

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

Pamplona, 1-5 de julio de 2001

**Simposios**

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

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

# ÍNDICE

## 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
Evolución 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
---	-----

## SIMPOSIOS

### LESIONES DERMATOPATOLÓGICAS RELACIONADAS CON LA RADIACIÓN SOLAR.

#### LESIONES INFLAMATORIAS CUTÁNEAS

Jesús Cuevas Santos  
Servicio de Anatomía Patológica  
Hospital General Universitario de  
Guadalajara

Las lesiones cutáneas de fotosensibilidad son producto de respuestas anómalas frente a la radiación ultravioleta o a las radiaciones de luz visible existentes dentro del espectro terrestre de la luz solar. Estas reacciones anómalas con manifestaciones clínicas variables en su forma de presentación y en su gravedad, ocurren en el 10- 20% de la población.

Afortunadamente la atmósfera de la tierra absorbe la mayoría de las radiaciones ultravioletas de onda corta que son nocivas para el ser humano. Las longitudes de onda de las radiaciones ultravioleta del espectro terrestre de la luz solar oscilan entre 290-400 nm y este espectro a su vez, ha sido subdividido en dos áreas: UVA: 320-400 nm y UVB: 290-320 nm. Las radiaciones de luz visible del espectro solar de la tierra se extienden entre 400 y 700 nm y los rayos infrarrojos por encima de los 700 nm. Las radiaciones ultravioletas (RUV) poseen mayores efectos indeseables en la piel humana que la luz visible o los rayos infrarrojos.

Las respuestas cutáneas a la reacción actínica se clasifican en reacciones de tipo agudo y crónico. Entre las primeras, destacan el eritema retardado o “quemadura solar”, el aumento de pigmentación y del grosor epidérmico. Entre las reacciones crónicas, el envejecimiento cutáneo prematuro es el resultado de la exposición prolongada a la radiación ultravioleta. La mayoría de estos hechos están relacionados con un efecto directo de las RUV sobre la piel con participación de epidermis y dermis en reacciones agudas (liberación de sustancias vasodilatadoras epidérmicas que a posteriori difunden hacia la dermis, fotooxidación de melanina previamente formada etc.) destacando en las crónicas, los cambios existentes en los vasos cutáneos dérmicos con pérdida parcial de la vascularización y fenómenos de elastosis.

Sin embargo otros mecanismos de naturaleza inmune son cruciales a la hora de evaluar el daño cutáneo producido por las RUV. Entre estos hechos destaca la desaparición o disminución franca de las células de Langerhans epidérmicas provocada fundamentalmente por las acciones movilizadoras de IL-1 y TNF- $\alpha$ . La importancia de este fenómeno es tal, que el individuo afecto queda desprovisto de gran parte de sus células Langerhans epidérmicas hecho que provoca una inadecuada captación y procesamiento de diversos antígenos dando lugar a severos defectos en los mecanismos de reactividad inmunológica con afectación predominante de la inmunidad celular (linfocitos Th1). Otros hechos importantes a la hora de evaluar el inicio y el mantenimiento de los procesos inflamatorios cutáneos en relación con las radiaciones ultravioletas son fenómenos de oxidación celular así como el papel de los macrófagos y de los mastocitos en la cronicidad del daño cutáneo provocado por radiaciones ultravioletas.

Algunas enfermedades que con cierta frecuencia se relacionan con reacciones de tipo lumínico se encuadran bajo el siguiente esquema:

#### **Dermatosis metabólico-nutricionales**

- Porfiria.
- Alteraciones del metabolismo del triptófano.
- Pelagra

#### **Genofotodermatosis**

- Xeroderma pigmentoso.
- Síndrome de Bloom.

#### **Dermatosis exacerbadas por radiaciones ultravioletas (dermatosis sensibles a la luz).**

- Lupus eritematoso.
- Liquen plano.

- Rosácea.
- Enfermedad de Darier.
- Dermatitis seborreica
- Dermatitis atópica.
- Infecciones por herpes simple.
- Poroqueratosis actínica diseminada.

### **Fotodermatosis**

- Dermatitis fototóxica
- Dermatitis fotoalérgica
- Hydroa vacciniforme
- Erupción lumínica polimorfa
- Urticaria solar.
- Fotodermatosis crónicas (reticuloide actínico y eccema fotosensible).

Dentro del cuadro previamente referido haremos especial hincapié en el grupo de las fotodermatosis y lupus eritematoso.

#### Reacciones fototóxicas.

La reacción fototóxica es el daño cutáneo inducido por RUV y/o reacciones visibles, fruto del resultado del contacto o de la ingestión de una sustancia fotosensibilizante. Clínicamente las reacciones fototóxicas recuerdan a una quemadura solar exagerada y si la lesión es severa pueden producirse ampollas seguidas de descamación e hiperpigmentación. Las reacciones de **fitofotodermatitis** son reacciones fotosensibles usualmente de tipo fototóxico como resultado del contacto con plantas que contiene psoralenos y otros furocumarínicos. Entre las drogas ingeridas capaces de causar una reacción fototóxica se incluyen furosemida, naproxeno, tetraciclinas, tiacidas, sulfonamidas y AINES.

Los hechos histopatológicos de las reacciones previamente enumeradas se caracterizan por queratinocitos apoptóticos salpicados (“sun-burn cells”) en reacciones fototóxicas ligeras y necrosis epidérmica con balonización de queratinocitos en reacciones severas.

Variable espongiosis y muy ligero infiltrado inflamatorio superficial compuesto por linfocitos y neutrófilos en reacciones severas.

#### Dermatitis fotoalérgicas

Tres factores son necesarios para el desarrollo de una reacción fotoalérgica: un **agente fotosensibilizante, luz** (usualmente en el rango de UVA) y una **respuesta inmunológica del tipo de hipersensibilidad retardada**. La absorción de la energía lumínica provoca una alteración de la sustancia química fotosensibilizante, convirtiéndose en un hapteno que se une a una proteína transportadora que estimula células inmunocompetentes, para provocar una respuesta de hipersensibilidad. Las sustancias fotosensibilizantes en las dermatitis fotoalérgicas generalmente son de tipo tóxico cutáneo aunque de modo infrecuente pueden presentarse reacciones fotoalérgicas tras ingestión de algunas drogas. La reacción fotoalérgica se desarrolla a las 24-48 horas después de la exposición solar en forma de una erupción pruriginosa y eccematosa.

Los principales alérgenos por fotocontacto son:

- Fenotiacinas (antihistamínicos tópicos)
- Sulfamidas empleadas tópicamente.
- Salicilanilidas halogenadas (sustancias bacteriostáticas de los jabones de baño y cosméticos).
- Perfumes (“Musk Ambrette”).
- Eosina (barras de labios).
- Tiourea (papel de fotocopias).

#### Histopatología

Las lesiones histológicas recuerdan a las observadas en las **dermatitis de contacto alérgico** incluyendo espongiosis epidérmica, paraqueratosis salpicada y ligera acantosis con infiltrados inflamatorios linfocitarios de moderada intensidad y de disposición perivascular en la dermis superficial (con frecuencia el infiltrado es más profundo que lo observado en la dermatitis de contacto alérgico).

#### Hydroa vacciniforme

Es una fotodermatosis manifestada clínicamente por el desarrollo de eritema y vesículas en piel expuesta existiendo uno o dos días de exposición solar previa. Las vesículas curan con cicatrices de tipo varioliforme. En general comienzan en la infancia con un curso crónico y en brotes antes de remitir generalmente en la adoles-

encia. Muchos de los casos inicialmente descritos bajo este diagnóstico correspondían a porfirias siendo esencial excluir esta enfermedad.

#### Histopatología

Las lesiones establecidas muestran vesiculización intraepidérmica, degeneración reticular y posteriormente necrosis epidérmica confluyente. Las lesiones ulceradas pueden estar asociadas con necrosis dérmica superficial. En el borde inferior de las zonas necróticas se identifican infiltrados inflamatorio de linfocitos y neutrófilos y en localización perivascular (superficial y profundo) se observan linfocitos.

En casos severos puede manifestarse con lesiones de paniculitis septal o lobular.

#### Erupción lumínica polimorfa

La erupción lumínica polimorfa es una fotodermatosis idiopática en la cual las lesiones son de morfología variada y se manifiestan varias horas o incluso días tras la exposición al sol persistiendo siete o diez días hasta su desaparición si la exposición se evita. Clínicamente se manifiesta en forma de pápulas pruriginosas, papulovesículas o placas urticariales. La localización de las lesiones preferentemente se sitúa en el dorso de las manos y brazos, cuello y en menor medida, la cara.

Aunque existe disparidad en la literatura, los mecanismos patogénéticos de la enfermedad en los últimos trabajos parecen concluir que se trata de una **forma peculiar de lupus eritematoso**. Otras teorías plantean la de un cuadro de hipersensibilidad retardada a antígenos cutáneos modificados por la luz solar.

#### Histopatología

- Infiltrados inflamatorios linfocitarios, densos, superficiales y profundos con disposición preferencial en torno al plexo vascular.
- Edema de la dermis papilar y en ocasiones marcada, hasta llegar a formar ampollas subepidérmicas.
- Escasa o nula reacción de interfase.
- Epidermis normal o con ligera espongirosis y en ocasiones presencia de mucinas en dermis reticular.

#### Fotodermatosis crónicas (dermatitis crónica actínica)

Este término engloba a un grupo de fotodermatosis de rara presentación con hechos clínicos superpuestos que incluyen fotosensibilidad persistente, predominio marcado en varones de edad avanzada y la presencia de placas eritematosas, edematosas o liquenificadas en zonas expuestas a la luz. En este grupo se incluyen las reacciones lumínicas persistentes, el eccema fotosensibilizante y reticuloide actínico. Esta última entidad ha sido separada de las anteriores en la literatura en base a su cuadro histopatológico el cual muestra un cierto recuerdo a los linfomas cutáneos de células T. Existen no obstante escasas publicaciones donde el cuadro de linfoma cutáneo se ha desarrollado en estos pacientes y generalmente su ocurrencia coincide en lesiones muy persistentes y en personas de edad avanzada siendo discutible sino es un cambio incidental en la evolución de esta fotodermatosis crónica.

#### **Enfermedades agravadas por la luz solar**

La luz solar puede actuar como un agente traumático inespecífico desencadenando alteraciones patológicas en individuos predispuestos que padecen algunos de los procesos previamente expuestos. Entre ellos es conocida la relación entre el lupus eritematoso y la exposición solar.

La respuesta del lupus eritematoso ante la luz solar es variable. Muchos pacientes no presentan intolerancia al sol. Las formas del lupus subagudo, lupus neonatal y sistémico son las más propensas a desarrollar importantes exacerbaciones con la luz solar. Es conocido que los enfermos con lupus eritematoso sistémico portadores de anticuerpos anti-Ro tienen una elevada prevalencia de fotosensibilidad interpretándose como mecanismo de naturaleza inmune la interrelación entre las RUV y el desencadenamiento de los brotes de lupus eritematoso. La presencia de mucinas abundantes en la dermis reticular frecuentemente la observamos en aquellos casos con mayor grado de fotosensibilidad a la luz.

#### Bibliografía

- 1.- Eczematous photodermatoses. Hawk J, Cheong W-K. Cap 9 of Eczema (pp.149-174). Edited by Ronald Marks. Martin Dunita. London 1992.
- 2.- Weedon D. Skin Pathology. Churchill Livingstone. 1997.

- 3.- Pérez MI, Edelson RL. Regulation of immunity by ultraviolet radiation and photosensitized reactions. En: Mechanisms of immune regulation. Granstein RD (edit). Chem Immunol, vol 58. Basel, Karger 1994; pags: 314-30.
- 4.- Villarrubia VG, González S, Cuevas J. Alteraciones inmunológicas provocadas por la radiación ultravioleta. Su relación patogénica con el fotoenvejecimiento y la aparición de cáncer de piel. Piel 1996; 11: 462-70.
- 5.- Kripke ML. Ultraviolet radiation and immunology: something new under the sun-presidential address. Cancer Res 1994; 54:6102-5.
- 6.- Villarrubia VG, Cuevas J, de las Heras E, González S. Los mecanismos de presentación antigénica y la piel (I): fisiología de las células de Langerhans. Dermatol Cosmet 1997;7:191-6

## LESIONES EPITELIALES CUTÁNEAS.

José Luis Rodríguez Peralto  
 Dpto. Anatomía Patológica  
 Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

El cáncer de piel es el tipo de neoplasia maligna más frecuente en la especie humana, especialmente en la raza blanca caucásica que habita en zonas donde la exposición solar es muy importante, como sucede en nuestro país. La mayoría de los tumores malignos cutáneos que se desarrollan en estos pacientes son carcinomas epidermoides y epiteliomas basocelulares, quedando relegados los melanomas a un tercer lugar a gran distancia de los anteriores. Afortunadamente, la mayoría de estos tumores, carcinomas epidermoides y basocelulares, tienen sólo un comportamiento agresivo local, siendo fácilmente tratables debido a su gran accesibilidad. Sin embargo, existe un grupo reducido de carcinomas epidermoides cuya evolución es realmente maligna, teniendo además del conocido carácter invasivo local, una capacidad metastásica importante. Esta capacidad metastásica no sólo depende de las características genéticas o fenotípicas de las células tumorales, sino también de la presencia de importantes alteraciones inmunológicas que impiden que el huésped pueda defenderse de forma adecuada frente a la agresión tumoral. Es más, en muchas ocasiones el sistema inmune actúa de forma paradójica no sólo permitiendo el desarrollo tumoral sino colaborando activamente en la progresión del mismo. Un ejemplo de la importancia del sistema inmune en la evolución de los tumores cutáneos, lo supone el hecho de las regresiones, bien conocidas, en los melanomas, queratoacantomas y epiteliomas basocelulares. Mientras que en el primero son desafortunadamente infrecuentes y mortales, en el queratoacantoma constituyen un hecho común y característico de la entidad y en el epitelioma basocelular alcanzan hasta un 20%.

El desarrollo del cáncer cutáneo se produce por una conjunción de tres fenómenos que están íntimamente imbricados: A) La inmunosupresión local o sistémica que facilita el terreno para que B) tanto la Radiación Solar (Radiaciones ultravioletas), como C) ciertos carcinógenos químicos o D) la infección por virus oncogénicos tipo HPV colaboren activamente en el desarrollo de alteraciones genéticas de iniciación y progresión tumoral. La inmunosupresión juega un papel fundamental, como lo demuestra la incidencia aumentada de carcinomas epidermoides y de epiteliomas basocelulares en los pacientes con trasplantes de riñón y corazón. Así, en un estudio llevado a cabo en los Países Bajos, se reconoce que la incidencia de carcinoma cutáneo de tipo no melanocítico en transplantados renales se incrementa desde el 10% a los 10 años de seguimiento hasta el 40% a los 20 años; y en un estudio similar australiano, se observa un riesgo acumulativo del 23% a los 5 años y del 44% a los 9. Además, la mayoría de los cánceres eran epidermoides, superando a los basocelulares en una proporción de 15 a 1, a diferencia de lo que ocurre en los sujetos inmunocompetentes en los que la proporción es de 1/5 a favor de los epiteliomas basocelulares. Estos datos demuestran que la inmunosupresión yatrogénica mantenida es responsable del incremento del cáncer cutáneo y que la inmunosupresión profunda en estos pacientes influye definitivamente en el tipo tumoral haciendo que predomine el carcinoma epidermoide sobre el basocelular.

