracción de RNA vino a confirmar los altos niveles de expresión de las células invasivas y la baja o nula inmunoreactividad de las células metastásicas.

- *Forozan* y colaboradores [9] al investigar el perfil de expresión de 1326 genes en 4 líneas celulares de cáncer de mama, que previamente habían sido analizadas por hibridación genómica comparativa (CGH), observaron que transcritos que aparecían sobreexpresados en el *biochip* de forma recurrente (RCH1, TOPO II, CAS, y MYBL2) curiosamente se localizaban en regiones cromosómicas con amplificaciones recurrentes de DNA (17q23, 17q21-q22, 20q13), en las que todavía no se conocía el gen implicado en la amplificación. La combinación de información obtenida por hibridación genómica comparativa (CGH) con perfiles de expresión en un *biochip* permite, pues, identificar genes desconocidos, que aparecen amplificados en algunas líneas celulares y tumores primarios. Para poder determinar la significación clínica de esas amplificaciones génicas caracterizadas de novo (RCH1 en 17q23, TOPO II en 17q21-q22, CAS y MYBL2 en 20q13), *Forozan* y colaboradores intentan validar su presencia en 372 carcinomas de mama incluidos en un *array tisular*.

- Alteraciones moleculares durante el proceso tumorigénico en genes que codifican para productos con diferentes funciones bioquímicas (factores de transcripción, kinasas, fosfatasa, proteasas, reguladores del ciclo celular, reguladores apoptóticos y antiapoptóticos, etc) van a condicionar perturbaciones en diversas vías celulares que explicarían la sensibilidad o resistencia intrínseca de las células cancerosas a la quimioterapia. Kudoh y colaboradores [10] han utilizado los *biochips* de cDNA para establecer “clusters” de genes asociados con resistencia intrínseca o adquirida a doxorubicina en cáncer de mama. En células MCF-7 tratadas transitoriamente con doxorubicina (1 µg/ml) observaron que se inducía la expresión de algunos genes que posibilitaban a las células cancerosas escapar a los efectos citotóxicos de la droga y por tanto pudieran estar implicados en la adquisición de resistencia a doxorubicina. En células MCF-7, seleccionadas previamente por su resistencia intrínseca a la droga (clon MCF-7/D40) comprobaron que se sobreexpresaban constitutivamente algunos de los transcritos incluidos en el “cluster” de genes inducidos transitoriamente (por ejemplo epóxido hidrolasa que es una enzima metabolizadora de drogas). De los 5760 genes analizados en el *biochip* por Kudoh y colaboradores aquellos coexpresados tanto por células tumorales con resistencia adquirida como por células tumorales intrínsecamente resistentes se consideraron parte del fenotipo molecular de resistencia a doxorubicina en cáncer de mama. Alguno de los cambios celulares derivados de la hipo o hiperexpresión de genes incluidos en dicho fenotipo son: represión de la transcripción, aumento de la apoptosis por disminución de Bcl-2 y activación de caspasas secundaria a una sobreexpresión de citocromo C, aumento de la proteólisis por ubiquitinación en el proteasoma.

- En nuestro grupo, dado el gran número de pacientes con carcinoma de mama y ganglios axilares positivos sin metástasis a distancia que son tratadas con taxanos y la relativa alta tasa de fallo en un tratamiento quimioterápico no exento de riesgos, nos hemos planteado investigar los niveles de expresión de 5000 cDNAs humanos en 2 líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB435) sometidas a concentraciones crecientes de paclitaxel y en 5 cultivos primarios de carcinoma ductal infiltrante tratados de forma transitoria con paclitaxel a concentración fija. El *biochip* incluirá ESTs y genes con funciones muy diversas : genes reguladores de *apoptosis*; genes asociados a *moléculas de adhesión*; genes relacionados con la *angiogénesis*; genes reguladores del *ciclo celular*; genes implicados en la *reparación y replicación del DNA*; genes que codifican para moléculas integrantes de la *estructura celular*; genes de *diferenciación y desarrollo*; genes asociados a *cáncer hereditario*; genes relacionados con la *respuesta a drogas*; genes que codifican para *receptores y factores de crecimiento*; genes codificadores de *hormonas e interleukinas*; genes codificadores de *kinasas y fosfatasa*; genes implicados en *metástasis e invasión tumoral*; genes asociados a *necrosis tumoral*; *oncogenes y proto-oncogenes*; genes que codifican para *proteínas ribosomales* implicadas en cáncer; genes relacionados con *stress celular*; genes que codifican para *factores de transcripción*; *genes supresores tumorales*; genes asociados a *ubiquitinación y proteólisis*; genes codificadores de *chaperoninas*; *genes virales* implicados en cáncer; genes *específicos de tejido y genes de afimetría*.

Para definir las alteraciones moleculares asociadas al fenotipo de resistencia a paclitaxel en cáncer de mama: 1) se intentará generar, a partir de las líneas parentales, clones resistentes a la droga y comparar su perfil de expresión génica con el de clones sensibles, 2) se comparará el patrón de expresión de cultivos primarios de mama resistentes a paclitaxel con el de un pool de cultivos primarios de mama sensibles a la droga. Para diferenciar la resistencia inducida por el tratamiento de la resistencia intrínseca se compararán los niveles de expresión en cultivos primarios resistentes a la droga con el patrón de expresión en cultivos primarios no tratados. La información obtenida con el *biochip* de cDNA se validará o confirmará mediante PCR cuantitativa en tiempo real de las muestras problema.

Algunos de los mecanismos moleculares implicados hasta el momento presente en la resistencia a paclitaxel son :

1. Alteraciones en la captación celular del fármaco por una sobreexpresión de P-glicoproteína (p170) secundaria a un incremento en la transcripción del gen MDR-1 (gen de multiresistencia a drogas).
2. Desactivación metabólica por enzimas del sistema citocromo P450 (CYP). Se ha comprobado que el paclitaxel metabolizado en el hígado por los enzimas CYP3A4 y CYP3A5 posee menor capacidad estabilizante de los microtúbulos y menor capacidad para inducir apoptosis.
3. Cambios estructurales en la molécula β -tubulina. Se ha visto que la sobreexpresión o hipoexpresión de determinados isotipos de β -tubulina puede alterar la dinámica microtubular de la célula e impedir la acción del paclitaxel. De igual forma mutaciones puntuales en el exón-1 y en el exón-4 del isotipo M40 pueden afectar su interacción con paclitaxel.
4. Cambios en los niveles de expresión de algunos componentes de la vía. Se ha observado que células que sobreexpresan Bcl-2 o Bcl-XL son mas resistentes a la apoptosis mediada por paclitaxel.

BIBLIOGRAFIA :

1. Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P. and Trent J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genet.*, Supplement Vol 21: 10-14, 1999
2. Cheung V.G., Morley M., Aguilar F., Massimi A., Kucherlapati R. and Childs G. Making and reading microarrays. *Nature Genet.*, Supplement Vol 21: 15-19, 1999
3. Benson D.A., Boguski M.S., Lipman D.J. and Ostell J. GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 25 : 1-6, 1997
4. Boguski M.S., Lowe T.M. and Tolstoshev C.M. dbEST-database for “expressed sequence tags”. *Nature Genet.*, 4: 332-333, 1993
5. Schuler G.D., Boguski M.S., Stewart E.A., Stein L.D., Gyapay G., Rice K., et al. A gene map of the human genome. *Science*, 274: 540-546, 1996
6. Perou Ch.M., Jeffrey S.S., Van de Rijn M., Rees Ch.A., Eisen M.B., Ross D.T., et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 : 9212-9217, 1999
7. Sgroi D.C., Teng S, Robinson G., LeVangie R., Hudson J.R. and Elkhouloun A.G. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res.*, 59: 5656-5661, 1999
8. Perou Ch.M., Sørlie T., Eisen M.B., Van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees Ch.A., et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000
9. Forozan F., Mahlamäki E.H., Monni O., Chen Y., Veldman R., Jiang Y., et al. Comparative Genomic Hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines : A basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res.*, 60: 4519-4525, 2000
10. Kudoh K., Ramanna M., Ravatn R., Elkhouloun A.G., Bittner M.L., Meltzer P.S., et al. Monitoring the expression profiles of doxorubicin-induced and doxorubicin-resistant cancer cells by cDNA microarray. *Cancer Res.*, 60: 4161-4166, 2000

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS SUPERIORES E INFERIORES.

FORMAS HISTOLÓGICAS ESPECIALES DEL CARCINOMA DE LARINGE.

Cosme Ereño.

Hospital de Basurto-Bilbao.UPV/EHU.

Introducción.

La clasificación de los tumores del tracto respiratorio superior y oído de la OMS (1) divide los tumores malignos de la laringe en 19 histotipos. La forma más común es el carcinoma de células escamosas (CCE) que representa entre el 85 y 95% del total de los cánceres (2, 3). En nuestro material, Serie del Hospital de Basurto (SHB) el CCE se presenta en el 93,2% de los casos y las formas especiales en el 5,8%. Es importante estar familiarizados en el reconocimiento de los histotipos especiales dado que tienen un claro impacto sobre el pronóstico y la supervivencia del paciente (2).

I.- VARIANTES DEL CARCINOMA DE CELULAS ESCAMOSAS

Carcinoma verrucoso (CV)

El carcinoma verrucoso es una variante muy bien diferenciada del CCE (1). En el tracto respiratorio la laringe es la localización más común tras de la cavidad oral (4). Representa entre el 1-4% de todos los carcinomas laríngeos (2); en la SHB el 1,6%. Aparece en varones fumadores en la 5^a-6^a década (5), con presencia ocasional del HPV16/18 (6). Frente a lesiones sin atipia celular como la hiperplasia reactiva o el papiloma escamoso, las características diferenciales del CV son la arquitectura “church spiked-like”, las papilas filiformes no ramificadas, la

banda gruesa de paraqueratosis superficial y el tamaño de la lesión, especialmente, en los casos de larga evolución. Hay que tener en consideración los carcinoma híbridos (mixtos) verrucoso-escamosos, aunque en la laringe su proporción es muy inferior a la de la cavidad oral (4, 5).

Carcinoma escamoso-papilar(CEP)

Incluido dentro del epígrafe carcinoma de células escamosas de la OMS (1). Se desarrolla en las vías aerodigestivas superiores (VADS) (7, 8, 9, 10). Algunos casos asientan sobre lesiones de papiloma benigno (10). Es una variante rara; las series publicadas son cortas y no aportan más de 60 casos (7, 8, 9, 10). Son supraglóticos y pueden alcanzar gran tamaño (7, 9). El CEP ha sido descrito además en la piel, cuello uterino, conjuntiva y timo (11). Típicamente el epitelio es similar al del carcinoma in-situ o al de la metaplasia inmadura del cervix (9, 10). La queratinización es muy rara, los cambios coilocíticos son ocasionales y sólo en algunos casos hay relación con HPV (10). Hay que diferenciarlos del papiloma con atipia y sobre todo del carcinoma escamoso exofítico y del CCE convencional, ambos de mucho peor pronóstico (9).

Carcinoma de células fusiformes (CCF)

Es una variante bifásica del carcinoma escamoso caracterizada por la presencia de un componente escamoso convencional y otro adyacente o subyacente de células fusiformes o pleomórfico (1). Su crecimiento es rápido, es polipoide la mayor parte de las veces y representa el 1% de los tumores de la laringe (2). Dentro de las VADS, la laringe es el asiento predilecto (12, 13) y en ella, las cuerdas vocales verdaderas (14). Los CCF comprenden:

- a) Tumores cuyo componente fusocelular es epitelial en el ME y en la IHQ.
- b) CCE con estroma pseudosarcomatoso, reactivo, no neoplásico, pseudosarcoma fibro/histioblástico de Lane.
- c) CCE con estroma sarcomatoso auténtico, carcinosarcomas o tumores de colisión. Este componente sarcomatoso (osteóide, cartílago, músculo) se aprecia en 15% de los casos aproximadamente (12). Recientemente se han establecido las claves diagnósticas para separarlos de los tumores miofibroblásticos inflamatorios (15).

Carcinoma basaloide-escamoso (CBE)

Es una variante bimorfa con componente mixto basaloide y escamoso (1). Muy maligno, raro, representa el 1,3% en la SHB. Fue descrito en las VADS por Wain y cols en 1986 (16). Puede crecer también en el ano, esófago, cuello uterino y pulmón. En las VADS asienta en la base de la lengua, seno piriforme y en la zona supraglótica de la laringe. Son tumores que se diagnostican en estadios avanzados, en varones de más de 60 años (17, 18). En la laringe son exofíticos, polipoides y ulcerados. Microscópicamente predomina el componente basaloide, con su celularidad, patrón de crecimiento y estroma típicos. Plantea problemas de diagnóstico diferencial principalmente con el carcinoma adenoide quístico (CAQ) y con el carcinoma de células pequeñas neuroendocrino. La positividad frente a la queratina de alto peso molecular (34□E12) permite discriminar mejor el CBE de los carcinomas de células pequeñas que los marcadores neuroendocrinos. La expresión de actina, de desmina y de la proteína S-100 favorecen el diagnóstico de CAQ (19).

Otras variantes.- Los carcinomas **adenoide-escamosos** muestranseudoluces por acantolisis y no presentan contenido mucinoso (1). El **carcinoma linfoepitelial** de la laringe e hipofaringe es un tumor similar al descrito en la nasofaringe (1), extremadamente raro y agresivo (3). El **carcinomas de células gigantes** (1, 3) es muy raro y morfológicamente similar al del pulmón.

II.- TUMORES NEUROENDOCRINOS (TNE)

La clasificación de OMS (1) separa los TNE en dos grupos, uno epitelial, con un espectro continuo desde el tumor carcinode típico hasta el carcinoma de células pequeñas, pasando por el carcinoide atípico y un segundo formado por los paragangliomas. Todos ellos son raros y se estima su frecuencia entre el 0,6% y el 2,5%, este último porcentaje en la SHB.

Tumor carcinoide típico

Es el más raro. Se han comunicado 13 casos hasta el año 1991. Se localiza en la zona supraglótica en los varones. Puede producir metástasis (20).

Tumor carcinoide atípico

Es el más común del grupo. Casi todos son supraglóticos (96%) y argentafines, queratina (96%), cromogranina (94%) y calcitonina (80%) positivos. Presentan metástasis ganglionares en el 43%, cutáneas en el 22% y en cerca de la mitad de los casos a distancia. La tasa de supervivencia acumulada a los 5 años es del 48% (21). El diagnóstico diferencial incluye el carcinoma medular de tiroides metastásico y el paraganglioma (24).

Carcinoma neuroendocrino de células pequeñas

Es un tumor raro; representa menos del 0,5% de los tumores laríngeos (22) y predomina en varones en región la supraglótica. Se presenta bajo tres patrones:

- a) tipo "oat-cell",
- b) de células intermedias,
- c) de patrón combinado.

El tipo de célula pequeña (oat-cell) es similar al del pulmón, con mitosis y necrosis frecuentes, así como con invasión vascular y linfática. La IHQ es útil ya que el tumor es siempre queratina positivo (AE1-AE3 y CAM 5.2) con patrón de tinción punteado (dot-like). Es muy agresivo y letal con una tasa de supervivencia del 5% a los 5 años (22). En el diagnóstico diferencial, al igual que en el de pulmón, las características nucleares son las que permiten diferenciar si son o no neuroendocrinos (23).

Paraganglioma.

Es una neoplasia rara, la única de predominio femenino. Crece en la supraglotis, en el pliegue aritenopiglótico y en la banda. Presenta el típico patrón organoide (zellballen). Es imposible predecir su comportamiento biológico, basándonos en parámetros histológicos. Expresan marcadores neuroendocrinos y a veces S-100 en las células sustentaculares, pero no reaccionan frente a las queratinas, calcitonina y CEA (24).

III.- CARCINOMAS TIPO DE GLANDULA SALIVAL.

Son muy raros; representan menos del 1% de los tumores malignos epiteliales de la laringe (25). Crecen en las zonas subglótica y supraglótica. El más frecuente es el carcinoma **adenoide quístico (CAQ)**, que representa el 0,25 % de los carcinomas de laringe y afecta por igual a ambos sexos sobre todo en la 6ª década. El **carcinoma mucoepidermoide**, es más común en varones, crece en el área supraglótica, y desarrolla metástasis ganglionares cervicales en el 45% y a distancia en el 10% de los casos. Los tumores mucoepidermoides de alto grado semejan a los carcinomas adenoescamosos poco diferenciados (24). La supervivencia global para todos los grados es del 75-80% a los 5 años (3). **Carcinoma adenoescamoso**, descrito por Gerughty y cols el año 1968 (26), sólo se han descrito 20 casos en la laringe (27). Crece sobre todo en la región supraglótica, es muy agresivo, y origina metástasis ganglionares en el 25% y a distancia en el 5% de los casos. La supervivencia a los cinco años es del 22%. Presenta un patrón con áreas de carcinoma epidermoide en superficie y de adenocarcinoma en las zonas invasivas profundas. Otros tumores: Se han comunicado una miscelánea de casos de otros tipos de tumores de las salivales como **carcinomas de células acinares, mioepiteliomas, carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma de células claras, carcinoma del ducto salival, adenocarcinoma oncocítico y adenocarcinoma papilar y mucoide.**

REFERENCIAS

1. Shanmugaratnam K, et al. Histological Typing of Tumours of the Upper Respiratory Tract and Ear. WHO International Histologic Classification of Tumours. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
2. Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, Devaney S L, Milroy ChM. Impact of phenotype on treatment and prognosis of laryngeal malignancies. Journal of Laryngology and Otology 1998;112: 710-714.
3. Barnes L. Squamous cell carcinoma of the larynx. Basaloid-squamous cell carcinoma. Lymphoepithelial carcinoma. Giant cell carcinoma. Mucoepidermoid and adenosquamous carcinoma. In: Barnes L. (ed) Surgical Pathology of the Head and Neck. Marcel Dekker, New York, Basel 2001.
4. Luna MA, Tortoledo ME. Verrucous carcinoma. In: Gnepp DR (ed) Pathology of the Head and Neck. Churchill-Livingstone, Edinburgh 1988.
5. Orvidas LJ, Olsen KD, Lewis JE, et al. Verrucous carcinoma of the larynx: a review of 53 patients. Head Neck 1998; 20: 197-203.
6. Fliss DM, Noble-Topham SE, McLachlin CM, et al. Laryngeal verrucous carcinoma: a clinicopathologic study and detection of human papillomavirus using polymerase chain reaction. Laryngoscope 1994; 104: 146-152.
11. Crissman JD, Kessis T, Shan KV, et al. Squamous papillary neoplasia of adult upper aerodigestive tract. Hum Pathol 1988; 19: 1387-1396.
12. Ishiyama A, Eversole LR, Ross DA, et al. Papillary squamous neoplasms of the head and neck. Laryngoscope 1994; 104: 1446-1452.
13. Thompson LDR, Bruce MW, Heffner DK, et al. Exophytic and papillary squamous cell carcinoma of the larynx: a clinicopathologic series of 104 cases. Otolaryngol Head Neck Surg 1999; 120: 718-724.
14. Suarez PA, Adler-Storhiz K, Luna MA, et al. Papillary squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract: A clinicopathologic and molecular study. Head Neck 2000 22: 360-368.

15. Slootweg PJ, Richardson M. Squamous cell carcinoma: Unusual variants. Papillary squamous cell carcinoma. In: Gnepp DR (ed) Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. Saunders Company, Philadelphia 2001.
16. Zarbo RJ, Crissman JD, Venkat H, et al. Spindle-cell carcinoma of the upper aerodigestive tract mucosa. An immunohistologic and ultrastructural study of 18 biphasic tumors and comparison with seven monophasic spindle-cell tumors. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 741-753.
17. Nappi O, Wick MR, Sarcomatoid neoplasms of the respiratory tract. *Semin Diag Pathol* 1993; 10: 137-147.
18. Hellquist HB, Olofsson J, Spindle cell carcinoma of the larynx. *APMIS* 1989; 97: 1103-1113.
19. Wenig BM, Devaney K, Bisceglia M. Inflammatory myofibroblastic tumor of the larynx. A clinicopathologic study of eight cases simulating a malignant spindle cell neoplasm. *Cancer* 1995; 76: 2217-2229.
20. Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Hum Pathol* 1986; 17: 1158-1166.
21. Banks ER, Frierson HF, Millis SE, et al. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. *Am J Surg Pathol* 1992; 16: 939-946.
22. Ereño C, López JI, Sanchez JM, et al. Basaloid-squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. A clinicopathologic study of 7 cases. *Path Res Pract* 1994; 190:186-193.
23. Morice WG, Ferreiro JA. Distinction of basaloid-squamous cell carcinoma from adenoid cystic and small undifferentiated carcinoma by immunohistochemistry. *Hum Pathol* 1998; 29: 609-612.
24. El-Naggar AK, Batsakis JG, Carcinoid tumor of the larynx. A critical review of the literature. *ORL* 1991; 53:188-193.
25. Woodruff JM, Senie RT. Atypical carcinoid tumor of the larynx . a critical review of the literature. *J Laryngol Otol* 1991; 53: 194-209.
26. Gnepp DR. Small cell neuroendocrine carcinoma of the larynx. A critical review of the literature. *ORL* 1991; 53: 210-219.
27. Guinee DG, Fishback NF, Koss MN, et al. The spectrum of immunohistochemical staining of small-cell lung carcinoma in specimens from transbronchial and open lung biopsies. *Am J Clin Pathol* 1994; 102:406-414.
28. Ferlito A, Milroy C, Wenig B, et al. Laryngeal paraganglioma versus atypical carcinoid tumor .*Ann Otol Laryngol* 1995; 104: 78-83.
29. Luna MA. Adenocarcinomas and salivary gland neoplasms of the larynx. *Patología* 1999; 32(3) : 329-330.
30. Gerughty RM, Hennigar GR, Brown FM. Adenosquamous carcinoma of the nasal, oral, and laryngeal cavities. A clinicopathologic survey of ten cases. *Cancer* 1968; 22: 1140-1154.
31. Fujino K, Ito J, Kanaji M, et al. Adenosquamous carcinoma of the larynx. *Am J Otolaryngol* 1995; 16: 115:118.

NUEVA CLASIFICACION DE LAS LESIONES PREMALIGNAS LARÍNGEAS

Lucía. Alós

Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Clínic, Universidad de Barcelona.

INTRODUCCION

El diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las lesiones premalignas laríngeas están relacionados con las alteraciones histológicas del epitelio escamoso. Por ello, con la finalidad de clasificar las lesiones hiperplásicas y displásicas de esta región, que nos referiremos como lesiones hiperplásicas laríngeas (LHL), es preciso una evaluación histológica precisa de las mismas (1). Durante las últimas tres décadas han sido propuestas múltiples clasificaciones para estas lesiones, pero con falta de uniformidad en la terminología y en el valor pronóstico (3-6). La mayor parte de estas clasificaciones están basadas en criterios similares a los utilizados para la clasificación de lesiones intraepiteliales escamosas del cérvix uterino (2). De hecho, la clasificación de la OMS para las lesiones escamosas premalignas de la laringe incluye tres grados de displasia (CIN I, CIN II y CIN III) y carcinoma “in situ” (5).

Sin embargo, estudios recientes han revelado que la epidemiología y la biología molecular del carcinoma escamoso son distintas en estas dos localizaciones. Mientras que en el cérvix uterino, el carcinoma escamoso se relaciona en más del 90% con el virus del papiloma humano (HPV) (7), en el cáncer laríngeo parece que el HPV no juega un papel determinante (8-12). En cambio, otros factores se han establecido más importantes en la etiología

del carcinoma laríngeo, como es el tabaco, el alcohol y la exposición a irritantes físicos y químicos. Estos carcinógenos actúan a nivel molecular, siguiendo una vía distinta a la carcinogénesis establecida en el cérvix uterino.

La necesidad de establecer el pronóstico de las lesiones precancerosas resulta de mayor relevancia en la laringe, un órgano menos accesible a controles periódicos citológicos y biopsicos. Además, debido a la anatomía del órgano, no se ha podido diseñar una intervención similar a la conización del cérvix uterino, con extirpación de la totalidad de la lesión premaligna.

Todo ello hace imperiosa la necesidad de establecer criterios precisos de diagnóstico de las LHL, distinguiendo aquellas que tienen riesgo de malignizarse de las que no lo tienen. Con estos objetivos, se creó una nueva clasificación, presentada en la Conferencia Internacional sobre Lesiones Laríngeas Epiteliales Hiperplásicas en Ljubljana en 1996. Esta clasificación se discutió entre los miembros de la Sociedad Europea de Patología, en diversas reuniones, estableciéndose el valor pronóstico y la reproducibilidad de la misma (13,14).

CLASIFICACION DE LJUBLJANA

En las lesiones laríngeas hiperplásicas el epitelio está engrosado ya sea de forma uniforme o bien irregular. Frecuentemente hay cambios de hiperqueratosis. En todos los casos la membrana basal está preservada y no se evidencian signos de invasión. La clasificación es la siguiente:

HIPERPLASIA SIMPLE:

Definición: hiperplasia del epitelio escamoso laríngeo, con conservación de la arquitectura y patrón histológico del mismo.

Criterios: el epitelio escamoso está engrosado a expensas fundamentalmente del estrato espinoso. Las capas basal y parabasal están inalteradas. No hay atipia celular.

HIPERPLASIA ANORMAL

Definición: el epitelio escamoso está engrosado, a expensas de las capas basal y parabasal. Estas capas expresan el antígeno Ki-67 (anticuerpo MIB-1), así como las citoqueratinas de células basales (CKs 5, 14, 17, 19).

Criterios: El epitelio escamoso mantiene su ordenación. Las capas de células basales y parabasales se disponen en capas, de forma perpendicular a la membrana basal, pudiendo alcanzar más del 50% del grosor epitelial. No existe atipia celular.

Las hiperplasias simple y anormal son lesiones benignas, a partir de las cuales el desarrollo de carcinoma escamoso acontece en aproximadamente un 1% de los casos. Por tanto, en este grupo de pacientes no hace falta ningún tipo de terapéutica.

HIPERPLASIA ATÍPICA

Definición: alteraciones displásicas del epitelio escamoso, sin alcanzar el grado de carcinoma "in situ". Se considera una lesión premaligna, a partir de la cual puede desarrollarse un carcinoma escamoso.

Criterios: la estratificación está preservada, pero se evidencian signos de atipia celular: núcleos aumentados de tamaño, de contornos irregulares, cromatina irregular, generalmente con nucleolos prominentes. Las mitosis están aumentadas, si bien no suelen ser muy numerosas y se sitúan en los dos tercios inferiores del epitelio. Las células disqueratóticas son frecuentes y se identifican células epiteliales escamosas apoptóticas (cuerpos de Civatte), con citoplasma eosinófilo hialino y núcleos picnóticos.

En los pacientes con hiperplasia atípica, un 11% desarrollan carcinoma escamoso. Para este grupo de pacientes es aconsejable un estrecho seguimiento clínico y repetición de tomas biopsicas, para descartar progresión de la enfermedad (desarrollo de carcinoma "in situ" o invasivo).

CARCINOMA "IN SITU"

Definición: lesión que presenta las características propias de un carcinoma escamoso, pero sin signos de invasión.

Criterios: las células exhiben atipia, y abundantes figuras de mitosis que suelen afectar la totalidad del grosor epitelial. Pueden verse células escamosas apoptóticas. A diferencia de la hiperplasia atípica, aquí existe pérdida de la estratificación del epitelio escamoso.

El carcinoma "in situ" precede al carcinoma invasivo, por lo que debe ser tratado, mediante tratamiento quirúrgico o radioterápico.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Kambic V. Epithelial hyperplastic lesions- a challenging topic in laryngology. *Acta Otolaryngol (Stoch)* 1997; Suppl. 527; 7-11.
- 2- Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ et al. Histological typing of female genital tract tumours. Berlin:Springer, 1994.
- 3- Shanmugaratnam K. Histological typing of upper respiratory tract tumours. Geneva: World Health Organization. Springer, 1978.
- 4- Hellquist H, Lundgren J, Olofsson J. Hyperplasia, keratosis, dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords- a follow-up study. *Clin Otolaryngol* 1982; 7;11-27.
- 5- Shanmugaratnam K. Histological typing of tumours of upper respiratory tract and ear. Berlin: World Health Organization. Springer, 1991.
- 6-Friedmann I. Precursors of squamous cell hyperplasia. In Ferlito A ed. *Surgical pathology of laryngeal neoplasms*. London: Chapman & Hall, 1996; 107-122.
- 7-zur Hausen H. Papiloma virus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys. Acta* 1996;1288;F55-F78.
- 8-Gallo O, Bianchi S, Giannini A et al. Lack of detection of human papillomavirus (HPV) in transformed laryngeal keratoses by in situ hibridization (ISH) technique. *Acta Otolaryngol (stoch)* 1993;114:213-217.
- 9-Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjanen S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol (Stockh.)* 1994; 114;348-351.
- 10-Kambic V, Gale N. *Epithelial hyperplastic lesions of the larynx*. Amsterdam: Elsevier, 1995.
- 11-Lindeberg H, Krogdahl A. Laryngeal dysplasia and human papillomavirus. *Clin Otolaryngol* 1997;22;382-386.
- 12- Brandwein MS, Nuovo GJ, Biller H. Analysis of prevalence of human papillomavirus in laryngeal carcinomas. Study of 40 cases using polymerase chain reaction and consensus primers. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1993;102:309-313.
- 13- Hellquist HB, Cardesa A, Gale N, Kambic V, Michaels L. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions. *Histopathology* 1999;34;226-233.
- 14-Gale N, Kambic V, Michaels L, Cardesa A, Hellquist H, Zidar N, Pljak M. The Ljubljana Classification: A practical strategy for the Diagnosis of Laryngeal Precancerous Lesions. *Advances in Anatomic Pathology* 2000;7:240-251.

PATOLOGIA MOLECULAR DEL CARCINOMA DE LARINGE

Antonio Cardesa, Alfons Nadal*, Pedro L. Fernández, Elías Campo.
Hospital Clínic y Hospital Casa de Maternitat*, Barcelona.

Introducción

Las alteraciones moleculares relacionadas con la aparición y el desarrollo del proceso neoplásico pueden resumirse en dos grandes grupos: La activación de los proto-oncogenes (que se convierten en oncogenes) y la inactivación de los genes supresores.

Oncogenes

bcl-1/CCND1

En realidad, *bcl-1* no es un gen, sino una región localizada en 11q13, que participa de fenómenos de reordenamiento génico observados en linfomas. En esta región se localizan, entre otros, los genes *int-2* y *hst-1*. Se han demostrado amplificaciones de éstas secuencias en tumores y líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello, pero no se ha podido demostrar la expresión de ninguno de ellos, así que no parece muy probable que éstos genes sean la diana del fenómeno de amplificación. Sin embargo, en esta región se encuentra también el gen *PRAD-1*, descrito asociado a un reordenamiento característico de los adenomas de paratiroides (de ahí su nombre, de parathyroid adenoma). *PRAD-1* codifica a la ciclina D1. Las ciclinas son una familia amplia de proteínas relacionadas con el control del ciclo celular y deben su nombre a la variación cíclica de su expresión. Ciclina D1 es la subunidad reguladora del complejo ciclina-quinasa dependiente de ciclina (en concreto ciclina D1 se une a *cdk4*), el cual incluye a *p21^{WAF1}* y *PCNA*. Este complejo, mediante su actividad quinasa, regula el estado de fosforilación de la proteína del gen del retinoblastoma y provoca la liberación de los factores de transcripción necesarios para avanzar a lo largo del ciclo celular, desde la fase *G₀* a la fase *S*, entre los que se encuentra *c-myc*.

Nuestro grupo ha podido demostrar que CCND1 (este es el nombre propuesto para el gen de la ciclina D1) se encuentra amplificado y sobreexpresado en carcinomas escamosos de laringe, de modo que el mecanismo que explica la sobreexpresión del gen es la amplificación del mismo. Además hemos observado que tanto la amplificación como la sobreexpresión de CCND1 se producen con más frecuencia en casos avanzados, sugiriendo que éstos son fenómenos tardíos en el proceso neoplásico.

Genes supresores

p53

Desde su descubrimiento en 1979, p53 se ha convertido en la molécula con mayor implicación en el desarrollo de neoplasias humanas. La detección inmunohistoquímica de p53 en tumores pero no en tejidos normales abonó la creencia de que se trataba de un oncogen. Al profundizar en el conocimiento del gen, se descubrió que la proteína acumulada en los tejidos tumorales se debía a la presencia de una mutación del gen de TP53 que estabilizaba la proteína, alargando su vida media, permitiendo su acumulación en el núcleo celular y su detección inmunohistoquímica.

p53 participa en el control del ciclo celular, la reparación del ADN, la apoptosis y la conservación de la integridad genómica, interaccionando con el ADN en forma de tetrámeros e induciendo la transcripción de varios genes (p21^{WAF1}, MDM2, bax, GADD45). El aumento de la proteína nativa conlleva la parada del ciclo celular antes de entrar en la fase de síntesis del ADN (a través de p21^{WAF1}), permitiendo la reparación del material genético dañado, o, alternativamente, induciendo los mecanismos que llevan a la muerte celular por apoptosis. Así pues, TP53 es un gen con actividad supresora tumoral. Aunque los genes supresores se consideran de carácter recesivo (en el sentido de que es necesaria la inactivación de los dos alelos para que se manifieste la pérdida del efecto supresor) algunas mutaciones de TP53 actúan de forma dominante, ya que al unirse proteínas mutantes a proteínas con la estructura nativa, los tetrámeros formados resultan inactivos.

Globalmente, se han detectado mutaciones de TP53 en el 50% de los cánceres humanos. En el carcinoma escamoso de laringe, la prevalencia es del orden del 28 al 40% según los autores. La mutación no es el único mecanismo de inactivación de p53. Proteínas celulares como MDM2 y las proteínas E6 de los virus del papiloma humano (HPV) son capaces de inducir la degradación de p53 con diversos grados de eficacia, según el tipo específico de HPV. Las observaciones de diversos grupos, entre ellos el nuestro, sugieren que las alteraciones de p53 son un fenómeno temprano en la transformación neoplásica en los carcinomas escamosos de laringe. Existe una falta de correlación con los grados de diferenciación o extensión tumoral, a lo que se añade que lesiones preneoplásicas también son portadoras de alteraciones de p53. Hasta la fecha no se ha podido demostrar valor pronóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de laringe. Además, es necesario tener en cuenta que la acumulación de proteína no es un marcador seguro de mutación de TP53. En nuestra experiencia, casos de carcinoma de laringe con mutaciones de p53 que destruyen la estructura de la proteína (mutaciones en que cambian el patrón de lectura o mutaciones sin sentido) y delección alélica no muestran sobreexpresión de p53. Así, una inmunohistoquímica negativa, que se interpretaría como una p53 normal, puede esconder en realidad un caso en el que la función de p53 está completamente anulada. Recíprocamente, hemos encontrado casos con intensa sobreexpresión de p53 en los que la secuencia del gen en las regiones conservadas (exones 5 a 9) no ha mostrado mutación alguna. En este sentido, recientes estudios han demostrado acumulación de p53 sin evidencia de mutación subyacente en linfomas, gliomas y carcinomas escamosos de cabeza y cuello, incluidos casos de laringe.

Inhibidores de las kinasas dependientes de ciclinas (CKI)

p21^{WAF1/CIP1/CAP20/SDI1} fue la primera CKI identificada, como un componente de los complejos cuaternarios de ciclina/CDK/PCNA regulado por p53, con actividad inhibidora de las kinasas dependientes de ciclinas y de PCNA. Posteriormente se demostró que existen vías de activación de p21^{WAF1} distintas de p53 y que su expresión se correlaciona con diferenciación terminal en diversos tejidos. Estudios recientes han demostrado la capacidad supresora tumoral de p21^{WAF1}. Sin embargo parece que la mutación de p21^{WAF1} en tumores humanos es un fenómeno poco menos que excepcional.