El virus del papiloma humano, tiene una influencia trascendental en el desarrollo de algunos cánceres, especialmente en el 90% de los carcinomas epidermoides de cérvix, íntimamente relacionados con las cepas virales HPV 16 y 18 y en más del 50% de otros cánceres anogenitales. También se relacionan con cánceres de esófago, laringe y mucosa oral. En la piel, la infección por HPV es muy frecuente, siendo la causa de lesiones tan benignas y frecuentes en la población adolescente e infantil como las verrugas vulgares, planas y plantares y de alteraciones más comprometidas como la epidermodisplasia verruciforme. Recientemente, algunos tipos de cepas de HPV como son la HPV-5 y la HPV-8 se han relacionado con la aparición de carcinomas epidermoides, tanto en pacientes inmunocompetentes como especialmente en inmunosuprimidos, por ejemplo tras trasplante renal o cardíaco. Así, Harwwod y cols demuestran que en pacientes inmunocompetentes, la incidencia

de HPV en carcinomas epidermoides es del 27%, en epitelomas basocelulares del 36,7% y en lesiones premalignas del 54%, aumentando estas cifras hasta el 84%, 75% y el 88% respectivamente en inmunocomprometidos.

En cuanto a los mecanismos etiopatogénicos de la infección por HPV, se sabe que durante el mecanismo de incubación del virus -3 a 4 meses- las partículas virales penetran en las células basales cutáneas y conforme estas proliferan y maduran emigrando a estratos superiores, el ADN vírico se replica y transcribe ensamblándose al núcleo hasta que los viriones completos formados se liberan con la muerte en apoptosis de los queratinocitos. Durante este periodo infeccioso, todas las capas epidérmicas proliferan, dando lugar al típico aspecto de las verrugas vulgares, en las que los efectos citopáticos son claramente visibles. Sin embargo, en las displasias intensas y en los cánceres secundarios a la infección viral, el ADN del HPV se integra completamente en el genoma de los queratinocitos. Así, el HPV-8 se inserta en genes P53 susceptibles, en los que la proteína E6 del virus va a provocar su degradación, aumentando el riesgo de carcinogénesis cutánea. Por otro lado, la prevalencia del virus HPV en la piel es mucho más alta que la frecuencia de cáncer cutáneo, lo que apunta a la existencia de otros factores, como son las alteraciones del sistema inmunológico y las radiaciones solares que podrían actuar conjuntamente iniciando o facilitando la progresión tumoral.

El hecho de que la mayoría de los carcinomas de piel aparezcan en zonas expuestas al sol, hace pensar que las radiaciones actínicas tienen una influencia perniciosa en el desarrollo de estos tumores y aunque influyen, como hemos visto, diferentes factores genéticos y medioambientales, el más importante es la exposición crónica a la radiación ultravioleta solar. Desde el punto de vista epidemiológico, es bien conocido que ciertos fototipos cutáneos y que determinados hábitos sociales o socioculturales, como la moda del bronceado, incrementan la aparición de carcinomas cutáneos. Así, la presencia de carcinomas epidermoides, basocelulares y melanomas se ha relacionado fehacientemente con la exposición de radiaciones ultravioletas B (UVB) durante los períodos de adulto joven y adolescente en sujetos con fototipos I y II. De esta forma, se estima que uno de cada tres individuos sanos de raza caucásica nacidos en USA después de 1994 desarrollará al menos un epiteloma basocelular a lo largo de su vida como resultado de la exposición actínica mantenida. Por el contrario, los carcinomas epidermoides, aunque plenamente relacionados con el sol, son más frecuentes en pacientes con algún compromiso del sistema inmune local o sistémico, producidos por trasplantes renales y cardíacos, quemaduras, cicatrices, etc, en donde los carcinomas adoptan comportamientos agresivos y patrones frecuentemente metastáticos. Pero no sólo la radiación ultravioleta natural tiene capacidad de inducir carcinomas de piel, sino que la terapia con PUVA cuando se administra a dosis elevadas o durante mucho tiempo, como ocurre con la psoriasis, se asocia a la aparición de carcinomas epidermoides y basocelulares.

El papel que juegan las radiaciones ultravioletas en el desarrollo de cánceres no melanocíticos cutáneos, es doble. En primer lugar, las radiaciones UV causan mutaciones en el DNA celular. Fallos para reparar este DNA alterado producen finalmente un crecimiento descontrolado y la aparición del cáncer. En segundo lugar, las radiaciones UV provocan alteraciones en el sistema inmune induciendo a estados de relativa inmunosupresión que dificultan el rechazo por parte del paciente al tumor. De esta forma, las radiaciones ultravioletas producirían mutaciones específicas fundamentalmente en el gen supresor P53 donde la Citosina se cambia por Timina (C--- T y CC --- TT) lo que alteraría el equilibrio del crecimiento celular y facilitaría una proliferación clonal de células atípicas (queratosis actínica). En ausencia de exposiciones sucesivas, la lesión podría regresar por apoptosis, pero si la exposición solar se mantiene, los rayos ultravioletas causarían mutaciones adicionales en el gen de la P53 y en otros genes críticos como el ras, dando lugar mediante una cascada de alteraciones genéticas a cambios más groseros, cromosómicos e incluso a aneuploidías que serían responsables de las alteraciones bioquímicas y fenotípicas características del carcinoma epidermoide infiltrante. Así, en un síndrome raro, pero clásico de la dermatopatología oncológica, como es el Xeroderma Pigmentoso, los pacientes presentan anomalías importantes en los genes reparadores del DNA, con lo que cualquier daño producido por las radiaciones ultravioletas en genes supresores como P53 no se repararía de forma adecuada, iniciándose y manteniéndose el crecimiento descontrolado neoplásico. Por otro lado, las radiaciones ultravioletas del sol dañan el sistema inmunológico alterando la función presentadora de antígenos de las células de Langerhans, promoviendo el desarrollo de células Th2 e inhibiendo el de Th1, lo que resultaría en una disminución de la respuesta de hipersensibilidad por contacto.

Como conclusión, llamamos la atención sobre la importancia que tiene el evitar la exposición solar en la infancia para disminuir el riesgo de desarrollo de cáncer cutáneo en la vida adulta; ya que el efecto de las radiaciones ultravioletas sobre el gen de la P53, alterando su función habitual en la apoptosis

mediante la teoría de los dos “hits” de la carcinogénesis, facilita el inicio y la progresión de estos tipos de neoplasias malignas de la piel.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

- 1.- Grossman D, Leffell DJ. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer. *Arch Dermatol* 133:1263-1270, 1997.
- 2.- Rees J. Genetic alterations in non-melanoma skin cancer. *J Invest Dermatol* 103:747-750, 1994
- 3.- Leffell D. The scientific basis of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 42:S18-22, 2000
- 4.- Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, Leigh IM, Hawk JL, Proby CM, McGregor JM. Detection of human papillomavirus DNA in PUVA-associated non-melanoma skin cancers. *J Invest Dermatol* 111:123-127, 1998
- 5.- Vidal S. Carcinomas basocelulares: estudio estadístico. En Pro XIII Reunión Nacional de Dermatólogos de las F.A.S. Zaragoza, 26-28 Octubre, 2000
- 6.- Stern RS, Liebman EJ, Vakeva LH. Oral psoralen and ultraviolet-A light (PUVA) treatment of psoriasis and persistent risk of non-melanoma skin cancer: the PUVA follow-up study. *J Natl Cancer Inst* 90:1278-1284, 1998
- 7.- Boonchai W, Walsh M, Cumming M, Chenevix-Trench G. Expression of P53 in arsenic-related and sporadic basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 136:195-198, 2000

## **LESIONES PIGMENTARIAS CUTÁNEAS**

Félix Contreras Rubio  
Dpto Anatomía Patológica  
Hospital Universitario La Paz. Madrid

Como introducción al primer Congreso de la SEAP del milenio recién inaugurado, en los albores del siglo XXI parece muy acertada la idea de dedicar un tiempo de reflexión anatomopatológica, a los efectos de la radiación solar contemplados desde desde el punto de vista de la Anatomía Patológica.

La dermatología ha sido, en mi opinión la especialidad médica pionera en valorar las ventajas y los inconvenientes de la radiación solar e incluso de estimular a la industria para construir aparatos emisores de radiaciones similares a la solar, desde las obsoletas lámparas de cuarzo a los actuales aparatos de rayos UVA y UVB para el tratamiento de eccemas, psoriasis o micosis fungoides y al mismo tiempo de estimular a la industria farmacéutica para elaborar filtros solares protectores de la piel en situaciones de hipersensibilidad lumínica como el lupus eritematoso, alguna urticaria, porfirias etc. o más moderadamente como profilaxis de tumores cutáneos que hoy sabemos íntimamente relacionados con la radiación solar.

Entre estas lesiones tumorales, las melanocíticas son especialmente temidas porque una vez desarrollado el melanoma maligno, en su fase de crecimiento vertical, el tratamiento deja mucho que desear porque todavía no existe ninguna pauta suficientemente satisfactoria.

Por tanto el énfasis dermatológico en el tema del melanoma se centra en una prevención y dentro de ella la dermatopatología juega un papel primordial al confirmar el diagnóstico de aquellas lesiones que puedan ser precursoras de melanoma, al permitir el diagnóstico diferencial con lesiones de menor o nulo riesgo y al colaborar en distinguir lesiones melanocíticas con mayor o menor influencia etiológica solar o genética.

En nuestra experiencia la distinción clínica de lesiones pigmentadas planas incluso con la ayuda de la dermatoscopia por epi-iluminación, es difícil y con gran frecuencia precisa de la información histopatológica y desgraciadamente tampoco en el terreno histopatológico existe acuerdo unánime ni en las nomenclaturas ni en la interpretación de los hechos morfológicos ni en la naturaleza de las lesiones.

Los conceptos que siguen en esta discusión deben considerarse como personales, basados en la experiencia propia, naturalmente contrastada con la bibliografía, pero abiertos a la crítica y a cualquier otra interpretación que aporte beneficio para el paciente.

Ante una lesión pigmentaria sometida al estudio histopatológico el primer paso es determinar si corresponde realmente a patología melanocítica o no. En nuestra experiencia las tres lesiones que con más frecuencia se confunden con lesiones melanocíticas relacionadas con el sol son: queratosis seborreicas planas, queratosis actínicas pigmentadas y pigmentaciones postinflamatorias postmedicamentosas (exantema fijo medicamentoso residual y melanosís de Riehl).

Entre las lesiones melanocíticas precursoras de melanomas, en relación con la radiación solar pueden establecerse tres grupos:

#### **I.- Lesiones melanocíticas actínicas de bajo riesgo.**

- Lentigo actínico.
- Acantoma de células grandes: (clásico, atrófico, verrucoso).
- Lentigo actínico negro estrellado (mancha de tinta).

#### **II.- Lesiones melanocíticas actínicas de riesgo dudoso**

(lesión actínica con genética favorable).

- Lentigo y Nevo Lentiginoso del tronco.

#### **III.- Lesiones melanocíticas con alto riesgo**

- NIM sobre nevo congénito (con actínico).
- NIM primario (N. displásico genéticamente condicionado)
- NIM secundario (provocado por sol sobre nevo convencional).
- NIM por fotoexposición intensa acumulable (Dubreuilh).

La distinción histopatológica entre lentigo simple y lentigo actínico no es fácil a no ser que existan simultáneamente otras lesiones actínicas. El lentigo actínico desarrollado tras PUVA o radiación solar natural o UVA para el bronceado, es con frecuencia intensamente pigmentado (mancha negra) y muestra activación melanocítica con hiperplasia y desorden arquitectural. Puede tener atipia nuclear salpicada y por tanto ser indistinguible del nevo displásico. Desconocemos si la lesión regresa o persiste o evoluciona.

El acantoma de células grandes en las diferentes presentaciones debe considerarse un lentigo actínico.

Los lentigos o nevos lentiginosos del tronco que con frecuencia surgen tras exposiciones solares intensas eventuales tienen un riesgo dudoso de desarrollar melanoma. Aparecen con mayor frecuencia y en mayor número en pacientes con fototipos I y II. Son muy frecuentes en pacientes con nevos displásicos o en familias con miembros con nevos displásicos, pero en principio no deben considerarse como nevos displásicos, aunque clínicamente son atípicos porque crecen radialmente y se hacen asimétricos.

La lesión precursora o incipiente de la historia natural de melanoma es la neoplasia intraepidérmica melanocítica (NIM). En mi opinión ésta se manifiesta o sobre un nevo congénito o como “**nevo displásico**”: proliferación melanocítica intraepidérmica con desorden arquitectural, atipia citológica salpicada y reacción en dermis papilar, o sobre un nevo melanocítico que conserve actividad intraepidérmica, como consecuencia de exposición a radiación UVA o UVB (nevo adquirido con displasia secundaria) o como consecuencia de fotoexposición intensa acumulable en piel muy expuesta (melanosís de Dubreuilh).

En el nevo displásico verdadero o primario existe un sustrato genético todavía mal definido y las lesiones son múltiples en el mismo paciente (isócronas o metácronas) y con cierta frecuencia familiares. La multiplicidad y familiaridad no son habituales ni en la NIM de los nevos congénitos ni en la de nevos adquiridos con displasia secundaria ni en la melanosís de Dubreuilh.

Lesiones que clínica e histológicamente son superponibles a la melanosís de Dubreuilh en piel poco expuesta o no expuesta deben considerarse como nevos displásicos verdaderos.

Todos estos hechos nos llevan a considerar que el melanoma que se origina en la melanosís de Dubreuilh es una entidad nosológica diferente al melanoma del tronco. A pesar de las opiniones imperantes de que lo único interesante y distintivo en los melanomas es su espesor, yo creo que los estudios epidemiológicos deben diferenciar estos dos tipos de melanomas como entidades nosológicas diferentes. El melanoma lentiginoso acral y el melanoma nodular probablemente tengan condicionamientos etiológicos y patogenéticos particulares y creo que en principio no deben incluirse en los estudios epidemiológicos de los otros dos tipos de melanomas mejor definidos.

Como simple orientación para aportar a este Congreso, he realizado una pequeña encuesta informativa sobre lesiones melanocíticas en relación con el sol, entre Servicios de Anatomía Patológica del norte, centro, sudeste y extrapeninsulares de España seleccionados únicamente por su más frecuente relación asistencial con nuestro Servicio. De esta pequeña encuesta se obtienen las siguientes orientaciones:

1º.- El volumen de patología melanocítica en los Servicios encuestados, en relación con el volumen de biopsias cutáneas es alto. Como cifra media, de cada 5 biopsias de piel, 1 corresponde a un nevo con-

vencional. En los centros donde la Dermatología está especialmente desarrollada, existe especial interés por esta patología y esta cifra es más baja.

2º.- El número de diagnósticos de melanoma no es alarmante en ningún Servicio en los últimos 5 años. No es apreciable un claro aumento de diagnósticos en relación con el número de biopsias ni con el número de nevos convencionales diagnosticados. Como media se diagnostica 1 melanoma cada 95 biopsias de piel o 1 melanoma cada 24 nevos convencionales. En los Servicios con unidades dermatológicas más desarrolladas, esta cifra es ligeramente más baja. En los Servicios de áreas geográficas especialmente soleadas, esta cifra media baja a 13 indicando la importancia de la radiación solar en la población asistida.

3º.- En esta pequeña encuesta destaca el bajo número de diagnósticos, que tampoco varía anualmente, de lentigo actínico o melanosis de Dubreuilh como lesión precursora de melanoma relacionado con acumulación progresiva prolongada de la radiación solar. Como media, se diagnostica solamente 1 caso por cada 128 nevos convencionales y esta cifra solo desciende mínimamente en los Servicios de zonas especialmente soleadas o en las relacionadas con unidades dermatológicas muy desarrolladas.

Esta encuesta no resta importancia a la actitud mundial de lucha en la prevención del melanoma pero aunque con escaso rigor estadístico, ofrece un pequeño apoyo de tranquilidad y al menos a través del trabajo que realizamos los patólogos, no parecen existir signos de especial alarma en relación con otros países.

#### **Bibliografía**

- 1.- Bataille V. Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000. 25:464-470
- 2.- Westerdahl J, Ingvar C, Masback A, Jonsson N, Olsson H. Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity. *Br J Cancer* 2000. 82:1593-1599,
- 3.- Hofmann WR, Wolf P, Smolle J, Reimann WA, Soyer HP, Kerl H. Influence of UVB therapy on dermoscopic features of acquired melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1997. 37: 559-563.
- 4.- Vicente V, Gómez S, Sánchez Pedreis J, Pérez D, Ortuño G. Melanoma cutáneo primario. Estudio clinicopatológico de 109 casos. *Actas Dermosifilig.* 982. 73: 281-288.
- 5.- Rubio J, Giménez R, Naveiro J, Salcedo V, Díaz M, Mayoral A. Estudio epidemiológico y clínico del melanoma cutáneo en el área sanitaria de León. *Med Clin (Barcelona)* 1991. 97: 693-696.
- 6.- Gardeazabal, Regalado J, Fernández Samaniego F, Pijoan J, Gabilondo FJ, Díaz JL. Estudio comparativo de las pacientes con melanoma en el Hospital de Cruces entre las décadas 1977-86 y 1987-96. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2000. 28:236-240

# NUEVAS TECNOLOGÍAS EN CITOPATOLOGÍA

## INMUNOCITOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR EN CITOLOGIA

MD Lozano  
Clinica Universitaria. Pamplona

Actualmente la citopatología ha dejado de ser exclusivamente una técnica de screening limitada al diagnóstico de triple toma cervicovaginal ("Pap Smear"). La inmunohistoquímica primero y la biología molecular después, han revolucionado el diagnóstico citológico, añadiendo al mismo aspectos pronósticos y terapéuticos.

Lo nuevo en citología cervicovaginal es la automatización. Lo nuevo en punción aspiración, y en general de alguna forma en todo tipo de muestra citológica, es la aplicación de nuevas tecnologías, de la misma forma que se hace con las biopsias.

El reto del citopatólogo es además del diagnóstico citológico, dar información detallada y precisa de las lesiones, tanto mediante detección de proteína y antígenos específicos por métodos inmunohistoquímicos como mediante el desarrollo y la aplicación de técnicas de biología molecular que permitan conocer alteraciones en el material genético de las lesiones susceptibles de diagnóstico citológico.

### **Papel de la inmunohistoquímica en citología**

La inmunohistoquímica se ha convertido en una técnica casi imprescindible en el diagnóstico histopatológico de muchas neoplasias y otras lesiones. La posibilidad de teñir y poner de manifiesto proteínas celulares, y más recientemente algunos genes y sus productos, en secciones tisulares, representa un gran avance en nuestras capacidades diagnósticas.

La importancia de la inmunohistoquímica en citología está claramente reconocida. En general la citología ofrece menos claves diagnósticas que la biopsia, la arquitectura de las lesiones es menos aparente y hay mayores problemas por muestra inadecuada o insuficiente, lo que hace que algunas claves diagnósticas de determinadas lesiones, puedan no estar presentes. A esto hay que añadir el aumento creciente de la demanda de diagnósticos citológicos, especialmente el auge de la punción aspiración con aguja fina, todo lo cual hace suponer que las técnicas de ayuda al diagnóstico como la inmunohistoquímica, se hayan convertido en uso casi obligado en la citología (2, 3). De hecho, las principales indicaciones de la inmunohistoquímica en citología son superponibles a las de la biopsia y pueden resumirse en las siguientes (4):

- Ayuda al diagnóstico y tipificación de tumores poco diferenciados.
- Identificación del tumor primario en determinadas lesiones metastásicas.
- Diagnóstico diferencial de adenocarcinoma frente a mesotelioma.

Sin embargo, hoy día la inmunohistoquímica no es una técnica ampliamente aceptada en citología. En general, carece de métodos estándar y ofrece resultados dispares. No existen series largas con protocolos establecidos, y faltan estudios comparativos entre la citología y la biopsia. En la literatura existen algunos estudios que comparan diversos métodos de fijación y tipos de muestras con resultados variables (5). En esta revisión se ponen de manifiesto los logros y las aplicaciones, así como algunos problemas en la práctica de inmunohistoquímica en citología.

Al igual que ocurre con la inmunohistoquímica sobre secciones tisulares, son factores determinantes del éxito de la inmunohistoquímica el material sobre el que se aplican las técnicas, el tipo y las características de fijación, los procesos de digestión enzimática, el método de tinción inmunohistoquímica empleado, los procedimientos de bloqueo de enzimas endógenas, y los tipos de anticuerpos y diluciones de los mismos utilizados. Todo esto es igualmente aplicable a la citología, con el añadido de que en ocasiones el mismo anticuerpo aplicado a un tejido y a una extensión citológica puede requerir condiciones de trabajo diferentes. En este sentido, existen resultados variables en las series publicadas según los anticuerpos utilizados y la experiencia

de los laboratorios. Así, el porcentaje de casos en que la inmunohistoquímica fue de alguna utilidad diagnóstica varía del 50% al 82% (6). Esta variabilidad en los resultados se ha atribuido a diversos factores:

- El número limitado de preparaciones citológicas comparado con la cantidad de cortes que pueden obtenerse de un bloque de parafina. Por ello, la elección de los anticuerpos puede ser cuidadosa.
- La arbitrariedad en la cantidad y calidad del material citológico en los diferentes extendidos, incluso en los provenientes de una misma muestra (por ejemplo PAAF). La inevitable superposición excesiva y agrupamientos celulares y la presencia de fondos intensamente hemorrágicos y necróticos, así como de material proteináceo en el fondo de las extensiones, pueden impedir la correcta difusión del anticuerpo.
- Problemas técnicos que se derivan y varían con la experiencia de cada laboratorio.

Todo esto da lugar a serios problemas de interpretación y al riesgo de falsos positivos y negativos. Una tinción falsamente positiva se deriva de células degeneradas que absorben el anticuerpo de forma inespecífica o en restos de membranas celulares embebidas en líquidos proteináceos. Por el contrario, no son raros los falsos negativos debidos a la pérdida de inmunorreactividad para algunos anticuerpos cuando las células se disponen de forma muy cohesiva, especialmente cuando están degeneradas debido a un retraso en la fijación, lo cual impide una adecuada penetración de los anticuerpos. Otras fuentes de falsos negativos son una inapropiada dilución de los anticuerpos, una baja concentración antigénica en las células que se analizan, y problemas inherentes a la experiencia de quién realiza la técnica. La existencia de fondo que dificulta la interpretación de los resultados es un problema frecuente. Generalmente se debe a la presencia de líquido rico en proteínas y hematíes en el fondo de las extensiones, que puede interferir total o parcialmente la interpretación de los resultados.

En un intento de obviar al menos en parte estos problemas se han propuesto diferentes soluciones (4, 5, 7):

- El procedimiento de fijación ideal debe ser de uso fácil y preservar adecuadamente la citomorfología y la inmunorreactividad frente a varios antígenos. En este sentido, distintos grupos han recomendado diversos fijadores y métodos de fijación: desde el convencional alcohol de 96° hasta complicados protocolos que incluyen combinaciones de acetona, formol y glutaraldehído con tiempos y concentraciones determinados.
- El uso de bloques celulares conlleva obtener mejores resultados. Una de las mayores ventajas es que permiten la realización de diversos anticuerpos en las mismas células, y los portos se procesan como cualquier biopsia. Sin embargo, esto no siempre es posible, especialmente cuando el material citológico es escaso. Por ello esta técnica se sigue aplicando a extensiones fijadas en alcohol no teñidas y a las teñidas con Papanicolaou.

Nuestra experiencia en la actualidad se basa en la aplicación de 30 anticuerpos a más de 300 muestras citológicas después de varios meses de optimización de estas técnicas. Las muestras proceden en un 70% de PAAF y el resto corresponden a líquidos corporales. Todas las muestras han sido fijadas de forma rutinaria en alcohol de 96°. Siempre realizamos la técnica de forma manual con estreptavidina-peroxidasa, revelado con AEC, y recuperación antigénica con microondas (4, 6).

Al igual que lo publicado en otras series, los mejores resultados a excepción del bloque celular se obtienen en extensiones previamente teñidas con Papanicolaou. La realización de técnicas de inmunohistoquímica directamente sobre extensiones teñidas con Papanicolaou tiene una serie de ventajas sobreañadidas, entre ellas la conservación de la citomorfología, que conlleva una buena preservación antigénica, disminuye la tinción de fondo y permite estudios retrospectivos.

Dadas las especiales características de la citología y su creciente auge como método diagnóstico, es importante la aplicación y optimización de cualquiera de las técnicas aplicables a la biopsia. La realización de inmunohistoquímica sobre extendidos citológicos es hoy día una ayuda diagnóstica con el mismo valor que tiene en el estudio de secciones tisulares, pero con una serie de limitaciones que deben ser tenidas en cuenta y que derivan de la propia naturaleza del material sobre el que se trabaja. Por ello, a la hora de aplicarla, es necesaria una interpretación cuidadosa basada en la propia experiencia con cada anticuerpo.

## PAPEL DE LA BIOLOGIA MOLECULAR EN CITOLOGIA

Al igual que lo que ocurre en la inmunohistoquímica, cualquiera de las técnicas de biología molecular puede realizarse sobre material citológico.

### HIBRIDACION “IN SITU”

La hibridación “in situ” puede definirse como la localización en la célula de secuencias genéticas. El objetivo por lo tanto es determinar la presencia o ausencia de secuencias específicas de DNA o RNA y localizarlas en lugares particulares dentro de la célula. La identidad de secuencias dentro de la célula se establece gracias a una propiedad fundamental de los ácidos nucleicos: su habilidad de formar híbridos estables entre secuencias complementarias. Marcando una de las cadenas, los híbridos formados pueden ser detectados por varios métodos. Los requerimientos básicos de la técnica de hibridación “in situ” son los siguientes (8):

1. Una sonda específica para la secuencia de interés, marcada de manera que permita una detección correcta.
2. Preservación suficiente de los detalles morfológicos para permitir la identificación y la localización de la sonda marcada.

Gran variedad de material de partida puede ser analizado mediante hibridación “in situ”: cultivos celulares, extensiones citológicas y material fijado en formol incluido en parafina. Un esquema de esta técnica aparece en la figura 1.

En la actualidad en nuestro laboratorio trabajamos de forma rutinaria con virus de Epstein Barr y HPV en extensiones citológicas previamente teñidas con Papanicolaou con resultados que mostramos en esta charla.

### **FISH**

La hibridación “in situ” con fluorescencia (FISH) permite la identificación y localización microscópica de alteraciones genéticas tanto en células en metafase como interfase. Estas alteraciones pueden ir desde la detección de alteraciones en el número de copias de un determinado cromosoma, detección de reordenamientos genéticos, detección de microdeleciones, hasta la localización y el número de copias de un determinado gen. Los principios del FISH se basan en las características bioquímicas del DNA, como son su capacidad de formar uniones sólidas entre secuencias complementarias y la posibilidad de que segmentos específicos de DNA puedan ser marcados con biotina o digoxigenina, que posteriormente reaccionan con avidina o un anticuerpo y por último unidos con un sistema de visualización inmunoenzimático o de fluorescencia. Así pues dentro de la estructura de un determinado cromosoma se abren tres posibilidades de detección:

- Secuencias génicas únicas conocidas, por ejemplo: p53, n-myc, por la utilización de múltiples secuencias geográficamente cercanas o por la inclusión de secuencias de interés en vectores de mayor tamaño (cósmidos o plásmidos).
- Las áreas centroméricas y en menor medida las teloméricas se caracterizan por secuencias repetitivas que son fácilmente detectables. La utilización de estas sondas para cromosomas individuales se usa ampliamente como un indicador del número de copias de un determinado cromosoma en núcleos de interfase. Esta es la técnica más utilizada en la práctica diaria.
- Sondas “painting” para todo el cromosoma, basadas en la identificación de cientos de secuencias únicas en toda la extensión del cromosoma. Entre otras su aplicación más usada es la identificación de reordenamientos cromosómicos complejos (traslocación).

La técnica de FISH se puede aplicar tanto en preparaciones citológicas (punciones e improntas) como en material de parafina. También puede realizarse sobre preparaciones de células enteras obtenidas de la disgregación de tejido sólido fresco o de cortes gruesos de parafina.

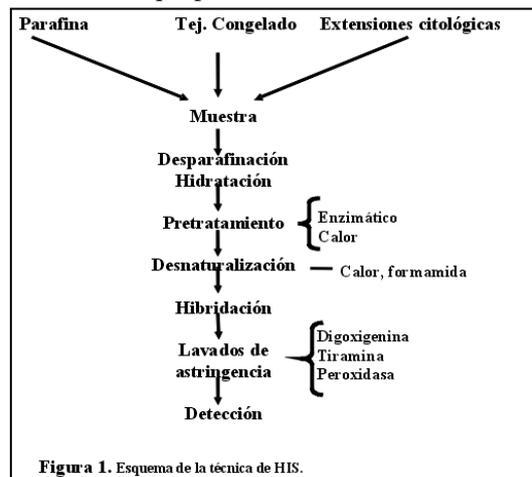


Figura 1. Esquema de la técnica de HIS.

Entre las aplicaciones interesantes del FISH en citología, la mayoría de los estudios se orientan principalmente hacia la determinación del número de copias del gen C-erb-2 en los tumores de mama, especialmente desde el desarrollo de alternativas terapéuticas para los tumores en los que se demuestra su amplificación (9, 10). Hasta el punto de que hay autores que postulan la realización de FISH conjuntamente a la punción aspiración citológica como ayuda al diagnóstico de carcinoma de mama por punción.

### PCR

La PCR se basa en la amplificación mediante la enzima Taq-polimerasa de secuencias cortas de DNA. Tanto el DNA como el RNA pueden extraerse de manera exitosa en muestras de toma citológica, tanto en fresco, como de material fijado en alcohol y teñido con Papanicolaou. Cualquier técnica de PCR puede realizarse en tomas de muestra citológica. Cabe destacar la utilidad diagnóstica en la rutina de un laboratorio de citología de la detección de reordenamientos de cadenas pesadas en la inmunoglobulina como ayuda diagnóstica a los linfomas B, algunas traslocaciones como la traslocación t(14;18) de linfomas foliculares o la traslocación t(2;5) de linfomas anaplásicos de células grandes, detección de traslocaciones en sarcomas, la realización de estudios de microsatélites y la detección de secuencias virales y agentes infecciosos (tbc) (11).

Un aspecto interesante de la citología es la posibilidad de la microdissección. Este dato es importante para estudios de microsatélites y estudios de clonalidad de un tumor en casos en los que se dispone únicamente de material de punción o de poco material. A partir del material obtenido por microdissección se realiza una extracción de DNA o RNA seguido de una PCR.

Para finalizar un breve comentario acerca de la técnica de proteómica. Los estudios de proteómica contribuyen a un mejor entendimiento del comportamiento de los tumores y de la progresión mediante la identificación y la cuantificación de las proteínas. La citología es una fuente excelente de células para el desarrollo de estas técnicas. De hecho se ha comprobado que células fijadas en alcohol y no teñidas dan muy buenos resultados para estudios de proteómica (12).

La citopatología se enfrenta hoy día a un reto apasionante. Andrea Abati describía esta idea diciendo: *“al ir desarrollando métodos para descubrir los secretos previamente encerrados dentro de las células individuales, se hace evidente que las células nos estaban continuamente hablando, nosotros sencillamente no sabíamos como escucharlas”* (1).