Nuestro grupo ha estudiado la expresión de la proteína p21^{WAF1} mediante inmunohistoquímica y de su ARN mensajero mediante análisis de Northern blot en los carcinomas escamosos de laringe. Los resultados fueron sorprendentes, ya que la mayor parte de los tumores expresan tanto la proteína como el ARNm de p21^{WAF1} en cantidades similares o incluso superiores (en ocasiones, muy superiores) a los de la mucosa no tumoral. Esta expresión es independiente de p53 ya que se detecta en casos con anulación completa de p53, pero muestra una clara asociación con el fenómeno de la diferenciación tumoral, ya que los tumores pobremente diferenciados (grado IV de Broders) no expresan p21^{WAF1}, e incluso en los tumores que sí expresan, las áreas más pobremente diferenciadas tienden a ser

negativas. Estos resultados nos hacen pensar que en contexto del carcinoma escamoso de laringe, p21^{WAF1} no tiene una función de gen supresor o, que la vía supresora en la que se encuentra no es funcional.

La familia de p21^{WAF1} se completa con p27^{KIP1} y p57^{KIP2} que comparten homología y funciones.

p16^{INK4/MTS1}, p15^{INK4b/MTS2}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d} constituyen una familia distinta de inhibidores de CDK, específicos para CDK4/CDK6. Tienen actividad supresora tumoral (de ahí su nombre de MTS, de "Multiple Tumor Suppressor") y nuestro grupo ha fijado su interés en p16^{INK4a}, el miembro mejor caracterizado y estudiado de la familia, como continuación lógica del trabajo sobre CCND-1.

Se ha estudiado la presencia de mutaciones por PCR-SSCP no radioactivo, seguida de secuenciación de los casos positivos, y la existencia de deleciones alélicas mediante análisis de pérdida de heterocigosidad de microsatélites vecinos al gen de p16^{INK4a}. A diferencia de p21^{WAF1}, el comportamiento de p16^{INK4a} sí resulta el esperado para un gen con actividad supresora tumoral. En todos los casos con mutación de p16^{INK4a}, esta se acompaña de deleción del otro alelo, de acuerdo con el modelo de inactivación de los genes supresores propuesto por Knudson. Se detecta pérdida de heterocigosidad en un número superior de casos al de los que muestran mutación, lo que nos lleva a creer que en el proceso de inactivación de p16^{INK4a}, la deleción alélica precede a la mutación.

Existen otros mecanismos conocidos de inactivación de p16^{INK4a} como son la deleción homocigota (especialmente frecuente en líneas celulares y la hipermetilación del promotor. Hemos analizado la prevalencia de estas alteraciones en los carcinomas escamosos de laringe, en los que el principal mecanismo de inactivación de p16^{INK4a} es la mutación acompañada de deleción alélica, seguida de la deleción homocigota y de la hipermetilación del promotor (acompañada también de deleción del otro alelo). La correlación con la expresión proteica y del ARNm de p16^{INK4a} es excelente en los casos de deleción homocigota y de hipermetilación del promotor, pero los casos mutantes pueden mostrar sobreexpresión o pérdida de expresión (tanto en el análisis de Western-blot como en el de Northern-blot), por lo que los análisis limitados a la expresión de p16^{INK4a} (por ejemplo mediante inmunohistoquímica) pueden ser causa de falsas interpretaciones.

El descubrimiento de que el locus del gen de p16^{INK4a} incluye a dos transcritos distintos según el proceso de maduración del ARNm, por empalme alternativo de exones 1 α (que da origen a p16^{INK4a}) o 1 β (que da origen a p19^{ARF} en el modelo murino) con los exones 2 y 3 de p16^{INK4a}, unido al hecho que p19^{ARF} muestra actividad supresora tumoral mediante su interacción con p53 ha venido a cuestionar cuál sea el verdadero responsable de la actividad supresora tumoral del locus de p16^{INK4a}.

Retinoblastoma

Como ya se ha descrito previamente, la proteína del gen del retinoblastoma juega un papel central en el control de la progresión a lo largo del ciclo celular, en el paso entre G₀ y la fase S. El gen del retinoblastoma se localiza en 13q14 y codifica una proteína (pRb) de 105 kd, que en estado de hipofosforilación secuestra factores de transcripción necesarios para la entrada en la fase S del ciclo celular. La fosforilación de pRb, mediada por los complejos de ciclina D1 libera a los factores de transcripción y permite la progresión. A este gen corresponde el honor de ser el primer gen con actividad supresora descrito.

Se han descrito pocas mutaciones del gen del retinoblastoma, ya que su enorme tamaño (consta de 27 exones repartidos a lo largo de más de 200 kb y su ARN mensajero mide 4,5 kb) dificulta mucho su estudio. Por contra, se han estudiado las deleciones, presumiendo que estas acompañan a alteraciones del alelo restante. En carcinomas de laringe, los estudios de pérdida de heterocigosidad de marcadores relacionados con el gen del retinoblastoma han dado como resultado que la deleción ocurre entre un 15-60% de los casos. Las discrepancias observadas impiden una valoración de cual pueda ser el auténtico papel del gen del retinoblastoma en la oncogénesis del carcinoma escamoso de laringe.

Nosotros hemos encontrado expresión inmunohistoquímica de pRb en 36 de 37 carcinomas escamosos de la laringe (un 97%). Dada la dificultad que implica un análisis genético de Rb, los resultados de expresión indican que la prevalencia de las alteraciones de Rb en estos tumores debe ser baja.

Bibliografía

A.Nadal, P.Jares, L.Hernández, P.L.Fernández, M.Cazorla, M.Pinyol, S.Hernández, S.Beà, E.Campo y A.Cardesa. Aspectos moleculares del carcinoma escamoso de laringe. Rev.Esp.Patología 1998; Vol.31, Nº 4, 471-478. **(Detallada revisión de la literatura).**

P.Jares, A.Nadal, P.L. Fernández, M.Pinyol, L.Hernández, M.Cazorla, S.Hernández, S.Beà, A.Cardesa, E.Campo. Disregulation of p16^{MTS1/CDK41} protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous-cell carcinoma of the larynx. Int.J.Cancer 1999; Vol.81, 705-711.

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA OSTEOARTICULAR.

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS TUMORES DE LOS TEJIDOS BLANDOS

Ricardo González Cámpora. Hospital Universitario V. Macarena. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

TUMORES MALIGNOS DEL TEJIDO ADIPOSO

El **liposarcoma** (LP) actualmente se considera el sarcoma más frecuente del adulto. En los últimos años se han realizado importantes avances en la categorización de estas lesiones. Por un lado, la Biología Molecular ha permitido reconocer dos formas básicas de LP: LP mixoide/ de células redondas -t(12; 16)(q13;p11) y t(12; 22)(q13;q11-22)- y LP bien diferenciado - ampliación de un gen situado en el cromosoma 12p, que se expresa en forma de cromosomas gigantes, cromosomas en anillo o cromosomas doble minutos-. El LP pleomórfico se considera un grupo heterogéneo, con cariotipo complejo, que puede corresponder a formas extremas de desdiferenciación de los otros dos tipos de LP (1).

Por otro lado, los estudios clínico patológicos han descrito dos formas adicionales de LP bien diferenciado: **LP inflamatorio**, que casi siempre es retroperitoneal y que se confunde con el pseudotumor inflamatorio (2), y el **LP de células fusiformes**, que suele ser una lesión superficial fácilmente confundible con un sarcoma de vainas neurales (3). Además, se ha ampliado el concepto de **LP desdiferenciado** para dar cabida a las denominadas lesiones secundarias y se ha introducido el concepto de componente desdiferenciado de bajo grado. Esto, en parte, ha conducido a que el LP desdiferenciado sea actualmente una lesión relativamente común (4-6).

II.- TUMORES VASCULARES DE MALIGNIDAD INTERMEDIA

El término **hemangiendotelioma** ha sido redefinido. Actualmente se utiliza para lesiones con hallazgos histológicos y comportamiento clínico intermedio entre los hemangiomas y los angiosarcomas. Su utilización debe ir siempre acompañada de un calificativo, puesto que el significado intermedio en estos tipos de tumores conlleva una gran variedad de situaciones clínicas y de comportamiento biológico.

Hemangiendotelioma de células fusiformes. Inicialmente se interpretó como un tumor de malignidad intermedia por las frecuentes recidivas y multicentricidad. Hoy se considera una lesión benigna, aunque no está claro si de naturaleza neoplásica, reactiva o hamartomatosa y se denomina angioma de células fusiformes (7).

Hemangiendotelioma epiteliode. En 1982 se señaló que esta lesión ocupaba una posición intermedia, entre el angioma epiteliode y el angiosarcoma. Actualmente se considera un tumor maligno, aunque con mejor pronóstico que el clásico angiosarcoma epiteliode. En los tejidos blandos, las dos series más importantes indican una tasa de metástasis del 20-30% y una mortalidad del 13-17%. Histológicamente se ha pretendido distinguir las lesiones agresivas (pleomorfismo, alto índice de mitosis) y no agresivas (uniformidad celular, ausencia de mitosis), pero dentro de esta última categoría no hay datos que permitan predecir la evolución (8).

Hemangiendotelioma retiforme. Es una de las pocas lesiones que se consideran verdaderamente de malignidad intermedia. Se caracteriza por mostrar un crecimiento lento pero con una alta tasa de recidivas locales. Aunque se ha referido metástasis ganglionares regionales en un paciente en ninguno se ha descrito metástasis sistémicas. Clínicamente se presenta en gente joven y muestra predilección por los tejidos superficiales de las partes distales de las extremidades. Histológicamente está constituido por canales vasculares largos y ramificados, con paredes delgadas tapizadas por células en tachueta. Es de destacar que, a pesar del claro patrón infiltrativo que se observa en la dermis e hipodermis, existe muy poca destrucción tisular (9). Las células endoteliales en tachueta, peculiares de esta entidad, no son exclusivas de la misma, también están presentes en el tumor de Daska, heman-

gioma de células en tacha y, más eventualmente, en los hemangioendotelio polimorfo, hemangioendotelio epiteliode y el angiosarcoma convencional (10).

Hemangioendotelio kaposiforme. Se considera una lesión de malignidad intermedia porque en algunos pacientes ha sido causa indirecta de muerte, bien por su localización (en retroperitoneo) e imposibilidad de resección o bien por la coagulopatía que a veces asocia. No se han descrito casos con metástasis, pero las recidivas por extirpación incompleta son frecuentes. Esta lesión es más común en la infancia que en la edad adulta y se localiza en retroperitoneo, pared torácica, extremidades, cabeza y cuello. Tanto la expresión clínica como la morfológica tienen un gran parecido con el sarcoma de Kaposi (11).

Hemangioendotelio polimorfo. Lesión extraordinariamente rara, descrita inicialmente en los ganglios linfáticos pero que puede afectar a los tejidos blandos. Se considera una neoplasia intermedia por su tendencia a ser multicéntrica y a presentar recidivas locales. Sin embargo, el tiempo ha demostrado que puede metastatizar (se ha señalado un caso con metástasis pulmonares que murió por la enfermedad) y ser fatal, de ahí que sea mejor considerarlas como malignas de bajo grado. Histológicamente combina diferentes patrones: áreas sólidas mezcladas con componente angiomatoso y irregulares tapizados por células en tacha sin atipia nuclear marcada ni actividad mitótica aumentada (12).

III.- TUMORES FIBROBLÁSTICOS MALIGNOS

En los últimos años, el fibrosarcoma (FS) ha vuelto a estar de actualidad debido al reconocimiento de nuevas variedades y a la caída, aún no todo lo definitivamente deseable, del concepto de histiocitoma fibroso maligno.

El tumor **miofibroblástico inflamatorio extrapulmonar** se presenta en los tejidos blandos y cavidad abdominal de niños y adolescentes, preferentemente del sexo femenino. Esta lesión se ha referido en la literatura bajo diversos términos: pseudotumor inflamatorio, granuloma de células plasmáticas, hamartoma mixoide omento-mesentérico y FS inflamatorio. Aunque las recidivas son relativamente frecuentes (10-25 %), las metástasis son inusuales (5%). El término sarcoma sólo es de aplicarse a los casos que han presentado metástasis. Histológicamente los tumores son bastante celulares. Las células se disponen en un patrón fascicular y se acompañan de infiltrado inflamatorio crónico prominente, particularmente de células plasmáticas. Rara vez se descubren signos de malignidad, generalmente de distribución focal, en forma de células grandes histiocitoides o células fusiformes bizarras. Los estudios de citogenética han revelado aberraciones genéticas que típicamente afectan al cromosoma 2p, resultando una redistribución del gen ALK (al igual que en el linfoma anaplásico). Las lesiones descritas como **pseudotumor fibroso calcificante** representan ejemplos de esta neoplasia que muestran marcada hialinización y calcificación distrófica (13-15).

Con el término de **sarcoma miofibroblástico de bajo grado** se ha individualizado otro grupo de lesiones miofibroblásticas, hasta entonces consideradas como fibrosarcoma de bajo grado o fibromatosis desmoide., que se presentan en jóvenes y adultos de edad media de ambos sexos. El 20-25% de los casos asientan en el cuello y cabeza (cavidad oral y lengua, preferentemente). Las recurrencias locales son frecuentes y en casos de seguimiento prolongado también se han señalado metástasis. El cuadro histológico, en general, se asemeja al de la fibromatosis, salvo en los siguientes hechos: son difusamente hiper celulares, presentan, al menos focalmente, atipia nuclear leve y, con frecuencia, tienen un patrón infiltrativo difuso dentro del músculo (16,17).

Sarcoma fibromixoide de bajo grado. Afecta preferentemente a gente joven en la 3-5ª década. Aunque su distribución anatómica puede ser muy variada, la mayoría tienen preferencia por la cintura pélvica. Histológicamente son neoplasias con poca atipia celular, compuestas por células fusiformes bastante uniformes, dispuestas en un patrón en remolino en el seno una matriz mixoide o con hialinización. Los vasos, al igual que las mitosis, son escasos. A pesar de su aspecto banal, el 50% de los casos metastatizan y tienen un curso fatal en un periodo de 10-30 años (18).

Tumor de células fusiformes hialinizante con rosetas gigantes. Lesión muy relacionada con la anterior, de la cual se diferencia por la existencia de nódulos hialinizados rodeados, a modo de rosetas, por células tumorales, más redondeadas, dispuestas con distribución axial. Eventualmente se han descritos metástasis (19).

FS epiteliode esclerosante. Variante inusual que interesa a adultos jóvenes y de edad media y asienta preferentemente en los tejidos profundos del tronco y extremidades. Aproximadamente el 50% de los casos presentan recurrencias locales y metástasis, pero su diseminación sistémica suele retrasarse 5 o más años. Histológicamente, se reconoce por su patrón arquitectural y por la morfología de las células. Estas son pequeñas, con hábito epiteliode, y se disponen en nidos, cordones y cintas en el seno de un estroma abundante y colagenizado. No deben confundirse con carcinomas metastásicos (20).

Sarcoma fibroblástico mixoinflamatorio acral. También conocido como tumor mixo-hialino inflamatorio, ocurre principalmente, aunque no exclusivamente, en las partes distales de las extremidades, particularmente en la mano de los adultos. Se caracteriza por presentar frecuentes recidivas, que a menudo conducen a una amputación, y metástasis muy ocasionales. Histológicamente es muy parecido al mixofibrosarcoma. Se diferencia de él por la presencia de áreas fibrosas compactas, infiltrado inflamatorio mixto prominente y células epiteliodes grandes con núcleo bizarro y nucléolo prominente, tipo inclusión (21, 22).

Mixofibrosarcoma. Clínicamente presenta una distribución por edades muy amplia, pero la mayoría de los casos se presentan entre 6-8ª década. No se han referido casos en menores de 20 años. Aproximadamente 2/3 de los casos se desarrollan en el tejido celular subcutáneo de las extremidades y muestran marcada tendencia a la multinodularidad y al crecimiento infiltrativo con límites mal definidos. La supervivencia global a los 5 años es del 60-70%. Las lesiones de bajo grado no tienen capacidad metastatizante pero pueden transformarse en alto grado y dar metástasis en las recurrencias. Las neoplasias de alto grado (equivalentes al histiocitoma fibroso maligno mixoide) muestran notable tendencia a presentar metástasis ganglionares, pulmonares y óseas.

El hallazgo común en todos los mixofibrosarcomas, con independencia del grado de malignidad, es la existencia de áreas hipocelulares con vasos de paredes delgadas y curvilíneas y células fusiformes o estrelladas, a veces, con citoplasma vacuolado. La celularidad y el grado de pleomorfismo se relacionan con el grado de malignidad histológica (23).

Referencias

- 1.- Fletcher CDM et al. Correlation between clinicopathological features and karyotype in lipomatous tumors. *Am J Pathol* 148:623,1996.
- 2.- Kraus MD et al. Well-differentiated inflammatory liposarcoma. *Am J Surg Pathol* 21:518, 1997.
- 3.- De Tois AP et al. Spindle cell liposarcoma. *Am J Surg Pathol* 18:913, 1994.
- 4.- Hendricks WH et al. Dedifferentiated liposarcoma. *Am J Surg Pathol* 21: 271, 1997.
- 5.- McCornick D et al. Dedifferentiated liposarcoma. *Am J Surg Pathol* 18:1213,1994.
- 6.- Nascimento AG et al. Dedifferentiated liposarcoma: a report of nine cases with a peculiar neurallike whorling pattern associated with metaplastic bone formation. *Am J Surg Pathol* 22:945, 1998.
- 7.- Perkins P, Weiss SW. Spindle cell hemangioendothelioma. *Am J Surg Pathol* 20:1196, 1996.
- 8.- Mentzel T et al. Epithelioid hemangioendothelioma. *Am J Surg Pathol* 21:363, 1997.
- 9.- Calonje E et al. Retiform hemangioendothelioma. *Am J Surg Pathol* 18:115, 1994.
- 10.- Guillou L et al. Hobnail hemangioma. *Am J Surg Pathol* 23:97, 1999.
- 11.- Mentzel T et al. Kaposiform hemangioendothelioma in adults. *Am J Surg Pathol* 18:450, 1994.
- 12.- Nascimento AG et al. Polymorphous hemangioendothelioma. *Am J Surg Pathol* 21:1083, 1997
- 13.- Meis-Kindblom JM et al. Inflammatory fibrosarcoma. *Semin Diagn Pathol* 15:133,1998.
- 14.- Su LD et al. Inflammatory myofibroblastic tumors: cytogenetic evidences supporting clonal origin. *Mod Pathol* 11:364,1998.
- 15.- Lawrence B et al. TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol* 157:377,2000
- 16.- Mentzel T et al. Low grade myofibroblastic sarcoma. *Am J Surg Pathol* 22: 1228, 1998.
- 17.- Montgomery EA et al. Myofibrosarcoma. *Am J Surg Pathol* 25:219, 2001.
- 18.- Folpe AL et al. Low-grade fibromyxoid sarcoma and hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes. *Am J Surg Pathol* 24:1353,2000.
- 19.- Lane KL et al. Hyalinizing spindle cell tumor with giant rosettes: a distinctive tumor closely resembling low-grade fibromyxoid sarcoma. *Am J Surg Pathol* 21:1481, 1997.
- 20.- Meis-Kindblom JM et al. Sclerosing epithelioid fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol* 19:979,1995.
- 21.- Meis-Kindblom JM, Kindblom LG. Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcoma. *Am J Surg Pathol* 22:911,1998.
- 22.- Montgomery EA et al. Inflammatory myxohyaline tumor of distal extremities with vascuole or Reed Sternberg-like cells. *Mod Pathol* 11:384,1998.
- 23.- Mentzel T et al. Myxofibrosarcoma. *Am J Surg Pathol* 20:391, 1996.

VALOR DIAGNÓSTICO DE LA PATOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE LOS TUMORES DE HUESO Y TEJIDOS BLANDOS.

Enrique de Alava.

Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra. Pamplona.

Sarcomas, translocaciones, y otros tipos de mutaciones.

Ciertos tipos de sarcomas se caracterizan por la presencia de translocaciones específicas, y es en este grupo de sarcomas donde se han realizado mayores avances tanto en aspectos clínicos como en el conocimiento de su patogenia.

Desde el punto de vista de la patogenia las translocaciones han dado mucha información relevante en algunos tipos de sarcomas, información de la que carecemos en otros tipos. Las fusiones génicas originadas a partir de las translocaciones son acontecimientos iniciadores de la sarcomagénesis, necesarios, y quizás suficientes en algún tipo tumoral. Las proteínas quiméricas originadas son factores de transcripción quiméricos, aberrantes (ver tabla

1). Las dos únicas excepciones son la fusión COL1A1-PDGFB del dermatofibrosarcoma protuberans, que es un factor de crecimiento autocrino, y la fusión ETV6-NTRK3 del fibrosarcoma congénito, que es una tirosín-quinasa.

Hay otros hallazgos moleculares específicos en sarcomas que no son translocaciones, como por ejemplo las mutaciones activadoras del gen KIT en los sarcomas del estroma gastrointestinal, o las mutaciones inactivantes del gen supresor tumoral hSNF5/INI1 en los tumores rabdoideos.

TABLA 1. ALTERACIONES MOLECULARES CON VALOR DIAGNÓSTICO EN SARCOMAS.

Tipo tumoral	Alteración citogenética	Alteración molecular	Prevalencia
Tumor de Ewing	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1	95%
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG	5%
	t(7;22)(p22;q12)	EWS-ETV1	<1%
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-E1AF	<1%
	t(1;22)(q42;q12)	EWS-?	<1%
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV	<1%
T. desmoplásico de células pequeñas y redondas	t(17;22)(q12;q12)	EWS-ETV4	
	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1	100%
Liposarcoma mixoide/de células redondas	t(12;16)(q13;p11)	TLS-CHOP	95%
	t(12;22)(q13;q12)	EWS-CHOP	5%
Condrosarcoma mixoide extraesquelético	t(9;22)(q22;q12)	EWS-CHN(TEC)	75%
	t(9;17)(q22;q11)	hTAFII68-CHN(TEC)	?
Sarcoma de células claras	t(12;22)(q13;q21)	EWS-ATF1	?
Sarcoma sinovial	t(X;18)(p11.23;q11)	SYT-SSX1	65%
	t(X;18)(p11.21;q11)	SYT-SSX2	35%
	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX4	
Rabdomiosarcoma alveolar	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FKHR	75%
	t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FKHR	10%
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	
Fibrosarcoma congénito /Nefroma mesoblástico celular	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3	
Sarcoma alveolar de partes blandas	der(17)t(X;17)(p11;q25)	TFE3-ASPL	
Tumores mesenquimales benignos*	Alteraciones 12q15	Alteraciones HMGI-C	
	Alteraciones 6p21	Alteraciones HMGI(Y)	

* Lipoma, hamartoma condroide pulmonar, adenoma pleomorfo, fibroadenoma de mama, leiomioma uterino, pólipo endometrial, angiomixoma.

Cómo detectar las translocaciones

La RT-PCR, realizada a partir de RNA, es el método de elección para su detección. Los puntos de rotura de las translocaciones tienen lugar habitualmente en ciertos intrones; sin embargo el lugar dentro de cada intrón donde tiene lugar dicha rotura es muy variable. El resultado de este hecho es que la estructura de la fusión a nivel del DNA genómico es bastante menos predecible que a nivel del RNA, donde tiene un número más constante de exones de cada uno de los genes implicados en la fusión. Por eso hacemos tanto hincapié para que se congele material de todos los sarcomas, porque la mejor fuente para conseguir RNA de calidad es el material congelado.

Otros métodos diagnósticos incluyen la citogenética convencional, el FISH, y probablemente la inmunohistoquímica. De todas ellas la más prometedora es el FISH, realizado en interfases tumorales. Las translocaciones se visualizan gracias a sondas específicas que flanquean los puntos de rotura, y que están marcadas con fluorescencia.

¿Se pueden detectar dichas translocaciones en material fijado en formol e incluido en parafina?. Si es posible en aproximadamente el 50% de los casos, extrayendo el RNA con un tratamiento proteolítico más largo del habitual y empleando primers que delimiten un producto de PCR muy corto.

Algunos (pocos) tipos de fusiones se pueden detectar con inmunohistoquímica. Por ejemplo en el tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, en el que se detecta una fusión que incluye el extremo aminoterminal de EWS y el carboxilotermino de WT1, se puede realizar inmunohistoquímica con anticuerpos dirigidos al dominio amino y carboxilo terminal de WT1. La intensa inmunorreactividad con éste último, y la ausencia con el primero ayudan a detectar la fusión. El método es análogo al que usamos en los linfomas anaplásicos de células grandes (y algunos seudotumores inflamatorios) con fusión NPM-ALK, en los que detectamos la sobreexpresión del dominio carboxilo de ALK con un anticuerpo específico. Aunque en la práctica es difícil encontrar los epitopos específicos, esta sistemática podría emplearse con todas las translocaciones de los sarcomas.

Cómo las translocaciones han ayudado a clasificar algunos sarcomas.

1. Hoy aceptamos que el sarcoma de Ewing y el Tumor neuroectodérmico primitivo periférico (TNEP) de hueso y tejidos blandos son la misma entidad, con un grado variable de diferenciación neural, debido, fundamentalmente, a que comparten una misma fusión EWS-FLI1 (por citar la más frecuente).
2. Las fusiones TLS-CHOP están presentes tanto en el liposarcoma de células redondas como en el liposarcoma mixoide, lo que confirma que se trata de la misma entidad, algo que ya era de suponer puesto que muchas veces se ven tumores que contienen áreas con los dos patrones.
3. La mayoría de los condrosarcomas mixoides extraesqueléticos tienen la fusión EWS-CHN, que está ausente en los condrosarcomas mixoides óseos. Este hecho, unido a ciertas diferencias clinicopatológicas sugiere que se trata de entidades diversas.
4. Algunos rhabdomyosarcomas indiferenciados, con un patrón de crecimiento sólido, que podrían ser diagnosticados como embrionarios, aparecen en localizaciones y grupos de edad típicos del rhabdomyosarcoma alveolar. Tienen además la fusión PAX3-FKHR, típica de este último, y representan probablemente la variante sólida del rhabdomyosarcoma alveolar.
5. El tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, además de aparecer característicamente en forma de nódulos peritoneales en adolescentes varones, y de tener un inmunofenotipo divergente, tienen una fusión característica EWS-WT1, descrita prácticamente a la vez que la entidad tumoral.

Cómo ayudan al diagnóstico, especialmente en determinadas ocasiones

1. Tumor de Ewing, especialmente cuando aparece en localizaciones anómalas (riñón, piel, páncreas, cérvix) o en pacientes mayores.
2. Rhabdomyosarcoma, especialmente la variante sólida del alveolar, que a pesar de su aspecto similar al rhabdomyosarcoma embrionario tiene un pronóstico mucho peor que éste.
3. Tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, especialmente aquellos casos, poco comunes, en los que surge en pacientes adultos, en localizaciones no habituales (tejidos blandos, parótida) o no se observa desmoplasia.
4. Diagnóstico diferencial de sarcomas con fenotipo epitelioides, especialmente para diferenciar el sarcoma sinovial, el tumor maligno de las vainas de los nervios periféricos, del sarcoma epitelioides. Y también para identificar sarcomas sinoviales hallados en lugares poco comunes, como la próstata, el riñón, o la pleura.
5. Diagnóstico de tumores fibroblásticos infantiles. El fibrosarcoma congénito contiene la fusión ETV6-NTRK3, ausente en las fibromatosis congénitas o en los fibrosarcomas de tipo adulto.

¿Qué hacer con los resultados inesperados?

Aunque la correlación entre tipos tumorales y tipos de fusiones es la regla, de vez en cuando se encuentran artículos en los que se informa de la detección inesperada de cierta fusión génica en cierto tipo tumoral. Ante un hallazgo de este estilo las siguientes preguntas pueden ayudar a evaluarlo críticamente.

1. ¿Se ha utilizado la técnica molecular adecuada?. Me refiero especialmente al uso de los controles positivos y negativos adecuados que descarten una contaminación. Por ejemplo al realizar una RT-PCR conviene, además de emplear un control en el que se incluya agua en lugar de muestra, otro control en el que estén presentes todos los componentes necesarios excepto los enzimas necesarios para la amplificación.
2. ¿Se confirma el hallazgo mediante el empleo de varias técnicas alternativas?. Es aconsejable, si hay material disponible, el confirmar los resultados de una PCR que muestre resultados inesperados realizando un FISH.
3. ¿Cuáles han sido los criterios empleados para realizar el diagnóstico?. Especialmente en tumores poco frecuentes los criterios pueden variar entre diversas instituciones o grupos de trabajo.
4. ¿Cuál es el significado biológico de la detección de dichas fusiones?. Especialmente cuando se utilizan técnicas muy sensibles el investigador puede estar empleando un umbral de detección demasiado bajo para que los resultados tengan valor biológico.
5. ¿Existe una confirmación independiente de los hallazgos por parte de otro grupo?. Este es un criterio de gran relevancia.

La presencia de un resultado negativo inesperado puede deberse a la mala calidad del material, con extensa necrosis, por ejemplo, o a la presencia de inhibidores tisulares de la reacción de PCR, o a que las translocaciones tengan un patrón complejo, que se detecte mejor mediante citogenética o FISH.

Futuro

1. La genómica, empleando microarrays de cDNA, tiene potencialmente un gran interés. Aunque a medio plazo, idealmente, se pueda llegar a una clasificación molecular de los sarcomas basada en los patrones de expresión de ciertos genes, a corto plazo lo más probable es que ayude a encontrar factores moleculares de interés pronóstico, o moléculas importancia clave en la patogenia tumoral, como por ejemplo los genes diana de las fusiones génicas, o genes susceptibles de convertirse en dianas terapéuticas.
2. La PCR cuantitativa en tiempo real permite conocer el número de copias de determinado DNA o transcrito y tiene utilidad potencial para validar las diferencias de expresión génica halladas en los estudios de genómica, o para cuantificar la enfermedad residual en pacientes con sarcomas tratados con quimio o radioterapia.

Conclusiones

Un buen número de sarcomas de alto grado tienen alteraciones moleculares específicas, lo que permite integrar su detección en la rutina diagnóstica como una prueba complementaria. Dado que algunos de dichos tumores tienen pautas de tratamiento específicas, cualquier técnica útil para su diagnóstico redundaría en un tratamiento más adecuado. La detección de alteraciones moleculares en sarcomas ha ayudado a delimitar mejor algunas entidades porque, en general, muestra una buena correlación con los tipos tumorales previamente descritos.

Referencias

de Alava E. Transcripts, transcripts everywhere. *Adv Anat Pathol* 2001 (en prensa)

Delattre O, Zucman J, Melot T, Sastre X, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche T, Aurias A, Thomas G. The Ewing family of tumors. A subgroup of small round cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331:294-299.

Ladanyi M, Bridge JA. Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. *Hum Pathol* 2000;31: 532-8.

Triche TJ. Molecular classification of sarcomas: gene expression profiling of childhood sarcomas. United States and Canadian Academy of pathology. Reunión Anual. Atlanta, Marzo 2001.

Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 1998;394:203-206.

RECENT ADVANCES IN PATHOLOGY OF BONE TUMORS

Franco Bertoni, MD

Università degli Studi di Bologna – Istituto Ortopedico Rizzoli Bologna Italy

Major advances in bone tumors are due to molecular biology techniques applied to bone tumors. In some tumors, genetic changes are distinctive. Reverse-transcriptase-polymerase chain reaction (PCR) analysis for the characteristic translocation products provide valuable biological information and serve as an important diagnostic and prognostic tool(1-4).

New studies cover the area of osteosarcoma (Ogs), spindle cell sarcoma and other rare varieties of spindle cell tumors. In the recent years several studies have brought up some “ varieties” in the complex chapter of the Ogs .More than clinico-pathologic varieties they are tumors in which the histologic features can be confused with benign tumors, so it is important to recognize them in order to achieve the right treatment (chondroblastoma-like Ogs, Giant cell rich-Ogs)(5-6). Occasionally in Ogs the proliferating cells have an epithelioid appearance (“epithelioid Ogs”)(7).It is necessary to recognize these features in Ogs because they have to be differentiated from metastatic carcinoma. This is particularly true for adults patients.

In the spindle cell sarcoma of the bone the leiomyosarcoma is well- recognized and the extensive research at the Sloan Kettering Cancer Center was reported recently(8).

Solitary fibrous tumor of the bone are rarely reported, but this entity is described in a variety of sites and the bone is no exception.

In giant cell tumors (GCT) extracellular matrix is unusual. GCT of the bone with matrix production was reported in 9% of the cases in a Mayo Clinic series(9). The presence of osteoid, chondroid or cartilage matrix usually means either that there is an associated fracture, there has been previous surgery or the lesion may not be a GCT. It is important not to confuse matrix production in GCT of the bone with other bone-forming tumors, particularly OGS.

REFERENCES

- 1-de Alava E , Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG, Ladanyi M:
EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing sarcoma. *J.Clin Oncol*, 16:1248-55,1998
- 2-de Alava E, Panizo A, Antonescu CR, Huvos AG, Pardo-Mindan FJ, Barr FG, Ladanyi M: Association of EWS-FLI1 type fusion with lower proliferative rate in Ewing's sarcoma. *Am J Pathol.*:156:849-55,2000
- 3-Antonescu CR, Gerald WI, Magid MS, Ladanyi M:
Molecular variants of EWS-WT1 gene fusion in desmoplastic small round tumors
Diagn Mol Pathol. 7:24-8,1998
- 4-Antonescu CR, Argani P, Erlandson RA, Healey JH, Ladanyi M, Huvos AG:
Skeletal and extraskeletal myxoid chondrosarcoma: a comparative clinicopathologic, ultrastructural, and molecular study. *Cancer*,83:1504-21,1998
- 5-Inwards C, Bertoni F: Chondroblastoma-like osteosarcoma: a report of eight cases.
Modern Pathology,8:7A,1995(Abstract n^o 18)
- 6- Inwards C, McLeod R, Bertoni F: Giant cell rich osteosarcoma.
Modern Pathology,8:7A,1995 (Abstract n^o 19)
- 7-Inwards C, Bertoni F, Unni K, Bacchini P: Epithelioid Osteosarcoma: A clinicopathologic and immunohistochemical study. *Modern Pathology*,10:11A,1997 (Abstract n^o 42)
- 8-Antonescu CR, Erlandson RA, Huvos AG: Primary leiomyosarcoma of bone:
a clinicopathologic, immunohistochemical and ultrastructural study of 33 patients and a literature review. *Am J Surg Pathol*:21:1281-94,1997
- 9-Bertoni F, Inwards CY, Beabout JW: Giant Cell Tumors of Bone with Matrix Production. *Modern Pathology*,13,8A,2000 (Abstract n^o 24)

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA GINECOLÓGICA.

NUEVOS MARCADORES DE RECEPTIVIDAD ENDOMETRIAL

Jaume Ordi
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Clínic. Barcelona

La adecuada preparación de la mucosa endometrial es un factor fundamental para la implantación del concepto ¹. Está bien establecida la existencia tras la ovulación de un periodo bien definido de receptividad uterina o “ventana de implantación”, dentro del cual la implantación del blastocisto resulta exitosa ². En el momento actual, y gracias al estudio con donación de ovocitos parece claro que los límites de la ventana de implantación van desde el día 6 al 10 postovulación (días 20 al 24 del ciclo tipo). Los estudios de experimentación animal sugieren además que la fase de receptividad uterina se sigue siempre de un periodo de no receptividad en el que el medio ambiente uterino resulta hostil para el blastocisto. Por otra parte, parece ser que solo es el embrión de 7 días el que es capaz de implantarse. Por tanto, debe existir una buena sincronía entre el desarrollo embrionario y la aparición de la ventana de implantación para que el embarazo se instaure con éxito ^{3,4}. Como es sabido, la maduración de la mucosa endometrial y, por tanto, el desarrollo de una adecuada fase de receptividad uterina, depende de una adecuada acción de estrógenos y progesterona sobre el endometrio.