### BIBLIOGRAFIA

1. Abati A, Fetsch P, Filie A. If cells could talk. The application of new techniques to cytopathology. Clin Lab Med 1998;18:561-83.
2. Shield PW, Perkins G, Wright G. Immunocytochemical staining of cytologic specimens. How helpful is it?. Am J Clin Pathol 1996;105:157-62.
3. Leong ASY. Immunostaining of cytological specimens. Am J Clin Pathol 1996;105:139-40.
4. Lozano MD, Panizo A, Toledo GR, Sola JJ, Pardo-Mindán J. Immunocytochemistry in the differential diagnosis of serous effusions. A comparative evaluation of eight monoclonal antibodies in Papanicolaou stained smears. Cancer (Cancer Cytopathol) 2001;93:68-72.
5. Suthipintawong C, Leong ASY, Vinyuvat S. Immunostaining of cell preparations: A comparative evaluation of common fixatives and protocols. Diagn Cytopathol 1996;15:167-74.
6. Lozano MD, Panizo A. Papel de la inmunohistoquímica en citología. Patología 1998;31:63-66.
7. Reynolds GM, Young FI, Young JA. Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens. Cytopathology 1994;5:245-58.
8. Herrington CS. In situ hybridisation. J Clin Pathol : Mol Pathol 1998;51:8-13.

9. Mezzelani A, Alasio L, Bartoli C, Bonora MG, Pierotti MA, Rilke F, Pilotti S. C-erbB2/neu gene and chromosome 17 analysis in breast cancer by FISH on archival cytological fine-needle aspirates. Br J Cancer 1999;80:519-25.
10. Frostad B, Martinsson T, Tani E, Falkmer U, Darnfors C, Skoog L, Kogner P. The use of fine-needle aspiration cytology in the molecular characterization of neuroblastoma in children. Cancer 1999;25:60-8.
11. Pardo FJ, Soria E, De Alava E, Leiva J, Sola JJ: Detection of mycobacterial DNA by PCR in tissues with incidentally found granulomatous lesions. Mod Pathol 2001;14:186A.
12. Panizo A, Roberts D, Al-Barazi H, Bryant B, Garcia-Macias MC, Chiesa A, Pardo J, Merino M. Utilization of cytology smears and manual microdissection for proteomic analysis. Mod Pathol 2001;14:59A.

## CITOMETRIA DE FLUJO EN PAAF Y LIQUIDOS

Pedro de Agustin, Jose Luis Rodríguez Peralto, Nuria Alberti, Miguel Angel Martinez Gonzalez, Andres Perez Barrios, Pilar Higuera, Pilar Redondo  
Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid

Consiste en el análisis rápido de un gran número de células (10.000-20.000) individualizadas en suspensión, dentro de un sistema de flujo laminar sobre el que incide un haz de luz láser que proporciona información acerca de sus características físico-químicas.

Se utiliza una unidad central y otra informática y de análisis de datos.

Se pueden utilizar tanto muestras citológicas como de biopsias.

Las aplicaciones son en ANÁLISIS DE DNA (muestra en fresco o en parafina) con valor pronóstico y en INMUNOFENOTIPO (muestra en fresco) con valor diagnóstico.

### ANÁLISIS DE ADN.

Consiste en la cuantificación del ADN (ploidía) en una determinada población celular.

La detección de ADN se hace mediante la aplicación de fluorocromos que se unen de forma esteoquinética a los ácidos nucleicos. El ARN se destruye con ribonucleasas para impedir que se una al fluorocromo. Para seleccionar la población tumoral se aplica un segundo fluorocromo frecuentemente unido a citoqueratina.

Es la aplicación menos utilizada en citología. Habitualmente se usa en el estudio de tumores.

Las muestras pueden ser de PAAF o de líquidos, sobre todo orinas, aunque no exclusivamente.

Es necesario conocer la siguiente nomenclatura:

**PLOIDIA:** contenido de ADN de una determinada población celular.

EUPLOIDIA: número normal de cromosomas, distinto según cada especie = n

**HAPLOIDE = n:** 23 cromosomas, ej. células germinales.

**DIPLOIDE = 2n:** 46 cromosomas, ej. células somáticas en reposo.

**TETRAPLOIDE = 4n:** 92 cromosomas, ej. células somáticas en la fase final del ciclo.

Los resultados de los estudios del ADN se expresan en datos estadísticos e histogramas.

El estudio de cada caso debe de incluir dos aspectos: **PLOIDIA Y ACTIVIDAD PROLIFERATIVA O INDICE DE PROLIFERACION.**

LA **PLOIDIA** se expresa mediante el índice de ADN = DI. Representa el contenido de ADN del tumor en relación con el de esta población en condiciones normales. Se calcula dividiendo el número "media canal" del pico G0/G1 de la muestra tumoral por el mismo pico G0/G1 de la población control. Un tumor puede tener más de un DI.

Las distintas posibilidades pueden ser:

D1 = 1 con un solo pico G0/G1 = patrón diploide.

D1 > 0 <= 1 = patrón aneuploide.

D1 < 1 = hipodiploide.

D1 > 1 = hiperdiploide.

D1 > 2 = hipertetradiploide.

LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA O INDICE DE PROLIFERACION es la información más importante. Indica el tanto por ciento de células que se encuentran en fase S (en realidad fase S + G2/M). Es decir que no están en reposo. Es el dato más útil para predecir la conducta del tumor ya que un índice alto de proliferación suele corresponder a más recurrencias y metástasis. Cada laboratorio tiene que calcular su propio rango para la fase S en sus neoplasias diploides y aneuploides.

## INMUNOFENOTIPO

Es la aplicación mas utilizada en citología.

Consiste en el análisis de antígenos de superficie de las células sanguíneas, especialmente de leucocitos polimorfonucleares neutrofilos, monocitos y linfocitos.

La detección se hace mediante el uso de anticuerpos de superficie monoclonales específicos o CD ("clusters of differentiation") marcados con fluorocromos.

### ANTISUEROS EMPLEADOS

En Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre se utilizan frecuentemente los siguientes:

CD 45.-Antígeno común leucocitario.

CD3.-Pan T.

CD 5.-Pan T.

CD 7.- Pan T.

CD.-19.-Pan B.

C20.-Pan B

CD 4.-Helper.

CD 8.-Killer.

Cadenas ligeras Kappa.

Cadenas ligeras Lambda.

CD 30.-Activación.

CD 15.-Hodgkin.

CD 10.-Calla.

CD 23

En resumen se emplean marcadores de:

Células T

Marcadores B

CD 10=CALLA=positivos en linfocitos B inmaduros y en células B centrofoliculares.

A veces para células plasmáticas CD38 y CD138 que si bien no son específicos su coexistencia es altamente sugestiva de diferenciación plasmocelular.

### INDICACIONES

Se utiliza fundamentalmente en dos tipos de procesos. Lo más frecuente en **TUMORES HEMATOPOYÉTICOS** (leucemias y linfomas). Tratando de distinguir procesos reactivos de verdaderas neoplasias o recurrencias de procesos ya conocidos. Ponemos algunos ejemplos a continuación. Leucemia linfoblástica. Leucemia linfática crónica y linfoma linfocítico bien diferenciado. Linfoma del manto. Linfoma centrofolicular. Linfoma T periférico. Mieloma múltiple, etc.

También se usa en **PATOLOGÍA NO TUMORAL**. En l.c.r. en el diagnóstico de enfermedades inflamatorias para el recuento y diferenciación de polimorfonucleares y linfocitos y en enfermedades degenerativas, ej. esclerosis múltiple. En la que se detecta un incremento de linfocitos CD 25+ en los brotes agudos. En lavados broncoalveolares en enfermedades inflamatorias pulmonares como sarcoidosis, tuberculosis, alveolitis alérgica extrínseca o bronquiolitis obliterante para el cálculo del cociente de linfocitos CD4+/CD8+.

### MUESTRAS CITOLOGICAS

Se puede hacer tanto en PAAF como en exfoliativa.

En PAAF fundamentalmente en ganglios linfáticos pero también en cualquier órgano con nódulos sugestivos de linfoma.

En exfoliativa sobre todo en derrames, líquidos cefalorraquídeos y lavados broncoalveolares.

### METODOLOGÍA EMPLEADA EN A.P. DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE

#### ELECCIÓN DEL CASO.

A los pacientes con una historia de linfoma o sospecha clínica de proceso linfoproliferativo se les hace además de estudio con Giemsa y Papanicolaou, una muestra citológica para citometría. Si la indicación es citológica, por ej si hay dudas entre proceso reactivo y linfoma de bajo grado, se vuelve a citar al paciente para nueva PAAF y citometría de flujo al día siguiente.

#### METODICA

Se recomienda puncionar dos veces procurando que la muestra no sea hemorrágica y que el material de aspiración caiga en forma de grumo al PBS (líquido conservante), agitando a continuación enérgicamente para que se diluya completamente. Si no se obtiene grumo, se puede lavar la aguja y el embolo de la jeringa, pero solo una vez, pues si se repite la operación más veces, se corre el riesgo de que se rompan los citoplasmas y no se pueda valorar la tinción de receptores de superficie. El material diluido en PBS, se puede conservar una hora, pero en nuestro Departamento preferimos hacer el procesado en las dos primeras horas.

## HISTOGRAMAS

Habitualmente se realizan los siguientes enfrentamientos:

- 1.-PE-FITC,es decir los fluorocromos sin antisueros para comprobar el calibrado del citometro.
- 2.-CD45 (antigeno comun leucocitario)-Tamaño celular para observar si las celulas estan dentro del espectro de tejido linfoide.Si lo son se elige esta población para seguir estudiandola.
- 3.-CD3 (pan T)-CD19 (pan B ),para comprobar la proporcion de celulas T y B.En los procesos inflamatorios las T son superiores a las B (aproximadamente 60% frente al 40%).Hay que sospechar proceso linfoproliferativo B si hay mas celulas B que T.
- 4.-CD4-CD8 para ver la distribución de celulas T.
- 5.-CD3-CD7.Si se pierde el CD7 hay que descartar un linfoma T.
- 6.-CADENAS LIGERAS KAPPA-LAMBDA.Si hay predominio de 8 veces de una sobre la otra se debe sospechar linfoma B.
- 7.-CD19-CD5.Si aparece una población celular compartiendo ambos hay que hacer otro histograma enfrentando CD19-CD23.Si los tres son positivos se trata de leucemia linfoide crónica o de un linfoma linfocitico y si es negativo el CD23 es un linfoma del manto.
- 8.-CD10-CD19.Si se expresan de forma simultanea hay que pensar en linfoma folicular,leucemia/linfoma linfoblástico y en linfoma de celulas grandes.El aspecto citologico y la clinica son de gran ayuda pues los linfomas linfoblásticos se dan en niños con mal estado general y aunque las celulas son muy atípicas no lo son tanto como las del linfoma de celulas grandes o el folicular que ademas se dan en adultos

## LIMITACIONES

La citometria no es la panacea universal pero si es una util herramienta de trabajo.Hay fallos y excepciones por no hablar de los casos de material no valorable.

Veamos algunos ejemplos.

En el Hodgkin teóricamente hay positividad a CD15 y CD30,pero es excepcional que en citometria de flujo se expresen ambos a la vez,probablemente por el escaso numero de celulas de Sternberg y de Reed-Sternberg.Sin embargo generalmente la PAAF es bastante diagnostica.

Muchos linfomas T pueden pasar desapercibidos en el flujo,porque pueden ser interpretados como procesos inflamatorios que tiene predominio T o porque muchos no pierden el CD7.No obstante algunos linfomas T como la micosis fungoide cuando infiltran al ganglio ,suele expresar en el 90% de los casos CD3 y CD4 lo que facilita el diagnostico.En todo caso se debe sospechar linfoma T si hay perdida de CD7 y/o el CD3 se expresa en una proporción superior al 80% en relacion al CD19.

Tambien puede haber problemas con los linfomas B.Por ej. Hay algunas expresiones aberrantes ,por lo demas excepcionales de CD5 en aislados linfomas de celulas grandes y en foliculares.

## CONCLUSIÓN

La citometria de flujo constituye una excelente herramienta de trabajo especialmente en el diagnostico por PAAF de procesos linfoproliferativos y aunque tiene sus limitaciones , son superiores sus ventajas. Debe de valorarse dentro de un contexto clinico morfológico.

## BIBLIOGRAFÍA RECOMENDADA

- Diagn Cytopathol 1988 18 41-46
- Acta Cytol 1999 43 1070-1078
- Diagn Cytopathol 1999 21 98-104
- Diagn Cytopathol 2000 22 147-151
- Diagn Cytopathol 2000 22 152-156
- Am J Clin Pathol 2000 114 912-921
- Am J Clin Pathol 2000 114 523-533
- Diagn Cytopathol 2001 24 1-10

## **CITOLOGIA LIQUIDA TÉCNICA MONOCAPA**

E. García Ureta

H. Juan Canalejo. Coruña

Las técnicas monocapa están ganando popularidad en los últimos años.

Con ésta metodología monocapa existen en el mercado, el Cytic Thin Prep Processor (Cytic Corp, Marlborough, Massachussets, USA) y el Cytovich (Autocyte, Inc, Ellon College, North Carolina, Usa. (23,56).

La comparación crítica entre ambos procederes fue recogida por un trabajo de la Dra. Mc. Googan. Durante un año, 6 meses con cada uno de los dos procesadores, evaluó diferentes aspectos. Sin embargo, en

éste momento, el estudio se encuentra limitado ya que los procesadores que se evaluaron han sido sustituidos por otros de nueva generación.

La técnica monocapa es un proceso automatizado, diseñado para mejorar la preparación de la citología convencional. Parece ser que su fundamento está basado en la antigua cámara de sedimentación de Sayk. (37,47).

El resultado con éste procesamiento es una extensión monocapa, sin sangre, moco ni restos necróticos, distribuída de forma regular en unas superficies de 20 ó 13 mm de diámetro, según se trate del sistema Thin Prep o CytoRich.

El examen al microscopio resulta más fácil, debido a la mejor calidad de la preservación celular y a una regular distribución monocapa de la muestra.

Otro aspecto a considerar es que tan sólo se utiliza una pequeña parte de la celularidad de la muestra, pudiendo emplearse el resto de la muestra para técnicas especiales o estudios de nuevos extendidos. (23,46,53).

La muestra en el medio líquido se mantiene en condiciones óptimas a temperatura ambiente durante bastante tiempo (40).

En el apartado ginecológico ésta metodología está enfocada a la disminución de la tasa de falsos negativos y a aumentar la efectividad del screening cervical. Los falsos negativos están originados en algunos de éstos tres apartados : inadecuada recolección de la muestra, inadecuada preparación de la misma y en una mala interpretación de los extendidos.

La metodología de la técnica monocapa puede colaborar ayudando al menos en los dos últimos apartados, con el mejoramiento en la preservación y en la disposición celular, lo que condiciona una más detallada morfología.

Otro de los beneficios es retirar muchas de las células de la sangre, moco y restos necróticos, aunque los elementos microbiológicos están presentes.

En relación con el diagnóstico de gérmenes específicos, la literatura ofrece cifras similares para la técnica monocapa y los métodos convencionales aunque pueden encontrarse algunas dificultades al apreciarse los portos limpios, sin el sustrato que acompaña a los distintos tipos de infecciones. (11,30,42,47,61).

En relación con otros procesos como el HPV también nos vamos a encontrar con cuadros citológicos expresivos, presencia de coilocitos, presencia de disqueratocitos, así como también suelen ser evidentes los caracteres secundarios, presencia de células en fibras, binucleación, disqueratosis profunda, células de sarampión, etc.

Se pueden aplicar técnicas para subclasificar los distintos grupos de virus (30,33,56).

El aumento de la detección de las lesiones ha sido ampliamente referido en la literatura con diversos porcentajes de significación estadística que varían ampliamente : 65% LEE K R (36), 110% CORKILL M (16), 56% PAPILO J L (42), 279% BOLICK O R (12), 12% ROBERTS J M (51), 41% DUPREE W B (21), 75% DIAZ ROSARIO L A (19).

En relación con los tipos de lesiones, la técnica monocapa es superior a los métodos convencionales en ambos grupos, de bajo grado y alto grado (10,11,12,13,26,39,49,56,57,61).

En cuanto a la entidad ASCUS la literatura presenta cifras en las que se aprecia una disminución en los diagnósticos de sus porcentajes. (7,31,49,56,57).