Por todos estos motivos resulta lógico que la valoración de la función lútea se considere un requisito indispensable en la valoración de la paciente estéril. El cuerpo lúteo tiene una doble misión fundamental: preparar el endometrio para la implantación y, una vez esta se ha producido, favorecer la evolución del embarazo. Estas acciones son debidas a la producción de progesterona, la cual necesita a su vez de un adecuado estímulo estrogénico previo para poder actuar sobre el endometrio. Por todo ello, y dado que el endometrio es la principal diana de estos estímulos hormonales, desde hace años la biopsia endometrial (BE) se ha considerado como el “gold standard” para valorar la función lútea ⁵.

La BE se valora clásicamente siguiendo los criterios de Noyes ⁶ que permiten establecer, mediante la valoración de datos de microscopía óptica, un datado del endometrio con un error de ± 1 día, el cual se compara con el día cronológico del ciclo que se establece, bien de acuerdo con el primer día de la regla siguiente (que se considera como día 28 del ciclo), o bien atendiendo a la ovulación (día 14 del ciclo) valorada mediante alguno de los métodos diagnósticos establecidos (temperatura basal, pico de LH, ecografía). Cuando el datado histológico muestra un retraso mayor de 2 o 3 días (según los diferentes autores) con respecto al datado cronológico, se considera que el endometrio está “fuera de fase” y se supone que no es adecuado para la implantación, considerándose sinónimo de fase lútea deficiente. Es interesante el hecho de que Noyes, en su artículo original de 1950, demostró únicamente que el datado histológico y el datado cronológico coinciden en ± 1 día en aproximadamente el 80% de los ciclos, pero nunca pretendió discriminar entre fase lútea adecuada y deficiente. Sus criterios, sin embargo, han sido ampliamente aplicados al estudio de la fase lútea, sobre la base de que el endometrio, como órgano diana, debería reflejar fielmente la acción hormonal del ovario, especialmente en fase premenstrual inmediata, cuando ha recibido todo el influjo de la progesterona. Por ello, se ha venido practicando la BE de forma rutinaria entre los días 24 a 27 del ciclo tipo, es decir, pasada la fase de receptividad uterina ^{6,7}. La BE en fase lútea media se ha considerado un mal predictor de la calidad de la fase lútea. Sin embargo, muchas pacientes estériles con biopsia premenstrual normal presentan un retardo madurativo evidente en la fase lútea media, cuando la implantación del blastocisto se debería producir ⁸.

En los últimos años diferentes estudios han puesto en duda la utilidad de la biopsia endometrial valorada mediante los criterios histológicos ópticos clásicos como método de valoración de la función lútea y de la receptividad endometrial. Así, el 85-100% de las mujeres con BE deficiente presentan niveles plasmáticos de progesterona normales ⁷. Los resultados de la BE no guardan relación con la fertilidad de la mujer, de manera que la incidencia de defectos lúteicos diagnosticados por BE es la misma en mujeres estériles que en mujeres con hijos, y el tratamiento del defecto lúteico en pacientes estériles no influye sobre la consecución del embarazo ni sobre su evolución (a término o aborto), comparado con los controles no tratados ^{6,7}. Por último, existe una notable variabilidad inter e intraobservador en la valoración de dichas biopsias, con numerosas implicaciones en el diagnóstico ⁹.

A pesar de estas notables limitaciones de la biopsia endometrial, parece claro el importante papel de una adecuada preparación de la mucosa endometrial para la implantación del concepto y la relación de esta maduración con los estímulos hormonales. Por todo ello, en los últimos años se han buscado nuevos marcadores que permitan establecer la potencial receptividad del endometrio para la anidación del blastocisto¹. Entre los posibles marcadores de receptividad endometrial más esperanzadores se encuentran las moléculas de adhesión (esencialmente las integrinas) y los pinópodos.

Las integrinas son moléculas ampliamente distribuidas en las diferentes células. Tienen una localización transmembranosa y actúan principalmente como receptores de adhesión. Su estructura es heterodimérica, conformada por dos subunidades α y β , de cada una de las cuales existen varios subtipos que combinándose entre sí forman las diferentes moléculas completas. Estas diferentes integrinas presentan una distribución tisular particular y funciones específicas. Además de actuar en los mecanismos de adhesión célula-célula, estas moléculas participan en los procesos de interacción celular, crecimiento y migración, por lo que es probable que desempeñen un importante papel en la interacción entre la mucosa endometrial y el embrión. Algunas de estas integrinas se expresan de modo peculiar en las distintas fases del ciclo endometrial, respondiendo probablemente a influjos hormonales. Así, mientras algunas integrinas parecen expresarse principalmente en la fase proliferativa, otras aparecen de forma exclusiva en la fase secretora. Algunos autores han propuesto incluso que algunas de estas integrinas, en particular las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$ y $\beta 3$, se expresarían de forma específica y exclusiva durante la ventana de implantación¹⁰⁻¹⁵, y estarían alteradas en diferentes defectos implantatorios endometriales como los defectos de fase lútea, la endometriosis y en las mujeres con hidrosalpinx. No obstante, en estudios efectuados por nuestro grupo hemos evidenciado que aunque la expresión de dichas integrinas, en particular de la $\alpha\beta 3$, está claramente relacionada con la maduración endometrial, ya que aparece hacia el día 6 post-ovulatorio, no existe relación entre su expresión o no, con la fertilidad ni con la endometriosis^{16,17}.

Por otro lado, diferentes estudios realizados con microscopía electrónica de barrido han revelado la existencia de cambios cíclicos muy bien definidos en la superficie luminal del endometrio. Así, la aparición en las células epiteliales del endometrio de unas peculiares prolongaciones apicales denominadas pinópodos, caracteriza un breve periodo de la fase secretora media. Aunque bien descritos desde el punto de vista morfológico, se desconoce su función exacta y los mecanismos biológicos responsables de su aparición. Tanto en estudios experimentales realizados en ratas o conejos, como en estudios realizados en mujeres en programas de fecundación *in vitro*, se ha evidenciado que dichos pinópodos aparecen y desaparecen fugazmente, pudiendo delimitar quizás el periodo de máxima receptividad endometrial¹⁸⁻²². Estudios de nuestro grupo, en curso en la actualidad, parecen indicar que tampoco existen diferencias en cuanto a este marcador ultraestructural entre las mujeres fértiles y las pacientes con diferentes tipos de esterilidad.

Existen además varias moléculas expresadas por el endometrio de forma mas o menos selectiva en la fase secretora y que se han querido relacionar con los defectos de receptividad, entre las que cabe destacar MUC-1, LIF (*leukemia inhibitory factor*) o EGF (*epidermal growth factor*)²²⁻²⁴, aunque tampoco está claro que permitan identificar a mujeres con defectos de implantación. Por último, se ha demostrado que en la mucosa endometrial tienen lugar una serie cambios en las poblaciones linfocitarias, en particular de las células NK (*natural killer*)²⁵, y en las respuestas inmunes, con un predominio de las respuestas de tipo humoral sobre las respuestas celulares^{26,27}, que han sido relacionadas por algunos autores con algunos defectos de implantación.

En conclusión, la morfología óptica de la mucosa endometrial, parece no aportar datos clínicamente útiles en el estudio de la esterilidad. En los últimos años hemos ampliado notablemente nuestros conocimientos sobre los mecanismos implicados en la implantación embrionaria. Aunque hasta el momento no existen marcadores que nos permitan identificar de forma clara a las mujeres con defectos de implantación, la mayor comprensión de dichos fenómenos puede mejorar en un futuro próximo nuestra aproximación al diagnóstico y tratamiento de la pareja estéril.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation. *Hum Reprod* 1995; 10 (suppl.2):1-13
2. Psychoyos A. The implantation window: basic and clinical aspects. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10:6
3. Bergh PA, Navot D. The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil Steril* 1992; 58: 537-42.
4. Blasco L. Dyssynchrony in the maturation of endometrial glands and stroma. *Fertil Steril* 1994; 61:596-7.
5. Balasch J, Creus M, Márquez M, et al. The significance of luteal phase deficiency on fertility: a diagnostic and therapeutic approach. *Hum Reprod* 1986; 1:145-147.

6. Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1950;1:3-25
7. Balasch J, Vanrell JA. Corpus luteum insufficiency and fertility: a matter of controversy. *Hum Reprod* 1987; 2:557-67.
8. Balasch J, Fábregues F, Creus M, Vanrell JA. The usefulness of endometrial biopsy for luteal phase evaluation in infertility. *Hum Reprod* 1992; 7:973-7.
9. Castillo M, Ordi J, Balasch J, et al. Timing of endometrial biopsy and inter and intra-observer variability in luteal phase defects. *Virchows Archiv* 1999; 435: 228A.
10. Castelbaum AJ, Wheeler J, Coutifaris CB, et al. Timing of endometrial biopsy may be critical for the accurate diagnosis of luteal phase deficiency. *Fertil Steril* 1994; 61:443-7.
11. Burrows TD, King A, Smith SK, Loke YW. Human trophoblast adhesion to matrix proteins: inhibition and signal transduction. *Hum Reprod* 1995; 10, 2489-500.
12. Klentzeris LD, Bulmer JN, Trejdosiewicz LK, et al. Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 1993; 8, 1223-30.
13. Lessey BA The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* 1994; 61, 812-814.
14. Sueoka K, Shiokawa S, Miyazaki T, et al Integrins and reproductive physiology: expression and modulation in fertilization, embryogenesis, and implantation. *Fertil Steril* 1997; 67:799-811
15. Lessey BA, Castelbaum AJ, Wolf L, et al. Use of integrins to date the endometrium. *Fertil Steril*. 2000;73:779-87.
16. Creus M, Balasch J, Ordi J, et al. Integrin expression in normal and out-of-phase endometrium. *Hum Reprod*. 1998; 13:3460-8.
17. Fabregues F, Balasch J, Ordi J, et al. $\alpha\beta 3$ integrin expression in the endometrium of infertility patients. A study of 100 cases. *Hum Reprod* 2000; 15:209-10 (A)
18. Psychoyos A, Nikas G. Uterine pinopodes as markers of uterine receptivity. *Assist Reprod Rev* 1994; 4:26-32.
19. Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 816:129-42.
20. Kolb B, Paulson RJ. The luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation and the possible impact of this hyperstimulation on embryo implantation. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176:1262-9.
21. Beier HM, Beier-Hellwig K. Molecular and cellular aspects of endometrial receptivity. *Hum Reprod* 1998; 4:448-58.
22. Acosta AA, Elberger L, Borghi M, et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril*. 2000;73:788-98.
23. Aplin JD. MUC-1 glycosylation in endometrium: possible roles of the apical glycocalyx at implantation. *Hum Reprod*. 1999;14 Suppl 2:17-25.
24. Lessey BA. The role of the endometrium during embryo implantation. *Hum Reprod* 2000 (suppl 6):39-50.
25. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update* 2000; 6:28-36
26. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 38:418-22
27. Vives A, Balasch J, Yagüe J, et al. Type-1 and type-2 cytokines in human decidual tissue and trophoblasts from normal and abnormal pregnancies detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) *Am J Reprod Immunol* 1999; 42:361-8

VALOR PREDICTIVO PRONÓSTICO DE LA APOPTOSIS Y FACTORES BIOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN LAS NEOPLASIAS OVÁRICAS DE TIPO EPITELIAL.

Angel García. Hospital Valle de Hebrón. Barcelona

El carcinoma de ovario primario representa el tumor ginecológico más letal, siendo su mortalidad prácticamente similar a la de todos los tumores ginecológicos juntos; de manera que en Estados Unidos se pro-

ducen 21.000 casos nuevos por año y 14.000 muertes / año por su causa. Su frecuencia parece ir en aumento en los países desarrollados, entre otras causas, por la prolongación de la esperanza de vida de las mujeres, ya que la aparición de este tipo de cáncer suele ser más frecuente en la menopausia. La elevada tasa de mortalidad se debe, fundamentalmente, a que el 70 % de los casos se detecta en un estadio muy avanzado (estadios III ó IV), dado que es un tumor intra abdominal y que crece silenciosamente, no habiendo hasta el momento ningún método diagnóstico que pueda ser usado como "screening" para detectar las pacientes en estadios tempranos. Las pacientes diagnosticadas en estadios I y II presentan una supervivencia a los 5 años superior al 70 % frente al 12 % de los casos avanzados, siendo la tasa de supervivencia global de 25-30 %. El coste de la realización de pruebas de cribaje en el total de la población resultaría de proporciones incalculables. Por lo general se usan los procedimientos diagnósticos si hay síntomas que los hagan necesarios o si la paciente presenta factores de riesgo importantes como son la ecografía, doppler, detección del Ca 125, u otros marcadores, exploraciones radiológicas, etc. Sin embargo, debe existir una confirmación histológica.

Uno de los mejores avances para el manejo de las pacientes con patología ovárica oncológica, es el estudio de la pieza quirúrgica para el conocimiento del pronóstico de la paciente y precisar si será necesario un tratamiento adicional a la cirugía más o menos agresivo. En 1985 la F.I.G.O. adoptó una clasificación de estadio patológico-quirúrgico, en el que se incluyen parámetros relacionados con el riesgo de recidiva y por tanto con el pronóstico de supervivencia, tales como rotura de la cápsula ovárica, presencia de tumor en la superficie ovárica, células malignas en el líquido ascítico, extensión y/o implantes en útero, trompas, u otros tejidos pélvicos además de las metástasis regionales o a distancia.

A pesar de la importancia del estadio en la evolución y pronóstico de las pacientes, la investigación básica sobre el carcinoma de ovario nos ha permitido utilizar otros hallazgos morfológicos que han demostrado ser muy válidos en la evaluación de la agresividad y comportamiento de estos tumores. Entre éstos se encuentran el tipo y el grado histológico, invasión de los espacio linfo-vasculares, atipia celular, índice mitótico, grado de necrosis, reacción inflamatoria y los caracteres del tejido ovárico no tumoral. Por otro lado, en los últimos años el avance de la biología molecular ha dado algunos frutos para el entendimiento de los acontecimientos dirigidos a la génesis y la biología del cáncer de ovario con el objeto de encontrar algunos marcadores que nos aproximen al diagnóstico precoz.

En cuanto a los diferentes tipos histológicos se caracterizan por poseer diferentes alteraciones moleculares:

Ca serosos: Síndrome familiar de Carcinoma ovario-mama \Rightarrow Mutaciones en BRCA1 y 2. Esporádicos \Rightarrow LOH en la región que incluye el BRCA 1 en Cr17.

Ca mucinosos: Mutaciones en K-ras.

Ca Endometrioides: Mutación en PTEN y β catenina e inestabilidad de microsatélites.

La investigación para luchar contra el cáncer de ovario se está centrando en el entendimiento del mecanismo exacto de la transformación maligna, estudiando la biología de estos tumores, con el fin de proporcionar métodos de diagnóstico precoz eficaces, así como objetivos para nuevas estrategias terapéuticas. Hasta ahora los trabajos se han centralizado en la proliferación celular del crecimiento tumoral, demostrándose ciertas alteraciones en el contenido del ADN, la sobreexpresión de ciertos oncogenes, la alteración en la función de los genes de supresión tumoral o la adquisición de resistencias a la quimioterapia, que harían que la célula se comporte biológicamente en un amplio espectro de posibilidades yendo desde la benignidad a la más alta malignidad. Por otra parte, también se sabe que el crecimiento tisular depende, no sólo de la proliferación celular, sino también de la falta de muerte celular programada. La apoptosis es por tanto un factor importante en la regulación de la densidad de la población celular normal, y pudiendo ser un mecanismo de supresión de células anormales que han sido lesionadas por toxinas, radiación y otros estímulos, por lo que su inhibición permitiría la permanencia de las células mutadas en el tejido siendo determinante para el crecimiento del tumor.

Apoptosis

La apoptosis es un proceso de vital importancia en la homeostasis tisular que está involucrada en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, entre los que destacaría el cáncer. En cuanto a la cinética celular tumoral se ha basado durante mucho tiempo en los índices de proliferación, sin embargo, los modelos experimentales sugieren que el crecimiento tumoral está determinado por, tres factores principales:

a) la duración del ciclo celular; b) el porcentaje de células proliferantes y c) el porcentaje de pérdida celular. Un punto importante sería la relación entre la proliferación y la apoptosis. En este sentido el índice de renovación (mitosis y apoptosis en 10 campos de gran aumento) parece ser de utilidad en el análisis de los linfomas y en relación con factores pronósticos en algunos tumores sólidos como el carcinoma de próstata.

La apoptosis parece jugar un papel importante en las neoplasias por: 1- la destrucción de células preneoplásicas. 2- estar presente en los tumores ya establecidos, como resultado de procesos intrínsecos de las células tumorales, o por factores externos que tienen lugar en el tejido tumoral. 3- ser necesaria para la respuesta terapéutica. A tal efecto, Stauton mostró que el índice apoptótico en los diferentes tipos de tumores humanos tenía una variabilidad mucho mayor que la mostrada en los estudios experimentales, en la que era relativamente pequeño y se mantenía en un estrecho y constante margen. Ello sugiere que los diferentes tipos de tumores diferirían en su inherente susceptibilidad hacia la apoptosis.

El estudio de la extensión de la apoptosis a los diferentes tumores sería una medida útil para el entendimiento de la cinética de las células tumorales y el comportamiento biológico de las mismas, para entender así el porqué muchos tumores son resistentes a los efectos terapéuticos de la radiación y la quimioterapia.

Con estos datos puede establecerse que los genes que regulan la apoptosis, son tan importantes en la patogénesis molecular y genética de la neoplasia, como lo son los oncogenes y los de supresión tumoral. Entre los más importantes caben destacar a:

El gen bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) se identificó hace más de una década, con el análisis y descubrimiento de la translocación 14;18 (q32,q21), en el cromosoma 18. La aberración cromosómica más común en los linfoma no Hodgkin (30 %), alcanzando el 70-80 % en los linfomas foliculares. Codifica una proteína de 26 KDa que se localiza principalmente en la membrana externa de la mitocondria, aunque también en la nuclear, y en el citosol a nivel del retículo endoplásmico liso. Entre los miembros de la familia de genes bcl-2: Los antiapoptóticos son bcl-2, bcl-x L, bcl-W, Mcl 1, A1, NR-13, BHRF 1, DRF 16, mientras los que promueven la apoptosis son Bax, bcl-x s, Bok y Bak, entre otras. La proteína codificada bcl-2 cuatro dominios (BH1, BH2, BH3 y BH4) y la bax, contienen tres dominios (BH1, BH2 y BH3) homólogos. Los miembros de la familia pro y anti-apoptótica pueden formar homodímeros, y si son diferentes heterodímeros. La apoptosis estaría regulada por el balance entre los miembros anti y pro apoptótico. Si contienen dos proteínas anti-apoptosis o una anti y otra proapoptosis se bloquea la muerte celular al no liberarse el citocromo c.

Las proteínas pro-apoptosis favorecen la formación de poros PTP mitocondriales, alterando así el equilibrio iónico entre la matriz y el espacio intermembrana, que rompe la membrana externa y libera hacia el citosol proteínas activadoras de las caspasas.

El citocromo c, se une aun cofactor denominado Apaf-1 (Apoptotic proteasa activating factor 1) y a la procaspasa -9, formando un complejo denominado apoptosoma, que es el encargado de activar la cascada de las caspasas produciendo la ejecución de la célula.

Para tumores sólidos, en general, la correlación entre la expresión de bcl-2 y un mejor pronóstico, parece ser la regla, con la excepción de los adenocarcinoma de próstata. Las células tumorales que expresen bcl-2 podrían sobrevivir a altas dosis de agentes quimioterápicos, a pesar de tener un daño genético significativo. De hecho se ha demostrado que estas drogas pueden inducir una parada del ciclo celular cuando el bcl-2 está sobreexpresado, por lo que de esta manera el bcl-2 podría convertir una droga citotóxica en citostática.

La proteína p53 induce un incremento de Bax, dando lugar a heterodímeros BAX-BAX. Bax está mutado en neoplasias gastrointestinales y algunas leucemias.

El gen de supresión tumoral p53: fue identificado y descrito, por primera vez, en 1979. En condiciones normales actúa como “guardián del genoma” Esta función es realizada por la proteína p53 normal (“wild type”) que recibe ese nombre por ser una fosfoproteína nuclear de 53 KDa constituida por 393 aminoácidos. Contiene tres dominios. El dominio central es la región por la que se une la proteína como tetrámero, a la secuencias dianas de los genes en el DNA. Esta zona está muy conservada entre las especies y, es donde se encuentran la mayoría de las mutaciones en tumores humanos. La p53 se activa por daño en el DNA,

que paraliza el progreso del ciclo celular, hasta que este daño no es reparado. Una segunda vía se lleva a cabo por la expresión de oncogenes como Ras o Myc, en ausencia de daño de DNA. Se inhibe la degradación de la proteína p53, estabilizándola a altas concentraciones.

Inhibición del ciclo celular: La p53 se une a secuencias específicas del DNA inhibiendo la transcripción de genes reguladores del ciclo celular. Estos ejercen un control negativo paralizando el ciclo celular en G1 y bloqueando la entrada en fase S, que es donde se sintetiza el DNA. Con esta interrupción del ciclo, se permite a los mecanismos reparadores celulares actuar antes de la replicación de ADN.

Apoptosis: Si el daño es extenso e irreparable, entonces, la p53 activa la transcripción del gen bax (NOXA y P53AIP1), como mecanismo de defensa, para proteger la propagación y proliferación de células que han sufrido la mutación. Sin embargo p53 parece tener una función pivote en la carcinogénesis humana, ya que el gen se encuentra mutado en más del 80 % de los tumores.

El mecanismo más frecuente para la inactivación de p53 responde a una sustitución de una base en la secuencia codificante de p53 que, cambia un aminoácido en el dominio central. El resultado de esa mutación es la síntesis de una proteína con cambios en su conformación, una vida media más prolongada y una función alterada.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en inmunohistoquímica, reconocen tanto la proteína “wild type” acumulada ante situaciones de daño genómico, como la proteína mutada que sobreexpresada.

Con estos conocimientos, se ha realizado un estudio con 130 casos de carcinomas de ovario, donde se han valorado tanto los factores clínicos (edad, paridad, antecedentes, tipo de cirugía, radioterapia o quimioterapia); morfológicos (tipo y grado histológico, estadio FIGO, necrosis) índice mitótico e índice apoptótico, (tanto por H/E como por método de TUNEL); inmunohistoquímicos (p53, bcl-2; bax). Por último se ha evaluado la relación entre los factores anteriores y el pronóstico (supervivencia y periodo libre de enfermedad). Con todo ello se han obtenido unos resultados preliminares:

- 1) Tumores de alto grado histológico y estadios avanzados: expresan un alto índice mitótico y de recambio celular (apoptótico); con porcentajes altos de p53 y Bax y bajos para la proteína bcl-2.
- 2) Tumores Borderline. Varían según se trate de serosos o mucinosos. En el primero de los casos expresan p53 y Bax, siendo el bcl-2 moderado o bajo. Los mucinosos suelen expresar más bcl-2 que los serosos. En éstos, la p53 es fácil de valorar mientras que el Bax y bcl-2, que son de expresión citoplasmática, el estudio es más complejo habida cuenta entre otros porque el citoplasma suele estar ocupado por moco,
- 3) Adenocarcinomas serosos: muestran un patrón inmunohistoquímico común, similar al de los tumores indiferenciados y de estadios avanzados, con aumento del índice mitótico y apoptótico y porcentajes altos de p53, Bax y bajos de bcl-2.
- 4) Adenocarcinomas de células claras y endometriodes: presentan un patrón inmunohistoquímico similar. La expresión de p53, a diferencia de los serosos papilares que es uniforme, muestra una distribución heterogénea, mientras que el Bax suele ser positivo de forma homogénea.

Agradezco la valiosa participación del Dr. Javier de la Torre Fernández de Vega, autor máxime del presente estudio de investigación.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Kaye B. Ovarian Cancer, from the laboratory to the clinic: challenges for the future. *Annals of Oncology*. 1996; **7**:9-13
2. Marcheko N, Zaika A, Moll U. Death signal induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000; **275**: 16202-16212
3. Shahin M, Hughes J, Sood A, Buller R. The prognostic significance of p53 tumor suppressor gene alterations in ovarian carcinoma. *Cancer*. 2000; **89**: 2006-2016
4. Adams J, Cory S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*; 1998; **281**: 1322-1326
5. Darnton SJ. p53 *J. Clin. Pathol*. 1998; **51**: 248-253
6. Vogelstein B, Lane D, Levine A. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; **408**: 307-310
7. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *J. Clin. Pathol*. 2000; **53**: 55-63.
8. Lowe S, Lin A. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; **21**: 485-495

PATOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE ENDOMETRIO.

José Palacios Calvo. Programa de Patología Molecular. CNIO. Madrid.

En los últimos años, se ha desarrollado el concepto de que existen, al menos, dos tipos de carcinoma de endometrio (1). El tipo A, relacionado con hiperestronismo, suele ser del tipo histológico endometriode, es normalmente de bajo grado y estadio, con frecuencia se asocia a hiperplasia, presenta positividad para receptores hormonales y su pronóstico suele ser bueno. Por el contrario, el tipo B, no asociado a estimulación estrogénica, suele tener como lesión precursora el denominado carcinoma intraepitelial, no expresa receptores hormonales y su prototipo histológico es el carcinoma seroso. Estos tumores, aun en estadios bajos suelen tener mal pronóstico. Obviamente, este punto de vista puede ser una simplificación, ya que algunos tumores no pueden encuadrarse claramente en estas dos categorías y, además, en algunos casos es probable que durante la progresión tumoral, algunas neoplasias del tipo A, adquieran características propias del B.

El mecanismo molecular implicado en la iniciación de los carcinomas serosos de endometrio parece ser la mutación de p53, que está presente en la mayor parte de las lesiones, incluido el carcinoma intraepitelial. Si embargo, las alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de los carcinomas endometriodes (CE) parecen ser más heterogéneas y estudios recientes han apuntado la participación de diferentes vías: inestabilidad de microsatélites y mutaciones de RAS, PTEN y β -catenina.

Inestabilidad de microsatélites (IM). En mujeres con carcinoma colo-rectal hereditario no asociado a poliposis, el carcinoma de endometrio es el segundo en frecuencia después del de intestino grueso. En este síndrome, el 90% de los pacientes presentan mutaciones germinales de los genes hMSH2 o hMLH1, genes implicados en la reparación del ADN durante la replicación. Como consecuencia, los tumores muestran un fenotipo caracterizado por inestabilidad de microsatélites. Los microsatélites son secuencias repetitivas cortas de ADN que ocurren a lo largo del genoma, tanto en regiones codificantes como no codificantes. Debido a su carácter repetitivo, los microsatélites presentan una susceptibilidad aumentada a las mutaciones durante los procesos de replicación del ADN. En condiciones normales, estas mutaciones son corregidas por una familia de enzimas codificadas por “*DNA mismatch repair genes*”. Aproximadamente el 20% de los carcinomas endometriodes de endometrio tienen mutaciones en múltiples microsatélites atribuibles a inactivación de genes reparadores (2-4). Sin embargo, las mutaciones de hMSH2 o hMLH1 ocurren en menos del 10% de estos tumores. Estudios recientes han demostrado que la inestabilidad de microsatélites en la mayor parte de estos casos (90%) se debe a la inactivación del gen hMLH1 por hipermetilación de su promotor. Este mecanismo está también presente en el 30% de las hiperplasias atípicas de endometrio. En el 50% de estas hiperplasias, la hipermetilación no se acompaña de MI, lo que sugiere que es una alteración molecular muy precoz (5). De hecho, se ha sugerido que la hipermetilación de hMLH1 pudiera ser un evento secundario en un proceso más global de hipermetilación, que afectara a promotores de distintos genes supresores como p14, p16, E-cadherina, etc. Se ha sugerido que la progresión de tumores con IM depende de la mutación de microsatélites incluidos en secuencias codificantes de diferentes genes que participan en procesos relacionados con cáncer, tales como apoptosis, diferenciación, adhesión o reparación del ADN. Algunos de los genes dianas mutados en carcinomas de endometrio con MI son: BAX (17-45%), TGF β -RII (0-24%), IGFRII (12-22%), MSH3 (13-25%) y MSH6 (0-26%). (6-7)

Mutaciones de RAS. La familia RAS está formada por tres genes muy relacionados: H-RAS, K-RAS y N-RAS. Las proteínas p21 codificadas por estos genes se localizan en la porción interna de la membrana celular, tiene actividad GTPasa y participan en la transducción de señales en la célula normal. Las mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61 de estos genes conlleva la pérdida de la actividad GTPasa de p21 y su activación. Las mutaciones observadas en cáncer de endometrio afectan fundamentalmente a los codones 12 y 13 de K-RAS, aunque se han descrito ocasionalmente mutaciones en N-RAS y el codón 61 de K-RAS. Las mutaciones de K-Ras ocurren en el 10-30% de los CE y en menos del 5% de los carcinomas serosos (8-10). En España. Lagarda et al. (2001) observan una frecuencia del 23% en una serie de 46 carcinomas endometriodes (11), similar al porcentaje (20%) encontrado en nuestra serie de 50 carcinomas endometriodes. No existe una clara correlación entre las mutaciones de K-RAS y otras características clinicopatológicas, a excepción del tipo histológico. Si bien algunos autores las consideran más propias de tumores de bajo grado asociados a hiperplasia, en otras series se observa correlación con un mal pronóstico en mujeres postmenopáusicas (12). No obstante, está claro que las mutaciones de K-RAS son una alteración precoz en el carcinoma de endometrio, ya que se detectan incluso en hiperplasias (8). En lo que se refiere a su asociación con otras alteraciones moleculares, Lagarda et al (2001) han comunicado una mayor incidencia de mutaciones de K-RAS en carcinomas endometriodes con MI (11), asociación que no se ha observado en otras series (10,13). En la serie de Lagarda, además, se encontró que el tipo de mutación difería entre los casos con y sin MI, predominando las transiciones en el primer grupo, frente a las transversiones en el segundo.

Mutaciones en PTEN/MMAC1. El gen supresor de tumores PTEN/MMAC1 (*phosphatase, tensin homologue/mutated in multiple advanced cancers*) se localiza en la región cromosómica 10q23 y se encuentra inactivado en diversos tipos de tumores, como el endometrio, SNC, mama, riñón y próstata. Además, las mutaciones germinales en el gen PTEN/MMAC1 están relacionadas con la enfermedad de Cowden y el síndrome Bannayan-Zonana (14). Diferentes estudios han demostrado que el gen PTEN/MMAC1 es el más frecuentemente mutado en carcinomas endometrioides de endometrio, oscilando entre el 33%-85% (14-16). Las mutaciones de PTEN/MMAC1 ocurren sólo en el 5% de los carcinomas no endometrioides (15). En CE, las mutaciones de PTEN son más comunes en estadios precoces (55% en estadio Ia frente a 19% en estadios III/IV) (15). El papel de la inactivación de PTEN/MMAC1 en la iniciación del CE de endometrio se pone de manifiesto también porque el 22-55% de las hiperplasias tienen mutaciones (16). Las mutaciones de PTEN/MMAC1 no sólo se asocian a CE en estadios precoces, sino también a tumores sin metástasis y con mejor supervivencia. Incluso en pacientes con estadios avanzados (estadios III/IV), los casos con mutaciones PTEN/MMAC1 tienen mejor pronóstico (17). En pacientes con CE en estadio avanzado (III/IV) el porcentaje de mutaciones en PTEN/MMAC1 difieren significativamente entre mujeres de origen caucásico y africano, siendo del 26% en el primer grupo y del 8% en el segundo (17).

Una característica interesante de las mutaciones de PTEN/MMAC1 en carcinomas de endometrio es la alta proporción de mutaciones tipo *frameshift* (60%), si se comparan con otros tipos tumorales como el glioblastoma (37%). La mayoría de estas mutaciones son inserciones o deleciones de 1-4 pb y se localizan predominantemente en la región N-terminal del gen o en los exones 7 y 8. En estos exones, afectan a secuencias (A)₆ entre los codones 256-257 y 321-323 respectivamente (14). Este tipo de mutaciones ocurre predominantemente en tumores con MI, grupo en el que las mutaciones de PTEN son especialmente frecuentes (18). Por el contrario, el 77% de las mutaciones *missense* se localizan en el exón 5 y el 45% de las *nonsense* en el exón 7 (14).

Mutaciones de β-Catenina β-Catenina es una molécula implicada en adhesión celular, que forma parte de los complejos cadherina-catenina. Si embargo, estudios en desarrollo embrionario han demostrado que también participa en señalización celular en la vía Wnt/APC/β-catenina/Tcf. En 1997 se describió por primera vez que β-catenina podía ser considerada una oncoproteína, ya que mutaciones heterocigotas en su gen tenían un efecto similar a la inactivación de APC en el desarrollo del carcinoma de colon (19). Las mutaciones de β-catenina ocurren en diversas neoplasias humanas con una frecuencia que varía según los tipos tumorales, por ejemplo, en cáncer de colon ocurren en el 10% de los casos, mientras que en los pilomatrixomas llegan a producirse en el 75% de los tumores. Las mutaciones ocurren normalmente en el exón 3 y afectan a los aminoácidos implicados en la fosforilación por GSK-3 (necesaria para la degradación de la proteína) que son las serinas localizadas en las posiciones 33, 37 y 45 y la treonina 45. Mutaciones que afecten a aminoácidos adyacentes, en especial en la posición 32 y 34, son también importantes ya que producen cambios conformacionales de la proteína que impiden la fosforilación de los aminoácidos diana. Las mutaciones de β-catenina producen un exceso de proteína citoplasmática y nuclear que se puede poner de manifiesto inmunohistoquímicamente (20).

En carcinomas de endometrio, las mutaciones de β-catenina afectan al 13-44% de los casos y son características de los tumores endometrioides (21-23). Se han descrito ocasionalmente en hiperplasias atípicas (23). En carcinomas de ovario, las mutaciones de β-catenina son muy específicas de los carcinomas endometrioides y ocurren en el 30-40% de los tumores de este tipo histológico (20). Sin embargo, no han sido descritas en carcinomas serosos ni mucosos. Un hecho de interés es que todos los carcinomas de colon con mutaciones en β-catenina tienen además inestabilidad de microsatélites (MI). Sin embargo, esta asociación no ocurre en carcinomas de ovario ni de endometrio (23); así entre los 50 casos analizados en nuestra serie, 8 presentaban mutaciones de β-catenina, pero sólo uno mostraba además MI. Las mutaciones de este oncogén parecen estar asociadas más comúnmente a carcinomas en estadios precoces (21).

Mutaciones de p53. Las mutaciones de p53 ocurren en el 53%-90% de los carcinomas serosos de endometrio (24,25) y son alteraciones precoces detectadas en el 70% de los carcinomas intraepiteliales (24). Por el contrario, se detectan sólo en el 10-20% de los CE y ocurren más frecuentemente en tumores de alto grado y estadio, siendo excepcionales en las hiperplasias. Existe una concordancia del 80% entre sobreexpresión inmunohistoquímica y mutación (26).

Bibliografía

- 1.- Lax SF, Kurman RJ. A dualistic model for endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Verh Dtsch Ges Path* 1997; 81:228-232
- 2.- Risinger JI, Berchuck A, Kholer MF, Watson P, Lynch NT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1993, 53:5100-5103
- 3.- Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajuer SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol* 1996, 148:1671-1678
- 4.- Catasús L, Machín P, Matías-Guiu X, Prat J. Microsatellite instability in endometrial carcinoma: clinicopathological correlations in a series of 42 cases. *Hum Pathol* 1998, 29:1160-1164:193-199

- 5.- Esteller, Catasús L, Matías-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG: hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999, 155:1767-1772
- 6.- Duval A, Iacopetta B, Ranzani GN, Lothe RA, Thomas G and Hamelin R. Variable mutation frequencies in coding repeats of TCF-4 and other target genes in colon, gastric and endometrial carcinoma showing microsatellite instability. *Oncogene* 1999; 18:6806-6809.
- 7.- Catasús LI, Matías-Guiu X, Machin P, Zannoni GF, Scambia, Pannici PB, Prat J. Frameshift mutations at coding mononucleotide repeat microsatellites in endometrial carcinomas with microsatellites instability. *Cancer* 2000; 88:2290-2997
- 8.- Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Rice J, Nakajima R, Tanizawa O, Nomura T. Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c-K-ras-2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Cancer Res* 1993; 53:1883-1888
- 9.- Carduff R, Johnston CM, Frank TS. Mutations of the Ki-ras oncogene in carcinoma of the endometrium. *Am J Pathol* 1995; 146:182-188
- 10.- Lax S, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in endometrioid and serous carcinoma. Evidence of distinct molecular genetic pathways. *Cancer* 2000, 88:814-824
- 11.- Lagarda H, Catasús LI, Argüelles R, Matías-Guiu X, Prat J. K-ras mutations in endometrial carcinomas with microsatellite instability. *J Pathol* 2001; 193-199
- 12.- Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg SG, Garret CT. K-ras point mutation in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecol Oncol* 1996; 63:238-246
- 13.- Swisher EM, Peiffer-Schneider S, Mutch DG, et al. Differences patterns of TP53 and KRAS2 mutations in a large series of endometrial carcinomas with or without microsatellite instability. *Cancer* 1999; 85:119-126
- 14.- Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1922-1932.
- 15.- Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barret JC, Berchuck. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathological characteristics. *Clin Cancer Res* 1998; 4:3005-3010
- 16.- Mutter GL, Lin M, Fitzgerald JT, et al. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:924-931.
- 17.- Maxwell GL, Risinger JI, Hayes KA, Álvarez AA, Barret JC, Berchuck. Racial disparity in the frequency of PTEN mutations, but not microsatellite instability, in advanced endometrial cancers. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2999-3005
- 18.- Bussaglia E, del Rio E, Matías-Guiu X, Prat J. PTEN mutations in endometrial carcinomas. A molecular and clinicopathological analysis of 38 cases. *Hum Pathol* 2000; 31:312-317.
- 19.- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW: Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997, 275: 1787-1790
- 20.- Palacios, Gamallo C: Mutations in the β -catenin gene (CTNNB1) in endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 1998, 58: 1344-1347
- 21.- Fukuchi T, Sakamoto M, Tsuda H, Maruyama K, Nozawa S, Hiroashi S: β -catenin mutations in carcinoma of the uterine endometrium. *Cancer Res* 1998, 58:3526-3528
- 22.- Shollossahuer PW, Pirog EC, Levine RL, Hedrick L. Mutational analysis of CTNNB1 and APC genes in uterine endometrioid carcinomas. *Mod Pathol* 2000; 13:1066-1071.
- 23.- Mirabelli-Primdahl L, Gryfe R, Kim H, Millar A, Luceri D, Dale D, Holowaty E, Bapap B, Gallinger S, Redston. β -catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res* 1999, 59:3346-3351
- 24.- Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. P53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150:177-185
- 25.- Kovalec S, Marchenko ND, Gugliotta BG, Chalas E, Chumas J, Mol UM. Loss of p53 function in uterine papillary serous carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29:613-619
- 26.- Soong R, Robbins, PD, Dix BR, et al. Concordance between p53 protein overexpression and gene mutations in a large series of common human carcinomas. *Hum Pathol* 1996; 27:1050-1055

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA UROLÓGICA.

TRASLACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN BÁSICA A LA PRÁCTICA MÉDICA

F. Algaba. Fundació Puigvert- Universitat Autònoma de Barcelona

Al igual que en otros conocimientos humanos, que han evolucionado de lo próximo al observador a lo alejado a él, el desarrollo de la anatomía patológica ha discurrido por el mismo camino, y así desde su nacimiento (históricamente ligado a Morgagni-siglo XVII), hasta nuestros días no se ha cesado de ahondar en estructuras morfológicas cada vez más pequeñas (alejadas de la observación directa), pasando desde los estudios necrópsicos, a los celulares, gracias a los cambios conceptuales inducidos por los avances técnicos.

Fue tan enorme el progreso que significó la introducción de la teoría celular en la anatomía patológica, que condicionó su progreso más allá que lo que lo hicieron otras disciplinas médicas en aquel momento, por lo que se explica que se pasara por un periodo de relevancia tal que muchos anatómo-patólogos consideraron que eran los *poseedores del fundamento científico de la Patología*. Esta situación explica que ciertos profesionales minimizaran las aportaciones bioquímicas y genéticas que se empezaron a hacer en los años cincuenta, y que se acomodaran a lo preestablecido, lo que comportó en la década de los ochenta la crítica del médico que desarrollaba su actividad frente al enfermo, echándole en cara que había nuevos métodos, supuestamente más precisos y reproducibles, que no se definían suficientemente criterios estrictos (tanto diagnósticos como pronósticos), y que la *experiencia* debía ser sustituida por el *aprendizaje de las nuevas técnicas*.

Como es natural ambas partes tenían razones, y equívocos.

Por un lado, por muchos avances que haya, hoy por hoy, ninguno de ellos sustituye a las técnicas anatomopatológicas previas (incluidas las que describiera Morgagni), sino que se complementan y mejoran, sino ¿cómo se podría llegar a conocer la auténtica función y consecuencias del más recóndito gen, si no se supiera localizar (macro-microscópicamente) el exacto origen y estado patológico del que procede el tejido estudiado?, eliminando elementos de distorsión tales como el tejido normal adyacente, el estroma del tumor, las lesiones que parecen cánceres y no lo son...

Por otra parte ¿cómo se podrían entender las actuales concepciones patológicas, sin las aportaciones hechas por la microscopía electrónica y la citogenética (de los años 60), la inmunohistoquímica (introducida en los setenta), y los resultados de las hibridaciones “in situ” iniciadas en los años ochenta.

Esta compleja situación ha llevado a una progresiva incorporación de ciertas técnicas, y a la definición de las *subespecialidades*, para poder incorporar lo más rápidamente posible los avances de las especialidades médicas. La subespecialización dentro de la anatomía patológica aporta beneficios, el más importante es la estrecha comunicación con los clínicos, y desventajas, como el costo, una cierta criptografía del léxico, y la vulnerabilidad a las influencias de los clínicos; y a su vez parece como si se alejara del patólogo general.

Independientemente de todas estas consideraciones, lo que sí que es irreversible es la progresiva incorporación de nuevas técnicas biológicas en la Medicina, lo que está acuñando la denominación de *Biomedicina*, y así en los noventa se han introducido las técnicas de *PCR* y de *FISH*, y en la década actual se está vislumbrando la introducción de las técnicas de *análisis secuencial de la expresión genética del reordenación del ADN (biochips)*. Frente a esta circunstancia es necesario que el médico en contacto con el enfermo tenga una información veraz y realista, exenta de las manipulaciones de grupos de interés, que a veces presentan ciertos logros como “*verdades fundamentales*” “*marcadores esenciales*” o “*métodos totalmente objetivos*”, y este papel puede ser desarrollado en parte por el patólogo.

El patólogo, por la misma naturaleza de su especialidad, tiene una serie de conocimientos que le permiten ejercer de puente entre la investigación básica y la aplicación clínica de sus resultados, en ambas direcciones, ya que puede trasladar los hallazgos de la biología “*traduciéndolos*” e incorporándolos a la morfología clásica (*Morfobiología*), y a su vez ayudar al biólogo a definir las series de pacientes en los que buscar las acciones de los genes y sus productos; con lo que se podrán definir mejor los test más útiles, el desarrollar los paneles de marcadores que controlen vías de acción sobre las células, determinar las áreas de microdissección, elaborar conjuntamente bancos de tejido para ulteriores comparaciones, en dos palabras: conseguir *colaboración* y *sistematización* en los estudios; y todo ello limará diferencias, evitará actitudes generacionales y de arrogancia por todas las partes.

Bibliografía

Jones D, Fletcher CDM.

How shall we apply the new biology to diagnostics in surgical pathology?

J.Pathol. 1999, 187: 147-154.

Kononen J, Budendorf L, Kallioniemi SA, y cols.
Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.
Nat. Med. 1998, 4: 844-847.

CLASIFICACIÓN ACTUAL DE LOS TUMORES EPITELIALES RENALES: BASES MORFOBIOLÓGICAS

J. Fernando Val Bernal

Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander

En los pasados 15 años se han producido considerables avances en la comprensión de las anomalías genéticas que conducen al desarrollo de los tumores renales. Los estudios han mostrado una gran correlación entre la apariencia histológica y las alteraciones genéticas de estos tumores. Estos estudios han desembocado en la formulación de una nueva clasificación patológica que se basa en los cambios genéticos de las células tumorales, pero que puede ser implementada por el uso de los métodos anatomopatológicos convencionales. Esto quiere decir que en la gran mayoría de los casos el diagnóstico certero puede alcanzarse por el uso de los métodos habituales disponibles en los laboratorios convencionales de anatomía patológica, sin necesidad de usar técnicas sofisticadas de patología molecular.

Las clasificaciones de Heidelberg en 1996 (1) y de Rochester en 1997 (2) dividen los tumores renales epiteliales en benignos y malignos, con subdivisiones patológicas dentro de cada una de estas categorías (Tabla 1).

Adenoma papilar

En la clasificación de consenso el adenoma renal se reconoce y se define con los siguientes criterios:

1. Arquitectura papilar, tubular, o tubulopapilar
2. Diámetro igual o menor de 5 mm.
3. Ausencia de parecido histológico con los carcinoma de células claras, de células cromóforas, o de los conductos colectores.

Inmunohistoquímicamente las células son EMA+, CK de BPM+, CK de APM+, CK7+ y vimentina + ó -.

Citogenéticamente se define por las alteraciones limitadas a +7, +17, y -Y.

La frecuencia de este tumor se incrementa con la edad y se encuentra aproximadamente en el 40% de la población por encima de los 65 años. Los adenomas papilares son más frecuentes en pacientes hemodializados por largo tiempo, en riñones con angioesclerosis y en fumadores. La mayoría son solitarios, pero ocasionalmente son múltiples y bilaterales. Cuando muestran un cuadro miliar se habla de adenomatosis renal.

Adenoma metanéfrico

Se compone de pequeños túbulos densamente agrupados en una matriz laxa. Las células son cuboides con escaso citoplasma. El pleomorfismo celular es mínimo y las mitosis escasas. Existen ocasionales áreas papilares con papilas cortas provistas de un estroma fibrovascular. Inmunohistoquímicamente las células epiteliales son CK7+. Sus caracteres citogenéticos son similares a los del adenoma papilar.

Adenofibroma metanéfrico

Es un tumor compuesto por nódulos de epitelio tumoral idénticos a los del adenoma metanéfrico incluidos en un crecimiento difuso de células fusiformes de densidad celular moderada. Pueden existir cambios mixoides y áreas hialinas. No contiene blastema.

Oncocitoma

Es el tumor renal benigno más frecuente en patología quirúrgica. Se reconoce por estar bien circunscrito, de color caoba, con una cicatriz estrellada central. Se compone de nidos, masas o túbulos de células cuboides de citoplasma intensamente granular y eosinófilo. El pleomorfismo nuclear es mínimo. Sin embargo en las zonas isquémicas en la vecindad de la cicatriz central las células pueden mostrar pleomorfismo. No presenta mitosis. Generalmente es un tumor solitario. En los casos múltiples se habla de oncocitomatosis. Con el microscopio electrónico se demuestra que las células están cargadas de mitocondrias, que son las responsables de la granularidad del citoplasma.

Las células tumorales son vimentina - .

Genéticamente los oncocitomas presentan pérdida de los cromosomas Y y 1. Unos pocos contienen una traslocación que afecta el cromosoma 11. Algunos han sugerido que la mutación en el ADN mitocondrial conduce a la proliferación de mitocondrias y de células, pero no se ha comprobado.

Carcinoma de células renales (CCR) de tipo convencional o de células claras.

Es el carcinoma renal más frecuente. Representa más del 70% de los casos en la mayoría de las series. Su aspecto macroscópico es característico: bien circunscrito con pseudocápsula fibrosa, blando, amarillento, con zonas de necrosis, de hemorragia y de fibrosis. El tumor puede estar compuesto solamente de células claras, de una mezcla de células claras con células granulares, o raramente casi exclusivamente de células granulares. Las células son cuboides agrupadas en el seno de una rica arquitectura vascular sinusoidal. En las formas de alto grado el patrón citológico y vascular se pierde. Frecuentemente se observan algunos quistes macroscópicos o microscópicos que reflejan un proceso degenerativo del tumor. La clasificación en grados nucleares de Fuhrman es únicamente aplicable a este tipo tumoral.

Inmunohistoquímicamente las células tumorales son vimentina+, CK de BPM+, y EMA+. Un dato que ayuda a separar este tumor del carcinoma de células renales papilar es la reacción negativa a la CK7.

Aproximadamente el 95% de los carcinomas de células renales convencionales muestran pérdida del brazo corto del cromosoma 3. Esta pérdida se acompaña de la mutación somática o de la pérdida de función del gen VHL (por hipermetilación y suspensión de la transcripción). El gen se localiza en 3p25. Otro gen localizado en el brazo corto del cromosoma 3 (en 3p14) es el gen de la triada frágil de histidina (FHIT) Este ha sido involucrado en el carcinoma convencional familiar y en la progresión del esporádico.

CCR papilar (cromófilo)

Se observa en el 10-15% de las series de nefrectomía radical. Es mucho más común en varones. Es un tumor bien circunscrito, globular, de color pardo. Frecuentemente muestra hemorragia y necrosis prominentes y la superficie de corte es friable o granular. Para su diagnóstico es preciso que al menos el 70% del tumor tenga estructura papilar o túbulopapilar. Existen variantes con papilas colapsadas o con estructuras “sólidas”. Las células de las papilas o los túbulos son cuboidales (tipo 1) o columnares (tipo2). Los tumores compuestos por células de tipo 2 se presentan en estadio más avanzado, son de mayor grado nuclear y tienen peor pronóstico que los compuestos por células de tipo 1 (3). Predominan los casos de bajo grado nuclear (tipo 1). El CCR papilar frecuentemente presenta abundantes macrófagos espumosos, cuerpos de psammoma, hemorragias recientes y antiguas con hemosiderina, y necrosis con cristales de colesterol. En el córtex pueden observarse adenomas papilares asociados. El CCR papilar es el tipo de tumor renal más comúnmente asociado con enfermedad quística renal adquirida en relación con hemodiálisis.

Este tumor es EMA+, CK de BPM+, CK de APM+, CK7+ y vimentina + ó -.

Genéticamente se asocia con trisomías de cromosomas 7, y 17 y pérdida de Y. Presenta mutación somática del c-met oncogene, que regula el receptor para el factor de crecimiento hepatocitario localizado en el cromosoma 7. Otras anomalías cromosómicas acompañan a la progresión tumoral.

CCR cromófobo

Constituye aproximadamente el 5% de los tumores renales. Es bien circunscrito, globular, sólido (sin quistes), de color pardo o gris uniforme. Presenta un patrón de crecimiento sólido en “pavimento” o “adoquinado”. Las células muestran gran número de vesículas intracitoplásmicas diminutas que imparten un aspecto pálido o reticular al citoplasma. Los núcleos son vesiculares o angulados, localizados centralmente y raramente exhiben pleomorfismo marcado. Característicamente se observan halos perinucleares. Frecuentemente existen células binucleadas. Las membranas aparecen reforzadas por la condensación periférica del citoplasma. La variante eosinófila de este tumor se compone de células con citoplasma intensamente eosinófilo y granular. estas células recuerdan las del oncocitoma. Los tumores suelen ser de bajo grado nuclear. Las mitosis son infrecuentes. El citoplasma se tiñe con azul alcian o hierro coloidal de Mowry. El perfil inmunohistoquímico de estos tumores es CK+ focal, EMA+ focal, vimentina-. El estudio citogenético y molecular ha revelado que el CCR cromófobo exhibe múltiples monosomías y patrón subdiploide con citometría de flujo. La mutación del p53 es más frecuente (alrededor del 30%) que en otros tumores renales. También existe alteración en el ADN mitocondrial.

La mayoría de los CCR cromófobos tienen mejor pronóstico que el CCR convencional.

Carcinoma de los conductos colectores

Es un carcinoma renal infrecuente que comprende aproximadamente el 1% en las series quirúrgicas. Generalmente se sitúa centrado en la médula renal con bordes infiltrantes. Es blanquecino o grisáceo con necrosis central. Tiene una arquitectura tubular, ductal y papilar con respuesta desmoplásica del estroma. Los conductos infiltrantes muestran una sola capa de epitelio con marcado pleomorfismo, mitosis y núcleos con nucleolos prominentes. Las células pueden ser columnares, cuboideas, o en tachuela. A veces los conductos muestran microquistes. La variante conocida como carcinoma medular presenta un patrón reticular o microquístico con áreas pobremente diferenciadas de crecimiento en sábana. Se presenta en pacientes con anemia de células falciformes. Se ha propuesto otra variante compuesta por múltiples microquistes de epitelio anofílico o eosinófilo de bajo grado de malignidad.

El carcinoma de conductos colectores aparece en edad más temprana que otros carcinomas renales. El tumor es positivo para CK APM y UEA-1 lectina y es vimentina-. No presenta un patrón consistente cromosómico. Las

alteraciones genéticas no están definidas. La importancia de su reconocimiento reside en su mal pronóstico. Es un tumor muy agresivo, de modo que el 90% de los pacientes fallecen como consecuencia de este tumor.

Carcinoma renal sarcomatoide

No es un tipo especial de carcinoma renal. Indica progresión tumoral a partir de cualquiera de los otros tipos. Por lo tanto su presencia empeora el pronóstico y debe ser incluida en el informe patológico (4).

CCR inclasificado

Se incluyen en este apartado los tumores que no pueden ser clasificados con el esquema anterior. Estos pueden ser casos con una mezcla de componentes, con arquitectura o patrón citológico no reconocible, o carcinoma sarcomatoide sin componente epitelial identificable.

Bibliografía

1. Kovacs G, Akhtar M, Beckwith JB, y cols. The Heidelberg classification of renal cell tumors. J Pathol 1977;183:131-133.
2. Bostwick DG, Eble JN, Murphy G. Conference summary: diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma. Cancer 1997;80:975-976.
3. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. Mod Pathol 1997;10:537-544
4. De Peralta-Venturina M, Moch H, Amin M, Tamboli P, Hailemariam S, Mihatsch M, Javidan J, Stricker H, Ro JY, Amin M. Sarcomatoid differentiation in renal cell carcinoma. A study of 101 cases. Am J Surg Pathol 2001;25:275-284.

Tabla 1. Categorías diagnósticas de los tumores epiteliales renales

A. Benignos

Adenoma papilar
Adenoma metanéfrico
Adenofibroma metanéfrico
Oncocitoma

B. Malignos

Carcinoma de células renales convencional (o de células claras)

Carcinoma de células renales papilar (o cromófilo)
Carcinoma de células renales cromóforo
Carcinoma de los conductos colectores
Carcinoma de células renales inclasificado

C. De potencial maligno indeterminado

Carcinoma de células renales quístico multilocular

PATOLOGÍA DEL CANCER DE LA VEJIGA URINARIA. ASPECTOS BIOMOLECULARES

Antonio López Beltran

Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Reina Sofía”. Córdoba

INTRODUCCION

En el momento del diagnóstico, aproximadamente 75% de los cánceres de vejiga pertenecen al grupo de los denominados “superficiales”, esto es no invasivos(Ta), y tumores que invaden lamina propia(T1). El 20% restante son músculo invasivos, presentando enfermedad metastásica un 5%. Tras el tratamiento quirúrgico, hasta un 70% de los tumores superficiales recidivarán, mientras que un 15% de estos progresaran a mayor estadio. La mayor parte de estos tumores presentan un crecimiento papilar. El carcinoma in situ plano(CIS), a pesar de ser una lesión “superficial”, presenta un comportamiento a agresivo con progresión de hasta un 80%, por lo que se recomienda no incluirlo con los tumores superficiales Ta/T1. Los factores convencionales predictivos de recidiva y progresión

en tumores superficiales incluyen alto grado, multifocalidad, invasión en la lamina propia, CIS asociado, tamaño tumoral mayor de 3 cm, e historia previa de tumores uroteliales.

Las marcadas diferencias de comportamiento observadas en los tumores vesicales, para una morfología similar, hacen de este tipo tumoral un terreno adecuado para investigación de posibles factores biomoleculares que nos permitan establecer subgrupos pronósticos, en especial referidos a marcadores de progresión tumoral.

Hasta el presente, un importante número de marcadores biológicos y moleculares han sido investigados, aunque, hasta el momento ninguno ha sido incluido como estudio de rutina en la práctica diaria. Los marcadores biomoleculares más relevantes ensayados hasta el momento se revisan en esta presentación, con especial énfasis con su posible aplicación como factores predictivos de recidiva y/o progresión en neoplasias uroteliales de la vejiga urinaria.

PERDIDAS ALELICAS

La identificación de pérdidas alelicas mediante citogenética o pérdida de heterocigosidad (LOH) son aproximaciones válidas para la identificación de genes supresores. Como se observa seguidamente(% cambios en relación con estadio), el número de alteraciones alelicas en cáncer de vejiga es importante:

Estadio	9p	9q	3p	11p	17p	18q
Ta	33	45	8	18	15	2
T1	42	62	27	33	45	2
T2-T4	40	58	43	42	50	33

LOH del cromosoma 9 es la alteración más común en tumores papilares de vejiga. Deleciones en el cromosoma 9 ocurren en más del 60% de los carcinomas papilares. Estas deleciones pueden constituir la única anomalía genética presente en ciertos tumores. La región 9p21 alberga 3 conocidos genes supresores: p14, p15, y p16. En la región 9q, se hallan los genes de los grupos sanguíneos (9q34.1-34.2) cuya expresión está reducida en bastantes tumores vesicales. Ocasionalmente, se han observado deleciones parciales del cromosoma 9p en urotelio normal adyacente a tumores superficiales.

Pérdidas alelicas del cromosoma 17p representan la segunda más frecuente anomalía cromosómica en cáncer de vejiga. Se observa principalmente en tumores músculo invasivos y en CIS. Esta región alberga el gen supresor p53.

Otros genes envueltos en la carcinogénesis vesical se encuentran en regiones cromosómicas tales como 11p, 3p, 18q, 13q(RB), y 8p(Nacetyltransferasa) entre otros.

INESTABILIDAD DE MICROSATELITES

Microsatelites son secuencias de di, tri, o tetranucleótidos que se repiten en el genoma y que son generalmente estables en el urotelio normal. Inestabilidad puede verse en cáncer de vejiga, y esta es cromosoma-específica. Se ha comunicado inestabilidad en el cromosoma X de la región del receptor androgénico, y en cromosoma 2 y 9p. Se ha observado una alta sensibilidad y especificidad (100%) en la identificación de recidiva temprana de carcinoma vesical en citología de orina, superior incluso a la observada para el diagnóstico citológico. Métodos basados en la detección de anomalías en microsatelites podrían estar disponibles en un futuro próximo para el diagnóstico de tumores vesicales recidivantes.

GENES SUPRESORES DE TUMOR

Los genes supresores actúan a nivel del ciclo celular donde inducen detención como mecanismo de control y coordinación de la proliferación celular. Su inactivación requiere la alteración en ambas copias del gen, aunque la alteración de una sola de las copias, es generalmente suficiente para cambiar su función. Los genes supresores pueden ser inactivados mediante mutación, deleción, o metilación. La metilación puede inactivar el promotor de un gen supresor silenciando la transcripción del gen.

p53

Es el gen supresor que con mayor frecuencia se altera en cáncer de vejiga, ya que el 50% de los tumores muestran anomalías en el mismo. p53 interviene en el ciclo celular a nivel de la fase G1 y determina si la célula entra en fase S, o bien progresa hacia apoptosis. p53 interacciona con otros genes como el MDM2 y el p21WAF. p53 se localiza en el cromosoma 17p13 y tiene 11 exones con diferentes funciones. Deleciones y mutaciones son los mecanismos más frecuentes de inactivación del p53, y suelen conllevar pérdida de la habilidad para regular la transcripción. Mediante inmunohistoquímica, la proteína p53 ha sido extensamente evaluada como marcador de progresión. Mutaciones en el p53 aumentan la estabilidad de la proteína y la hace detectable por inmunohistoquímica. La mayor parte de estudios encuentran una asociación significativa entre acumulo de p53 y grado/estadio patológicos, principalmente en tumores de alto grado y estadio. Entre los factores de variabilidad de resultados, se hallan el tipo de anticuerpo utilizado, el nivel de positividad, y el tipo de muestra utilizada. La determinación inmunohistoquímica de la p53 es el candidato más firme para su detección rutinaria en carcinomas vesicales.

CANDIDATOS PARA GENES SUPRESORES DE TUMORES DE LA VEJIGA

Recientemente, se han propuesto diferentes candidatos a genes supresores de tumores vesicales. Quizás los 2 mas prometedores en este momento son DBC1(deleted in bladder cancer) que se encuentra en la región 9q32-33, y TERE1(transitional epithelial response) situado en la región 1p36. Ambos parecen ser importantes en tumores músculo invasivos.

REGULADORES DEL CICLO CELULAR(p14,p16,p21WAF1,p27,pRB, ciclina D1)

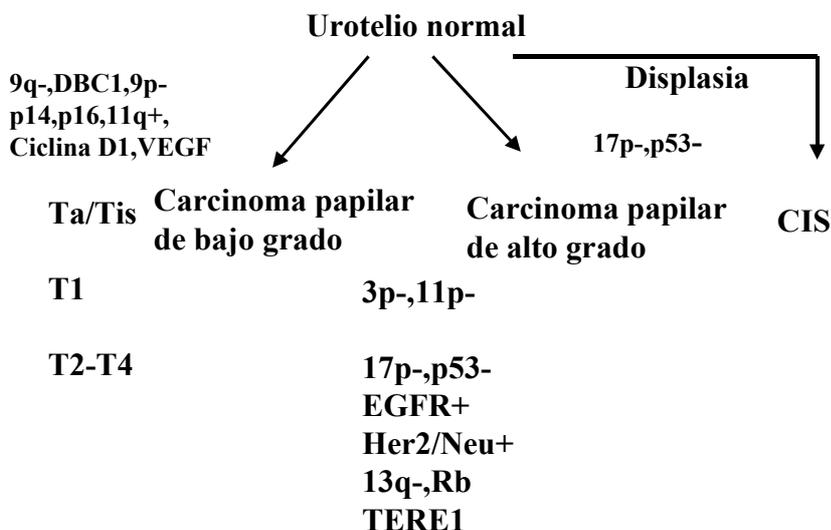
p14 y p16 se localizan en el locus INK4 del cromosoma 9p21, y ambos regulan el ciclo celular. p14 estimula la expresion de p53 e indirectamente la inhibe vía MDM2. p53 estimula p21WAF1 el cual inhibe la fosforilación de pRB, lo que conlleva detención del ciclo en fase G1. Cuando pRB se fosforila la célula sigue hacia delante con el ciclo. P16 tiene un efecto similar sobre la fosforilación de pRB.

La expresión del gen RB esta alterada en 1/3 de los cánceres de la vejiga. Disminución de la pRB se ha observado en 34% de tumores músculo invasivos, y 1% de tumores superficiales. Pacientes con p53 positivo(>20%) y pRB negativo tienen riesgo de progresión 10 veces superior. Sobreexpresion de pRB se ha relacionado con agresividad elevada en tumores T1. Las mutaciones en p21WAF1 son raras, pero su mRNA esta disminuido en tumores musculo invasivos. Mediante inmunohistoquímica se ha demostrado que p21 es un factor independiente de recidiva y supervivencia en estudios multivariados. p21 se relaciona con el estado de p53 de tal manera que pacientes con p53 alterado y p21 negativo, tiene elevado nivel de recidiva y baja supervivencia..

Sobreexpresion de ciclina D1 se ha observado en 47% de carcinomas grado 1 y en 20% de grado 2, pero no en casos de grado 3. Tumores que expresan >50% de ciclina D1 pueden recidivar rápidamente.

Entre otros marcadores estudiados se incluye ki67(MIB1) como marcador de proliferación, el cual se ha relacionado con mal pronostico en cáncer de vejiga tanto en estudios uni o multivariados. HER-2/neu, al igual que el factor de crecimiento epidérmico, podrían ser marcadores independiente de supervivencia, aunque necesitan ser validados. Factores de crecimiento relacionados con angiogenesis, como el VEGF podrían ser marcadores pronósticos en cáncer de vejiga. Finalmente, la citokeratina 20 podría ser un marcador útil en la diferenciación entre papiloma y carcinomas uroteliales papilares.

Patología Molecular del cancer de vejiga



BIBLIOGRAFIA

- Alvarez J, Lopez-Beltran A, et al. Biología molecular en el cancer vesical. Actas Urol Esp 24:604-625, 2000
- Baithun SI, et al. Molecular and kinetic features of transitional cell carcinomas of the bladder:biological and clinical implications. Virchows Arch 438:289-297, 2001
- Bostwick D and Lopez-Beltran A. Molecular biology of the bladder. En Bladder Biopsy Interpretation, Capitulo 15, pags 277-298. United Pathology Press, Washington 1999
- Cordon Cardo C, et al. Altered expression of retinoblastoma gene product: prognostic indicator of bladder cancer. J Natl Cancer Inst 84:1251-6, 1992
- Cordon-Cardo C, et al. Genetic and molecular markers of urothelial premalignancy and malignancy. Scand J Urol Nephrol Sppl 205:82-93, 2000
- Gonzalez-Xzulueta M, et al. Microsatelite instability in bladder cancer. Cancer Res 53:5620-3, 1993

- Korkolopoulou P, et al. Cell cycle regulators in bladder cancer: a multivariate survival study. *Human Pathol* 31:751-60, 2000
- Nakopoulou L, et al. The prevalence of bcl-2, p53, and ki67 in bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Human Pathol* 29:146-154, 1998
- Lopez-Beltran et al. Prognostic factors in survival of bladder cancer. *Cancer* 70:799-807, 1992
- Ross JS, et al. Biomarkers for the detection of bladder cancer. *Adv Anat Pathol* 8:37-45, 2001

HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA SU RELACIÓN CON LA MORFOBIOLOGÍA DEL ACINO

Ferran Algaba. Fundació Puigvert- Universitat Autònoma de Barcelona

Cada vez más la interpretación de la patología se fundamenta en el conocimiento de la biología y de los mecanismos reguladores de la cinética celular.

La próstata es un órgano con peculiaridades embriológicas (*se constituye en dos fases distintas de la embriogénesis*), filogenéticas (*va adquiriendo el aspecto de un solo órgano a medida que se asciende en la escala de los mamíferos*) y fisiológicas (*secreción de 0.5 a 2 cc al día*). Lo que explica que haya diferencias anatómicas (*distintas zonas*) e histológicas (*la estructura de los ductos y los acinos es muy similar*) (1).

El acino prostático ha sido, desde siempre, el punto de partida para la comprensión del cáncer de próstata. En el momento actual el acino sigue ocupando el mismo lugar en la interpretación del cáncer, sólo que gracias a los nuevos conocimientos que se tienen de dicha estructura se pueden comprender algunos aspectos oscuros de la neoplasia. Así pues creemos de interés empezar por la revisión actualizada del acino de la próstata.

Cinética celular del acino prostático – concepción histológica actual

Con H&E sólo se reconocen dos tipos celulares (las células *basales* y las *secretoras* con una relación basal/secretora de 1/3) (2). Ya con tinciones de plata, y por supuesto con métodos inmunohistoquímicos, se han podido demostrar, desde hace muchos años, células *neuroendocrinas*.

Sin embargo el avance conceptual más reciente se ha hecho gracias a la introducción de los procedimientos de doble tinción, que demuestran simultáneamente marcadores específicos de un tipo celular. Y así se han visto células que comparten inmunofenotipos distintos, con lo que se ha forjado el concepto de células *intermedias*, que probablemente representan células basales en el proceso de transformación, y que apoyan el *modelo de "stem cell"* para comprender la citocinética del acino prostático. Si a estos conceptos añadimos el que existen distintos receptores hormonales en las células, definiéndose un compartimento andrógeno-independiente, y otro andrógeno dependiente, podemos hacer una nueva lectura de la histología del acino prostático.

Así pues con un concepto morfológico puede considerarse que el acino prostático está constituido por:

- **Células basales** caracterizadas por:
 - Localizarse en la porción más profunda del acino
 - El escaso citoplasma
 - Representar el 70% de las células en proliferación.
 - Expresión citoqueratinas de alto peso molecular (34-beta E12)
 - Ausencia de PSA y PAP
 - Expresión de EGFR (erbB23, erbB 3).
 - Contener receptores de estrógenos y progesterona.
 - Expresión de Bcl-2
 - Expresión de receptores androgénicos en una porción de la población celular.

Por todo ello se le ha considerado que su función es de *"stem cell"* (3).

- **Células intermedias**, que son más un concepto biológico que una realidad morfológica, ya que microscópicamente son indistinguibles de las otras células (4). Se caracterizan por la expresión simultánea de:
 - CK 34-beta-E12 y PSA
 - 34-beta-E12 y cromogranina A
 - PSA y cromogranina A

Y los receptores hormonales también son variables.

- **Células secretoras** (5) de citoplasma amplio y claro de localización adluminal y que representan el volumen celular más importante del acino (75%), con un índice proliferativo de sólo el 10%, y que se caracterizan por:

- Expresar CK 8 y 18.
- Secretar PSA, PSMA y PAP.
- Expresar Bcl-x y carecer de Bcl-2.
- Contener la mayoría de los receptores androgénicos.
-
- **Células neuroendocrinas** de localización basal, la mayoría de ellas sin comunicación con la luz acinar, extensión hacia las células de alrededor, y con expresión de :
 - Cromogranina A, sinaptofisina, serotonina
 - Polipéptidos diversos (bombesina, PTH-like, calcitonina-like, etc).
 - Carecer de receptores androgénicos.

Ocasionalmente se pueden ver ocasionales células que expresan PSA o CK 34-beta-E12 (4).

A partir de este modelo celular puede comprenderse el modelo celular del cáncer de próstata

Origen celular del adenocarcinoma prostático acinar

El fenotipo más usual del adenocarcinoma prostático es el de **célula secretora** (*expresión de CK 8 y 18, PSA y PAP, receptores de andrógenos y de 5-alfa reductasa 1 y 2*) (6). Este hecho condujo a que ciertos autores consideraran que el carcinoma provenía de las células secretoras (7), pero esta hipótesis no se ha podido probar en su totalidad, ya que las células basales pueden perder su fenotipo y adquirir otro durante su transformación (8).

Otra característica fenotípica de las células prostáticas malignas es el alto índice proliferativo, con inversión del compartimento de proliferativo y expresión de Bcl-2 (6). La prolongación de la vida celular por la anómala expresión de Bcl-2 puede predisponer al acúmulo de anomalías genéticas, con incremento de su inestabilidad, y por lo tanto con incremento de la agresividad.

El otro aspecto fenotípico que puede adquirir el cáncer de la próstata es el de **célula neuroendocrina**. A las células neuroendocrinas normales no se les ha demostrado capacidad proliferativa (9), pero en modelos experimentales de tumores humanos, deprivados de andrógenos (PC-295) se ha podido constatar proliferación de las células neuroendocrinas, poco después de la deprivación hormonal, con células postmitóticas de fenotipo mixto (secretor y neuroendocrino) (10). Este hallazgo, junto a la existencia de células anficrinarias, sugiere que las células malignas neuroendocrinas podrían proceder de células secretoras (exocrinas) transformadas durante el proceso de progresión (4).

Así pues el modelo de “*stem cell*” puede explicar el abigarrado aspecto fenotípico (óptico e inmunohistoquímico) que pueden llegar a tener estas neoplasias (11).

Morfobiología de la invasión local en el cáncer de próstata

La invasión estromal precisa de una serie de procesos escalonados que llevan a que las células malignas se despeguen entre sí y de las membranas basales, que estas últimas se degraden, y que las células adquieran la capacidad de crecer en un ambiente de estroma.