En el apartado de las muestras satisfactorias pero limitadas por las técnicas monocapa presentan una reducción estadísticamente significativa (15,30,32,38,60).

Se aprecia una más alta proporción de muestras satisfactorias pero limitadas por ausencia de células endocervicales en las técnicas monocapa en relación con los métodos convencionales (1,6,20).

En cuanto a la valoración del epitelio endocervical la literatura también presenta buenos resultados con una importante disminución de la tasa de AGUS. (3,7,30,32,38,49).

Otro aspecto a considerar es el tiempo empleado en la lectura de los extendidos citológicos que es bastante inferior con la técnicas monocapa en relación con los métodos convencionales (22,23,41,42,54).

Una superficie inferior, 20 ó 13 mm de diámetro frente a 20x50 mm, menor número de células, distribución más uniforme, caracteres morfológicos mejor preservados y casi ausencia de elementos oscurecedores.

Es de señalar sin embargo que el tiempo empleado en la preparación de los extendidos citológicos es superior en las técnicas monocapa que en los métodos convencionales (22,40).

El empleo de las técnicas monocapa está alcanzando un alto grado de aceptación en muestras no ginecológicas, incluída la PAAF (40).

La técnica monocapa ha tenido una excelente aceptación para el procesamiento de las muestras de orina, debido a las similitudes físicas de los constituyentes celulares con las muestras ginecológicas para las cuales la técnica monocapa fue originalmente diseñada (47).

El bajo contenido en proteínas de las muestras de orina facilita la separación de las células en suspensión. Con la celularidad recogida pueden hacerse técnicas especiales, por ejemplo, el empleo de Inmunit.

En relación con los derrames cavitarios, la celularidad recogida por el Thin-Prep es superior a la de la citocentrífuga para iguales pequeños volúmenes, tanto para las células epiteliales como para las células inflamatorias (48).

Dentro de los procesos malignos el aspecto del Adenocarcinoma puede ocasionar problemas diagnósticos en relación con una menos acusada superposición celular (8). De otro lado, la riqueza del detalle, muchas de las células mesoteliales también pueden plantear problemas diagnósticos (8).

Las muestras correspondientes al aparato respiratorio : esputos, cepillados, aspirados bronquiales y lavados broncoalveolares presentan un examen más fácil al microscopio debido a la ausencia de moco, sangre y restos necróticos.

Las técnicas monocapa contienen menos células, alrededor de un 10%, que las preparaciones convencionales (14,28), aunque toda la celularidad de la muestra está representada debido a una minuciosa mezcla durante el proceso automatizado.

El diagnóstico citológico del Carcinoma Anaplásico de Células Pequeñas, si no se piensa en él, puede conllevar algunas dificultades (45). La celularidad se nos presenta en pequeños acúmulos donde los elementos suelen presentarse disociados, con un moldeamiento nuclear poco evidente; éstas células pueden presentar nucleolo conspicuo pudiendo apreciarse ribete citoplasmático. Esta morfología puede hacer pensar en Linfocitos o Linfoma.

En un primer momento, la técnica monocapa en la punción parece ofrecer una superior calidad a los métodos convencionales en relación con ausencia de elementos oscurecedores y una distribución más uniforme de la celularidad.

La valoración de los portas es más fácil porque las células tienen una disposición monocapa y están concentradas en un área más pequeña; sin embargo, esto no es estrictamente así ya que hay algunas dificultades añadidas.

Las técnicas monocapa pueden motivar la pérdida de células. Los hematíes están lisados o desechados a través de los poros del filtro; en las muestras muy hemáticas solo puede estar presente un número reducido de hematíes.

Las células de tamaño pequeño, tales como los linfocitos, los neutrófilos, o las células mioepiteliales, pueden igualmente ser desechadas a través de los poros del filtro y estar infrarepresentadas.

Las pequeñas partículas tales como melanina, hemosiderina y restos granulares, desaparecen del fondo.

Los restos necróticos también pueden disminuir y tienden a presentarse en pequeños acúmulos.

Los materiales extracelulares como coloide, mucina, amiloide, etc., están cuantitativamente disminuidos y alterados cualitativamente (9,23,34,35,40). Pueden aparecer como gotas más pequeñas, densas, o adquirir una apariencia filamentosas indistinguible de la fibrina.

Las grandes placas bidimensionales y los acúmulos papilares tradicionalmente apreciables en las muestras convencionales aparecen fragmentados como pequeños acúmulos (23,45). Estos cambios arquitecturales van acompañados por un aumento del número de células aisladas en el fondo que pueden dar la falsa impresión de discohesión celular.

Con la técnica monocapa, las células, en relación con la fijación en un medio líquido, aparecen más pequeñas que las mismas células en los métodos convencionales. (34,35).

Los caracteres generales de malignidad tales como pleomorfismo e irregularidades en la membrana están bien preservados. Los citoplasmas, especialmente los de las células pequeñas, son densos y precisos. Los detalles cromatínicos están bien preservados. Los nucleolos son más conspicuos, más prominentes y rojizos. Las inclusiones intranucleares, en general, son menos visibles.

En general, los procesos malignos de la mama, son fácilmente reconocibles, excepto aquellos con bajo grado nuclear o un gran componente mucinoso. (45). Estos procesos pueden ser difíciles de distinguir del epitelio mamario benigno si sólo se emplea la técnica monocapa (35,40,50).

El fibroadenoma es quizá la lesión más problemática debido a la ausencia de estroma, descenso de la celularidad, disposición celular y escasez de células bipolares.

La diferencia más significativa se encuentra en el patrón arquitectural. Las grandes placas bidimensionales características de los fibroadenomas aparecen fragmentadas en pequeños acúmulos (18,24,35).

Las células mioepiteliales aparecen disminuídas en número y tienden a disponerse en la periferia de la superficie adoptando una morfología algo más redondeada. (35,40).

Se ha demostrado un descenso en el número de muestras insatisfactorias por la superior presentación del detalle citológico y la eliminación de elementos oscurecedores.

En el extendido citológico también se pueden emplear técnicas para determinar receptores hormonales.

En el tiroides existen algunas diferencias entre las valoraciones de las muestras con las técnicas monocapa y los métodos convencionales (9,18,25,34,35,40,44).

La cantidad de coloide se encuentra disminuída y su forma de presentación también es distinta, haciéndolo en gotas en vez de una película difusa. Los detalles nucleares se aprecian mejor en las técnicas monocapa. Los núcleos tienden a ser más pequeños y uniformes. La literatura hace referencia a que las inclusiones intranucleares se aprecian mejor con los métodos convencionales que con las técnicas monocapa (9).

En cuanto a los extendidos a valorar, Frost reconoce una importante disminución en el número de portas para obtener el diagnóstico en relación con los métodos convencionales (25).

La introducción de las técnicas monocapa ha modernizado la citología (23).

Permite recoger las muestras en un medio líquido y ofrece una metodología para estandarizar la preparación de las muestras.

La técnica monocapa es ciertamente un mejoramiento y resuelve muchos problemas aunque introduce algunas dificultades.

La técnica monocapa asegura :

La presencia de células bien conservadas

Extendidos en una delgada lámina

Mínima superposición celular

Un fondo limpio de elementos oscurecedores (sangre, moco y restos necróticos)

El hecho de que la preservación de la morfología celular es muchas veces mejor, permite un diagnóstico concluyente con mucha mayor frecuencia. Así, Fischler comunica una reducción en el material de punción del 17 al 1 % en las muestras insatisfactorias. (23)

Los métodos convencionales son más expresivos para evaluar :

La arquitectura

La disposición celular

Material extracelular

En una valoración global parece ser que los beneficios superaron a los inconvenientes, teniendo además en cuenta que sólo se utiliza una pequeña parte de la muestra, pudiendo emplearse el resto para técnicas especiales o nuevos extendidos.

En relación con las técnicas de ICQ ofrece también mejores posibilidades (8,17,35,46)

Más fácil interpretación

Fondo más limpio

Menor superposición celular

Menor superficie

Empleo de menor cantidad de anticuerpos etc.

Finalmente es de señalar que todos los artículos de la literatura invariablemente hacen referencia a que es necesario un entrenamiento y adquirir cierta experiencia para interpretar los extendidos citológicos (2).

## BIBLIOGRAFIA

1. APONTE-CIPRIANI SL,  
Acta Cytol 1994;39:623-630.
2. ALLEN K A.  
Cancer 1998;84:324-327.
3. ASHFAG R.  
Acta Cytol 1999;41:81-85.
4. AUSTIN R.  
Acta Cytol 1998;42:178-184.
5. AMEN C  
Diagn Cytopathol 1993;11:33-37.

6. AWEN C H.  
Diagn Cytopathol 1994:11:33-32.
7. BAI H.  
Diagn Cytopathol 2000 :23:19-22
8. BEDROSSIAN C.  
Acta Cytol 1996:40:1059.
9. BISCOTTI C V.  
Am J. Clin. Pathol 1995:104:150-153.
10. BISHOP J W.  
Acta Cytol 1997:41:15-23.
11. BISHOP J W.  
Acta Cytol 1998:42:189-197.
12. BOLICK D R.  
Acta Cytol 1998: 42:209-213.
13. BUR M.  
Acta Cytol 1995:39:631-632.
14. COMPTON I.  
Acta Cytol 1993:37:797.
15. CORKILL M.  
Acta Cytol 1997:41:39-44.
16. CORKILL M.  
J Lower Genital Trac Dís 1998:2:12-16.
17. DABBS D J.  
Diagn Cytopathol 1997:17:388-392
18. DEY P.  
Acta Cytol 2000:44:946-50.
19. DIAZ-ROSARIO L A.  
Arch Pathl.Lab.Med 1999:17:388-392.
20. EVANS S K.  
Acta Cytol 1993:37:776.
21. DUPREE WB.  
Cancer Cytopathol 1998:84:202-207.
22. FERENCZY D F.  
Acta Cytol 1996:46:1136-1142.
23. FISCHLER D F.  
Acta Cytol 1996:40:669-675
24. FLORENTINE B D.  
Cancer 1999:87:278-85
25. FROST A R.  
Cancer 1998:84:17-25
26. GUIDOS B J.  
Diagn Cytopathol 1999:20:70-73
27. HATCH K D.  
Obstet Gynecol 2000:95:51
28. HEESK  
Diagn Cytopath 1995,12:181-185
29. HOWELL L P.  
Acta Cytol 1998:42:171-177
30. HUTCHINSON M L.  
Am J Clin Pathol 1991:96:300-305
31. HUTCHINSON M L.  
Acta Cytol 1992:36:499-504
32. HUTCHINSON M.  
Am J Clin.Pathol 1994:101:215-219
33. HUTCHINSON M L.  
Cancer 1999:87:48-55

34. KURTYCZ D F.  
Diagn Cytopathol 2000:23:1-5
35. LEE K R.  
Acta Cytol 1996:40:895-899
36. LEE K R.  
Obstet Gynecol 1997:90:278-84
37. LEHMITE R.  
Z Med Lab Diagn 1982:22:224-228
38. LINDER J.  
Diag Cytopathol 1998:18:24-32
39. LINDER J.  
Arch Pathol Lab Med 1998:122:139-144
40. LEUNG C S.  
Diagn Cytopathol 1997:16:368-371
41. MASSARONI-WAFAI R.  
Diagn Cytopathol 2000:23:208-212
42. MC GOOGAN E.  
Acta Cytol 1996:49:107-199
43. MC GOOGAN E.  
Acta Cytol 1998:42:25-32
44. MESONERO CE.  
Acta Cytol 1993:37:795
45. MICHAEL C W.  
Diagn Cytopathol 2000:23:6-13
46. NASER IA.  
Acta Cytol 1993:37:799
47. NICOL T.  
Acta Cytol 2000:44:567-575
48. PAPILO J L.  
Acta Cytol 1994:18:33-36
49. PAPILO J L.  
Acta Cytol 1998:42:203-208.
50. PEREZ-REYES N.  
Am J Clin Pathol 1994:102:349-353
51. ROBERTS J M.  
Med J Aust 1997:167:466~469
52. SALVAGGI S M.  
Diagn Cytopathol 2000:23:23-26
53. SCHMITT F C.  
Diagn Cytopathol 2000:23:27-28
54. TEZUKA F.  
Acta Cytol 1996:40:513-518
55. VASSILAKOS P.  
Acta Cytol 1996:40:496-500
56. VASSILAKOS P.  
Acta Cytol 1998:42:198-202
57. VASSILAKOS P.  
Acta Cytol 1999:43:65-68
58. WEINTRAUB J.  
1997 Paris France Editions Mellet
59. WEINTRAÜB J.  
Diagn Cytopathol 2000:22:52:59
60. WILBURG D.  
Am J Clin Pathol 1994:101:209-214
61. WILBUR D C.  
Acta Cytol 1997:41:24-29

## AUTOMATIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO CITOPATOLÓGICO

José Antonio Giménez Mas  
H. Royo Villanova. Zaragoza

La baja incidencia del cancer de cervix en España es en parte debida a las campañas de prevención y en particular a la eficacia de la citología cervico-vaginal para detectar lesiones premalignas. La incidencia de cancer de cervix avanzado se detecta mayoritariamente en pacientes que no han sido captadas en los programas de prevención o que los han seguido irregularmente por lo que se debe seguir insistiendo en ampliar el radio de acción, definiendo grupos de especial riesgo, con el objetivo final de una total cobertura.

Los resultados obtenidos son producto de un trabajo que, si bien afecta a distintos segmentos de la estructura sanitaria, exigen un esfuerzo muy considerable a los servicios de Anatomía Patológica, sobre los que descansa la responsabilidad final del diagnóstico. Aunque se podría afirmar que tras un periodo razonable de entrenamiento las decisiones diagnósticas en este campo de la patología no revisten especial dificultad, se detecta una proporción en torno al 20-30 % de falsos negativos, cifra excesivamente elevada que debería ser voz de alarma intranquilizadora e inductora de medidas correctoras.

Para mejorar la eficacia de este programa de prevención se pueden adoptar medidas aplicables en distintos niveles de la cadena del proceso. Así incrementar el reclutamiento alcanzando poblaciones que por diversos motivos se han mantenido excluidas y una formación específica del personal dedicado a la toma de la muestra podrían ser medidas enormemente eficaces.

Otras medidas incumben directamente a los servicios de Patología. Así las nuevas tecnologías de extensión citológica monocapa (ThinPrep<sup>®</sup>, AutoCyte PREP<sup>®</sup>) proporcionan muestras de mayor calidad en donde el diagnóstico se hace en mejores condiciones. Estos sistemas requieren que la toma, realizada como habitualmente, sea introducida en un líquido fijador y enviada al laboratorio en vez de extenderla sobre el porta manualmente. El notable incremento en el coste por muestra ha limitado su uso, al menos de momento.

El gran número de muestras que generan estas campañas y la alta proporción de negatividades convierte el diagnóstico de las citologías cervicovaginales en una actividad rutinaria que facilita la aparición de falsos negativos, en parte por fatiga profesional y en parte por la inconsciente noción preconcebida de que la muestra posiblemente será negativa.

Para neutralizar este efecto se han propuesto distintos modos de corrección como por ejemplo la revisión sistemática del 10 % de las citologías diagnosticadas como negativas en una primera observación seleccionadas por azar, o bien la observación rápida (30'') de todas ellas en una segunda vuelta.

Como alternativa, los modernos métodos informáticos y de análisis de imagen nos proveen de nuevas herramientas automáticas para contradespistaje ('screening' secundario) o para 'screening' primario. El primer objetivo de las mismas fue el 'screening' secundario, es decir chequear las muestras previamente informadas de negativas seleccionando un porcentaje para reexaminar. Actualmente existen ya equipos para el 'screening' primario, es decir que automáticamente seleccionan un alto porcentaje de citologías definitivamente negativas y una minoría que deben ser examinadas personalmente.