De una forma académica podríamos sistematizar estas fases de la progresión local de la siguiente forma:

- **Pérdida de la adherencia intercelular:** En la membrana celular hay un complejo sistema de moléculas de adhesión, entre las que destacan las E-cadherinas y las alfa-cateninas, que están unidas a microfilamentos del citoesqueleto (actina). Las anomalías nucleares disrregulan la expresión de estas moléculas, correlacionándose su anómala expresión con el grado de indiferenciación (12), y así se ha podido ver con inmunohistoquímica, que la expresión de E-cadherina es intensa en un 64.3% de los tumores con score Gleason menor a 7, pero sólo se expresa en el 25% de los carcinomas con un score superior (13).
- **Pérdida de la adherencia célula-estroma:** La pérdida de la diferenciación de las células basales va acompañada de la pérdida de la formación de hemidesmosomas asociadas a las moléculas de adhesión intercelular, incluidas la colágena VII, laminina 5 y algunas integrinas (14).
- **Destrucción de la membrana basal:** La pérdida de la membrana basal se corresponde, muy estrechamente, con el grado de indiferenciación celular del adenocarcinoma. La renovación de la membrana basal normal está regulada por metaloproteinasas, y su acción proteolítica es inactivada por inhibidores (TIMPs). La inadecuada expresión de estas TIMPs por parte de las células malignas permite su acceso a la estroma (15).
- **Disminución de la unión normal célula-estroma, y aparición de las nuevas uniones entre célula maligna y estroma:** Las células normales necesitan de la unión con la membrana basal para poder proliferar, pero las células malignas proliferan habiéndolo perdido. Esta independencia con capacidad proliferativa (uniones independientes) lo hace a través de la emisión de “falsos mensajes” por parte del núcleo, como si estuviera adherida a la membrana basal, cuando en realidad no lo está (16). Este mensaje probablemente es enviado a través de la síntesis de una nueva membrana basal, por parte de la célula maligna, a la que le falta la laminina-5 asociada a los hemidesmosomas, la colágena VII y la IV (2). Las células malignas producen distintos tipos de membrana basal pericelular, con expresión simultánea de receptores de laminina y de colágena (17). Esta ne-

omembrana basal incrementa con la progresión tumoral, y esto podría explicar la sobreexpresión de la la tailin (molécula de adhesión célula-estroma) paralela al incremento del score de Gleason (13).

- **Angiogénesis:** Aparentemente para que las células neoplásicas se extiendan más allá de 2 mm es necesaria la aparición de nuevos capilares, por ello se consideran cruciales para la invasión estromal los factores angiogénicos. Estos factores son secretados por las células malignas. Los factores angiogénicos pueden ser activadores (VEGF, basic-FGF) e inhibidores (tromboesponin y angiostatin). Las células del adenocarcinoma producen angioestatin, lo que puede explicar la evolución relativamente indolente de algunos pacientes; por otra parte las células neuroendocrinas pueden activar al VEGF y así explicar la mayor agresividad de las neoplasias con esta diferenciación (18).

Morfobiología de la progresión del adenocarcinoma prostático

La progresión del cáncer está definida por la adquisición de la capacidad metastática y la independencia de los andrógenos.

- **Capacidad metastática:** En el momento actual se considera que ésta se adquiere por la acumulación progresiva de alteraciones cromosómicas (19). Esta acumulación de alteraciones cromosómicas se expresa a través de la anisocariosis y de la evaluación de las alteraciones del control del ciclo celular la proliferación y la apoptosis.
 - **Grado:** Sigue siendo el patrón de comparación para todos los nuevos métodos (20).
 - **Control del ciclo celular:** Los estudios que se están realizando apuntan, cada vez más, que para poder llegar a correlaciones con la evolución de los tumores, posiblemente se han de estudiar varios marcadores interrelacionados, tal como la p53 y la p21 WAF1 (21).
 - **Control de la proliferación y la apoptosis:** La expresión de Mib 1 (Ki67) y la de Bcl-2 son factores correlacionados con la agresividad de los adenocarcinomas prostáticos (22 y 23).
 - **Genes controladores del fenotipo metastático:** Siempre ha llamado la atención la peculiar afinidad de los adenocarcinoma de próstata por el hueso. La explicación actual de tal hecho sugiere la existencia de moléculas de adhesión con un código de área (OB-cadherinas y alfa 2 beta 1-integrina) (24).
- **Independencia androgénica:** Todos los carcinomas de próstata son andrógeno-dependientes en su inicio, pero incluso cuando se vuelven andrógeno insensibles siguen teniendo receptores para los andrógenos, pero desarrollan más los receptores estrogénicos, con lo que pueden proliferar sin andrógenos (14). Otros mecanismos implicados en la hormono independencia son la Bcl-2, la diferenciación neuroendocrina y la amplificación del receptor androgénico Xq11-q3.

Bibliografía

- 1.- McNeal JE
Normal histology of the prostate. *Am.J.Surg. Pathol.* 1988; 12: 619-633.
- 2.- Bonkhoff H, Remberger K
Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: A stem cell model. *Prostate* 1996; 28: 98-106.
- 3.- Bonkhoff H, Stein U, Remberger K
Widespread distribution of nuclear androgen receptors in the basal cell layer of the normal and hyperplastic human prostate. *Virchows Arch.* 1993; 422: 35-38
- 4.- Bonkhoff H, Stein U, Remberger K.
Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. Simultaneous demonstration of cell specific epithelial markers. *Hum. Pathol.* 1994; 25: 42-46.
- 5.- Xue Y, Smedts F, Verhofstad A y cols.
Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: New perspectives. *Prostate* 1998; S8: 62-73.
- 6.- Bonkhoff H
Role of the basal cells in premalignant changes of the human prostate: A stem cell concept for the development of prostate cancer. *Eur. Urol.* 1996; 30: 201-205.
- 7.- Nagle RB, Ahman FR, McDaniel KM y cols.
Cytokeratin characterization of human prostatic carcinoma and its derived cell lines. *Cancer Res.* 1987; 47 : 281-286.
- 8.- Sherwood ER, Berg LA, Mitchell NJ y cols.
Differential cytokeratin expression in normal, hyperplastic and malignant epithelial cells from human prostate. *J.Urol.* 1990; 143: 167-171.
- 9.- Bonkhoff H, Stein U, Remberger K.

- The proliferative function of basal cells in the normal and hyperplastic human prostate. *Prostate* 1994; 24: 114-118.
- 10.- Noordzij MA, van Weerden WM, Ridder CH y cols.
Neuroendocrine differentiation in human prostatic tumor models. *Am. J. Pathol.* 1996; 149: 859-871.
- 11.- Magi-Galluzi C, Loda M.
Molecular events in the early phases of prostate carcinogenesis. *Eur. Urol.* 1996; 30: 167-176.
- 12.- Paul R, Ewing CM, Jarrad DF y cols.
The cadherin cell-cell adhesion pathway in prostate cancer progression. *Br. J.Urol.* 1997; 79: 37-41.
- 13.- Rubio-Briones J, Pulymood A, Collett G, y cols.
Expression and localization of talin in benign and malignant human prostate and its relation to E-cadherin and alpha-catenin. *UroOncology* 2000; 1: 25-37.
- 14.- Bonkhoff H, Remberger K.
Morphogenic concepts of normal and abnormal growth in the human prostate. *Rev.Esp.Patol.* 1999; 32: 368-369.
- 15.- Fuchs ME, Brawer MK, Reunels MA.
The relationship of basement membrane to histologic grade of human prostatic carcinoma. *Mod.Pathol.* 1989; 2: 105-111.
- 16.- Ruoslahti E, Reed JC.
Anchorage dependence integrins, and apoptosis. *Cell* 1994; 77: 477-478.
- 17.- Bohnkoff H, Wernert N, Dhom E y cols.
Distribution of basement membranes in primary and metastatic carcinomas of the prostate. *Hum. Pathol.* 1992; 23: 934-939.
- 18.- Furusato M, Wakui S, Sasaki H.
Tumour angiogenesis in latent prostatic carcinoma. *Br.J.Cancer* 1994; 70: 1244-1246.
- 19.- Nupponen N, Visakorpi T.
Molecular biology of progression of prostate cancer. *Eur. Urol.* 1999; 35: 351-354.
- 20.- Gleason DF.
Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum.Pathol.* 1992; 35: 351-354.
- 21.- Matsushima H, Sasaki T, Goto T y cols.
Immunohistochemical study of p21WAF1 and p53 proteins in prostatic cancer and their prognostic significance. *Hum.Pathol.* 1998; 29: 778-783.
- 22.- Naito S, Sakamoto N, Kotoh S.
Proliferating cell nuclear antigen in needle biopsy specimens of prostatic carcinoma. *Eur.Urol.* 1994; 26: 164-169.
- 23.- Thompson CB.
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.
- 24.- Hrouda D.
Mechanisms of metastasis in prostate cancer. *Prospectives issues in managing disease.* 1998; 7:5-8.

PATOLOGÍA ONCOLÓGICA LINFOIDE.

NUEVAS TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA. DEL CARIOTIPO A LA MATRIZ DE EXPRESIÓN

Dr. Juan C. Cigudosa

Unidad de Citogenética. Departamento de Genética Humana. Programa de Patología Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas Carlos III. Madrid

INTRODUCCIÓN

El análisis citogenético de las células tumorales ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas clonales en más de 30.000 neoplasias humanas [1]. Hoy sabemos que la presencia de alteraciones cromosómicas aporta información importante para los dos ámbitos más esenciales de la salud pública: por un lado tienen valor diagnóstico y pronóstico y, por otro, señalan el camino a seguir para descubrir los oncogenes, responsables últimos de la enfermedad neoplásica. El conocimiento de la alteración cromosómica asociada a un determinado diagnóstico permite hacer un seguimiento de la evolución de la enfermedad, valorar la respuesta a tratamiento y detectar y cuantificar la enfermedad mínima residual (EMR). Cada vez en más protocolos clínicos, especialmente en neopla-

sias hematológicas y sarcomas, las decisiones terapéuticas están basadas, entre otros parámetros, en el análisis genético de las células neoplásicas [2-4].

En neoplasias hematológicas, gracias a las grandes series publicadas, existe abundante información no sólo de las alteraciones cromosómicas que se asocian específicamente a un determinado tipo de leucemia y linfoma (Tablas 1) [5], sino también del valor pronóstico de las mismas [6,7]. Por ejemplo, la presencia en el cariotipo de una translocación t(8;14) (oncogen *c-MYC*) en un paciente con linfoma, confiere un pronóstico muy desfavorable. Esta observación llevaría a una actitud terapéutica distinta y más agresiva que si se detectara en el mismo diagnóstico una alteración cromosómica de buen pronóstico, como por ejemplo un cariotipo hiperdiploide u otras translocaciones. De hecho, en los linfomas, el análisis citogenético convencional presenta más dificultades que en las leucemias: los cariotipos tienden a ser más complejos, el acceso al tejido implicado es más limitado y la información recogida hasta la fecha está basada en clasificaciones histopatológicas no uniformes que dificultan su interpretación. Sin embargo, los estudios que han correlacionado los marcadores citogenéticos con el pronóstico sugieren que, al igual que en las leucemias, algunas alteraciones cromosómicas en linfomas tienen significación pronóstica independiente [8].

En el caso de los tumores sólidos hay factores, fundamentalmente metodológicos, que han frenado la incorporación del análisis citogenético convencional a la rutina diagnóstica, que pudiera complementar al diagnóstico anatómico-patológico. Entre los obstáculos técnicos para obtener metafases analizables a partir de muestras de tumor cabe destacar, entre otros: baja viabilidad celular debido a la necrosis de la muestra; necesidad de disgregación enzimática de la muestra; contaminación microbiana; "contaminación" con células normales y, por último, debido al tiempo de manifestación clínica de la mayor parte de los tumores, la ocurrencia de alteraciones cromosómicas muy complejas y variables que hacen difícil determinar el cambio cromosómico primario asociado con un tipo de tumor [9]. En la actualidad se han descrito unas 100.000 alteraciones en más de 30.000 neoplasmas, de los que aproximadamente 21.000 son leucemias, 3.000 linfomas y 8.100 se refieren a tumores sólidos [10]. Todas las alteraciones cromosómicas descritas en cáncer pueden ser consultadas en la base de datos del Proyecto de Alteraciones Cromosómicas en Cáncer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCAP>).

La descripción de alteraciones cromosómicas asociadas específicamente a un tipo de cáncer se ha constituido como un paso previo a la detección y localización de los genes implicados en la génesis tumoral. Se han identificado hasta el momento 1.800 puntos de rotura en las alteraciones cromosómicas asociadas a neoplasias. Muchos de ellos han sido ya caracterizados a nivel molecular lo que ha permitido la identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumores [5,11]. Existen bases de datos actualizadas que permiten consultar información detallada acerca de los aproximadamente 100 genes identificados hasta el momento en las 600 reordenaciones cromosómicas equilibradas y recurrentes asociados a neoplasias humanas: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CGAP> y <http://infobiogen.fr/services/chromcancer>.

Así, cada día son más conocidas las alteraciones citogenéticas responsables de la transformación neoplásica, y los mecanismos moleculares que subyacen. En los linfomas, las translocaciones t(8;14), t(14;18), t(11;14) asociadas a linfomas de Burkitt, folicular y manto, respectivamente, han permitido localizar y aislar los oncogenes implicados en estas patologías: *c-MYC*, *BCL1* y *BCL2*. En estos casos, el mecanismo molecular subyacente consiste en la activación de estos protooncogenes por yuxtaposición con secuencias reguladoras de un gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH), provocando una sobreexpresión de la proteína codificada por el protooncogén.

HERRAMIENTAS DE CITOGENÉTICA MOLECULAR Y SU APLICACIÓN AL DIAGNÓSTICO DE PROCESOS NEOPLÁSICOS LINFOIDES

Hibridación *in situ* con fluorescencia. FISH

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral para la cual es específica. Es muy importante destacar que no es una técnica de búsqueda de nuevas alteraciones cromosómicas, sino que detecta únicamente aquello que buscamos, el resto del genoma permanece oculto. Podemos utilizar sondas de ADN de distintos tipos: centroméricas (marcan únicamente las zonas centroméricas), de pintado cromosómico (marcan todo un cromosoma) o de secuencias específicas de locus (marcan regiones cromosómicas de secuencia única). Esta técnica complementa perfectamente a la citogenética convencional en todas aquellas situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo: disponer de metafases de poca calidad, o no haber obtenido metafases, o bien en los casos en los que las alteraciones cromosómicas asociadas a un diagnóstico son crípticas no visibles en el cariotipo. Entre las demás ventajas de esta técnica estarían:

- Puesto que no es imprescindible analizar metafases, permite emplear además de tejidos frescos, muestras congeladas y parafinadas, lo que hace esta técnica muy útil en estudios retrospectivos de tumores sólidos.
- Es una técnica rápida (24h) y permite analizar un gran número de células en poco tiempo.
- Detecta anomalías cromosómicas numéricas y estructurales siempre que dispongamos de las sondas.
- Permite monitorización: seguimiento de una terapia antitumoral, detección de enfermedad mínima residual, detección temprana de recaídas y cuantificación de células genéticamente alteradas.
- Permite la detección de deleciones y amplificaciones génicas.

Al margen de sondas de “fabricación propia”, existen en el mercado sondas de FISH para un gran número de translocaciones en linfomas. Están señaladas en la Tabla 1.

Tabla 1. Translocaciones cromosómicas recurrentes en Linfomas no Hodgkin y genes implicados*			
	Alteración citogenética	Genes implicados	Diagnóstico FISH
LNH-B:			
Burkitt	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p11;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC</i> -IGH <i>IGK</i> - <i>MYC</i> <i>MYC</i> -IGL	Disponible 2001
Folicular	t(14;18)(q32;q21) t(2;18)(p12;q21) t(18;22)(q21;q11) t(1;22)(q22;q11)	<i>IGH</i> - <i>BCL2</i> <i>IGK</i> - <i>BCL2</i> <i>BCL2</i> -IGL <i>FCGR1B</i> -IGL	Disponible
DCG	t(3;22)(q27;q32) t(3;14)(q27;q32) t(2;3)(p12;q27) t(14;15)(q32;q11-q13) t(10;14)(q24;q32) t(14;18)(q32;q21) t(8;14)(q24;q32) t(6;14)(p21;q32) t(1;14)(q21;q32)	<i>BCL6</i> -IGL <i>BCL6</i> -IGH <i>IGK</i> - <i>BCL6</i> <i>IGH</i> - <i>BCL8</i> <i>NFKB2(LYT10)</i> -IGH <i>IGH</i> - <i>BCL2</i> <i>MYC</i> -IGH <i>CyclinD3</i> -IGH <i>MUC1</i> -IGH	Disponible 2001
Manto	t(11;14)(q13;q32)	<i>BCL1(CyclinD1)</i> -IGH	Disponible
Marginal:			
Linfoplasmocitoide	t(9;14)(p13;q32)	<i>PAX5</i> -IGH	
Malt	t(11;18)(q21;q21) t(1;14)(p22;q32)	<i>API2</i> - <i>MLT</i> <i>BCL10</i> -IGH	
Linfocítico (small)	t(14;19)(q32;q13)	<i>IGH</i> - <i>BCL3</i>	
Esplénico vellosa	t(7;14)(q21;q32) t(2;7)(p12;q21)	<i>CDK6</i> -IGH <i>IGK</i> - <i>CDK6</i>	
Otros	t(11;14)(q23;q32) t(11;14)(q23;q32) t(12;14)(q24;q32) t(12;22)(q24;q32)	<i>PAFAH2</i> -IGH <i>RCK</i> -IGH <i>BCL7A</i> -IGH <i>CyclinD2</i> -IGL	
LNH T:			
Anaplásico K1+ (T o B)	t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK</i> - <i>NPM</i>	Disponible
variable T	t(10q24) t(7;14)(q35;q11) t(7;14)(p15;q11) t(7;7)(p15;q11) t(11;14)(p13;q11) inv(14)(q11q32) t(14;14)(q11;q32)	<i>NFKB2(LYT10)</i> TRCB-TRCA/D TCRG-TCRA/D TCRG <i>RBTN2</i> -TRCD TCRA-TCL1 TCRA-IGH	
* La lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados linfomas puede ser consultada en: (http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP)			

Hibridación genómica comparada (CGH)

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los mayores problemas al que se enfrenta la citogenética convencional es la ausencia de metafases. Una opción adecuada ante este problema es el empleo de la CGH, una

técnica que emplea ADN del tumor y obvia, por lo tanto, la necesidad de células en crecimiento. Ha sido utilizada con éxito en linfomas y otros tumores sólidos [12,13].

Esta técnica se basa en la hibridación competitiva de dos ADN (tumoral y de referencia o normal), marcados con distintos fluorocromos, sobre cromosomas normales. En condiciones normales, como la cantidad de ADN disponible de tumor y de referencia es la misma, el resultado de la hibridación es un cromosoma de color homogéneo. En condiciones patológicas, si el tumor contiene una ganancia cromosómica la cantidad disponible de ADN tumoral es superior y la hibridación marcará una desviación hacia uno de los fluorocromos. Si en el tumor hay delección, la desviación de color irá en sentido contrario. El software adecuado elabora un perfil medio para cada cromosoma y el resultado final nos indica cuáles son las zonas cromosómicas amplificadas o delecionadas para cada paciente.

Las ventajas de esta técnica son:

- No necesita células en cultivo del paciente (puede utilizarse ADN extraído de la muestra fresca o simplemente del bloque de parafina)
- Se puede trabajar con pequeños grupos celulares obtenidos por microdissección.

La principal desventaja es que con esta técnica no se pueden detectar translocaciones (sólo se detectan ganancias y pérdidas cromosómicas).

La CGH ha contribuido significativamente al conocimiento actual de las alteraciones genómicas en los linfomas. Se han caracterizado los cambios genéticos de varios tipos histológicos [14-16, entre otros].

Todas las alteraciones cromosómicas, ganancias y pérdidas, descritas en cáncer por CGH pueden ser consultadas en la base de datos actualizada de la Universidad de Helsinki (<http://www.helsinki.fi/~lgl/www/CMG.html>).

Cariotipo multicolor. SKY

Dentro de las técnicas citogenéticas de última generación que utilizan la hibridación *in situ* con fluorescencia como método de identificación de una determinada secuencia (sonda), y compitiendo con la CGH, merece un capítulo aparte la técnica denominada Cariotipo Espectral Multicolor, cuya abreviatura, ya comercializada, es SKY por el término inglés *Spectral Karyotype*.

Esta técnica identifica con una combinación específica de fluorocromos el material genético de cada par cromosómico. Es decir, “pinta” cada cromosoma de un color. Esto hace que el SKY sea, al menos teóricamente, la herramienta de diagnóstico perfecta para la definición de translocaciones o para la identificación del material cromosómico que compone los cromosomas marcadores, de aparición tan frecuentes en tumores. La realidad no es tan excitante como la teoría hace suponer ya que esta técnica también tiene limitaciones y, en la práctica diaria, su excesivo precio y la complejidad de su análisis hace que, todavía, sea una técnica citogenética complementaria al análisis tradicional. Sin embargo, las expectativas que ha levantado desde su descripción [15] y los resultados obtenidos hasta la fecha en leucemias agudas y otros tumores hematológicos [16-18] son muy halagüeñas y nos hace albergar un futuro más que prometedor para este tipo de análisis, tanto por su fiabilidad como por las aplicaciones diagnósticas y de investigación que se deriven de su utilización.

Ventajas o aportaciones del SKY:

- Es extraordinariamente útil para determinar translocaciones que se escapan al análisis por bandas G.
- Es muy útil para detectar el origen de segmentos cromosómicos no identificados (marcadores como el famoso 14q+ de los linfomas pueden ser identificados ahora como translocaciones y detectar que cromosomas están implicados).
- La identificación cromosómica es unívoca ya que está relacionada con la secuencia genética de cada cromosoma.

Entre las desventajas, señalaremos:

- El poder de resolución es el mismo que la citogenética convencional, es decir, al menos una banda cromosómica ha de estar translocada.
- Es una técnica poco útil para detectar alteraciones que no supongan intercambio de material genético entre cromosomas, como deleciones o inversiones.
- Necesita metafases (células en cultivo) de la muestra en estudio.

MICROCHIPS DE cDNA. MATRICES DE EXPRESIÓN

Como última herramienta para el estudio y clasificación de las neoplasias mieloides, hemos de mencionar los análisis de expresión mediante microchips de cDNA, cDNA arrays o matrices de expresión. El propósito de esta ponencia es apuntar hacia las nuevas tecnologías y en este simposium existe otra contribución que trata el tema de microchips en profundidad. Únicamente mencionar el ya clásico trabajo de Alizadeh y cols [19] que puso de manifiesto que esta herramienta puede ser muy útil para discriminar aquellos pacientes afectados de linfoma difuso de células B con peor pronóstico. Estos estudios son preliminares y, entre la discriminación propuesta basada en los patrones de expresión no se tuvieron en cuenta, por carecer de ellos, los datos provenientes de la citogenética de cada tumor. Estamos convencidos de que la complementariedad de los datos citogenéticos será de gran ayuda en un futuro próximo para el análisis de los resultados obtenidos mediante los microchips de cDNA.

BIBLIOGRAFÍA

1. MITELMAN F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. New York, NY, Wiley-Liss Inc., 1998.
2. ROWLEY JD. Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol.* 2000; 37(4): 315-319.
3. PATEL AS, HAWKINS AL, GRIFFIN CA. Cytogenetics and cancer. *Curr Opin Oncol.* 2000; 12(1): 62-67.
4. LINDBLOM A, LILJEGREN A. Tumour markers in malignancies. *BMJ.* 2000; 320(7232): 424-427.
5. MITELMAN F, MERTENS F, JOHANSSON B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet.* 1997; Spec No: 417-474.
6. GRIMWADE D, WALKER H, OLIVER F, WHEATLEY K, HARRISON C, HARRISON G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92(7): 2322-2333.
7. ROULSTON D, LE BEAU M. Cytogenetic analysis of hematologic malignant diseases, en: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JL, editores. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* Philadelphia: Lippincott-Raven (3ªed), 1997: 325-350.
8. ONG ST, LE BEAU MM. Chromosomal abnormalities and molecular genetics of non-Hodgkin's lymphoma. *Semin Oncol.* 1998; 25(4): 447-460.
9. THOMPSON FH. Cytogenetic Methods and findings in human solid tumors, en: Barch M, Knutsen T, Spurbeck JL, editores. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual.* Philadelphia: Lippincott-Raven (3ªed), 1997: 375-408.
10. MITELMAN F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res.* 2000; 462(2-3): 247-253.
11. KIRSCH IR, RIED T. Integration of cytogenetic data with genome maps and available probes: present status and future promise. *Semin Hematol.* 2000; 37(4): 420-428.
12. KNUUTILA S, BJORKQVIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI O, et al. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 1998; 152(5): 1107-1123.
13. LICHTER P, JOOS S, BENTZ M, LAMPEL S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol.* 2000; 37(4): 348-357.
14. RAO PH, HOULDSWORTH J, DYOMINA K, PARSA NZ, CIGUDOSA JC, LOUIE DC, et al. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 1998; 92(1): 234-40.
15. SCHROCK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, et al. Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.
16. VELDMAN T, VIGNON C, SCHROCK E, et al. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nat genet* 1997; 15: 406-410.
17. ROWLEY JD, RESHMI S, CARLSON K, et al.: Spectral karyotype analysis of T-cell acute leukemia. *Blood* 1999; 93:2038-2042.
18. RAO PH, CIGUDOSA JC, NING Y, et al. Multicolor spectral karyotyping identifies new recurring breakpoints and translocations in multiple myeloma. *Blood* 1998; 92: 1743-1748.
19. ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; 403:503-511

THE IMPACT OF DNA MICROARRAY TECHNOLOGY IN THE UNDERSTANDING OF LYMPHOPROLIFERATIVE DISORDERS

Andreas Rosenwald, M.D., Louis M. Staudt, M.D., Ph.D.
Metabolism Branch, National Cancer Institute,
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Since the initial distinction of Hodgkin's disease from other malignant and reactive conditions, lymphoma classifications have been controversial. The most recent classification scheme, which was published in 1994 as the 'Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms' (REAL), is based on a list of disease entities, which are defined by a combination of morphological, immunophenotypical, genetic and clinical features (1). There is little doubt, however, that various entities in this classification still comprise lymphoma cases that show a marked heterogeneity in their clinical behavior, e.g. in their response to chemotherapy or overall survival. Recent technical advances made it possible to quantitate the expression of thousands of genes in parallel using complementary DNA microarrays (2). It is hoped that genomic-scale expression profiling will elucidate many aspects of cancer biology, cancer diagnosis, and the mechanisms underlying susceptibility and resistance to treatment.

Approximately 90% of human non-Hodgkin's lymphomas (NHL) are derived from B-lymphocytes. A major component of the biological potential of a cancer cell is likely to be inherited from its normal counterpart and, therefore, each NHL subtype has been provisionally assigned to a particular stage of B-cell differentiation based on immunophenotypical markers together with analysis of immunoglobulin gene rearrangement and mutation.

By using genome-scale gene expression profiling we wanted to address whether we could (a) generate molecular portraits of distinct NHL subtypes; (b) identify previously not recognized clinically relevant subtypes; (c) relate each subtype to normal stages of B-cell development. We designed a specialized microarray – termed the 'Lymphochip' (3,4) – by selecting genes that play a role in normal and malignant lymphocyte biology, immunology and cancer. Furthermore, a large proportion of clones including thousands of EST's from so far unknown genes was chosen from a germinal center B-cell library (4). The 'Lymphochips' were used to characterize gene expression patterns in diffuse large B-cell lymphoma (DLCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) as well as their relationships to gene expression profiles obtained from various normal stages of B-cell development. Approximately 1.8 million measurements of gene expression from 96 normal and malignant lymphocyte samples were analyzed using a hierarchical clustering algorithm. Although no information on the identity of the samples was used during the clustering process, the algorithm segregated recognized subtypes of NHL and different stages of B-cell differentiation and activation based on similarities in their global gene expression patterns demonstrating that each category has its own gene expression signature. The expression profiles obtained from follicular lymphomas shared significant features with the patterns seen in normal germinal center B-cells, whereas the patterns in chronic lymphocytic leukemia cells did not resemble those in germinal center cells but instead were reminiscent of resting peripheral blood lymphocytes. As for DLCL, the initial clustering dendrogram suggested that their expression patterns might be inhomogeneous. Clinically, about 40% of patients with DLCL respond well to current chemotherapy regimens and have prolonged survival, whereas the remainder succumb to the disease. We could show that there is a considerable diversity in gene expression among DLCL cases reflecting variation in their proliferative activity, host response and B-cell differentiation stage. Based on gene expression profiling we identified two molecularly distinct forms of DLCL which display expression patterns indicative of different stages of B-cell differentiation. The 'germinal center B-like DLCL' expressed genes characteristic of normal germinal center B-cells, whereas the 'activated B-like DLCL' expresses genes that are normally induced during *in vitro* activation of peripheral blood B-cells. The molecular differences between these two forms of DLCL were accompanied by a remarkable divergence in clinical behavior: 76% of germinal center B-like DLCL patients were still alive after five years, as compared to only 16% of 'activated B-like DLCL' patients, suggesting that these subgroups of DLCL should be considered separate entities (5).

In a recent study, we used 'Lymphochips' to further illuminate the gene expression phenotype in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL), a malignancy of mature B-cells with a characteristic clinical presentation but a variable clinical course. It has been observed that the rearranged immunoglobulin (Ig) variable genes in CLL cells may be either germ-line in sequence or somatically mutated and the lack of Ig mutations defined a distinctly worse prognostic group of CLL patients (6,7). This finding suggests that CLL might comprise two different diseases that have been lumped together using current standard diagnostic methods. Using genomic-scale gene expression profiling we defined a common CLL gene expression 'signature' that is characteristic of all CLL cases, irrespective of Ig mutational status. Nonetheless, the expression of hundreds of other genes correlated with the Ig mutational status. These genes might provide a new molecular framework for understanding the etiology of this leukemia and the divergent clinical courses of these patients. The differential expression of these genes was also used to build a CLL subtype predictor that may help in the clinical classification of patients with this disease.

References:

- 1- Harris, N.L. et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361-1392.
- 2- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-470.
- 3- Alizadeh, A., Eisen, M., Botstein, D., Brown, P.O. & Staudt, L.M. Probing lymphocyte biology by genomic-scale expression analysis. *J. Clin. Immuno.* 18, 373-379.
- 4- Alizadeh, A. et al. The Lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Volume LXIV, 71-78.
- 5- Alizadeh, A. et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403, 503-511.
- 6- Damle, R.N. et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1840-1847.
- 7- Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G. & Stevenson F.K. Unmutated Ig (V) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94, 1848-1854.

INFLUENCIA DEL DIAGNÓSTICO ANATOMOPATOLÓGICO EN EL MANEJO CLÍNICO DE LOS LINFOMAS. NUEVAS TERAPÉUTICAS BIOLÓGICAS EN EL TRATAMIENTO DE LOS LINFOMAS.

I Ezpeleta, A. Elósegui. Servicio de Hematología-Hemoterapia. Hospital Virgen del Camino. Servicio Navarro de Salud-Osasunbidea. Pamplona.

En condiciones ideales, quizás reales en el futuro próximo, cada tipo de linfoma debería tener un tratamiento a la carta en función de sus características biológicas, como ya sucede con la erradicación del *Helicobacter Piloni* en el linfoma MALT gástrico, el ácido retinoico en la Leucemia Aguda Promielocítica y con el inhibidor de la tirosin-quinasa STI571 en la Leucemia Mieloide Crónica . Sin embargo, en la práctica clínica actual, las opciones para tratar los linfomas son limitadas, y la mayoría de los pacientes reciben unas pocas opciones terapéuticas. En su elección, el subtipo histológico del tumor es el primer aspecto que los clínicos consideramos, pero no es el único ni, en muchos casos, el más importante.

El esquema mental que subyace al decidir un tratamiento comienza con el diagnóstico anatomopatológico, continua con el estadiaje y la obtención de otros factores con relevancia pronóstica, sigue con la consideración de las características, los deseos y las expectativas del enfermo, y se puede modificar en función de la respuesta y/o la toxicidad. Esto explica el éxito entre los clínicos de la “Working Formulation for clinical usage” de 1982, y las propuestas para establecer grupos clínicos con implicación pronóstica y terapéutica en las nuevas clasificaciones (1) (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación pronóstica y terapéutica de los linfomas

LINFOMAS INDOLENTES	CELULAS B	*DE LINFOCITOS PEQUEÑOS *LINFOPLASMOCITOIDE *DE LA ZONA MARGINAL *CENTROFOLICULARES
	CELULAS T	*LINFOMAS T CUTANEOS *LEUCEMIA DE LINFOCITOS GRANDES GRANULARES
LINFOMAS AGRESIVOS	CELULAS B	*DE CELULAS DEL MANTO *DIFUSO DE CELULA GRANDE
	CELULAS T	*ANAPLASICO DE CELULA GRANDE *OTROS T PERIFERICOS
LINFOMAS MUY AGRESIVOS	CELULAS B	*LINFOBLASTICO *BURKITT
	CELULAS T	*LINFOBLASTICO
ENFERMEDAD DE HODGKIN		

Enfermedad de Hodgkin

En la enfermedad de Hodgkin, los diferentes subtipos histológicos no implican en la actualidad diferencias en el estudio de extensión ni en el tratamiento, con la excepción del predominio linfocítico nodular localizado, en los que la radioterapia de la zona afectada parece ser suficiente (2). El estudio de extensión no difiere del de los linfomas no Hodgkin, ya que la esplenectomía de Kaplan ha caído en desuso, por las mejores técnicas de imagen y la generalización del tratamiento combinado quimio-radioterápico para estadios clínicos localizados. En ellos, se obtiene una supervivencia global a los 10 años del 80 %, tanto con radioterapia como con tratamientos combinados quimio-radioterápicos, pero las recidivas (32,7% a los 10 años) se reducen a la mitad al asociar quimioterapia (3).

En estadios avanzados, el tratamiento con poli-quimioterapia ABVD (Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina y Dacarbacina) ha desplazado a otros tratamientos basados en el MOPP (Mostaza nitrogenada, Oncovin ó vincristul, Procabazina y Prednisona), primer tratamiento eficaz en esta enfermedad, por su mayor eficacia antitumoral, su menor capacidad de producir esterilidad y su menor poder leucemógeno al no incluir alquilantes (4). Otros tratamientos más intensos están siendo probados en ensayos clínicos y es necesario un mayor seguimiento para establecer su papel en esta enfermedad que, por su relativo buen pronóstico, permite la aparición de complicaciones tardías del tratamiento, como las enfermedades cardíacas por la radioterapia cardíaca y las antraciclinas (Adriamicina) y los tumores secundarios.

Linfomas no-Hodgkin muy agresivos

El tratamiento de este grupo, con protocolos basados en los empleados para las leucemias agudas linfoblásticas, depende de forma primordial del diagnóstico anatómo-patológico de linfoma de Burkitt ó linfoblástico, ya que los primeros responden a dosis altas y fraccionadas de ciclofosfamida, metotrexate y citarabina (5). En los linfoblásticos se utilizan protocolos similares a los de las leucemias agudas linfoblásticas.

Linfomas no-Hodgkin agresivos

El tto convencional de este grupo de linfomas se ha basado en el utilizado para los linfomas difusos de células grandes, por ser los más frecuentes y porque, aunque se conoce que otros subtipos tienen características y pronósticos diferentes, no existen estudios prospectivos amplios y randomizados en los que basar un tto diferenciado.

El tratamiento de los estadios localizados incluye bien radioterapia de campos afectados, a dosis entre 36 y 45 Gy, combinada con 3 ciclos de quimioterapia CHOP, ó bien 8 ciclos de quimioterapia CHOP aislada (6).

El tratamiento convencional de los estadios avanzados se basa en la quimioterapia CHOP desarrollada hace más de 20 años. Un trabajo colaborativo de fase III de varios grupos estadounidenses, que incluyó a más de 1.200 pacientes estableció que otros tratamientos más intensos ó con más fármacos, llamados de tercera generación como ProMACE-CytaBOM (Prednisona, Metotrexate, Adriamicina, Ciclofosfamida, Etoposido, Citarabina, Bleomicina, Vincristina) y MACOP-B (Metotrexate, Adriamicina, Ciclofosfamida, Vincristina, Prednisona, Bleomicina) no mejoraban las respuestas ni la supervivencia, pero aumentaban la toxicidad grave del 1 al 6 % (7). Los pacientes que alcanzan remisión completa y presentan factores pronósticos desfavorables, con un Índice Pronóstico Internacional (tabla 2) alto ó intermedio-alto, con una edad y un estado general adecuados, reciben tratamiento de consolidación con quimioterapia intensiva seguida de autotransplante de progenitores hematopoyéticos, en base a los resultados de 3709 pacientes incluidos en el estudio francés GELA-LNH-87 (8), confirmados por otros grupos.