Los sistemas que se relacionan a continuación están en diversas fases de desarrollo:

- AutoPap System<sup>®</sup> se ha concebido como un sistema para 'screening' primario el cual trabaja sobre citologías extendidas monocapa con AutoCyte PREP<sup>®</sup> o ThinPrep<sup>®</sup>. En la actualidad selecciona no más de un 25 % de citologías que no requieren ser revisadas personalmente. El resto son jerárquicamente cualificadas según el riesgo de ser anormales. También puede ser utilizado en 'screening' secundario.
- PAPNET<sup>®</sup> es un sistema ideado para 'screening' secundario sobre muestras citológicas extendidas manualmente.
- CYMET<sup>®</sup> es un sistema que examina una preparación en 90'' y ofrece al citotecnólogo los campos potencialmente atípicos.
- AcCell-Savant<sup>®</sup> se basa en la tecnología de citometría de flujo para análisis del ciclo celular y permite seleccionar las células anormales para revisión.

Estos y otros sistemas requieren madured, mejorar su eficacia y un análisis de costes que hagan posible su implantación en la rutina práctica.

## DETECCION DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.

Enrique Lerma

Servicio de Patología. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

### ACCIONES DEL VPH.

La infección por el virus del papiloma humano (VPH) tienen lugar en el cérvix, en las células de la capa basal de la zona de transición, a través de microerosiones epiteliales. Probablemente la integrina  $\alpha\beta 4$  actúe como receptor viral específico. Una vez en la célula, el virus se multiplica en paralelo a la maduración celular y así puede producirse la transmisión de la infección, vía contacto sexual. En el bajo porcentaje de casos en los que aparece una lesión precancerosa, parece que hay una relación directa entre la severidad de la displasia y el aumento en la expresión de la proteína de los oncogenes virales E6 y E7 (al menos en relación con las cepas 16 y 18). El mecanismo sería el siguiente: Tras la integración del ADN viral en el genoma del huésped y activación de E2, se produciría un aumento en la expresión de E6 (que originaría la degradación de p53) y de E7 (con una inactivación/degradación de pRb). Además, E7 activa a las ciclinas A y E y bloquea a p21 y p27. Todos estos fenómenos conducen a una proliferación celular sin control. A esta relación de errores genéticos podríamos añadir otros como activación de c-myc y las sobreexpresiones de c-erbB2 y de cdk4, que generalmente tienen lugar en la fase de carcinoma invasor. Si a esto le sumamos un déficit local de la inmunidad, con disminución en la expresión de interferón  $\gamma$ , interleukina (IL)10 e IL12 podremos explicar, al menos parcialmente, el desarrollo de la neoplasia.

El cambio coilocítico, marcador morfológico de la infección viral, se produce por efecto de la sobreexpresión de E6, con la participación de E4, con la alteración del citoesqueleto y la aparición de la vacuola perinuclear.

### DETECCION DEL VPH.

Hay numerosas técnicas para demostrar la presencia del VPH en muestras del aparato genital femenino. El Southern blot era la más sensible, pero tenía la desventaja de ser muy tediosa, complicada y cara; además requería material fresco. La técnica de Dot blot es más simple, con una sensibilidad similar a la anterior, pero con el inconveniente de que también hasta hace pocos años se requerían sustancias radiactivas para su revelado. También se ha desarrollado técnicas de PCR basadas en la utilización de "primers" de consenso (MY09/11 y GP5+/6+). Por último, tenemos

el método de captura de híbridos en fase líquida (HC II), en la que células colonizadas por distintas cepas del virus se pueden identificar mediante una hibridación del ADN viral y su posterior identificación inmunohistoquímica con un Ac terciario marcado con fosfatasa alcalina unida a su vez con una sustancia luminiscente. La sensibilidad de HC II es de 1 pg. ADN-VPH/ml, casi tal alta como la del Dot blot, pero mucho más sencilla y económica. Además, este método permite cuantificar la carga viral de las células, como parámetro cuantitativo de valoración de la severidad de la infección.

Desde un punto de vista práctico, las técnicas que parecen imponerse para la identificación del VPH son las dos últimas, que tienen sensibilidad semejante. Les expondré mi experiencia con el método de la de captura de híbridos en fase líquida (nueva versión) y los resultados que hemos obtenido.

### APLICACIONES DE LA DETECCION DE VPH.

Inicialmente se pretendió introducir esta técnica como sustituto de la citología convencional para el cribado del cáncer de cérvix, dado el elevado número de falsos negativos, que según algunos autores llegan al 50%. No se tuvo en consideración que más del 90% de las infecciones virales curan de modo espontáneo y que sólo en el 3% de las de las infecciones persistentes acaba apareciendo una lesión escamosa intraepitelial (LEI) o un carcinoma. Aún se publican trabajos apoyando esta idea y, así, recientemente se ha publicado que la HC II tiene más sensibilidad que la citología para identificar el virus (100% vs 48%). Además del sesgo que supone utilizar el HC II como referencia y a la vez como parámetro de comparación, cuando se valora la especificidad de ambos métodos se advierte la ventaja de la citología (91.3% vs 98.8%) en el diagnóstico de la lesión. La conclusión que podemos extraer es que **la citología identifica la lesión preneoplásica, que es lo hoy tiene tratamiento, mientras que el HC II identifica la presencia del VPH y la mayoría de las infecciones regresan espontáneamente.**

La positividad en la detección del VPH en las LEI es del 95% en las de alto riesgo, 85% en las de bajo riesgo y 55% en los ASCUS. Parece claro que la aplicación de HC II en estos casos es redundante pues ya tenemos identificada la lesión. Además, también en el 20-28% de las inflamaciones cervicales se identifica el VPH, por lo que vuelve a destacarse la poca especificidad de las técnicas virales para el diagnóstico de las lesiones

cervicales. Por ello los autores que aún insisten en el empleo de HC II en el cribado del cáncer de cérvix, lo limitan a mujeres mayores de 35 años, cuando disminuye la incidencia de infecciones virales.

En base a nuestra experiencia, y en la de otros autores como Meijer y cols., las aplicaciones prácticas de las técnicas moleculares en la patología del cervix uterino serían:

1. **Complemento de la citología en paciente de riesgo**, como las VIH+, para la reducción del porcentaje de falsos negativos.
2. **Modificación del seguimiento en los casos de atipia de significado indeterminado**. Este criterio también se podrá aplicar a las **LEI de bajo grado**. Solo en los casos VPH positivos estaría indicada la colposcopia.
3. **Control de los tratamientos**. Diagnóstico precoz de recidivas.

## BIBLIOGRAFIA

- Bosch FX y cols. Papillomavirus reseach update: highlights of the barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. J Clin Pathol 2001; 54:163-175.
- Durst M y cols. Human papillomavirus type 16 gene expression and DNA replication in cervical neoplasia. 1992; 189:132-40.
- Ferenzy A. Viral testing for genital human papillomavirus infections: recent progress and clinical potentials. Int J Gynecol Cancer 1995; 5:321-328
- Meijer y cols. HPV typing testing in gynecological pathology: has the time come?. Histopathology 1998; 33:83-86.
- Mitra AB y cols. ErbB2 oncogene is frequently amplified in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Cancer Res 1994;54:637-9.
- Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:4412-7.
- Wright TC y cols. Comparison of management algorithms for the evaluation of women with low grade cytologic abnormalities. Obstet Gynecol 1995; 85:202-210.
- Zerfass-Thome K y cols. Inactivation of the cdk inhibitor p27kip1 by the human papillomavirus type E16E7 oncoprotein. Oncogene 1996; 13:2323-30.

## EVOLUCIÓN TECNOLÓGICA Y SUS APLICACIONES PRÁCTICAS EN CITOPATOLOGÍA

Hugo Galera Davidson. Sevilla

Está fuera de discusión y de duda que los nuevos métodos diagnósticos, entre los que destacan las técnicas de imagen, rescatan para el médico clínico parte del diagnóstico morfológico, pero no es menos cierto que el patólogo puede también hacer uso de nuevas tecnologías que facilitan el desarrollo de su disciplina en las dos vertientes tradicionales: por un lado le permiten una mayor aproximación al conocimiento etiopatogénico de la enfermedad y, por otro lado, le configuran un espacio de mayor nivel científico con unos diagnósticos más precisos y con otros antes no previsibles. Desde otro punto de vista, hasta hace aproximadamente 30 años, el patólogo sólo disponía de tres métodos para el estudio morfológico de la enfermedad (anatómico, histológico y citológico), pero primero las técnicas inmunoquímicas y morfométricas, comenzaron a modificar su forma de ejercicio, y en el presente la biología molecular no sólo comienza con una seria revolución que amenaza el contenido de la disciplina y la actividad profesional, sino que obliga a esta comunidad científica a propiciar un necesario y programado vuelco de los profesionales hacia tales materias. En una gran parte de las enfermedades, pero sobre todo en las hereditarias y en el cáncer, a menudo es preci-

so integrar los datos proporcionados por la genética molecular con los rasgos clínicos y patológicos convencionales. Ningún otro especialista de la medicina o licenciado en otras materias, está tan capacitado como el patólogo para llevar a cabo dicha integración en el lugar adecuado, es decir, allí donde asienta la enfermedad. En ocasiones anteriores ya he insistido en que el patólogo tiene en su mano algo que le va a permitir sobrevivir con holgura en este nuevo campo biotecnológico. En medicina casi todos los escalones de un proceso diagnóstico o de investigación requieren un ligamen morfológico, para situarse en el tejido y en la lesión. No es posible que biólogos, químicos y, menos aún, médicos clínicos, puedan dejar de contar con eso tan importante como es la tradicionalmente sólida formación del patólogo en la identificación de células y tejidos. La interpretación patobiológica no puede completarse en la medida de lo actualmente posible, sin el concurso del patólogo.

Estamos en el marco de un congreso de la SEAP, afrontando un Simposio sobre Citopatología y, en particular, haciendo referencia a la aplicación de nuevas tecnologías. En principio, para introducir mi tema y por lo anteriormente expuesto, no parece oportuno hacer distinción entre estudios histopatológicos y citopatológicos, pues simplemente se trata de dos métodos de estudio de un mismo cuerpo de doctrina que es la Patología, lo cual perfila la existencia de una única especialidad médica. En ocasiones la pretendida distinción ha sido fuente de conflictos, con reactivaciones periódicas, pero más sobre la base de intereses estrictamente personales o de pequeños colectivos, que sobre bien sustanciados argumentos. No obstante, estos dos métodos de trabajo por fortuna intervienen en el programa completo de residentes en la especialidad, siendo todo ello compatible con que, en el ejercicio profesional posterior, se desarrollen inclinaciones particulares por especial inclinación hacia determinado campo de la patología, bien sea cito o histológico, sin que ello suponga un necesario desgaje de titulaciones a partir de la Patología o Anatomía Patológica. Tanto es así que son muchos los patólogos que practican con destreza la citopatología, sin dejar de ser excelentes patólogos generales o que, incluso, practican a la vez, y con continuidad, la citopatología, y determinados campos de la patología, o incluso la patología general con todo su contenido.

Precisamente esta visión integral de la Patología, es la que obliga a un buen uso y racional aplicación del armamentario tecnológico que en el presente está a disposición de los profesionales. Con ello, se quiere llamar la atención especialmente en el uso innecesario de técnicas inmunocitoquímicas y de biología molecular en determinados estudios citológicos. Acciones de este tipo favorecen las críticas de los eficientistas y dificultan la implantación de técnicas, a veces de elevado coste, pero que verdaderamente mejoran la calidad diagnóstica exigible y amplían el campo de actuación de la citopatología.

Un buen ejemplo de la utilización indebida de tecnología compleja, puede ocurrir en la citología de los ganglios linfáticos. Salvo raras excepciones, ante un diagnóstico más o menos sugestivo de proceso linfoproliferativo resulta impropio realizar un perfil inmunohistoquímico, pues el obligado estudio biopsico proporciona arquitectura tisular para un examen de mayor calidad. Algo parecido ocurre con otras muchas localizaciones o tipos de lesión que sin o con el resultado de técnicas sofisticadas, la indicación clínica necesariamente será el imprescindible estudio histológico con material más adecuado para la aplicación de las técnicas en cuestión.

Parece oportuno completar estos comentarios con algunos otros ejemplos ilustrativos sobre las ventajas de las nuevas tecnologías en citopatología.

La disección de los ganglios axilares está siendo sustituida por el examen del ganglio centinela. Este procedimiento es logísticamente complicado, requiere mucho tiempo y, a menudo, requiere la evaluación preoperatoria inmunohistoquímica. La PAAF dirigida con ecografía, de los ganglios axilares, es un procedimiento fácil y accesible que se puede incluir en el estadiaje preoperatorio de pacientes con cáncer de mama que necesitan una disección completa de los ganglios linfáticos en la primera cirugía.

La citología en fase líquida o citología de monocapa o de capa fina elimina en gran parte las grandes variaciones de calidad técnica que aparecen en los frotis convencionales. Algunos trabajos comparativos refieren una disminución hasta del 50% de ASCUS y de AGUS en los preparados de monocapa. Estos resultados son contundentes desde el punto de vista de la calidad diagnóstica, pero el elevado coste de material que se utiliza exige una mayor comprobación en estudios de coste-efectividad. Otros trabajos señalan un menor índice de material inadecuado, mayor presencia de células endometriales y mayor seguridad diagnóstica en las lesiones H-SIL. También en los estudios citológicos de derrames y de lavados, los preparados monocapa ofrecen una mayor sensibilidad diagnóstica. En particular, en citopatología pulmonar los resultados parecen ser excelentes. Pero estos buenos resultados tan sobresalientes lo siguen siendo en la PAAF de cada órgano, permitiendo no sólo un diagnóstico de gran calidad, sino también la fácil aplicación de investigaciones complementarias, como receptores hormonales, ploidía del ADN, receptores de membrana HER2, inmunocitoquímica, etc...; todo ello con excelente calidad de imagen y valoración más fiable que la proporcionada sobre frotis convencionales.

Los estudios cromosómicos con técnicas convencionales o con sistemas más modernos, también pueden formar parte del área de expansión de la citopatología. en el cáncer de mama, por ejemplo, las anomalías numéricas de los cromosomas están estrechamente relacionados con la ploidía y con el grado de malignidad. Pero los indicadores pronósticos están más influenciados por aberraciones estructurales y por regulaciones transcripcionales. Sin embargo, la aneuploidía del cromosoma 17 es marcador de alto grado de malignidad que se acompaña de función anormal de la P53.

Aunque la cuantificación del ADN sigue siendo cuestionada en muchas de sus aplicaciones, en distintas situaciones patológicas, se acepta que, en el cáncer de mama cualquiera que sea el programa empleado, el valor de la mediana de la fase S, representa un marcador biológico de pronóstico suficientemente firme. Esta práctica puede ser aplicada en material aspirado, incluso con mayor fiabilidad que en material tisular.

Dentro del prometedor campo de la citología urinaria, es conveniente resaltar la necesaria crítica a que se debe de someter la evaluación de la ploidía del ADN. En general, los carcinomas uroteliales de bajo grado son diploides y los de alto grado son aneuploides. Como resultado, la aneuploidía es un importante

indicador de alto grado de malignidad, pero también lo puede ser de carcinoma in situ. A su vez la aneuploidía, junto con una citología sospechosa, es altamente predictiva de recidiva. Como se puede ver, el análisis de ADN tiene importantes aplicaciones en citología urinaria, pero los resultados pueden estar distorsionados. Las causas de esta distorsión pueden ser intrínsecas, tal como la medida de células superficiales, o extrínsecas, debido a la medición de células infectadas por virus del poliovirus o de células procedentes de las vesículas seminales. Por consiguiente, hay que tener siempre en cuenta que determinadas alteraciones benignas pueden causar anomalías en la ploidía del ADN de las células de la orina.