Tabla 2 . Índice Pronóstico Internacional.

RIESGO	Nº de factores desfavorables	Factores desfavorables
Bajo	0-1	Edad \geq 60 años LDH $>$ normal Estadio III-IV Afectación extranodal $>$ 1 Estado general ECOG \geq 2
Bajo-intermedio	2	
Alto-intermedio	3	
Alto	4-5	

Linfomas no-Hodgkin indolentes.

El tto convencional de este grupo se ha basado en el utilizado para los linfomas foliculares, que son los más frecuentes. La reciente definición de otros subtipos histológicos y su menor incidencia explican que no existan estudios prospectivos amplios en los que basar recomendaciones terapéuticas diferenciadas, con la excepción de los linfomas MALT gástricos localizados que responden a la erradicación del *Helicobacter Piloni* y los linfomas de la zona marginal esplénica que responden a la esplenectomía.

El tratamiento inicial depende, en primer lugar de la extensión. En estadios localizados I-II de Ann-Arbor, el tratamiento de elección es la radioterapia de las zonas afectadas y adyacentes, a dosis de 30 Gy, con supervivencias libres de enfermedad del 40-50 % a los 10 años (9).

Sin embargo, la mayoría debutan en estadios avanzados III-IV y, aunque responden al tratamiento, no son curables en la actualidad, aunque permiten una supervivencia de 6 a 12 años, con frecuentes recidivas. Por todo ello, el tratamiento convencional es paliativo y, se inicia cuando hay síntomas, datos de progresión, alteración de la hemopoyesis ó gran masa tumoral, manteniendo hasta entonces la actitud denominada “watch and see“ y por otros “watch and live” (10) que no compromete la supervivencia.

Cuando es preciso iniciar el tratamiento las opciones convencionales incluyen, por orden de respuesta y toxicidad, aunque con una supervivencia global similar: los alquilantes orales como el Clorambucil (Leukeran) ó la poliquimioterapia de baja toxicidad tipo COP (Ciclofosfamida , Oncovin ó Vincrisil y Prednisona) ó de moderada toxicidad tipo CHOP (COP+ Adriamicina). Ninguno de ellos mejora la supervivencia en los grados histológicos I y II (11). La adición de interferon- α al tratamiento tipo CHOP prolonga la duración de la remisión, al menos en algunos estudios (12). Los análogos de las purinas, como la fludarabina, sólo ó asociados a otros citostáticos producen remisiones completas en un 35-89 %, pero su lugar en el tratamiento de estos linfomas está aún por definir (13).

NUEVAS TERAPEÚTICAS BIOLÓGICAS EN EL TRATAMIENTO DE LOS LINFOMAS.

A pesar de los progresos realizados en los últimos años en el diagnóstico, la estratificación pronóstica, y el soporte con factores de crecimiento de granulocitos, todavía muchos de nuestros pacientes fallecen por su enfermedad. La avanzada edad de muchos de ellos y la toxicidad de algunos tratamientos hacen deseable conseguir alternativas más eficaces y menos tóxicas. Algunas de ellas, ya disponibles ó en el horizonte cercano, son mencionadas a continuación.

Anticuerpos monoclonales. Una reciente incorporación a la práctica clínica es el uso de anticuerpos monoclonales. El único disponible para uso clínico es el rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20 aprobado en nuestro país para los linfomas foliculares, en recidiva ó resistentes, con la denominación MabThera^R. El antígeno CD 20 está expresado de forma intensa en practicamente todas las células de estirpe linfoide B, pero no en las células madres hematopoyéticas , tiene una expresión estable, no es ocultado ó internalizado tras su unión al anticuerpo y, por ello es considerado como una diana ideal para los linfomas B.

El rituximab es un monoclonal quimérico, que combina la región variable de un anticuerpo monoclonal murino específico anti-CD 20 con las regiones constantes de inmunoglobulinas (Ig) de clase IgG1 humana, que son las que activan la respuesta inmune. El hecho de que la región constante (Fc) sea humana y no murina es importante porque disminuye su inmunogenicidad. Los mecanismos de acción del rituximab son la citotoxicidad dependiente del complemento, la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y, al menos “in vitro”, la inducción de apoptosis por activación de las proteasas caspasa-3, y el aumento de la toxicidad de algunos medicamentos quimioterápicos convencionales.

En el estudio que motivó su aprobación para uso clínico, en 166 pacientes con linfoma de bajo grado en recidiva ó resistentes, con 4 dosis semanales de 375 mg/m² i.v. se obtuvieron respuestas objetivas en el 48 %, y en el 6 % remisiones completas, algunas de ellas moleculares, con una duración mediana de 1 año (14). Los efectos adversos más frecuentes son fiebre, escalofríos ó náuseas, y son muy poco frecuentes las complicaciones infecciosas, mielosupresión u otras reacciones graves.

En pequeños ensayos asociando quimioterapia CHOP se obtienen hasta 95 % de respuestas (15). Están en marcha ensayos clínicos de fase III que incluyen rituximab sólo ó con otros fármacos en LLC, mieloma múltiple, macroglobulinemia, tricoleucemia, primera línea de linfomas de bajo grado, linfomas difusos de célula grande, de células del manto, en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, en enfermedad de Hodgkin y en enfermedades autoinmunes. En los próximos años quedará establecida su papel en el manejo de estos procesos.

Otros anticuerpos monoclonales no aprobados para uso clínico, entre ellos los anti-CD 20 conjugados con isótopos radioactivos (*), están recogidos en la tabla 3.

Tabla 3. Otros anticuerpos monoclonales

ANTICUERPO	DIANA	CELULAS	ENFERMEDADES
Campath 1H	CD52	Mononucleares	LLC,PLL,LNH
HLL2	CD22	B maduras	LNH-B
Hu1D10	HLA-DR	B, Macrófagos, Dendríticas	LNH-B
HuM291	CD3	T maduras	Psoriasis, trasplante renal, LNH-T
¹³¹ I-tositumomab*	CD20	B maduras	LNH-B
IDEC-Y2B8*	CD20	B maduras	LNH-B
Lym-1	HLA-D	B, Macrófagos, Dendríticas	LNH-B

LLC:Leucemia Linfática Crónica; PLL:Leucemia Prolinfocítica; LNH:Linfoma no Hodgkin ; (*) combinado con isótopos radioactivos.

Oligonucleótidos “anti-sentido”. Son secuencias cortas sintéticas de DNA de cadena única, complementarias del DNA ó RNA mensajero de un gen de expresión aberrante, que bloquean la transcripción DNA>RNA ó traducción RNA>proteína, y disminuyen la síntesis de la proteína final anómala ó excesiva. Aunque en teoría parecen muy interesantes, existen múltiples problemas prácticos para diseñarlos y para hacerlos llegar a su diana (16).

En algunos linfomas, los altos niveles de proteína bcl-2 bloquean la apoptosis y la muerte celular tras la quimio ó radioterapia, por lo que algunos investigadores han intentado bloquear esta proteína con oligonucleótidos anti bcl-2. En un estudio de fase I, se trataron 9 pacientes con linfomas refractarios y con alta expresión de proteína bcl-2, con infusión subcutánea de oligodeoxinucleótido anti-bcl-2. En 2 se observó disminución de masa tumoral en TAC y, en otros 2, una disminución del número de linfocitos tumorales circulantes, con efectos adversos leves. En 2 de los 5 pacientes en los que se cuantificó la proteína bcl-2, mediante citometría de flujo, se objetivó una disminución (17). Otros ensayos con bcl-2 antisentido (G3139, Genta USA) están en marcha.

Vacunas anti-idiotipo. La secuencia de la región variable (idiotipo) de la Ig de superficie de los linfomas B, es característica de cada clon y, por tanto, un marcador específico del tumor. La vacunación con esta proteína, ó con la secuencia de DNA complementario al gen que la codifica, induce una respuesta inmune, humoral y celular, capaz de erradicar la enfermedad mínima residual en linfomas de bajo grado y en mielomas. Están en marcha ensayos clínicos con vacunas anti-idiotipo proteínicas y DNA (18).

Minialotransplantes. En los trasplantes clásicos, el acondicionamiento con dosis supraletales de quimio ó de radioterapia pretende erradicar tanto la hemopoyesis como las células tumorales del receptor. En la actualidad se sabe que parte de su eficacia antitumoral depende del efecto injerto contra tumor (GVM), estrechamente vinculado al efecto injerto contra huésped (GVH) y mediado por los linfocitos T del donante.

En un minialotransplante se utilizan regímenes de acondicionamiento menos intensos, más inmunosupresores que mieloablativos, que no destruyen el sistema linfohematopoyético del receptor pero evitan el rechazo del injerto. Tras inocular el injerto, coexisten células del donante y del receptor (quimerismo mixto), se establecen reacciones de injerto contra-huésped (GVHD en inglés), injerto contra tumor (GVM en inglés) y huésped contra injerto (HVG en inglés) que se pueden modular mediante el ajuste del tratamiento inmunosupresor, ó la infusión de linfocitos del donante postransplante (19). Con esto se pretende disminuir la mortalidad del alotransplante convencional y hacerlo extensible a más pacientes.

Se están realizando ensayos clínicos tanto en hemopatías malignas, incluyendo linfomas, como en tumores sólidos, inmunodeficiencias, enfermedades genéticas y autoinmunes. En la tabla 4 se recogen las características de las series más amplias.

Tabla 4. Algunas series de minialotransplantes presentadas en el congreso de la Asociación Americana de Hematología de 1999.

Autor	n	Diagnostico	Donante	MRT % Dia +100
Slavin	70	LMC 19; LA 33; LNH 17; MM:1	Emparentado 54 No emparentado 16	7
Giralt	86	LMC 27; LA 37; LNH 13	Emparentado 46 No emparentado 40	42
McSweeney	44	LMC 8; LA 13; LLC 8; MM 8; LINFOMAS 7.	Emparentado 44	6,8
Michellet	92	LMC 12; LA 30; LNH 19; MM 14; LINFOMAS 7.	Emparentado 92	48

LMC: Leucemia Mieloide Crónica; LA: Leucemia Aguda; LNH: Linfoma no Hodgkin; MM: Mieloma Multiple; MRT: Mortalidad Relacionada con el Transplante.

BIBLIOGRAFIA:

1. Hidderman W, Longo DL, Coiffier B et al. Lymphoma classification-the gap between biology and clinical management is closing. *Blood* 1996; 88:4085-4089.
2. Diehl V, Sextro M, Franklin J et al. Clinical presentation, course and prognostic factors in lymphocyte-predominant Hodgkin's disease and lymphocyte rich classical Hodgkin's disease: report from the European task force on lymphocyte-predominant Hodgkin's disease. *J.Clin Oncol* 1999; 17:776.
3. Specht L, Gray RG, Clarke MJ, Peto R. Influence of more extensive radiotherapy and adjuvant chemotherapy on long-term outcome of early-stage Hodgkin disease: a meta-analysis of 23 randomised trials involving 3888 patients. *J.Clin Oncol*; 1998;16:830.
4. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin disease with MOPP, ABVD or MOPP alternating with ABVD. *N England J Med*.1992; 327:1478-1484.
5. Magrath I, Adde M, Shad A, et al. Adults and children with small non-cleaved cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J Clin Oncol* 1996; 14:925-934.

6. Miller TP, Dahlberg S, Cassady JR, et al. Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1998; 339:21-26.
7. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *New Engl J Med* 1993; 328:1002-1006.
8. Haioun C, Lepage E, Gisselbrecht C, et al. High-dose therapy followed by stem cell transplantation in partial response after first-line induction therapy for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 1998;9 (Suppl 1):S5-S8.
9. MacManus PM; Hoppe RT. Is radiotherapy curative for stage I and II low grade follicular lymphoma? Results of a long term follow-up study of patients treated at Stanford University. *J Clin Oncol* 1996; 14:1282-1290.
10. Brice P, Bastion Y, Lepage E et al. Comparison in low burden follicular lymphomas between an initial non treatment policy, prednimustina or interferon alfa : a randomised study from the Groupe d'Etude des lymphomes Folliculaires. *J Clin Oncol* 1997; 15:1110-1117.
11. Dana BW, Dahlberg S, Nathwani B et al. Long term follow-up of patients with low grade lymphomas treated with doxorubicin based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *J Clin Oncol* 1993; 11:644-651.
12. Solal-Céligny P, Lepage E, Brousse N, et al. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alpha-2b for advanced follicular lymphomas: Final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 trial. *J Clin Oncol* 1998; 16:2332-2338.
13. Foussard C, Deconinck E, Desablens B et al. A randomized trial of fludarabine, mitoxantrone (FM) versus doxorubicin, cyclophosphamide, vindesine, prednisone (CHEP) as first line treatment in patients with advanced low-grade non-Hodgkin's lymphoma : a multicenter study by GOELAMS group. *Blood* 1998; 92:316.
14. McLaughlin P, Grillo-Lopez A, Link B, et al. Rituximab chimeric anti-CD-20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma : half of patients respond to a 4-dose treatment program . *J Clin Oncol* 1998; 16:2825-2833.
15. Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy.. *J Clin Oncol* 1999; 17:268-276.
16. Gewirtz AM, Sokol DL and Ratajczak MZ. Nucleic acid therapeutics: State of the art and future prospects. *Blood* 1998;92:712-736.
17. Webb A, Cunningham D, Cotter F, et al. Bcl-2 anti-sense therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 1997; 349:1137-1141.
18. Bendandi M. Anti-idiotypic vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* 2000; 14 (8):1333-1339.
19. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, et al. Non myeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. *Blood* 1998; 91: 756-763.

PATOLOGIA ONCOLOGICA DEL APARATO DIGESTIVO

PROBLEMAS DIAGNÓSTICOS Y PRONÓSTICOS EN EL ESOFAGO DE BARRETT.

Julio Torrado, Manuel Manrique*, Irene Otero, Jose María Martínez-Peñuela**

Servicios de Anatomía Patológica: Hospital Aránzazu, San Sebastián.

* Policlínica Gipuzkoa, San Sebastián. ** Hospital de Navarra, Pamplona.

Se describe el *esófago de Barrett* como una lesión de esófago distal estrechamente relacionada con el reflujo gastro-esofágico en la que se produce un reemplazamiento del epitelio normal estratificado por un epitelio de tipo cilíndrico. Este fenómeno de metaplasia está bien documentado mediante endoscopias seriadas con tomas biopsicas en pacientes con esofagitis por reflujo y puede ser reproducido en animales de experimentación. Debido a que el epitelio columnar es más resistente a los efectos del ácido que el epitelio escamoso, el desarrollo de un epitelio de Barrett parece constituir un mecanismo protector frente al reflujo gastroesofágico. El precio de esta protección es, sin embargo, alto ya que el esófago de Barrett es una lesión con potencial de malignidad.

La primera referencia sobre esófago de Barrett se realiza a principios de este siglo por el patólogo W. Tileston, quien describió diversos casos de úlcera péptica en esófago, haciendo notar que el epitelio que rodeaba estas lesiones guardaba estrechas similitudes con el encontrado en las úlceras pépticas gástricas. Los primeros autores en mencionar la presencia de células calciformes en lesiones de esófago de Barrett fueron Bosher y Taylor en 1951 y la importancia asignada a esta lesión en relación con su potencial de malignización se puso en evidencia de manifiesto.

La media de edad de los pacientes con esófago de Barrett esta entre 55 y 65 años con una distribución que parece binodal entre el nacimiento y los 15 años y entre los 40 y los 80 años de edad, lo que probablemente está en relación con distintas etiopatogenias, habiéndose propuesto una etiología diferente para niños y adultos (Wright 1996, Hassall 1993). Estudios poblacionales muestran una prevalencia de enfermedad de Barrett de 0,8% a 3,9%, pero es mas alta en pacientes con sintomatología de reflujo gastroesofágico en los que la prevalencia varía entre el 2,5% al 24%. En estudios autópsicos se ha encontrado una prevalencia de esta enfermedad 21 veces mayor que la de la población sintomática, indicando que el esófago de Barrett puede ser asintomático y permanecer ignorado. Estos datos sugieren que hasta un 5% del total de la población tiene esófago de Barrett, de tal forma que solamente una caso de cada veinte es detectado en vida (Cameron 1990). Invariablemente, las series estudiadas muestran una mayor frecuencia en hombres cercana al 80%, habiéndose involucrado al mayor consumo de alcohol y tabaco en este fenómeno.

Clásicamente, se ha definido el esófago de Barrett como ***“la presencia de epitelio columnar en mucosa de esófago distal, generalmente asociada a reflujo gastrointestinal”***. Esta definición excluye otro tipo de lesiones como la heterotopia gástrica del esófago cervical y se muestra útil si la lesión es extensa y endoscópicamente bien detectable. Sin embargo, en la práctica, el diagnóstico de enfermedad de Barrett ha planteado y plantea problemas de tipo técnico y conceptual aún no del todo aclarados.

En primer lugar, existen problemas de tipo práctico en la identificación de la zona de unión entre el esófago y el estómago. Esta zona ha sido definida de diferentes formas por anatomistas, fisiólogos, radiólogos y endoscopistas. A efectos prácticos, parece que la identificación de esta zona por los endoscopistas en el momento de la toma biopsica sería la más aconsejable. En condiciones normales esta zona es fácilmente identificable y coincide con aquella zona en la que el esófago pierde su conformación tubular para continuarse con el área sacular gástrica. Sin embargo, esta conformación sufre variaciones fisiológicas peristálticas y de translaciones durante la inspiración-espriación y, por otra parte se ve grandemente afectada en condiciones patológicas que frecuentemente acompañan al esófago de Barrett. Así, en muchos de estos pacientes se encuentra una hernia hiatal asociada por lo que el esfínter esofágico distal y la llamada línea Z (unión escamo-glandular) pueden trasladarse a una posición más proximal. Por otra parte, la línea Z está normalmente situada dentro del esfínter distal esofágico que tiene una longitud aproximada de 3 cms. De esta forma, un trayecto de más de 2 centímetros del esófago distal puede estar recubierto en condiciones no patológicas de una mucosa gástrica de tipo cardial.

En relación con estos problemas de tipo práctico, una mas completa definición de esófago de Barrett fue ampliamente establecida, como ***“la presencia de epitelio columnar en mucosa de esófago distal, generalmente asociada a reflujo gastrointestinal en una lesión endoscópicamente localizada a más de 3 centímetros por encima del margen tubular distal del esófago”***. Con esta definición se asegura que al menos hay un centímetro de epitelio metaplásico. Sin embargo, este margen de seguridad hace que exista la posibilidad de exclusión de auténticas lesiones de esófago de Barrett existentes en individuos en los que la posición de la línea Z sea baja o incluso normal.

Clásicamente, en relación al tipo de mucosa metaplásica encontrada, se han distinguido tres tipos de esófago de Barrett: a) cardial, cuando la mucosa mimetiza la mucosa gástrica cardial; b) fúndico, cuando la mucosa incluye células parietales; y c) especializado, cuando hay presencia de células mucosecretoras de tipo intestinal (células caliciformes y/o columnares secretoras de sialo- y/o sulfomucinas).

Los dos primeros tipos de mucosa de Barrett son indistinguibles de la mucosa normalmente encontrada en la vecindad del cardias y ello ha hecho que muchos autores hayan limitado el diagnóstico de esófago de Barrett a aquellos casos en los que la mucosa presenta áreas de metaplasia intestinal. Por tanto, una nueva definición hoy ampliamente aceptada es la de **“la presencia de epitelio columnar con áreas de metaplasia intestinal en mucosa de esófago distal, generalmente asociada a reflujo gastrointestinal”**. Al estar asociada estrechamente la metaplasia intestinal a un riesgo de transformación maligna del epitelio de Barrett, esta definición tiene la ventaja de que solo incluye los individuos con esófago de Barrett de alto riesgo.

Sin embargo, por su propio carácter restrictivo, esta definición ofrece algunos aspectos negativos. En primer lugar, parece que, especialmente en la población infantil, es frecuente una verdadera mucosa de Barrett sin fenómenos de metaplasia intestinal (Cooper 1987, Kohler 1988). Por otra parte, existen datos que sugieren que la presencia de metaplasia intestinal en el esófago de Barrett es un fenómeno que en cierta forma está asociado a la edad o a la duración de la enfermedad (Qualman 1990). Finalmente, la ausencia de metaplasia intestinal, una lesión que se presenta de forma multifocal, en muchos casos está sin duda relacionada con un simple error de muestreo, pudiendo de esta forma dejar de considerarse casos con esta patología.

Por otra parte, la evidencia de un epitelio columnar con metaplasia intestinal en una biopsia de esófago distal no excluye la posibilidad de que esta haya sido tomada de la mucosa cardial gástrica. Los fenómenos de metaplasia intestinal en este área son mas frecuentes de lo que se creía y se han descrito hasta en un 15-23% de pacientes sometidos a endoscopia gástrica (Spechler 1994, Morales 1997) así como asociadas a adenocarcinomas del área cardial (Cameron 1995).

Parece bien establecido en la actualidad que la metaplasia intestinal, tanto sobre un esófago de Barrett como sobre una gastritis crónica atrófica de antro o cuerpo gástricos, constituye una lesión precursora de cáncer. Sin embargo, si existe una lesión premaligna de este tipo en cardias, no es un hecho aún aclarado. Por ello, de acuerdo con Spechler (1994), clasificamos la metaplasia columnar en esófago distal y unión cardioesofágica de la siguiente forma:

Lesión	Relación con el adenocarcinoma	Seguimiento endoscópico
Esófago de Barrett con metaplasia intestinal	Sí	Sí (cada 1-2 años)
Esófago de Barrett sin metaplasia intestinal	Improbable	No (Sí, en grupos de riesgo)
Epitelio columnar con metaplasia intestinal en unión cardioesofágica	Probable	Probablemente sí

ADENOCARCINOMA DE BARRETT

En general, al menos un 90% de todos los cánceres de esófago corresponden a carcinomas escamosos y, aproximadamente, un 6% son adenocarcinomas. Sin embargo, la incidencia de adenocarcinomas de esófago distal y cardias está incrementándose dramáticamente en algunas regiones habiendo incluso sobrepasado en algunas de ellas a la del carcinoma escamoso. Diversos estudios realizados en Estados Unidos y Europa han demostrado un rápido incremento en la incidencia de adenocarcinoma de esófago y cardias desde principios de los años 70 (Blot 1991, Yang 1988, Powell 1990, Levi 1991, Hamson 1993, Moller 1992). Así, entre 1976 y 1987, la incidencia de adenocarcinoma de esófago en hombres blancos en Estados Unidos se incrementó en un 100%, un aumento mayor que el de cualquier otro tumor maligno. Antes de 1970 el adenocarcinoma de esófago constituía menos del 8% de todos los carcinomas primarios de esófago (NCI 1975, Raphael 1966, Hesketh 1989, Alpern 1989), mientras que el resultado de algunos estudios llevados a cabo en la mitad de los años 70 y 80 mostraron que este porcentaje se había incrementado hasta el 17-30% (Blot 1991, Hesketh 1989, Alpern 1989). Estudios similares efectuados en Europa mostraron idéntica tendencia (Powell 1990, Moller 1992, Tuyns 1992, Sutton 1992). En Estados Unidos el adenocarcinoma de esófago es encontrado predominantemente en varones blancos, con una relación blanco:negro

de 3,1 y una relación hombre:mujer de 7,6. La razón para este incremento en los adenocarcinomas de esófago es por el momento desconocida. Sin embargo, este aumento en la incidencia de estos tumores es real y no está en relación con una mejor técnica en el diagnóstico endoscópico, con variaciones geográficas o con cambios en la clasificación de tumores de cardias y del esófago distal.

Aunque el esófago de Barrett es la consecuencia de un reflujo gastroesofágico severo, todavía permanece sin aclarar que componentes del reflujo son importantes en el desarrollo de la metaplasia intestinal y el cáncer. Algunos investigadores creen que el contenido duodenal es más importante que el ácido o la pepsina. Estudios experimentales en animales, con o sin la administración de carcinógenos, muestran que el reflujo duodenogastroesofágico induce la aparición de esófago de Barrett y de adenocarcinomas (Attwood 1992, Miwa 1994, Mirvish 1993, Seto 1991, Pera 1989). Asimismo, algunos estudios de pH-metría efectuados en humanos implican a un incremento en el reflujo duodenogastroesofágico en la etiología del esófago de Barrett y del adenocarcinoma (Stein 1992, Gillen 1988, Attwood 1989). Finalmente, se ha implicado al uso de antagonistas de receptores de la histamina (cimetidina) con el cáncer de esófago (Colin-Jones 1991). Sin embargo, los resultados de otros estudios efectuados no apoyan esta tesis (Chow 1995, Moller 1989). Algunos autores han sugerido que la terapia médica supresora de ácido puede haber contribuido al incremento epidémico del esófago de Barrett y del adenocarcinoma de esófago mediante la producción de un aumento del reflujo del contenido duodenal (Attwood 1992, Mirvish 1993, Stein 1992, Miwa 1995, Pera 1993).

La asociación entre adenocarcinoma de esófago distal y esófago de Barrett fue bien establecida durante los años 70. Diversos autores llamaron la atención sobre el hecho de que el epitelio que rodeaba a los adenocarcinomas esofágicos era de tipo columnar y que invariablemente contenían áreas de metaplasia intestinal que, frecuentemente, ofrecían cambios displásicos. Aunque no exenta de controversias, cada vez se fue haciendo más claro que la metaplasia de tipo intestinal era la lesión que más predisponía a la aparición de transformación maligna en el esófago de Barrett. En la actualidad, está bien establecido que la mayoría de los casos de adenocarcinoma afectando al esófago distal asientan sobre una lesión previa de esófago de Barrett con cambios de metaplasia intestinal, siendo esta lesión culpable del riesgo de malignización del esófago de Barrett.

El adenocarcinoma de Barrett es, pues, un proceso que se desarrolla en el tiempo a través de diversas lesiones entre las que, como en otras localizaciones, el evento principal parece ser el desarrollo de una metaplasia de tipo intestinal. En respuesta al reflujo gastroesofágico, el epitelio escamoso estratificado normal del esófago es ulcerado y reemplazado por un epitelio de tipo columnar metaplásico que puede sufrir cambios progresivos de displasia y, finalmente, originar un adenocarcinoma. La secuencia de lesiones en la progresión maligna del esófago de Barrett han sido en su mayor parte inferida mediante el estudio de la mucosa que rodea a los adenocarcinomas. Los factores que promueven el desarrollo de displasia y adenocarcinoma son, sin embargo, pobremente conocidos. Aunque se ha propuesto que el efecto continuado del reflujo gastroesofágico puede ser un factor que interviene en este proceso de malignización (Smith 1984), se han descrito diversos pacientes en los que se desarrolló un adenocarcinoma tras cirugía antirreflujo (Hamilton 1984), no existiendo evidencias que sustenten la tesis de que la eliminación del reflujo gastroesofágico reduzca el riesgo de malignización.

El tiempo requerido para que una lesión metaplásica desarrolle una displasia y, finalmente, un adenocarcinoma es desconocido y puede variar de paciente a paciente. Por otra parte, la historia natural de la displasia de alto grado en el esófago de Barrett no es bien conocida. Esta lesión podría regresar, persistir durante un período prolongado de tiempo o progresar a adenocarcinoma (Hameeteman 1989). Los resultados de algunas series quirúrgicas muestran que alrededor del 50% de los pacientes que han sufrido esofagectomía como consecuencia de un diagnóstico histológico de displasia de alto grado tenían un adenocarcinoma en la pieza quirúrgica (Skinner 1983, Altorki 1991, Hamilton 1987). Este hecho ha impulsado a algunos autores a proponer la esofagectomía en aquellos pacientes con displasia de alto grado diagnosticada sobre material biopsico.

Parece haber un mayor riesgo de malignización en hombres que en mujeres. Así, mientras la relación hombre:mujer en lesiones de esófago de Barrett es de 3:2 (Cooper 1987, Achkar 1988, Willianson 1991), esta relación se eleva en pacientes con adenocarcinoma de Barrett hasta un rango que varía de 5:1 hasta 29:1, según las series estudiadas, con una media de 10:1 (Skinner 1983, Sampliner 1985, Sanfey 1985). Algunos autores han sugerido que este efecto está determinado por un mayor consumo de tabaco y alcohol en hombres (Gray 1993, Spechler 1984).

El riesgo de desarrollo de adenocarcinoma en esófago de Barrett es difícil de valorar y, debido a la variabilidad de los criterios diagnósticos utilizados en los diversos estudios, existe una gran diversidad en los resultados. La prevalencia de adenocarcinoma en esófago de Barrett aparece definida por el porcentaje de pacientes con adenocarcinoma de esófago cuando el esófago de Barrett es primeramente diagnosticado. Los resultados de prevalencia recogidos en la literatura son muy dispares y oscilan de un 10% a un 46% (Naef 1975, Skinner 1983). Sin embargo, gran parte de los datos de prevalencia reportados podrían estar sobrestimados debido a que un número importante de individuos con lesiones de esófago de Barrett son asintomáticos (Cooper 1987), de tal forma que parece que solamente uno de cada 20 casos es diagnosticado (Cameron 1990). Aproximadamente un 10% de adultos en Estados Unidos tienen sintomatología de reflujo gastroesofágico y más de un 10% de estos pacientes tienen lesiones de esófago de Barrett, elevándose esta cifra a un 32% si existe asociada una esofagitis por reflujo (Winthers 1987).

Por tanto, el método mas apropiado para averiguar el riesgo de adenocarcinoma en el esófago de Barrett es a través de los datos de incidencia de esta neoplasia en estudios prospectivos de seguimiento de pacientes con lesiones de esófago de Barrett. Diversos estudios de este tipo han asignado una incidencia de adenocarcinoma en esófago de Barrett que oscila entre un caso por cada 52 pacientes/año de seguimiento hasta 1 por cada 441 (Tabla 1).

Referencia	nº de pacientes	Seguimiento en años	Incidencia (cancer-paciente-año)
Spechler 1984	105	3,3	1 en 175
Sprung 1984	41	4,0	1 en 81
Cameron 1985	122	8,5	1 en 441
Sampliner 1985	25	3,7	1 en 92
Achkar 1988	62	2,6	1 en 166
Robertson 1988	56	2,9	1 en 56
Van Der Veen 1989	166	4,4	1 en 170
Ovaska 1989	32	6,7	1 en 55
Hameeteman 1989	50	5,2	1 en 52
Willianson 1991	176	2,8	1 en 99

Tabla 1. Incidencia de adenocarcinoma de Barrett. Revisión.

Los altos índices de prevalencia e incidencia de adenocarcinoma en el esófago de Barrett, así como la pobre supervivencia de aquellos pacientes con presentación de tumores sintomáticos (supervivencia media de dos años, tasas de supervivencia a los 5 años menores del 25%) hacen necesario un seguimiento endoscópico de pacientes con esófago de Barrett. La finalidad es intervenir en el periodo de la secuencia displasia de alto grado-carcinoma no infiltrante que tienen mejores índices pronósticos. Por otra parte, la displasia de alto grado está asociada a un carcinoma no invasivo en un 50-60% de los casos y está considerada por muchos autores como una indicación de actuación quirúrgica (Pera 1992, Hamilton 1987).

Sin embargo, los programas de seguimiento en enfermos con esófago de Barrett han suscitado gran controversia, debido en gran parte a razones económicas (coste por enfermo detectado), pero también por los bajos índices de detección en una población generalmente de avanzada edad. En un estudio de costes efectuado por Achkar y Carey en 1988 el coste por caso detectado fue calculado en 62.000 dólares (9.300.000 pts) y en otro realizado por Wright en 1996 fue de 15.000 libras (3.750.000). Estas cifras parecen altas, sin embargo se relativizan cuando se las compara con los costos de programas de detección en otros tipos de cánceres. Así, cuando se utiliza el test de sangre oculta en heces para la detección precoz del cáncer colorectal, el costo por vida salvada se ha calculado en torno a los 225.000 \$ (33.750.000 pts) y en el caso de los programas de mamografía en la detección precoz del cáncer de mama se ha estimado un coste superior a los 250.000.000 de pesetas (Lieberman 1995, Baum 1995).

Deben tenerse en cuenta, sin embargo, otro tipo de consideraciones. Así, los programas de detección de cáncer en pacientes con lesiones de esófago de Barrett deben efectuarse únicamente en aquellos pacientes que, en su caso, sean susceptibles de una intervención quirúrgica de esofagectomía. Por otra parte, ha de tomarse en consideración que en la población de edad avanzada el potencial beneficio de un aumento en la expectativa de vida por la detección precoz de un adenocarcinoma de esófago es realmente limitado. En un estudio holandés efectuado por Van Der Burgh et al (1996), un grupo de 155 pacientes con esófago de Barrett que no entraron en un programa de seguimiento endoscópico efectuado entre los años 1973 y 1986, fueron examinados en 1994. En ese tiempo, 75 pacientes habían muerto. Dos de ellos murieron a consecuencia de un adenocarcinoma de esófago, uno de metástasis y el otro de complicaciones postquirúrgicas. En otros tres pacientes se detectó un adenocarcinoma de esófago que permaneció intratado, muriendo los pacientes de otras causas. Los autores concluyen que este grupo de pacientes no se hubiera beneficiado de un programa de seguimiento endoscópico. Los similares resultados de algunos de estos estudios han puesto en duda los posibles beneficios de un programa de seguimiento en pacientes con esófago de Barrett.

Sin embargo, una aproximación real a estos problemas podría establecer algunas limitaciones en el seguimiento de este tipo de pacientes, atendiendo a las siguientes consideraciones:

1. El seguimiento endoscópico debe estar dirigido a la obtención de muestras biópsicas, esencialmente para la detección de cambios displásicos. Debido a que la displasia es una lesión invariablemente focal y para disminuir en lo posible los fenómenos de muestreo, se aconsejan tomas biópsicas múltiples procedentes de los cuatro cuadrantes de la lesión y obtenidas aproximadamente cada 1-2 centímetros. La realización de una buena técnica endoscópica es fundamental en la optimización de los resultados del seguimiento.

2. Únicamente deben ser considerados a efectos de seguimiento endoscópico aquellos casos en los que la muestra biópsica tenga lesiones de metaplasia intestinal. Aunque carecemos de datos acerca de la im-

portancia pronóstica del tipo de metaplasia (tipo intestino delgado o colónica), debería hacerse constar esta en el informe biopsico.

3. Los pacientes de edad avanzada o aquellos que, por distintas causas, no sean susceptibles de una eventual esofagectomía deben ser excluidos del seguimiento.

4. Otras consideraciones que podrían ser tenidas en cuenta son el sexo masculino, alto consumo de tabaco y alcohol, desarrollo del esófago de Barrett a una edad temprana, cirugía gástrica previa y lesiones de Barrett extensas.

MARCADORES DE RIESGO

Una alternativa al seguimiento indiscriminado de pacientes con esófago de Barrett sería la delimitación de grupos de alto riesgo a través de marcadores pronósticos efectuados sobre material biopsico. El epitelio metaplásico de Barrett tiene características histoquímicas similares a las observadas en la mucosa gástrica y las áreas de metaplasia intestinal muestran las mismas variantes de la metaplasia intestinal gástrica. El significado de la expresión de sulfomucinas en células de tipo columnar como predictor de malignidad en el esófago de Barrett permanece aún en debate (Lapertosa 1992, Peuchmant 1984).