El uso de técnicas moleculares en citopatología se aproxima como una práctica brillante para ciertas aplicaciones concretas. Pero otras aplicaciones están todavía en fase experimental o de desarrollo, careciendo en el presente de utilidad clínica. La literatura reciente sobre este tema contiene trabajos citopatológicos incluyendo detección de clonalidad, FISH, pérdida de heterocigosidad, mutaciones, etc... Otras nuevas técnicas moleculares, recientemente descritas, pueden tener un impacto espectacular en el diagnóstico patológico en general y citopatológico en particular. Sobre todo las técnicas de detección in situ de mutaciones puntuales y la tecnología de biochips de ADN, tal vez puedan ser aplicaciones potenciales en la citopatología del futuro.

La PCR-SSCP es una excelente técnica analítica para establecer la posible relación entre una lesión metastásica y un tumor primario conocido. En el caso de un adenocarcinoma endometrial con recidiva postquirúrgica en el septo-rectovaginal y con ganglio linfático metastásico, la presencia en ambas lesiones del mismo patrón aberrante PCR-SSCP permite asegurar el mismo origen endometrial de ambas lesiones. El análisis inmunohistoquímico no podría distinguir entre metástasis de cáncer de mama y de adenocarcinoma endometrial. En consecuencia, el análisis molecular puede ayudar a identificar la fuente de la enfermedad metastásica.

Pero el campo de actuación en citopatología se puede ampliar aún más con la aceptación del concepto oncológico de enfermedad mínima residual. Material aspirado de médula ósea y de ganglios linfáticos, puede permitir la identificación inmunocitoquímica de células tumorales aisladas o simplemente la de determinantes moleculares de micrometástasis. De esta forma el diagnóstico citopatológico puede convertirse en decisivo en el diseño de nuevas estrategias para el tratamiento sistémico de la enfermedad mínima residual.

En otros campos de actuación las cosas no están tan claras, o al menos no se sigue un camino común para conseguir un determinado objetivo. Para algunos la aneuploidía analizada con citometría de alta resolución supone mejor marcador de progresión o persistencia de una lesión CIN I/II que la demostración de infección por HPV de alto riesgo. Para otros los mecanismos moleculares de la transformación inducida por el HPV se sitúan como fundamento de un diagnóstico completo (riesgo y progresión) para un futuro no muy lejano. La expresión de los oncogenes E6 y E7 es crítica para inducir la transformación y mantener el crecimiento continuo de las células del cáncer cervical. La inestabilidad genética generada por E6 y E7 permite la recombinación entre genes virales y celulares, lo cual es la base de la integración del virus en los cromosomas de las células del huésped. De este modo se incrementa la expresión y estabilidad de RNAm de E6 y E7 y se mantiene la actividad oncogénica. Esta nueva visión de los mecanismos moleculares que inducen la

displasia y neoplasia cervical permite perfilar nuevos marcadores diagnósticos. Buenos ejemplos son la marca de expresión de los oncogenes virales en células basales competentes para la replicación (p.e., ciclina dependiente de kinasa inhibidor p16), así como identificar la progresión de L-SIL a H-SIL mediante la detección de copias de genoma integrado (prueba APOT).

El cáncer de vejiga muestra un presente y un futuro con importantes requerimientos de estudios citopatológicos. La mayoría de los pacientes (80%) tienen un tumor urotelial superficial o no invasivo. Más del 60% de estos tumores superficiales recidivan después de la resección transuretral, y más importante aún, el 15% de estas lesiones recidivantes progresan a través de la lámina propia hasta alcanzar el músculo detrusor de la vejiga. La supervivencia a los 5 años de los pacientes con cáncer infiltrante es sólo del 50%. En consecuencia, es importante detectar el tumor inicial y la recidiva con la mayor precisión posible. En este sentido, se han puesto en práctica distintas pruebas biomoleculares, tratando de mejorar la sensibilidad de la citología convencional. Algunas pruebas pretenden detectar proteínas de matriz nuclear típicamente expresadas por tejido canceroso (NMP22, BLCA-4), mientras otras son más específicas para detectar cambios en el citoesqueleto urotelial canceroso (citoqueratina 20, VC). Pero hasta ahora ninguna de estas pruebas no citológicas ha podido superar el despistaje convencional. La detección de microsatélites es un método sensible para determinar inestabilidad genética y pérdida de heterocigocidad en células de la orina, pero su integración en la práctica clínica es difícil por la complejidad de la prueba y la dificultad para seleccionar los marcadores. Por consiguiente, por ahora no existe una prueba, en lo que a especificidad se refiere, que sea superior a la citología convencional. Sin embargo, la detección de pequeñas lesiones de bajo grado puede mejorar con las nuevas tecnologías.

Aunque los criterios anteriormente expuestos acerca del diagnóstico citológico del cáncer urotelial, son las más comúnmente aceptadas, algunas líneas de investigación apuntan en otro sentido. Así, la aplicación de la tecnología FISH a las células de la orina, bien con sondas uni o multicoloreadas parece ser una prueba bastante sensible para el diagnóstico de cáncer urotelial, especialmente en tumores diploides de bajo grado y sobre todo teniendo en cuenta que se precisan muy pocas células para su evaluación. Una de las mayores ventajas de la técnica FISH es que el análisis molecular puede realizarse en las células mientras se preserva la morfología.

## **Referencias**

- Cairns P et al. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nature Genetics* 11: 210-212, 1995.
- Meloni AM et al. FISH studies of urinary cells of patients with bladder cancer. *Urol Oncol*, 1: 234-239, 1995.
- Raffle AE. Screening for the 21st century: Learning from the past. *Cytopathology*, 11: 4-7, 2000.
- Rimm DL. Molecular biology in cytopathology: Current applications and future directions. *Cancer* 90: 1-9, 2000.
- Sauter G et al. Y chromosome loss detected by FISH in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 82: 163-169, 1995.
- Scurry JP y Duggan MA. Thin layer compared to direct smear in thyroid fine needle aspiration. *Cytopathology*, 11: 104-115, 2000.

Stoler MH. Advances in cervical screening technology. Mod Pathol 13: 275-284, 2000.

Tabbara SO et al. Changing trends in breast fine-needle aspiration: Results of the Papanicolaou Society of Cytopathology Survey. Diagn Cytopathol 22: 126-130, 2000.

## **PATOLOGÍA AUTÓPSICA**

### **REGISTROS DE AUTOPSIAS**

Dra. Isabel Guerra Merino

H. Txagorritxu. Vitoria

#### **INTRODUCCIÓN**

El objetivo final de un sistema de salud es prolongar en cantidad y calidad la vida del individuo. La muerte, por tanto, es su mayor fracaso. Analizar y aprender de ella, mediante la autopsia, debe ser una actividad obligada y sistemática, ya que la autopsia permite el estudio completo del enfermo y de la enfermedad.

La autopsia contribuye a la evaluación de la calidad, de la utilización de los recursos diagnósticos y terapéuticos, tiene un gran valor desde el punto de vista docente, tanto en la formación pregrado como postgrado, y es de gran utilidad para la realización de trabajos científicos, así como desde el punto de vista legal.

El valor de la autopsia hoy sigue siendo indudable. A pesar de ello la autopsia atraviesa una crisis en el mundo actual y en los hospitales españoles. Los avances diagnósticos mediante las técnicas de imagen no han reducido su valor, pues las discordancias clínico-patológicas siguen existiendo en nuestros días, en que tenemos a nuestro alcance una importante tecnología diagnóstica. Además la autopsia debe contribuir a los estudios epidemiológicos de diversas enfermedades.

En la investigación no solamente es útil para trabajos descriptivos de hallazgos histopatológicos, sino también como aplicación de la investigación básica a la clínica. El examen postmortem aporta al investigador la oportunidad única de examinar cambios en los tejidos humanos, de otra forma, inaccesibles. Algunas técnicas moleculares pueden aplicarse al estudio de muestras de biopsia incluidas en parafina. Así mismo el tejido procedente de autopsia, en bloques de parafina, puede servir para estudiar no solamente neoplasias sino infecciones víricas y enfermedades hereditarias y familiares, de pacientes de generaciones anteriores fallecidos hace años.

### **HISTORIA DE LOS REGISTROS DE AUTOPSIA**

#### ***JAPÓN***

Cada año fallecen en Japón unas 700.000 personas y, debido a la tradición, las autopsias se realizan más raramente que en los países occidentales.

En 1958, la Sociedad de Patología Japonesa estableció un sistema de registro de autopsias para recoger los datos de forma escrita, de las mayores instituciones de Japón y permitir así a sus miembros usar la información de esos pocos casos de forma efectiva, y publicar los resultados. Desde 1960 los datos recogidos son publicados anualmente en el Anuario de casos de autopsia de Japón, también denominado "Bouken Shuho".

Entre 1958 y 1973 se registraron 393.343 casos, y entre 1974 (año en que se comienza con la informatización) y 1993 se recogieron 689.000 casos más. El índice de autopsias durante todo este tiempo ha permanecido constante, alrededor del 5%, es decir unas 35.000 autopsias al año, registradas todas ellas en el Bouken Shuho.

En el Registro japonés, se recogen los datos de interés de cada paciente, que son: hospital, nº de autopsia, edad, sexo, localidad, ocupación, diagnósticos clínicos, diagnósticos anatomopatológicos y comentarios.

Posteriormente se codifica la patología de la autopsia con la CIE-9 (Clasificación Internacional de Enfermedades) añadiendo el código MOTNAC (Manual of Tumor Nomenclature and Coding de la Sociedad Americana de Cáncer) en las neoplasias.

La sección estadística se encarga de realizar la explotación de los casos emitiendo tablas de enfermedades según la edad. Destaca especialmente un estudio de neoplasias en 20 años, en el que se compara la frecuencia de determinados tumores primarios en cuatro periodos de cinco años, diferenciando por edad, sexo y tipo histológico. Se establecen igualmente la frecuencia de los tumores en las diferentes regiones de Japón, creando así un mapa epidemiológico de las neoplasias.

## **CUBA**

En Cuba, desde hace años, el índice de autopsias es alto (50-60%). En 1994 nace el Sistema Automatizado de Registro y Control en Anatomía Patológica (SARCAP) con dos bases de datos, para biopsias y autopsias. La llamada Base de Datos de Autopsia Nacional tiene entre sus objetivos: facilitar el conocimiento de los diagnósticos clínicos y anatomopatológicos y en especial las causas de muerte: directas, intermedias, básicas o contribuyentes; conocer las discrepancias y coincidencias diagnósticas; evaluar la calidad de la labor médica realizada y realizar trabajos científicos en diversas líneas de investigación

Los diagnósticos clínicos y anatomopatológicos se codificaron según la CIE-9 y SNOMED. El registro cuenta hasta el momento con 50.000 autopsias, que constituyen el total de las realizadas.

En ellas, la bronconeumonía fue la causa directa de muerte más frecuente, en el 26,1%, y el infarto agudo de miocardio en el 14%. La arteriosclerosis sistémica fue la causa básica de muerte más frecuente, encontrándose en el 18,2%, seguida de la arterioesclerosis coronaria en el 12,7%. El pulmón se encontró afectado en el 57,9% de los casos y en el 32,1% de los pacientes se encontraron lesiones de daño multiorgánico. El cáncer de pulmón se diagnosticó en el 4,8% y el de colon en el 1,8% de los casos.

Se ha realizado la correlación clinico-patológica según los siguientes criterios: *total*, cuando los códigos clínicos y autópsicos coinciden; *parcial* si el diagnóstico coincide en lo general y discrepa en lo particular y *no existente* cuando no hay coincidencia diagnóstica. Hubo acuerdo total en la causa básica en el 48,6% y en la causa directa en el 41,4%. Acuerdo parcial en la causa básica en el 13,9% y en la causa directa en el 22,6% y los diagnósticos no coincidieron en la causa básica en el 30,3% y en la causa directa en el 22,4% de los casos.

## **ESTADOS UNIDOS**

En 1975 el College of American Pathologists propuso el desarrollo de una Base de Datos Nacional de Autopsias, que sirviera de centro de información patológica, biomédica, demográfica y epidemiológica, con un potencial beneficio desde el punto de vista científico y para la investigación, sin embargo no se llegó a desarrollar.

En 1995 se creó la Internet Autopsy Database (IAD) en el John Hopkins Hospital de Baltimore, con la aportación de 49.000 informes de autopsia procedentes de doce centros hospitalarios. La información del registro ha sido utilizada hasta el momento en unas 1200 publicaciones.

Para proteger la privacidad de los pacientes, la base recoge el código de la entidad colaboradora, de la localidad y del paciente mediante unas cifras. Existe un doble sistema de encriptación que hace imposible la identificación del paciente y del centro. También se registra el año de la muerte, la edad, el sexo, la raza y la ocupación. Se incluyen de forma concisa y breve los datos clínicos, los hallazgos anatomopatológicos y la causa de la muerte, todo ello ha de estar bajo un formato especial que ocupa menos de un folio. Cualquier centro del mundo puede colaborar con sus casos si los envía con ese formato. Posteriormente las hojas del registro se traducen automáticamente en un listado de términos médicos, que se codifican electrónicamente al SNOMED, pasando a formar parte de la base de datos.

Aquellos investigadores que quieran más información de determinados casos, o incluso preparaciones o tejido para la realización de trabajos especiales, tienen a su disposición una dirección de correo electrónico para solicitarla al Registro y éste se pone en contacto con el centro colaborador del caso que establecerá el contac-

to con el investigador.

La base de datos de autopsia en Internet americana es de gran valor para epidemiólogos y para investigadores, ofreciendo la posibilidad tanto de contribuir con casos como de obtener libremente datos de otros centros, y asegura la confidencialidad de los pacientes, de los médicos y de los centros hospitalarios.

## **REGISTRO INTERHOSPITALARIO DE DIAGNÓSTICOS AUTÓPSICOS DE LA SEAP**

En enero de 1997 se creó el Club de Patología Autópsica dentro de la SEAP. Las funciones y objetivos aprobados entonces estuvieron orientados a impulsar el aprovechamiento de los hallazgos autópsicos con fines científicos, entre ellos la creación de un REGISTRO INTERHOSPITALARIO DE DIAGNÓSTICOS AUTÓPSICOS de ámbito nacional.

### **OBJETIVOS**

La finalidad principal de este registro (denominado RIDA) es obtener el máximo aprovechamiento de la información científica entre los profesionales estimulando la realización de trabajos, a partir de los datos registrados. Además grandes bases de datos permiten a los patólogos probar hipótesis personales basadas en un pequeño número de casos sobre más casos similares de una gran base de datos.

También pretende promover el intercambio de material archivado entre hospitales, para la realización de técnicas especiales (inmunohistoquímicas, ultraestructurales, genéticas, moleculares, etc) en los bloques en parafina de determinados casos, creándose así un banco de tejidos interhospitalario. También pretende ser útil para el estudio de enfermedades familiares, de predisposición genética o de escasa frecuencia, pudiéndose reunir un número suficiente de pacientes para poder sacar conclusiones.

El informe de la autopsia es el documento más fiable para determinar la causa de la muerte. Por lo tanto una base de datos basada en los informes de varios hospitales permitiría a los epidemiólogos obtener los datos de la causa de muerte junto con una lista de hallazgos anatomopatológicos. Como objetivo a medio plazo el RIDA sería útil para conocer las causas de mortalidad de nuestra población, según las regiones y para informar a las autoridades sanitarias de la aparición y frecuencia de nuevas enfermedades. En este momento las autoridades sanitarias han sentido la necesidad de registrar todos los casos de Enfermedades por Priones estudiados mediante la autopsia, para controlar la epidemia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, con posible repercusión en humanos en nuestro país.

### **MÉTODOS**

El Registro requiere una documentación básica del hospital colaborador que es la fotocopia del resumen de la historia clínica o de la solicitud de la autopsia y del informe definitivo de la misma de los casos realizados.