Se ha descrito una anómala expresión de antígeno Lewis a en áreas de metaplasia intestinal y displasia en pacientes de distintas áreas geográficas con diferentes tasas de incidencia de cáncer gástrico. Estos estudios han mostrado una buena correlación entre la positividad y grado de severidad de esta anomalía antigénica con la severidad de las lesiones histológicas e histoquímicas (sulfomucinas). Estudios de seguimiento han demostrado que la simultánea expresión de antígeno Lewis a anómalo y de sulfomucinas puede ser considerada como un buen marcador de progresión útil en la identificación de pacientes de alto riesgo con lesiones precursoras de cáncer gástrico (Torrado 1992; Torrado 1992; Ruiz 1994).

Estudios preliminares de ambos marcadores en lesiones de esófago de Barrett muestran un progresivo incremento en la prevalencia y extensión de ambas anomalías en relación a la severidad de las lesiones. Así, la presencia de ambas anomalías es máxima en los casos de displasia, metaplasia de Barrett asociada a adenocarcinomas y, finalmente, en las células neoplásicas. El significado pronóstico de estas alteraciones en lesiones de esófago de Barrett debe ser, sin embargo, explorado en futuros estudios de seguimiento.

REFERENCIAS

- Achkar E, Carey W. The cost of surveillance for adenocarcinoma complicating Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 291-4.
- Alpern HD, Buell C, Olson J. Increase in percentage of adenocarcinoma in primary carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 574.
- Altorki NK, Sunagawa M, Little AG, Skinner DB. High-grade dysplasia in the columnar-lined esophagus. *Am J Surg* 1991; 161: 97-9.
- Atwood SEA, DeMeester TR, Bremner CG, *et al.* Alkaline gastroesophageal reflux: implications in the development of complications in Barrett's columnar-lined lower esophagus. *Surgery* 1989; 106: 764-70.
- Atwood SEA, Smyrk TC, DeMeester TR, *et al.* Duodeno-esophageal reflux and the development of esophageal adenocarcinoma in rats. *Surgery* 1992; 111:503-10.
- Baum M. Screening for breast cancer, time to think- and stop?. *Lancet* 1995; 346: 436 (letter).
- Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287-9.
- Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313(14):857-9.
- Cameron AJ, Zinsmeister AR, Ballard DJ, Carnay JA. Prevalence of columnar-lined (Barrett's) esophagus. Comparison of population-based clinical and autopsy findings. *Gastroenterology* 1990; 99: 918-22.
- Cameron AJ, Lomboy CT, Pera M, *et al.* Adenocarcinoma of the esophagogastric junction and Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1995; 109: 1541-6.
- Chow W, Finkle WD, McLaughlin JK, *et al.* The relation of gastroesophageal reflux disease and its treatment to adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1995; 274:474-7.
- Colin-Jones DG, Langman MJS, Lawson DH, *et al.* Post-cimetidine surveillance for up to ten years: Incidence of carcinoma of the stomach and oesophagus. *Q J Med* 1991; 285: 13-19.
- Cooper RT, Barbezat GO. Barrett's esophagus: a clinical study of 52 patients: *Q J Med* 1987; 238: 98-108.a
- Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, *et al.* Implication of duodenogastric reflux in the pathogenesis of Barrett's esophagus. *Br J Surg* 1988; 75: 540-3.

- Gray MR, Donnelly RJ, Kingsnorth AN. The role of smoking and alcohol in metaplasia and cancer risk in Barrett's columnar lined esophagus. *Gut* 1993; 34: 727-31.
- Hameeteman W, Tytgat GNJ, Houthoff HJ, Van Den Tweel JG. Barrett's esophagus: Development of dysplasia and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96: 1249-56.
- Hamilton SR, Smith RRL. The relationship between columnar epithelial dysplasia and invasive adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 301-12.
- Hamilton SR, Hutcheon DF, Ravich WJ, Cameron JL, Paulson M. Adenocarcinoma in Barrett's esophagus after elimination of gastroesophageal reflux. *Gastroenterology* 1984; 86: 356-60.
- Hamson LE, Sparen P, Nyren O. Increasing incidence of carcinoma of the gastric cardia in Sweden from 1970-1985. *Br J Surg* 1993; 80: 374-7.
- Hassall E. Barrett's esophagus: new definitions and approaches in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 345-64.
- PJ, Clapp RW, Doos WG, *et al.* The increasing frequency of adenocarcinoma of the esophagus. *Cancer* 1989; 64:526-30.
- Kohler B, Kohler G, Riemann JF. Spontaneous esophagotracheal fistula resulting from ulcer in heterotopic gastric mucosa. *Gastroenterology* 1988; 95:828-30.
- Lapertosa G, Barracchini P, Fulcheri E *et al.* Mucin histochemical analysis in the interpretation of Barrett's esophagus: results of a multicenter study. *Am J Clin Pathol* 1992; 98:61-66.
- Levi F, Vecchia CL. Adenocarcinoma of the esophagus in Switzerland. *JAMA* 1991; 265:2960.
- Liberman DA. Cost-effectiveness model for colon cancer screening. *Gastroenterology* 1995; 109: 1781-90.
- Mirvish SS, Huang Q, Chen SC, *et al.* Metabolism of carcinogenic nitrosamines in the rat and human esophagus and induction of esophageal adenocarcinoma in rats. *Endoscopy* 1993; 25: 627-31.
- Miwa K, Segawa M, Takano Y, *et al.* Induction of esophageal and forestomach carcinomas in rats by reflux of duodenal contents. *Br J Cancer* 1994; 70: 185-9.
- Miwa K, Hattori T, Miyazaki Y. Duodenogastric reflux and foregut carcinogenesis. *Cancer* 1995; 75:1426-32.
- Moller H, Lindvig K, Klefter R, *et al.* Cancer occurrence in a cohort of patients treated with cimetidine. *Gut* 1989; 30: 1558-62.
- Moller H. Incidence of cancer of esophagus, cardia and stomach in Denmark. *Eur J Cancer Prev* 1992; 1:159-64.
- Morales TG, Sampliner RE, Bhattacharyya MD. Intestinal metaplasia of gastric cardia. *Am J Gastroenrol* 1997; 92: 414-418.
- Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70:826-35.
- National Cancer Institute. Third National Cancer Survey: Incidence data. Monograph 41. Bethesda, MD. National Cancer Institute, 1975: 204.
- Ovaska J, Miettinen M, Kivilaakso E. Adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 1336-9.
- Pera M, Cameron AJ, Traskek VF, Carpenter HA, Zinsmeister AR. Increasing incidence of adenocarcinoma of esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104: 510-13.
- Pera M, Trastek VF, Carpenter HA, Allen MS, Deschamps C, Pairolero PC. Barrett's esophagus with high-grade dysplasia: an indication for esophagectomy? *Ann Thorac Surg* 1992; 54: 199-204.
- Pera M, Cardesa A, Bombi JA, *et al.* Influence of esophagojejunostomy on the induction of adenocarcinoma of the distal esophagus in Sprague-Dawley rats by subcutaneous injection of 2,6-dimethylnitrosomorpholine. *Cancer Res* 1989; 49: 6803-8.
- Peuchmaur M, Potet F, Goldfain D. Mucin histochemistry of the columnar epithelium of the esophagus (Barrett's esophagus). A prospective biopsy study. *J Clin Pathol* 1984; 37:607-610.
- Powell J, McConkey. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *Br J Cancer* 1990; 62:440-3.
- Qualman SJ, Murray RD, McClung HJ, *et al.* Intestinal metaplasia is age related in Barrett's esophagus. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:1236-40.
- Raphael HA, Ellis FH Jr, Dockerty MB. Primary adenocarcinoma of the esophagus: 18-year review of the literature. *AnnSurg* 1966; 164: 785-96.
- Robertson CS, Mayberry JF, Nicholson Da, James PD, Atkinson M. Value of endoscopic surveillance in the detection of neoplastic change in Barrett's esophagus. *Br J Surg* 1988; 75: 760-3.
- Ruiz B, Correa P, Torrado J *et al.* Lewis antigens and the prevalence of *Helicobacter pylori* infection, peptic ulcer and gastric carcinoma. /th Workshop of European *Helicobacter pylori* study group. *Am J Gastroenterol* 1994;89:133 (abstract).
- Sampliner RE, Kogan FJ, Morgan TR, Tripp M. Progression-regression of Barrett's esophagus (abstract). *Gastroenterology* 1985; 88: 1567.
- Seto Y, Kobori O, Shimizu T, *et al.* The role of alkaline reflux in esophageal carcinogenesis induced by N-amyl-N-methylnitrosamine in rats. *Int J Cancer* 1991; 49:758-63.

- Skinner DB, Walther BC, Riddell RH, Schmidt H, Lascone C, DeMeester TR. Barrett's esophagus. Comparison of benign and malignant cases. *Ann Surg* 1983; 198:554-66.
- Smith RRL, Hamilton SR, Boitnott JK, Rogers EL. The spectrum of carcinoma arising in Barrett's esophagus: a clinico-pathologic study of 26 patients. *Am J Surg Pathol* 1984; 8: 563.
- Spechler SJ, Robbins AH, Bloomfield R, Vincent ME, Heeren T, Doos WG, *et al.* Adenocarcinoma and Barrett's esophagus. An overrated risk? *Gastroenterology* 1984; 87: 927-33.
- Spechler SJ, Zeroogian JM, Antonioli DA, Wang HH, Goyal RK. Prevalence of metaplasia at the gastrooesophageal junction. *Lancet* 1994; 344: 1533-1536.
- Sprung DJ, Ellis FH, Gibb SP. Incidence of adenocarcinoma in Barrett's esophagus (abstract). *Am J Gastroenterol* 1984; 79: 817.
- Stein HJ, Barlow AP, DeMeester TR, *et al.* Complications of gastroesophageal reflux disease: Role of the lower esophageal sphincter, esophageal acid and acid/alkaline exposure, and duodenogastric reflux. *Ann Surg* 1992; 216: 35-43.
- Sutton R, Herd J, Youngson J, *et al.* Increasing incidence of adenocarcinoma of esophagus in women and men within the Mercey region from 1963-1987. *Gut* 1992; 33: A32 (abstract).
- Torrado J, Correa P, Ruiz B, Bernardi P, Zabala D, Bara J. Lewis antigen alterations in gastric cancer precursors. *Gastroenterology* 1992; 102:424-430.
- Torrado J, Correa P, Ruiz B, Zabala D, Bara J. Prospective study of lewis antigen alterations in the gastric precancerous process. *Cancer Epidemiology, Biomarker and Prevention* 1992;1:199-205.
- Torrado J, Ruiz B, Garay J, Lopez, Asenjo G, Tover JA, Cosme A and Correa P. Blood groups phenotypes, sulfomucins and Helicobacter pylori in Barrett's esophagus: *Am J Surg Path*, 1997a (in press).
- Torrado J, Ruiz B, Garay J, Cosme A, Arenas JI, Bravo JC, Fonham E and Correa P. Lewis, secretor and ABO phenotypes and sulfomucin expression in gastric intestinal metaplasia. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 1997b;6:287-289.
- Tuyns AJ. Oesophageal cancer in France and Switzerland: Recent time trends. *Eur J Cancer Prev* 1992; 1: 275-8.
- Van der Burgh A, Dees J, Hop WCJ, *et al.* Oesophageal cancer is an uncommon cause of death in patients with Barrett's esophagus. *Gut* 1996; 39:5-8.
- Van Der Veen AH, Dees J, Blankenstein JD, Van Blankenstein M. Adenocarcinoma in Barrett's esophagus: an overrated risk. *Gut* 1989; 30: 14-18.
- Williamson WA, Ellis FH, Gibb SP, *et al.* Barrett's esophagus: prevalence and incidence of adenocarcinoma. *Arch Intern Med* 1991; 151: 2212-2216.
- Winters C Jr, Spurling TJ, Chobanian SJ, *et al.* Barrett's esophagus. A prevalent, occult complication of gastroesophageal reflux disease. *Gastroenterology* 1987;92:118-24.
- Wright TA, Gray MR, Morris AI, Gilmore IT, Ellis A, Smart HL, Myskow M, Nash J, Donnelly RJ, Kingsnorth AN. Cost effectiveness of detecting Barrett's cancer. *Gut* 1996; 39: 574-579.
- Yang PC, Davis S. Incidence of cancer of the esophagus in the US by histologic type. *Cancer* 1988; 61: 612.

BIOLOGIA MOLECULAR EN EL ESTUDIO DE LOS TUMORES DEL ESTROMA GASTROINTESTINAL

J. J. Sola Gallego. A. Panizo Santos.
 Dpto. de Anatomía Patológica
 Clínica Universitaria de Navarra.

INTRODUCCION

El término tumor del estroma gastrointestinal (GIST) se emplea para designar al tipo más común de tumor mesenquimal del tracto gastrointestinal. Estos tumores mesenquimales pueden aparecer en todo el tracto GI (desde el esófago hasta el ano) y en ocasiones incluso en el mesenterio. Estos tumores tienen un amplio espectro clínico.

DEFINICION

Los GIST son tumores mesenquimales fusocelulares, epitelioides o pleomórficos en ocasiones, del tracto GI que expresan la proteína KIT (CD117) y que es detectable mediante inmunohistoquímica. La mayoría de los tumores mesenquimales del tracto GI son intensa y uniformemente inmunorreactivos con anticuerpos frente a la proteína KIT. Existen sin embargo otros tumores que pueden ser inmunorreactivos frente a KIT (melanoma metastásico, angiosarcoma, carcinoma de células pequeñas de pulmón, sarcoma de Ewing, mastocitoma y seminoma) que rara vez entran dentro del diagnóstico diferencial de los GIST.

Esta definición excluye aquellos tumores mesenquimales derivados del músculo liso (leiomiomas y leiomiomas), schwannomas y neurofibromas. Sin embargo, hay un pequeño grupo de tumores morfológicamente similares a los GIST pero que no expresan KIT. Estos tumores mesenquimales indiferenciados típicamente carecen de otros marcadores empleados en el diagnóstico diferencial de los GIST (CD34, MSA, desmina y proteína S-100). La clasificación de estos tumores con fenotipo nulo está abierta. Algunos trabajos los incluyen dentro de los GIST, mientras que otros los excluyen.

EPIDEMIOLOGIA

Se estima una incidencia de 10-20 GIST por millón de habitantes. De éstos, solamente el 20 al 30 % son tumores malignos. Los GIST son tumores típicamente de la edad adulta (individuos mayores de 55 años). La edad media en los diferentes trabajos publicados oscila entre los 55 y los 65 años. Algunos trabajos muestran un predominio en varones, aunque según otras series, no parece haber diferencia en cuanto al sexo. Los GIST son poco frecuentes antes de los 40 años y son excepcionales en niños.

Los GIST son más frecuentes en el estómago (60-70%), seguido por el intestino delgado (20-30%), colon y recto (5%) y esófago (<5%). En algunas ocasiones se han descrito GIST en localizaciones extragastrointestinales tales como peritoneo, mesenterio y serosa vesical.

PRESENTACION CLINICA

Los GIST de pequeño tamaño con frecuencia se detectan de forma casual en la serosa gástrica o intestinal durante intervenciones quirúrgicas por otras patologías. Los GIST se detectan también durante estudios gastroscópicos como nódulos submucosos.

Los GIST sintomáticos del esófago se presentan frecuentemente con disfagia o en ocasiones como tumores mediastínicos. Los GIST gástricos y los localizados en intestino delgado con frecuencia se presentan con síntomas vagos o poco específicos, aunque en ocasiones pueden debutar con hemorragia gastrointestinal alta. Los GIST localizados en el colon pueden debutar con hemorragia gastrointestinal baja, perforación del colon, dolor y obstrucción.

ESPECTRO MORFOLOGICO

Los GIST presentan un amplio rango de rasgos morfológicos dependiendo de su localización. El tipo morfológico más frecuente dentro de los GIST gástricos es el tumor fusocelular con poco o moderado colágeno intersticial. Algunos de estos tumores presentan un aspecto neural debido a la disposición en empalizada de los núcleos, mientras que otros muestran una vacuolización perinuclear destacada. Los GIST con aspecto epitelioides corresponden a los clásicamente designados leiomioblastomas, los cuales pueden tener un patrón sólido, mixoide, paraganglioma-like o carcinoide-like. Los GIST localizados en el intestino delgado con frecuencia tienen glóbulos de colágeno extracelular (fibras skenoides), descritos por Min.

MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS

Aproximadamente el 60-70 % de los GIST son inmunorreactivos para CD34. Basado en estudios de aproximadamente 300 GIST, los tumores esofágicos y rectales son los que con mayor frecuencia son CD34+ (más del 90%). Parece no haber diferencias de expresión de CD34 en los GIST benignos frente a los malignos. Los GIST localizados en el intestino delgado son los que expresan con menos frecuencia CD34.

Un subconjunto significativo de GIST también expresan actina muscular específica. Esta expresión puede ser focal o global, y de forma interesante es recíproca con la expresión de CD34: los tumores AMS+ son con frecuencia CD34- y viceversa. En algunos casos la inmunoreactividad para AMS del músculo liso atrapado de la pared gastrointestinal puede dificultar la interpretación.

La desmina, un filamento intermedio de 53 kDa típico de músculo liso, esquelético y cardíaco, se expresa de forma excepcional en algunos GIST, y generalmente en forma de células inmunorreactivas aisladas. Algunos autores han encontrado que aproximadamente un 5-10 % de los GIST contiene células tumorales positivas para desmina. Esta inmunoreactividad frente a desmina es más frecuente entre los GIST epitelioides.

Aunque los GIST son típicamente S100 negativos, un cierto porcentaje de ellos (aproximadamente un 10%) presentan inmunoreactividad citoplasmática o nuclear frente a la proteína S100, aunque generalmente de forma aislada y con poca intensidad.

La proteína caldesmón (una proteína del citoesqueleto que se une a la actina) se expresa típicamente en los GIST, en los leiomiomas y en los leiomiomas. Como todos los tumores mesenquimales, los GIST son típicamente

inmunorreactivos frente a vimentina. Son negativos para neurofilamentos y proteína fibrilar ácida glial. Según algunos autores la expresión de citoqueratinas en los GIST es mucho menos frecuente que la observada en los leiomiomas, y se da especialmente en los GIST malignos epitelioides.

PROTEINA KIT E HISTOGENESIS DE LOS GIST

Los GIST se definen inmunohistoquímicamente como tumores kit positivos. Típicamente esta positividad es difusa e intensa y citoplasmática en todas las células tumorales. En ocasiones la inmunoreactividad frente a KIT es menos intensa en los GIST con morfología epitelioides. La proteína KIT (CD117) es un receptor transmembrana del factor de crecimiento stem cell y pertenece a la familia de los receptores con actividad tirosin-quinasa.

Los GIST presentan similitudes con las células intersticiales de Cajal y por tanto se ha sugerido que derivan de este tipo celular. Otra posibilidad apuntada por otros autores es que estos tumores se originen de células madre pluripotenciales.

COMPORTAMIENTO Y FACTORES PRONOSTICOS

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que los GIST presentan un comportamiento variable según su localización. En el estómago la mayoría son benignos, mientras que los localizados en esófago y recto son en su mayor parte malignos.

Los GIST de pequeño tamaño son en su mayoría benignos, así como los que presentan una actividad mitótica baja (cinco o menos mitosis por 50 campos de gran aumento). Sin embargo existe un pequeño porcentaje de GIST mitóticamente inactivos que metastatizan. Ya que los GIST con bajo índice mitótico y comportamiento maligno son generalmente de gran tamaño, la combinación de bajo índice mitótico y pequeño tamaño (< 5 cm) puede predecir con mayor precisión un comportamiento benigno. Sin embargo, los GIST gástricos parecen tener un comportamiento menos agresivo que los localizados en el intestino delgado de tamaño e índice mitótico similar.

Los GIST con un índice mitótico igual o superior a 5 por 50 cga se designan habitualmente como malignos, y los que presentan más de 50 mitosis/50 cga se designan como GIST de alto grado de malignidad. Estos tumores presentan un alto riesgo de diseminación intra-abdominal y metástasis hepáticas (las dos principales vías de diseminación de los GIST malignos). Las metástasis óseas y pulmonares son raras.

Los factores pronósticos adversos clínico-patológicos estudiados en grandes series de GIST y que se han visto que son estadísticamente significativos incluyen: aneuploidía estudiada mediante citometría de flujo, tamaño tumoral menor de 5-6 cm, presencia de necrosis de coagulación, alto índice de proliferación medido mediante el índice Ki-67, sobreexpresión de p53, bcl-2 y c-myc.

CAMBIOS GENETICOS EN LOS GIST

Mediante estudios de citogenética se ha observado que los GIST presentan con frecuencia cariotipos complejos, con frecuentes pérdidas de los cromosomas 14 y 22. Algunos de estos cambios o alteraciones se han confirmado con técnicas de hibridación genómica comparativa (CGH). Mediante esta técnica se puede comparar de forma global los cambios en el número de copias de DNA en cada banda cromosómica entre el tumor y un control normal. Estos estudios pueden poner de manifiesto las áreas de pérdidas que pueden contener genes supresores tumorales. Las áreas que contienen ganancias o amplificaciones pueden representar localizaciones de diferentes oncogenes amplificados. Entre las pérdidas que se han encontrado tanto en los GIST benignos como malignos, destacan las localizadas en 14q y en 22q, que no están presentes en el resto de los tumores mesenquimales del tracto gastrointestinal. Estos hallazgos han hecho pensar a algunos autores que en esas zonas, en especial 14q, estaría localizado algún gen tumor específico implicado en el desarrollo de estos tumores. Estudios comparativos con CGH entre tumores clasificados como benignos y malignos con los criterios tradicionales han hallado que algunas amplificaciones en determinados loci ocurren de forma predominante en los GIST malignos, como por ejemplo la amplificación del cromosoma 5p o la pérdida extensa en 1p, lo cual sugiere que esta técnica molecular podría tener un valor predictivo pronóstico. Un hecho frecuentemente observado es que a diferencia de otros tumores malignos, el perfil de ganancias o pérdidas genéticas es prácticamente idéntico entre el tumor primario y las sucesivas recidivas o las metástasis.

Mediante estudios de pérdida de heterocigosidad (LOH), recientemente se han identificado tres áreas con mayor frecuencia de pérdidas: 14q11.1-q12 (D14S283), 14q23-q24.3 (D14S258) y 1p36.1-p36.33. Un trabajo reciente ha comprobado como todos los GIST (benignos y malignos) presentan pérdidas de heterocigosidad en 14p y 14q, mientras que únicamente los tumores malignos presentaban LOH en 22q, 9p y 9q. Otro trabajo ha confirmado cómo aquellos paciente son GIST que mostraban LOH en 1p36 tenían una supervivencia significativamente menor que aquellos pacientes cuyos GIST no mostraban esta alteración genética.

Mediante técnicas de biología molecular se ha estudiado en los GIST la actividad telomerasa y la expresión de las diferentes subunidades de esta enzima (hTERT y hTR), en un intento de encontrar otro factor molecular que sea útil para predecir el pronóstico. Recientes trabajos han comprobado como los GIST malignos expresan actividad telomerasa a niveles significativamente altos, mientras que los tumores benignos no presentan actividad de esta enzima.

Un aspecto que ha tomado especial relevancia en los últimos años por diferentes razones es el estudio de las alteraciones del gen Kit y sus implicaciones tanto diagnósticas como terapéuticas. Las descripciones iniciales detectaron en un reducido número de casos mutaciones que implican una activación de la proteína en el dominio yuxtamembranoso. Estas mutaciones afectan al exon 11 e incluyen preferentemente deleciones de 3 a 18 bases y en unos pocos casos mutaciones puntuales. Se ha comprobado la capacidad tumorigénica de estas alteraciones en células linfoides de ratón transfectadas con el DNA complementario mutado, e incluso se ha detectado la presencia de estas mutaciones en la línea germinal en pacientes de familias afectas de múltiples casos de GIST. Estos hallazgos iniciales se han ido expandiendo especialmente en lo que se refiere al número de casos e incluso a la presencia de alteraciones en otros exones. Así se ha visto que las mutaciones en el exon 11 se dan preferentemente en los casos de GIST malignos, aunque no exclusivamente. Sin embargo sólo se detecta en un 60% de los casos de media, con valores extremos entre el 21% y el 88%. Además aunque con mucha menos frecuencia se han encontrado alteraciones que afectan al exon 9 (5%), y al exon 13, compartiendo con la más frecuente el carácter activador de la función tirosin-quinasa. Sin embargo hay todavía resultados contradictorios en lo que se refiere al posible valor pronóstico de estas alteraciones. Diferentes autores, a veces del mismo país (Japón) han encontrado tanto diferencias significativas en la evolución de tumores con y sin la mutación, como comportamientos similares en ambos casos.

Como ya se ha comentado, prácticamente todas las mutaciones traen como consecuencia la activación de la función tirosin-quinasa del receptor Kit. Esta actividad es común a otros muchos oncogenes y ha sido objeto de intensos estudios destinados a la búsqueda de sustancias que inhiban esa actividad. Uno de ellos es el STI571, un derivado fenilaminopirimidínico con capacidad selectiva de inhibición de la actividad enzimática de muchas tirosin-quinazas entre las que se incluye la del c-Kit. Al día de hoy hay varios ensayos clínicos de su efectividad en el tratamiento de las metástasis de GIST con resultados muy prometedores.

BIBLIOGRAFIA

- Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999; 31(10):1037-51.
- Breiner JA, Meis-Kindblom J, Kindblom LG, McComb E, Liu J, Nelson M, Bridge JA. Loss of 14q and 22q in gastrointestinal stromal tumors (pacemaker cell tumors). *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 120(2):111-6
- Carrillo R, Candia A, Rodriguez-Peralto JL, Caz V. Prognostic significance of DNA ploidy and proliferative index (MIB-1 index) in gastrointestinal stromal tumors. *Hum-Pathol*. 1997; 28(2): 160-5.
- Chan JK. Mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a paradise for acronyms (STUMP, GIST, GANT, and now GIPACT), implication of c-kit in genesis, and yet another of the many emerging roles of the interstitial cell of Cajal in the pathogenesis of gastrointestinal diseases? *Adv Anat Pathol* 1999; 6(1):19-40.
- Cunningham RE, Federspiel BH, McCarthy WF, Sobin LH, O'Leary TJ. Predicting prognosis of gastrointestinal stromal smooth muscle tumors. Role of clinical and histologic evaluation, flow cytometry, and image cytometry. *Am J Surg Pathol* 1993; 17:588-594.
- El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Knuutila S, Miettinen M. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer-Res*. 2000; 60(14): 3899-903.
- El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Miettinen M, Knuutila S. High-resolution deletion mapping of chromosome 14 in stromal tumors of the gastrointestinal tract suggests two distinct tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 27(4): 387-91.
- El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M, Knuutila S, Andersson LC. DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer-Res*. 1996; 56(14): 3230-3.
- Emory TS, Derringer GA, Sobin LH, O'Leary TJ. Ki-67 (MIB-1) immunohistochemistry as a prognostic factor in gastrointestinal smooth-muscle tumors. *J Surg Pathol* 1997; 2:239-242.
- Emory TS, Sobin LH, Lukes L, Lee DH, O'Leary TJ. Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:82-87.
- Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki RM, Emory TS, Sobin LH, O'Leary TJ. KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1998; 78(12):1633-6.
- Franquemont DW, Frierson HF. Muscle differentiation and clinicopathologic features of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:947-954.
- Franquemont DW. Differentiation and risk assessment of gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol* 1995; 103:41-47.
- Fukasawa T, Chong JM, Sakurai S, Koshiishi N, Ikeno R, Tanaka A, Matsumoto Y, Hayashi Y, Koike M, Fukayama M. Allelic loss of 14q and 22q, NF2 mutation, and genetic instability occur independently of c-kit mutation in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91(12):1241-9.
- Graadt van Roggen JF, van Velthuysen ML, Hogendoorn PC. The histopathological differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumours. *J Clin Pathol* 2001; 54(2):96-102.

- Günther T, Chneider-Stock R, Häckel C, et al. Telomerase activity and expression of hTERT and hTR in gastrointestinal stromal tumors in comparison with extragastrointestinal sarcomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1811-1818.
- Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Zigler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000; 96(3):925-32
- Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nakamura J, Okazaki T, Kitamura Y. Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 2001; 193(4):505-10.
- Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y, O'Brien P, Kapusta L, Dardick I. Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-kit gene. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(2):326-7.
- Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med*. 2001; 344(14): 1052-6.
- Kim NG, Kim JJ, Ahn JY, et al. Putative chromosomal deletions on 9p, 9q, and 22q occur preferentially in malignant gastrointestinal stromal tumors. *Int J Cancer* 2000; 85:633-638.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 1998; 152(5):1259-69.
- Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-Kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999; 154(1):53-60.
- Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am J Pathol* 2000; 157(4):1091-5
- Lerma E, Oliva E, Tugues D, Prat J. Stromal tumors of the gastrointestinal tract: a clinicopathological and ploidy analysis of 33 cases. *Virch Arch* 1994; 424:19-24.
- Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G, Xiao S, Singer S, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156(3):791-5.
- Miettinen M, Monihan JM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Carr NJ, Emory TS, Sobin LH. Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery: clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am J Surg Pathol* 1999; 23(9):1109-18.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999; 30(10):1213-20.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas in the colon: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(10):1339-52.
- Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Sobin LH, Lasota J. Esophageal stromal tumors: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 17 cases and comparison with esophageal leiomyomas and leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(2):211-22.
- Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Mod Pathol* 2000; 13(10):1134-42.
- Miettinen MM, Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Lasota J. Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicates traits of smooth muscle differentiation. *Mod Pathol* 1999; 12(8):756-62.
- Mikhael AI, Bacchi CE, Zarbo RJ, Ma CK, Gown AM. CD34-expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract. *Appl Immunohistochem* 1994; 2:89-93.
- Min KW. Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural investigations. *Am J Surg Pathol* 1992; 16:145-155.
- Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR, Rumpel CA, Franquemont DW, Frierson HF Jr. Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 1999; 18(10):1897-902.
- Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Hase-Sawada N, Taniguchi M, Nishida T, Kanayama S, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y. A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 1998 Nov;115(5):1090-5.
- Nishida T, Hirota S, Taniguchi M, Hashimoto K, Isozaki K, Nakamura H, Kanakura Y, Tanaka T, Takabayashi A, Matsuda H, Kitamura Y. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT. *Nat Genet* 1998; 19(4):323-4.
- O'Leary T, Ernst S, Przygodzki R, Emory T, Sobin LH. Loss of heterozygosity at 1p36 predicts poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1999; 79:1461-1467.

- Panizo Santos A, Sola I, Vega F, de Alava E, Lozano MD, Idoate MA, Pardo-Mindán FJ. Predicting metastatic risk of gastrointestinal stromal tumors: role of cell proliferation and cell cycle regulatory protein. *Int J Surg Pathol* 2000; 8(2):133-144.
- Reith JD, Goldblum JR, Lyles RH, Weiss SW. Extragastrintestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod Pathol* 2000; 13(5):577-85.
- Robinson TL, Sircar K, Hewlett BR, Chorneyko K, Riddell RH, Huizinga JD. Gastrointestinal stromal tumors may originate from a subset of CD34-positive interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 2000; 156(4):1157-63.
- Rudolph P, Gloeckner K, Parvaresh R, Harms D, Schmidt D. Immunophenotype, proliferation, DNA-ploidy, and biological behaviour of gastrointestinal stromal tumors: a multivariate clinicopathological study. *Hum Pathol* 1998; 29:791-800.
- Sakurai S, Fukasawa T, Chong JM, Tanaka A, Fukayama M. C-kit gene abnormalities in gastrointestinal stromal tumors (tumors of interstitial cells of Cajal). *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(12):1321-8.
- Sarlomo-Rikala M, El-Rifai W, Lahtinen T, Andersson LC, Miettinen M, Knuutila S. Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. *Hum-Pathol*. 1998; 29(5): 476-81.
- Sakurai S, Fukayama M, Kaizaki Y, et al. Telomerase activity in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1998; 83:2060-2063.
- Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Mod Pathol* 1998; 11(8):728-34.
- Schmid S, Wegmann W. Gastrointestinal pacemaker cell tumor: clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study with special reference to c-kit receptor antibody. *Virchows Arch* 2000; 436(3):234-42.
- Seidal T, Edvardsson H. Expression of c-kit (CD117) and Ki-67 provides information about the possible cell origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumors. *Histopathology* 1999; 34:416-424.
- Sola I, Panizo A, Zudaire I, Calasanz MJ, Lozano MD, Pardo J, Idoate MA, de Alava E. Chromosomal aberrations of malignant gastrointestinal stromal tumors (GIST) detected by CGH. *Mod Pathol* 2000; 13(1):89A (abstract).
- Suster S. Gastrointestinal stromal tumors. *Semin Diagn Pathol* 1996; 13:297-313.
- Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999; 59(17):4297-300.
- Tazawa K, Tsukada K, Makuuchi H, Tsutsumi Y. An immunohistochemical and clinicopathological study of gastrointestinal stromal tumors. *Pathol Int* 1999; 49(9):786-98.
- Ueyama T, Guo K-J, Hashimoto H, Daimaru Y, Enjoji M. A clinicopathologic and immunohistochemical study of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer* 1992; 69:947-955.
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ, De Laet MH, Vanderhaeghen JJ, Schiffmann SN. CD34 immunoreactivity and interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2000; 302:145-153.
- Wang L, Vargas H, French SW. Cellular origin of gastrointestinal stromal tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:1471-1475.

CORRELACIÓN ENTRE ECOGRAFÍA ENDORRECTAL Y ANATOMÍA PATOLÓGICA EN LA ESTADIFICACIÓN PARIETAL Y LINFOGANGLIONAR DEL CÁNCER DE RECTO.

J. Ortego, M.J. Palacios y J.M. Ramírez.
Dptos de Anatomía Patológica y Cirugía
Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa”, Zaragoza

INTRODUCCIÓN

La ecografía endorrectal está considerada actualmente como la técnica más precisa para la estadificación preoperatoria de los tumores de recto (uTM).

Utilizamos el patrón de normalidad establecido por Beynon en 1985 (1) y la clasificación de Hildebrant (2). Este patrón está formado por 5 capas concéntricas que se alternan en distinta ecogenicidad. La anatomía ecográfica de la pared rectal normal se interpreta según el siguiente esquema:

1er. anillo: hiperecoico (blanco), corresponde a la interfase entre el agua de llenado, la pared del globo de látex y la mucosa rectal.

2º anillo: hipoeoico (negro), corresponde a la muscularis mucosae.

3er. anillo: hiperecoico, (blanco, anillo central) corresponde a la interfase entre mucosa y muscular propia, es decir, a la submucosa.

4º anillo: hipoeoico (negro), corresponde a la capa muscular propia.

5º anillo: hiperecoico (blanco, el más externo) y corresponde a la interfase entre la muscular propia y la grasa perirrectal.

Yamashita (3) describe cuatro anillos hiperecoicos y tres hipoeoicos debiéndose el incremento de dos anillos considerados por este autor a la diferenciación de las dos capas que constituyen la muscular propia, entre las que habría una interfase hiperecoica. La visualización de estos siete anillos se debe a la utilización de transductores de alta frecuencia y si hay edema en los tejidos, pero carece de relevancia clínica.

El nivel de invasión local parietal de cada tumor viene definido por la alteración ecográfica de las distintas capas de la pared rectal. Esto da lugar a la clasificación UICC-TNM, colocando delante de la T una “u” de ultrasonografía (tabla 1).

Tabla 1.

Estadio	Niveles de invasión parietal. Clasificación UICC-TNM
uT1	La lesión rompe la muscularis e invade la submucosa. Capa muscular propia íntegra
uT2	Infiltración de la muscular propia. Tejido perirrectal no afectado. Última capa blanca libre
uT3	Rotura de la última línea blanca, con invasión tumoral de la misma
uT4	Invasión de estructuras vecinas (próstata, útero, vagina, etc.).

La ecografía permite la determinación de la invasión de los ganglios linfáticos. Se visualizan como imágenes redondeadas hipoeogénicas, debiendo diferenciarse los ganglios linfáticos inflamatorios de los metastásicos.

Cada vez más, el cirujano colorrectal basa la decisión quirúrgica del cáncer de recto principalmente en los hallazgos de la ecografía endorrectal referidos a estadio de penetración tumoral en la pared rectal e invasión linfoangliar.

De la información así obtenida toma la decisión terapéutica: cirugía local *versus* cirugía radical convencional, junto con otros tratamientos complementarios. Los estudios realizados coinciden en que la fiabilidad de la ecografía endorrectal oscila entre el 80-90% para determinar la invasión parietal rectal y del 50-75% en cuanto a la metástasis linfoglangiolar.

Las principales imprecisiones se producen por sobreestadificación y en menor medida por infraestadificación de la extensión local de los tumores y por error en la interpretación de los ganglios linfáticos. El conocimiento de los posibles errores de la ecografía endorrectal y sus causas pueden ayudar a mejorar la precisión de ésta.

El objetivo del estudio es evaluar de forma prospectiva la eficacia diagnóstica de la ecografía endorrectal en la estadificación preoperatoria de la invasión parietal por los tumores de recto y la existencia o no de metástasis linfoglangiarias, así como analizar las causas de los errores cometidos.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Pacientes: Estadificamos 120 pacientes (75 varones y 45 mujeres) con carcinomas de recto, entre junio de 1996 y diciembre de 1998, mediante ecografía endorrectal. La edad media de los pacientes fue de 70 años, con un rango de 39-95. Todos los tumores se situaron en los 20 centímetros distales del recto.

Material: el equipo utilizado fue un ecógrafo B&K modelo 2003, con sonda 1850 que incorpora un transductor multifrecuencia de 5,7 y 10 Mhz. Este equipo proporciona una imagen sagital que girando a una velocidad de 5 ciclos/seg permite ver una imagen de 360°.

Técnica:

Las exploraciones se realizaron ambulatoriamente. La preparación consistió en enema de limpieza y los pacientes se situaron en decúbito lateral izquierdo. Todas las exploraciones se registraron en papel y/o cinta de vídeo.

Se coloca el transductor en la punta de la sonda, se recubre con una pequeña bolsa de látex, que se rellena con agua desgasada evitando las burbujas. Se introduce la sonda en el recto, a través de un rectoscopio rígido, de 20 mm de diámetro, lo que permite lograr una inserción alta segura, sobrepasando el tumor. A partir de esta localización se va retirando la sonda, obteniendo así imágenes seriadas del tumor.

Método:

Preoperatoriamente, se realiza una ecografía endorrectal in vivo a cada paciente y se aplica la clasificación uTNM de Hildebrant.

Tras la extirpación quirúrgica del recto, se hizo ecografía in vitro de la pieza de resección suspendida en un baño de agua (ref). Cada nódulo detectado ecográficamente in vitro, fue marcado individualmente, mediante una serie de señales con hilos de sutura y agujas de distintos colores, tamaños y formas, para facilitar y asegurar su posterior identificación individual en el momento de la disección linfoganglionar.

Luego, se abrió la pieza quirúrgica por la cara posterior, se claveteó con agujas hipodérmicas en un tablero de corcho y sumergió en una solución de formol tamponado al 10%. Tras fijación de 24 a 48 horas, se hizo la disección linfoganglionar, reflejando en un mapa, realizado a tamaño natural, la ubicación de cada uno de los ganglios linfáticos en la situación localizada en la ecografía in vitro.

Cada ganglio linfático así disecado se partió en dos mitades, siguiendo la línea del ecuador y se introdujo cada uno en una cassette, de forma separada

Las piezas de resección fueron estudiadas por el patólogo, desconocedor de los resultados ecográficos previos. Los tumores se clasificaron por nivel de profundidad intraparietal rectal y según la afectación linfoganglionar, siguiendo la clasificación TNM.

Se compararon los resultados de la ecografía con los del informe histopatológico de la pieza quirúrgica, excluyendo los pacientes intervenidos paliativamente y aquellos que habían sido sometidos a radioterapia preoperatoria.

En los casos de error diagnóstico, se revisaron de nuevo la pieza de exéresis, las imágenes de la ecografía endorrectal y las características clinicopatológica, con el fin de descubrir, si era posible, las causas de error.

Estadística:

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el test de correlación de Spearman.

RESULTADOS

41 de los 120 pacientes estudiados se clasificaron como uTis-uT1, 10 como uT2, 60 uT3 y 9 como uT4. La correlación entre los resultados ecográficos y la anatomía patológica fue del 90%. La ecografía y el estudio histopatológico coincidieron en 108 pacientes. El coeficiente de correlación de Spearman fue de 0,9.

En 31 pacientes se estableció el diagnóstico ecográfico de afectación linfoganglionar (un1) y en 89 pacientes no se detectaron ganglios linfáticos metastatizados (uN0). La correlación ecográfica-histopatológica en la invasión linfoganglionar fue del 70% y el coeficiente de correlación de Spearman de 0,7. Hubo 12 errores en la estadificación. 7 pacientes fueron sobreestadificados y 5 infraestadificados: 3 pacientes clasificados como uT1 correspondían histopatológicamente a PT2. 2 pacientes clasificados como uT2 eran en realidad PT3, y 7 pacientes estadificados en uT3 eran PT2 (tabla 2).

Tabla 2. Análisis prospectivo de los tumores rectales estadificados mediante ecografía endorrectal. Comparación ecografía/patología

pT1	pT2	pT3	pT4	Total	
uT1	38	3*	-	-	41
uT2	-	8	2*	-	10
uT3	-	7*	53	-	60
uT4	-	-	-	9	9
Total	38	18	55	9	120

* errores cometidos

Los ganglios linfáticos visualizados en el estudio ecográfico in vivo eran siempre mayores de 5mm y se localizaban alrededor del tumor o en los 7 cm proximales al mismo, no detectándose ninguno a una distancia mayor.

Estos ganglios se diferencian de otros nódulos que aparecen como imágenes peritumorales de límites imprecisos y ecogenicidad mixta, que corresponden a satélites tumorales en mesorrecto.

La ecografía endorrectal in vitro confirmó siempre los hallazgos del estudio preoperatorio, pero localizó un número superior de ganglios situados hasta los 10 cm proximales y de un diámetro tan pequeño como 3mm.

Discusión

La ecografía endorrectal es actualmente el método de elección para la evaluación preoperatoria del cáncer rectal. Su precisión para determinar la **invasión parietal rectal** y la **afectación linfoganglionar** es superior a otros métodos como examen digital, TC y RNM.

La mayor trascendencia de conocer preoperatoriamente el nivel de **extensión local** de los tumores de recto está relacionada con la elección de la estrategia quirúrgica.

A pesar de ser el método más preciso en la estadificación del cáncer rectal, es posible intentar mejorar su fiabilidad, para lo cual es conveniente conocer los errores producidos y sus posibles causas, para así ayudar a mejorar la técnica y en consecuencia el grado de precisión.

En general, los errores en la interpretación de las imágenes ecográficas se traducen en sobre e infraestadificación de los tumores rectales, como consecuencia de problemas técnicos, características del propio tumor y dificultades en la valoración linfoganglionar.

Es más importante la repercusión que puede tener la infraestadificación, porque derivaría en un tratamiento insuficiente.

La mayor parte de los errores ecográficos son por sobreestadificación. El más común se da en la diferenciación entre tumores pT2 en los que la existencia de cambios inflamatorios, desmoplásicos, hipervascularización en zonas limítrofes al tumor, producen un imagen hipoecoica en la pared rectal, que es fácilmente interpretada como áreas de carcinoma y se clasifican así como uT3. Esta distinción es relevante clínicamente, porque las acciones terapéuticas son diferentes.

La infraestadificación se produce principalmente por infravalorar la afectación linfática, sobre todo en lesiones estenóticas en que no se puede valorar correctamente los tejidos pararectales.

Hemos analizado individualmente los casos erróneos mediante protocolo elaborado para estudiar las causas de error (tabla 3).

Tabla 3. Análisis de las causas errores en la estadificación de tumores rectales.

3 uT1→ pT2	1: Mala preparación intestinal 2: Tumor a 18 cm de margen anal 3: Tumor estenosante y de gran tamaño
2 uT2→ pT3	1: Tumor próximo a margen anal (2cm) 2: Paciente con biopsia previa
7 uT3→ pT2	1, 2: Tumores próximos a margen anal (2 y 3cm) 3: Mala preparación intestinal 4, 5: Tumores estenosantes 6, 7: Cambios inflamatorios y desmoplásicos

En nuestra serie, la sobreestadificación se debió principalmente a la dificultad en diferenciar zonas tumorales de cambios inflamatorios y desmoplásicos, y la infraestadificación a problemas técnicos y derivados del propio tumor.

Tres tumores muy próximos al margen anal fueron incorrectamente valorados. Dos fueron sobreestadificados, ya que fueron considerados preoperatoriamente como uT3 y eran en realidad pT2, y un tumor pT3 fue clasificado previamente como uT2.

Son de difícil interpretación los tumores localizados en el propio margen anal y también los situados en la unión rectosigmoidea. En el primer caso porque el balón con frecuencia no puede pasar a través del esfínter anal y tiene que ser deshinchado, por lo que las capas de la pared rectal se diferencian pobremente. La unión rectosigmoidea es especialmente conflictiva porque es difícil establecer y mantener contacto acústico con la pared, al no tener sujeción ni fijación del mesorrecto. Un tumor situado a 18 cm de margen anal que fue clasificado uT1 era en realidad pT2. Para evitar este tipo de errores hay que dedicar más tiempo a la exploración de estos casos e ir rectificando la posición del paciente para cambiar la angulación del intestino.

Otras causas de error fueron la mala preparación del intestino que motivó dos de nuestros errores. Un tumor se sobreestadificó (uT3→pT2) y otro se infraestadificó (uT1→pT2). También provocan errores las burbujas de aire en el balón, que hay que extraer antes de insertar el transductor, los restos fecales que pueden simular un tumor vellosos, por lo que es necesario realizar siempre un enema de limpieza antes de la exploración.

Otros artefactos están determinados por los ecos producidos por clips metálicos, aire y líquido en cráteres de tumores úlcero-excavados, intersticios de masas vellosas y el aire de otros tramos del sigma.

La valoración de los tumores vellosos es siempre difícil ya que originan una imagen de superposición de capas que induce a sobreestimar la invasión tumoral real. La submucosa es la clave diagnóstica, ya que su

integridad hace que el tumor sea clasificado como no infiltrante, es decir, benigno.

El principal problema en la valoración ecográfica lo constituyen los tumores estenosantes, siendo necesario sobrepasar la lesión para que pueda ser evaluada correctamente, lo cual no siempre es posible.

Otros factores dependientes del tumor como hemorragia, inflamación reactiva y desmoplásia, originan zonas hipoecóicas que inducen a confusión en general por sobreestadificación.

En conclusión, corrigiendo los errores evitables la ecografía endorrectal puede proporcionar una precisión del 96,66%, en cuanto al estadio de infiltración parietal, lo que reafirma nuestra opinión de que es la prueba de elección en la estadificación del cáncer rectal.

Los **ganglios linfáticos** normales no se observan, por ser su ecoestructura similar a la de la grasa perirrectal. Su tamaño suele ser menor de 3 mm. Cuando en la ecografía, de un paciente con cáncer rectal, no se precian ganglios, la posibilidad de que haya metástasis linfoganglionares es muy baja.

El aumento del tamaño linfoganglionar se puede deber a inflamación reactiva o a metástasis. Habitualmente, los ganglios **inflamatorios** son hiperecóicos, tienen 4 mm de diámetro o más, patrón homogéneo, contorno ovalado y margen neto.

Los ganglios **metastatizados** suelen tener un patrón hipoecoico irregular (más que el tumor primario), redondeados y de borde bien delimitado.

Se puede observar un tercer tipo de nódulos, constituido por **satélites** tumorales o implantes neoplásicos en el espesor de la grasa perirrectal, no relacionados con tejido linfoganglionar conservado y que pueden corresponder bien a ganglios linfáticos previos sustituidos y desbordados por la metástasis linfoganglionar, o a implantes tumorales a distancia (satélites primarios o puros) y que no tienen por tanto connotaciones de verdadera metástasis linfoganglionar de cara a la estadificación, aunque sin embargo tienen serias consecuencias para el pronóstico y el diseño de la estrategia terapéutica del caso. Ocasionalmente, los vasos sanguíneos cortados transversalmente pueden dar lugar a falsos positivos.

En 31 pacientes se estableció el diagnóstico ecográfico de metástasis linfoganglionar (Un1) y en 89 pacientes no se detectaron metástasis linfoganglionares (Un0). la correlación ecográfica e histológica en el diagnóstico de metástasis linfoganglionar fue del 70% de los 12 errores de estadificación 7 fueron por sobre estadificación y 5 por infraestadificación.

La principal deficiencia que presenta la ecografía endoluminal rectal es la diferenciación entre ganglios linfáticos inflamatorios y metastásicos. Se han empleado como parámetros diferenciales el tamaño linfoganglionar y la distinta ecogenicidad entre ellos (hipoecoico = tumoral, hiperecoico = inflamatorio). Sin embargo, estos dos aspectos no son suficientes para lograr una fiabilidad adecuada, es por ello que estamos actualmente estudiando una serie de parámetros de las imágenes ecográficas que nos puedan permitir, tras el oportuno análisis matemático y estadístico, la segregación de variables ligadas específicamente a cada una de las tres posibles situaciones a discriminar: ganglio linfático reactivo inflamatorio, metástasis linfoganglionar y satélite tumoral intrameso.

En la actualidad, el tratamiento más adecuado del cáncer de recto, que sigue siendo fundamentalmente quirúrgico, consiste en individualizar a cada paciente ofreciéndole la mejor alternativa.

La mayoría de pacientes con cáncer de recto localizado en tercios medio y superior puede beneficiarse de resección anterior y restauración de la continuidad intestinal. Pero, para los tumores de tercio distal hay distintas alternativas (cirugía radical versus cirugía conservadora) y la elección de una u otra se basa en una valoración preoperatoria adecuada del tumor, en aspectos como tamaño, estadio de penetración local y afectación linfoganglionar, y es aquí donde la ecografía endorrectal se está mostrando como la técnica más eficaz para una adecuada selección.

Con ella se puede seguir una serie de pautas de tratamiento, dividiendo a los pacientes en cinco grupos:

Grupo 1. Estadio uT1N0: excisión local.

Grupo 2. Estadio uT2N0: excisión local + tratamiento adyuvante.

Grupo 3. Estadios uT2N1 y uT3N0: cirugía radical + radio y quimioterapia preoperatoria en algunos pacientes.

Grupo 4. Estadio uT3N1: cirugía radical + radioterapia preoperatoria

Grupo 5. Estadios uT4N0 y uT4N1: radioterapia preoperatoria.

La ecografía endorrectal tiene además otras indicaciones como son descartar la malignización de adenomas vellosos de recto, detectar tumores susceptibles de excisión local, seleccionar pacientes para tratamiento radioterápico, seguimiento de pacientes intervenidos por neoplasias de recto y detección precoz de recidivas y estudio de lesiones extrarrectales.

Bibliografía

1. M.J. Palacios, J.M. Ramírez. Valor de la ecografía endoluminal en coloproctología. Rev. Esp. Ecogr

- Dig 2000; 2 (2): 69-80.
2. Palacios M.J., Ramírez J.M., Aguilera V. y col. Ecografía endorrectal en los tumores de recto: eficacia, causas de error y limitaciones. Rev. Esp. Enf. Digest. 2000; 92 (4); 222-226.
 3. Palacios M.J., Ramírez J.M., Lozano R., Ortego J. y col. Estudio escográfico del mesorrecto: ¿qué, como y donde buscar? en: 3ª Reunión Nacional de la Asociación Española de Coloproctología. Valencia, 19-20, noviembre 1999.
 4. Yamashita Y, Mati J., Shilouzu K, et all. Evaluation of endorectal ultrasound for the assessment of wall invasion of rectal cancer. Dis Colon Rectum. 1988; 31: 617-623.
 5. Hildebrant U., Shiefel G. Preoperative staging of rectal cancer by intrarectal ultrasound. Dis Colon Rectum. 1985; 28: 42-6.

INFECCION POR HELICOBACTER PYLORI Y CANCER GASTRICO

A.Echarri, JM Martínez-Peñuela. Hospital de Navarra. Pamplona.

ADENOCARCINOMA GASTRICO. INTRODUCCION

En las últimas décadas, se ha observado una disminución global en la incidencia de cáncer gástrico (CG), aunque sigue manteniendo gran variabilidad geográfica. Países como Chile, Colombia o Irlanda presentan una prevalencia alta, es la neoplasia más frecuente en regiones como China o Japón, ocupando el segundo puesto en el ranking mundial de mortalidad por cáncer. (1-6)

Por otra parte, el nexo de unión entre CG e infección por *Helicobacter pylori* (HP) cada vez adquiere más relevancia, planteándose la erradicación indiscriminada o la vacunación de la población en zonas de alto riesgo (5-9)

La reducción del número de casos de CG afecta preferentemente al tipo más frecuente, el adenocarcinoma tipo intestinal de localización distal (clasif. Lauren y Ming), no siendo tan notable para el tipo difuso e incluso observándose, un aumento llamativo en localizaciones más proximales. La clasificación del CG como difuso o intestinal no siempre es posible, pero parecen representar desordenes con distintos factores epidemio-etiológicos lo que explicaría sus diferencias en incidencia. (3,10)

A la vez que disminuía el CG distal, se iba observando un incremento progresivo de casos de CG proximal y de la unión gastroesofágica, con un ritmo de crecimiento que supera a neoplasias tan frecuentes como el melanoma o el cáncer de pulmón. Se especula con el papel que HP pueda jugar en la aparición del cáncer proximal. Para algunos actuaría como cofactor neoplásico al ascender hacia la región subcardial, bien como resultado de ineficaces terapias erradicadoras o al extenderse el proceso atrofia/metaplasia. Para otros, representaría un paradójico factor protector, basándose sobre todo en las experiencias de pacientes con reflujo(10-13). Tras la erradicación de HP en pacientes con RGE, se observa una mayor dificultad de control sintomático con su medicación habitual y una mayor incidencia de complicaciones, entre ellas esófago de Barrett que contribuiría al incremento del número de cánceres de esófago distal o cardial.

ASPECTOS ETIOLOGICOS DEL CANCER GASTRICO

La relación variable entre incidencia de CG y área geográfica viene determinada por la distinta exposición a factores medioambientales. Se han realizado diversos estudios epidemiológicos para valorar los cambios de incidencia de CG en grupos de inmigrantes, observándose que inicialmente se mantiene el riesgo de CG de la población origen, asumiendo en la segunda o tercera generación el de la población de acogida, es decir que la exposición temprana, a uno o más factores ambientales es determinante en el desarrollo del cáncer. (1,2)

Dentro de los factores medioambientales que influyen en el desarrollo del CG, señalar los distintos **patrones dietéticos**. La ingesta de ahumados y salazones por su alto contenido en nitratos, favorece el desarrollo de CG. Por acción bacteriana, se convierten en **nitritos** (nitrosaminas/nitrosamidas) de capacidad mutagénica y carcinogénica. El **consumo elevado de sal** favorece la replicación celular aumentando la efectividad de carcinógenos conocidos como la N-metil-N-nitrosoguanidina. La refrigeración y los métodos actuales de preservación de alimentos han contribuido a la disminución del CG al desterrar las antiguas técnicas de salazón y ahumado. Es aconsejable potenciar la ingesta de una **dieta "protectora", rica en frutas y verduras**, por su alto contenido en **antioxidantes (vit. E y vit. C)**. (14-18)

La **hipoaclorhidria gástrica** mantenida, asociada a ciertas patologías (gastritis atrófica, anemia perniciosa, situaciones post-cirugía), determina un mayor riesgo para CG. El sobrecrecimiento bacteriano favorecido por esta situación facilita la formación de nitritos y nitrosaminas, así como la disminución de la concentración luminal de vit. C. (14-20)

Existe cierta agrupación familiar del CG, aunque no se han logrado definir factores genéticos concretos y, al menos en parte puede estar mediada por factores medioambientales. El CG difuso es más frecuente entre portadores del **grupo sanguíneo A** y se han observado casos en gemelos univitelinos sin haberse detectado por el momento, asociación con el antígeno HLA.

INFECCION POR HELICOBACTER PYLORI Y CANCER GASTRICO

ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS

Factores económicos y socioculturales influyen tanto en la prevalencia de la infección como en el desarrollo de CG, siendo más frecuentes en poblaciones de **bajo nivel socioeconómico**. Se han publicado distintos estudios serológicos que confirman esta relación y que demuestran una alta prevalencia de anticuerpos frente a HP en zonas de elevada incidencia de CG (2)

Se han realizado numerosos estudios con el objetivo de valorar el efecto de la migración sobre el CG que ponen de manifiesto la influencia de factores ambientales (infección por HP entre otros) en las primeras décadas de la vida. Estudios serológicos retrospectivos que comparan la prevalencia de anticuerpos anti-HP entre sujetos con CG y un grupo control, demuestran una asociación significativa HP/CG, y un incremento del riesgo de CG en sujetos infectados (OR=1,6-4,7). El análisis serológico prospectivo de muestras procedentes de bancos de suero, ha mostrado prevalencias más altas de infección por HP en pacientes con CG, determinándose un riesgo 3-6 veces superior en individuos infectados. (9,21,22)

PATOGENIA

La colonización de la mucosa gástrica por HP condiciona distintas lesiones inflamatorias. Inicialmente se aprecia una gastritis superficial que puede evolucionar, a través de un prolongado proceso multifactorial hacia la atrofia y el desarrollo de metaplasia. Esta lesión, considerada preneoplásica se asocia con un mayor riesgo de aparición de CG (tipo intestinal), calculándose un RR de 9.1 si se compara con sujetos sanos no infectados. La gastritis superficial inicial, supondría en si misma, un mayor riesgo para el desarrollo de carcinoma, si bien en menor medida, calculándose un RR de 2,5. (23-28)

Se ha sugerido que la gastritis superficial se relacionaría con el CG de tipo difuso, mientras que el tipo intestinal lo haría con la gastritis crónica atrófica, con una mayor presencia de metaplasia intestinal.

Ambos tipos de gastritis representan estadios consecutivos de una misma infección, por lo tanto la aparición de uno u otro tipo de CG se relaciona con factores ambientales que actúan en distintos niveles del proceso. El CG tipo difuso es más frecuente en pacientes jóvenes, mientras que el tipo intestinal se observa en pacientes de mas edad y con mayor prevalencia de gastritis atrófica, es decir que la diferenciación del CG hacia uno u otro tipo histológico dependerá del estado evolutivo de la gastritis, de inflamación superficial a atrofia. (26-29).

Múltiples estudios demuestran que el CG tipo intestinal o endémico, es el producto final de un prolongado proceso multifactorial desarrollado en diversas etapas y en el que el suceso clave lo constituye la aparición de la atrofia gástrica.

La gastritis crónica superficial puede progresar hacia una gastritis atrófica con metaplasia. No todas las áreas de metaplasia presentan un riesgo de CG similar. Las lesiones con metaplasia intestinal tipo IIB (o III), metaplasia enteróide incompleta con predominio de sulfomucinas, son las de mayor riesgo, considerándose incluso por ciertos autores lesiones displásicas. La gastritis crónica atrófica con metaplasia podría evolucionar a través de la displasia hacia adenocarcinoma, estimándose un riesgo de cáncer gástrico de 3 a 6 veces superior. (25-29).

Considerando que la infección por HP es la principal causa de gastritis crónica, y que la evolución histológica de la gastritis lleva a la atrofia y a la metaplasia en un alto porcentaje de casos, podría considerarse a HP como uno de los principales factores en el desarrollo del CG. No obstante, la progresión hacia la atrofia depende, no tanto de la presencia de la bacteria como de otros factores concomitantes, considerándose en la actualidad, un proceso multifactorial mediado por factores medioambientales (entre ellos HP) y genéticos. (6,27-30).

MECANISMOS CARCINOGENICOS

Recientemente la OMS clasificó HP como carcinógeno tipo I (factores con capacidad carcinogénica probada). No se ha demostrado que HP produzca agentes carcinógenos lesivos que actúen directamente sobre la mucosa gástrica, más bien están implicados diversos mecanismos indirectos que ejercen su acción durante un tiempo prolongado de infección.

La infección por HP produce un daño en el epitelio mucosecretor glandular que se acompaña de **permeación por células inflamatorias**, especialmente linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos. Las células epiteliales tras la adhesión bacteriana, liberan interleukina-8 que junto con factores citotóxicos del propio germen, favorecen la **activación** de PMN y la **liberación de proteasas** y **metabolitos reactivos de oxígeno**. El **estallido oxidativo** puede dañar el ADN e inducir **mutaciones** en las células germinales mucosas. Si estos daños no se reparan (alteraciones de la apoptosis, de proteínas reguladoras del ciclo, p53 u otros oncogenes) el proceso culminaría con la aparición del CG. La actividad inflamatoria incluso puede **alterar el ADN** de genes supresores de oncogenes inactivándolos y favoreciendo por lo tanto el desarrollo neoplásico. (26,31-33)

En sujetos infectados por HP se ha observado un **aumento del grado de proliferación celular** mediado por factores de crecimiento epidérmico (factores liberados por el germen, hipergastrinemia) que remite tras la erradicación bacteriana. Esta situación podría aumentar la posibilidad de mutaciones “espontáneas”, algunas de las cuales podrían incorporarse de forma permanente al ciclo celular. En nuestro grupo de investigación hemos estudiado los índices de proliferación celular de pacientes infectados y su relación con la erradicación, observando al igual que otros autores, que tras la aparición de determinadas lesiones –atrofia, metaplasia- la proliferación se mantiene a pesar de la desaparición del germen y que esta situación coincide con la alteración en la expresión del p53. (34-36).

El consumo de vit.C tiene un efecto protector frente al CG al contribuir a la neutralización de nitritos. La ingesta de frutas y verduras, ricas en agentes antioxidantes, reduce el nivel de N-nitrosaminas y radicales libres. Un mecanismo de transporte activo consigue incrementar las concentraciones de vit.C en jugo gástrico. La infección por HP puede alterarlo y producir una **disminución en la concentración de ácido ascórbico** restaurable con la erradicación. (37,38)

El **amoníaco**, liberado por la acción ureasa se ha implicado en la acción estimuladora de la replicación celular, produciendo asimismo un efecto mutagénico. (39)

Estudios recientes han demostrado que HP induce autoanticuerpos contra la mucosa gástrica que pueden desempeñar un papel crucial en la patogénesis de la atrofia gástrica. En cualquier caso, la totalidad de los mecanismos carcinogénicos estaría estrechamente interrelacionada y, posiblemente, su efectividad sería interdependiente. (40,41).

Hay que tener en cuenta que no todas las cepas de HP son igualmente patógenas, habiéndose descrito “marcadores de agresividad” (citotoxinas Cag A, Vac A pe) que condicionan complicaciones clínicas más severas. Es por lo tanto, la conjunción de factores ambientales con las cualidades geno y fenotípicas de cada cepa en cuestión, la condición necesaria para el desarrollo de patología: enfermedad ulcerosa péptica o CG, teniendo en cuenta que la aparición del adenocarcinoma gástrico representa tan sólo una mínima parte del espectro de lesiones relacionadas con la infección.(42-44).

LINFOMA MALT GASTRICO

La infección por *Helicobacter pylori* actúa de manera determinante en la aparición y desarrollo del linfoma Malt gástrico, de tal manera que se considera de elección el tratamiento erradicador de *Helicobacter pylori* ante el diagnóstico de linfoma Malt consiguiéndose en estadios precoces la remisión completa del mismo.

En un primer momento, los estudios epidemiológicos demostraron una prevalencia mayor de la infección por HP en los pacientes diagnosticados de linfoma Malt con tasas de infección cercanas al 100%, habiéndose estimado un riesgo relativo RR 80 veces superior para el desarrollo de linfoma Malt entre la población infectada.(44)

En el contexto de la gastritis crónica asociada a HP es frecuente observar acúmulos de linfocitos en la mucosa gástrica, bien en forma de folículos linfoides o bien diseminados en lamina propia constituyendo el tejido linfoide asociado a mucosas o tejido MALT, base del posible Linfoma MALT. Wotherspoon desarrolló una escala de graduación de 1 a 6 según la severidad del tejido linfoide asociado, desde mucosa normal a linfoma Malt de bajo grado, pasando por la gastritis crónica activa con formación de folículos linfoides y la infiltración linfomatosa en lámina propia(45).

La infección por HP directa e indirectamente presenta efectos quimiotácticos y activadores de linfocitos T y B, que en presencia de ciertas anomalías cromosómicas (pérdida, trisomía del cr 3) favorecería el desarrollo monoclonal de células B, con la consiguiente aparición de linfoma Malt. Toda esta cadena de desarrollo progresivo es dependiente de HP, de tal manera que al cesar el estímulo antigénico causal tras la erradicación, se conseguiría la remisión y regresión del linfoma. La aparición de otras alteraciones cromosómicas (traslocación 11:14, 11:18) dotarían al linfoma de independencia de HP, con desarrollo y crecimiento a pesar de la erradicación o incluso de diferenciación hacia linfoma de alto grado (alteración P53) con distintas repercusiones de pronóstico y tratamiento.(46,47) Por lo tanto, en un primer estadio del linfoma Malt (linfoma confinado a mucosa y submucosa), la desaparición del germen con un tratamiento erradicador adecuado conseguiría la remisión del mismo.(47)

Existen ciertas características histológicas que nos pueden ayudar a diferenciar linfoma Malt de bajo grado e hiperplasia folicular linfoide asociado a HP, como la presencia de lesiones linfoepiteliales características constituidas por células linfoides que permean el epitelio glandular, destruyéndolo y que en un estadio final desembocan en un importante infiltrado linfoide vacío de espacios glandulares. Se han desarrollado técnicas de inmunohistoquímica y PCR, para determinar monoclonalidad y facilitar el diagnóstico y seguimiento en casos dudosos.(45-47)

BIBLIOGRAFIA

1. Fuchs C, Mayer R. Gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1995; 333: 32-41.
2. Neugut A, Hayek M. Epidemiology of gastric cancer. *Semin Oncology* 1996; 23:281-291.
3. Thompson G. Carcinoma of the stomach: are we making progress? *Lancet* 1993; 342:713-18
4. Fernández M, Docobo F. Epidemiología del cáncer gástrico. *Rev Pat Digest* 1996; 19:3-4.
5. Parsonnet J, Friedman G, Vandersteen D, Chang Y, Orentreich N et al. H. pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 1127-1131.
6. Donald A, Antonioli M. Precursors of gastric carcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 994-1005.
7. Lynch D, Axon A. Helicobacter pylori, gastric cancer and gastric epithelial kinetics: a review. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7(1 Suppl):17S-23S.
8. Parsonnet J. H. pylori and gastric cancer. *Gastroenterol Clin North Am.* 1993; 22: 89-104.
9. The Eurogast Study Group: An international association between Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *Lancet* 1993; 341: 1359-1362.
10. Martín Argila C, Boixeda D, Gisbert JP, García Plaza A. Relation between histologic sub-types and location of gastric cancer and H. pylori. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:303-307.
11. Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW, Fraumeni JF. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287-1289.
12. Hansson LE, Sparen P, Nyren O. Increasing incidence of carcinoma of the gastric cardia in Sweden from 1970 to 1985. *Br J Surg* 1993; 80: 334-377.
13. Hansson LE, Engstrand L, Nyrén O, Lindgren A. Prevalence of Helicobacter pylori infection in subtypes of gastric cancer. *Gastroenterology* 1995; 109: 885-888.
14. González CA, Sanz JM, Marcos G, et al. Dietary factors and stomach cancer in Spain: a multi-center case-control study. *Int J Cancer* 1991; 49: 513-519
15. Nomura A, Grove J, Stemmermann G. A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption. *Cancer Res* 1990; 50: 627-631.
16. Risch H, Jain N, Choi NW, et al. Dietary factors and the incidence of cancer of the stomach. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 947-959.
17. You WC, Blot WJ, Chang YS, et al. Diet and high risk of stomach cancer in Shandong, China. *Cancer Res* 1988; 48: 3518-3523.
18. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975; 2: 58-60.
19. Mirvish SS. The etiology of gastric cancer: intragastric nitrosamide formation and other theories. *J Natl Cancer Inst* 1983; 71: 629-647.
20. Forman D. Gastric cancer, diet and nitrate exposure. *BMJ* 1987; 294: 528-529.
21. Forman D, Newell DG, Fullerton F. Association between infection with H. pylori and risk of gastric cancer: evidence of a prospective investigation. *Br Med J* 1991; 302:1302-1305.
22. Nomura A, Stemmerman G, Kato I, Perez-Perez G, Blaser M. H. pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136.
23. Correa P. The gastric precancerous process. *Cancer Sur* 1983; 2: 437-450.
24. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740.
25. Genta R. H. pylori as a promoter of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; (1 Suppl):25S-30S.
26. Correa P. H. pylori and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19(1 Suppl):37S.
27. Hattori T, Sugihara H. The pathological sequence in the development of gastric cancer: *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(214 Suppl): 34S-35S.
28. Watanabe H. The pathological sequence in the development of gastric cancer: *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(214 Suppl): 36S-39S.
29. Sakaki N, Momma K, Egawa N, Yamada Y, Kan T, Ishiwata J. The influence of H. pylori infection on the progression of gastric mucosal atrophy and occurrence of gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7(1 Suppl):59S-62S.
30. Fenoglio-Preiser C, Noffsinger A, Belli J, Stemmermann G. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 292-306.
31. Drake IM, Warland D, Charwell N et al. Reactive oxygen species (ROS) activity and damage in H. pylori-associated gastritis. *Gut* 1995; 37(1 Suppl): A155.
32. Nguyen T, Brunson D, Crespi J et al. DNA damage and mutations in human cell exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030-3039.
33. Shiao Y, Rugge M, Correa P et al. P53 alterations in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994; 144: 54-57.

34. Cahill R, Sant S, Beattie S, Hamilton H, O'Morain C. H. pylori and increased epithelial cell proliferation: a risk factor for cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1994; 6:1123-1128.
35. Lynch D, Mapstone N, Clarke A, Sobala G, Jackson P, Morrison L et al. Cell proliferation in H.pylori associated gastritis and the effect of eradication therapy. *Gut* 1995;36: 346-350.
36. Preston-Martin S, Pike M, Ross R, Jones P, Henderson B. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7415-7421.
37. Ruiz B, Rood J, Fonthman E. Vitamin C concentration in gastric juice before and after anti Helicobacter pylori treatment. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 533-539.
38. Rood J, Ruiz B, Fonthman E. Helicobacter pylori gastritis and vitamin C concentration in gastric juice. *Nutr Cancer* 1994; 22: 65-72.
39. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Nagano K, Ito T, Hayashi N et al. Ammonia, a possible promotor in H. pylori related gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 1992; 65: 15-18.
40. Appelmek BJ, Negrini R, Moran A et al. Molecular mimicry between Helicobacter pylori and the host. *Trends in Microbiology* 1997; 8: 70-73.
41. Negrini R, Lisato L, Zanella I et al. Helicobacter pylori infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology* 1991; 101: 437-445.
42. Parsonnet J, Friedman G, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative H. pylori infection. *Gut* 1997; 40: 297-301.
43. Fox J, Correa P, Taylor N, Thompson N, Fontham E, Janney F et al. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive Helicobacter pylori strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1554-1560.
44. Stolte M., Eidt S., Bayerdorffer E., Fischer R. Helicobacter Pylori associated gastric lymphoma. En: *Helicobacter Pylori, basic mechanisms to clinical use.* De Hunt R.H., Tytgat G.N. ed. Kluwer Academic Publishers. Lancaster U.K. 1.994: 498-503
45. Wotherspoon A.C., Doglioni C., Diss T.C., Pan L. y cols. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue after eradication of Helicobacter Pylori. *Lancet.* 1.993; 342: 575-577
46. Du M., Diss T.C., Xu C., Peng H. y cols. Ongoing mutation in MALT lymphoma immunoglobulin gene suggests that antigen stimulation plays a role in the clonal expansion. *Leukemia.* 1.996; 10: 1190-1197
47. España M.P., Huelin J., De la Cruz J. Helicobacter Pylori y linfoma gástrico. En: *Helicobacter Pylori, un paso más.* Huelin J. ed. Prous Science. Barcelona. España. 1.997: 59-63