El centro que se encarga del registro codifica e incluye en el programa, los datos que se recogen. Entre ellos la extensión del estudio, si es completa o parcial, las cavidades y órganos analizados, si se han estudiado macro y microscópicamente o si se han obtenido exclusivamente muestras por punción.

Existen dos tipos de fichas: a) Adulto-Infantil (se considera paciente Adulto desde los 15 años, e Infantil: entre los 29 días y los 14 años) b) Fetal-Perinatal-Neonatal (se registran los fetos desde las 9 semanas de gestación, correspondientes a una muerte fetal precoz, y hasta los recién nacidos que hayan fallecido en los primeros 28 días de vida).

Del resumen de la historia clínica o de la solicitud de la autopsia, se extraen los diagnósticos clínicos de Enfermedad Fundamental, Causa probable de Muerte y Otras hallazgos de interés. Del informe anatomopatológico definitivo, se codifican los diagnósticos correspondientes a Enfermedad Fundamental, Causa Probable de Muerte y otros Hallazgos relevantes. En todos ellos hay seis posibles diagnósticos, y en otros hallazgos anatomopatológicos hasta ocho.

Todos estos diagnósticos se codifican según la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-9) en las enfermedades no tumorales, y mediante el código SNOMED las tumorales.

En las muertes fetales han de especificarse las semanas de gestación, el peso, la talla, el perímetro cefálico, la longitud del pie y el tipo de mortalidad. Es conveniente, si es posible, adjuntar el diagnóstico de la placenta, que será codificado como el resto de los hallazgos anatomopatológicos.

## RESULTADOS

Desde el comienzo del RIDA, en octubre de 1997, hasta diciembre de 2000, se han recibido 4500 procedentes de 30 hospitales de diferentes comunidades españolas, que progresivamente están siendo registrados con el programa desarrollado en arquitectura cliente-servidor y lenguaje de programación SQL-Windows. Desde el primer momento hemos pretendido garantizar la confidencialidad de los datos de identificación habiendo suprimido cualquier dato de identificación del paciente entre los registrados. Además nos valemos del protocolo Secure Socket Layer, garantizando la encriptación de la información.

El RIDA esta creado para ser consultado, y para facilitar el intercambio de datos con fines clínicos, para la investigación y la planificación sanitaria con la posibilidad de colaborar con otros Registros Internacionales.

## CONCLUSIÓN

Hoy, que cada vez se realizan menos autopsias clínicas en los hospitales, es más importante que nunca la existencia de un Registro Nacional o Interhospitalario para conocer realmente de qué muere nuestra población y qué enfermedades padece. Los organismos sanitarios han de plantearse cómo justificar el gasto de las autopsias cuando no existe un sistema de recoger, organizar y analizar los valiosos datos de ellas con fines científicos y epidemiológicos.

La pretensión del RIDA es recibir el mayor número posible de casos, para poder utilizar los datos con rentabilidad, y ofrecer la información del Registro a quienes deseen realizar estudios basados en la patología autopsica.

## BIBLIOGRAFÍA

- URANO Y, BABA K, AIZAWA S. Annual of Pathological Autopsy Cases in Japan. Computerization of Autopsy Data from 1974 to 1979 and Their Statistical Study. *Acta Pathol Jpn* 1982; 32 (s1): 23-46
- BABA K, AIZAWA S. Nationwide Autopsy Registration over 30 years. In: Autopsy in Epidemiology and Medical Research. Ed E. Riboli & Delendi. Lyon, *International Agency for Research on Cancer*, pp. 235-244, 1991.
- AIZAWA S, FUKUSHIMA T, INFORMATION MANAGEMENT COMMITTEE OF THE JAPANESE SOCIETY OF PATHOLOGY. A statistical analysis of computerized pathologic autopsy data in Japan from 1974 through 1993. *Pathol Intern* 1997;47:126-46.
- HURTADO DE MENDOZA AMAT J, ALVAREZ SANTANA R, JIMENEZ LÓPEZ A, FERNÁNDEZ PEREZ LG. El SARCAP, sistema automatizado de registro y control de Anatomía Patológica. *Rev Cubana Med Milit* 1995;24:23-30.
- HURTADO DE MENDOZA AMAT J, ALVAREZ SANTANA R, WALWYN SALAS V, MONTERO GONZÁLEZ TJ, CARRILES MARTÍNEZ-PINILLOS R, RODRIGUEZ-GUERRA J. Autopsias realizadas en el hospital "Dr. Luis Díaz Soto" de 1962 a 1995. *Rev Cubana Med Milit* 1997;26:122-8.

- HURTADO DE MENDOZA AMAT J, MONTERO GONZÁLEZ TJ, WALWYN SALAS V, ALVAREZ SANTANA R. El daño multiorgánico en autopsias realizadas en Cuba en 1994. *Rev Cubana Med Milit* 1997;26:19-29.
- PEERY T. A proposal for pathologists to contribute to the health care of the nation. *Am J Clin Pathol* 1978;69(suppl):258-9.
- CARTER JR, NASH NP, CECHNER RL, PLATT RD. Proposal for a national autopsy data bank. A potential major contribution of pathologists to the health care of the nation. *Am J Clin Pathol* 1981;76(suppl):597-617
- MOORE GW, BERMANN JJ, HANZLICK RL, BUCHINO JJ, HUTCHINS GM. A prototype internet autopsy database: 1625 consecutive fetal and neonatal autopsy facesheets spanning twenty years. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:782-5.
- MOORE GW, BERMAN JJ. Performance Analysis of Manual and Automated Systemized Nomenclature of Medicine (SNOMED) Coding. *Am J Clin Pathol* 1994;101:253-256
- BERMAN JJ, MOORE GW. SNOMED-Encoded surgical pathology databases: a tool for epidemiologic investigation. *Mod Pathol* 1996;9:944-50.
- BERMAN JJ, MOORE GW, HUTCHINS GM. Maintaining patient confidentiality in the public domain internet autopsy database. *Proc AMIA Annu Fall Symp*1996:328-32.
- SILVESTRINI F, BUSSANI R, GIARELLI L. Changes in underlying causes of death during 85 years of autopsy practice in Trieste. *Autopsy in Epidemiology and Medical Research. Ed. Riboli&Delendi. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp. 3-23, 1991.*
- BERMAN JJ, HUTCHINS GM. Internet Autopsy Databases. *Hum Pathol* 1997;28:393-4.
- FERNADEZ-SEGOVIANO P. La autopsia clínica se está revitalizando: una necesidad. *Rev Calidad Asistencial* 1999;14:157-9.
- DIZ-LOIS F, PELLICER GONZÁLEZ C, JIMENEZ GÓMEZ P, ARNAL MONREAL F. Estudio necróscico y control de calidad. *Rev Calidad Asistencial* 1999;14:161-4.
- KLEINER DE, EMMERT-BUCK R, LIOTTA LA. Necropsy as a research method in the age of molecular pathology. *Lancet* 1995;346:945-8.
- STEEL CM. Necropsy as a research method. *Lancet* 1995; 346: 1368-9.

## LA AUTOPSIA EN EL NUEVO CICLO FORMATIVO DE TÉCNICO SUPERIOR EN ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOLOGÍA

Isabel Jáuregui Vicente  
Centro Educativo “María Inmaculada”. Pamplona

La formación profesional específica sanitaria, incluye diversos ciclos formativos de grado medio y superior, organizados en módulos profesionales de duración variable. Entre ellos se encuentra el ciclo formativo de grado superior para la obtención del título de técnico superior en Anatomía Patológica y Citología (TSA-PYC), que sustituye a la titulación oficial previa de técnico especialista en Anatomía Patológica (TEAP). Este cambio en la formación profesional, que se inició en 1993, tiene como objetivo que la formación del alumno esté directamente relacionada con el entorno laboral, cobrando más importancia la formación en los

centros de trabajo. También se pretende que el perfil de los nuevos profesionales se ajuste a las necesidades cambiantes del mundo laboral.

En lo referente al título de TSAPYC, el Real Decreto 538/1995 de 7 de Abril (B.O.E. 3-6-1995) establece su existencia y enseñanzas mínimas, en todo el territorio español sin competencia transferida en materia de enseñanzas no universitarias. Los ámbitos territoriales con competencia transferida establecen su propio currículo, si bien en todas ellas los contenidos son idénticos a los recogidos en el B.O.E. En Navarra, el currículo de este ciclo formativo queda reflejado en el Decreto Foral 347/1998 de 1 de Diciembre.

El cambio más importante, en el nuevo ciclo formativo de TSAPYC, es que principalmente va dirigido a formar citotécnicos y técnicos de necropsias clínicas y forenses. Los técnicos con la anterior titulación carecían de competencia en estos campos, estando su formación dirigida exclusivamente al procesado de tejidos y células. Este cambio de orientación, según la ley, se adapta más a las necesidades reales del sector y permite definir un perfil profesional actualmente desempeñado por personal con distintas cualificaciones, debido a la ausencia de titulación oficial previa.

El título de Especialista en Anatomía Patológica (Formación Profesional de segundo grado, rama Sanitaria), según establece la ley, “tiene los mismos efectos académicos y profesionales “ que el nuevo de TSAPYC, con lo que ambas titulaciones se equiparan. Por tanto, los TEAP, si son requeridos, deben participar en las actividades que son propias del TSAPYC, si bien no han adquirido de forma reglada los conocimientos y la práctica que estas precisan.

El nuevo ciclo formativo de TSAPYC tiene una duración de 2000 horas, distribuidas en dos cursos académicos. Las enseñanzas se organizan en módulos profesionales y se desarrollan en dos áreas:

A- Formación en el centro educativo (66%)

1- Organización y gestión del área de trabajo asignada en la unidad/gabinete de anatomía patológica y citología (96 horas; Primer curso)

2- Necropsias (128 horas; Primer curso)

3- Proceso de tejidos y citopreparación (320 horas; Primer curso)

4- Citología ginecológica (288 horas; Primer curso)

5- Citología de secreciones y líquidos (192 horas; Segundo curso)

6- Citología de muestras no ginecológicas obtenidas por punción (160 horas; Segundo curso)

7- Fotografía macro y microscópica (64 horas; Primer curso)

8- Formación y orientación laboral (64 horas; Primer curso)

B- Formación en los centros de trabajo (34%) : 688 horas; Segundo curso

Actualmente en España, la formación profesional de grado superior es la vía de acceso a una titulación oficial que capacita para realizar tareas de técnico de autopsias clínicas y médico-legales, siendo el único título oficialmente reconocido para este perfil profesional el de TSAPYC.

El módulo profesional de necropsias se asocia a la unidad de **competencia 2** que incluye los siguientes criterios de realización:

- **Identificar y registrar los datos del cadáver, según los protocolos previamente establecidos:** documentación necesaria, recepción del cadáver, sistemas de registro de entrada .

- **Realizar la necropsia clínica o médico-legal, siguiendo los protocolos preestablecidos y las indicaciones del médico patólogo/ forense:** preparación del instrumental, preparación y colocación del cadáver en la mesa de necropsias, realización de la autopsia siguiendo las indicaciones médicas y protocolos establecidos, identificación y colocación de los órganos en los recipientes adecuados, registro de incidencias y hallazgos durante la necropsia, recomposición del cadáver y órdenes de traslado al tanatorio, limpieza y desinfección del material empleado, eliminación de desechos en los contenedores correspondientes siguiendo los protocolos, orden del material de la sala de necropsias y verificación de que la sala está en condiciones óptimas para realizar la siguiente autopsia.

- **Asistir al médico patólogo/forense en el estudio macroscópico de los órganos y tallado, para su estudio histológico, inmunohistoquímico y ultraestructural:** registro de características físicas y lesiones macroscópicas, en el soporte adecuado, identificación en los recipientes adecuados y anotación de los procesos requeridos en la hoja de trabajo.

- **Realizar la identificación, conservación y envío de las piezas necrósicas al laboratorio de anatomía patológica, según protocolos establecidos:** identificación de los tejidos mediante códigos y colocación del líquido fijador adecuado.

Siendo estas las actividades que son competencia del técnico en la realización de las autopsias, el módulo profesional incluye los **contenidos teóricos** que debe recibir y son:

- Legislación y documentación de autopsias

- Sala de autopsias : material y medios

- Prevención de enfermedades transmisibles en la sala de autopsias

- Normas y procedimientos de seguridad en el manejo de equipos
- Estudio y tareas previos a la apertura del cadáver: preparación y observación externa del cadáver. Estudio de la cara y cavidad bucal
- Anatomía patológica de la piel
- Generalidades descriptivas y artefactos macroscópicos
- Procedimientos de apertura de cavidades del tronco
- Anatomía patológica macroscópica de la mama, pared torácica y abdominal y tejido linfopoyético
- Extracción del aparato genital masculino
- Apertura y estudio de la cavidad craneal y sistema nervioso
- Últimos estudios sobre el cadáver y recomposición del mismo
- Anatomía patológica macroscópica del aparato locomotor y médula ósea
- Disección y estudio de órganos supradiaphragmáticos
- Anatomía patológica macroscópica del aparato respiratorio, aparato cardiocirculatorio y tiroides
- Disección y estudio de órganos abdominales
- Anatomía patológica macroscópica del aparato digestivo, bazo, aparato urinario, aparato genital femenino y glándulas suprarrenales
- La autopsia forense o médico-legal
- Protocolos de envío de muestras de autopsia a los laboratorios de anatomía patológica, medicina legal y toxicología

La formación del TSAPYC se completa en los **centros de trabajo** que ,en lo que se refiere a necropsias, incluye los siguientes **contenidos**:

- **Preparación y puesta a punto de los equipos, documentos e instalaciones para realizar necropsias humanas clínicas o médico-legales:** preparación de las instalaciones, verificación de las normas de seguridad de equipos e instalaciones, preparación del instrumental, revisión de la documentación, preparación de los equipos de registro, identificación y colocación del cadáver en la mesa de autopsias, preparación del cadáver para la autopsia y preparación del espacio y material para la disección y tallado de los órganos.
- **Realización de la apertura del cadáver:** descripción de los hallazgos macroscópicos externos y durante la apertura del cadáver, realización de la evisceración y toma de muestras del cadáver, descripción macroscópica de los órganos eviscerados, recomposición del cadáver, disección y estudio de los órganos, preparación del fijador, fijación de órganos , realizar la toma de muestras y prepararlas para su envío e identificación de las mismas.

Estos contenidos siempre referidos y asociados a la unidad de competencia 2, previamente descrita.

Con la formación actual, el TSAPYC puede ejercer su actividad profesional, tal como establece la ley, “en el sector sanitario, tanto en atención primaria como en los servicios generales de apoyo al diagnóstico de atención especializada. Asimismo, podrá trabajar en institutos anatómico-forenses, realizando necropsias y procesando piezas necrósicas, y en laboratorios de centros de investigación biológica humana y animal, procesando muestras de tejidos.”

Los subsectores en los que puede trabajar son:

- Atención primaria y comunitaria: laboratorios de citología, laboratorios de unidades de detección precoz del cáncer, laboratorios de centros de planificación familiar
- Servicios generales hospitalarios: laboratorios de anatomía patológica y citología
- Institutos anatómico-forenses: sala de necropsias, laboratorios de anatomía patológica
- Centros de investigación: laboratorios

“ El TSAPYC puede participar en todas las actividades que se realicen en su área de trabajo, incluida la docencia de otros técnicos y la colaboración en labores de investigación que se le asignen.”

La irrupción de los nuevos ciclos formativos, como el de TSAPYC, está suponiendo, tanto para los centros educativos como para los centros de trabajo, una ardua labor de adecuación de lo escrito en la ley a la realidad laboral y educativa.

Es necesario adaptar los contenidos teóricos y prácticos a las actividades reales del personal técnico, delimitando con claridad sus competencias.

La mayor especialización en la formación del técnico de grado superior implica la enseñanza de conocimientos y destrezas complejas. Como consecuencia, el profesorado de los centros de educativos debe estar adecuadamente cualificado y sería necesario, en mi opinión, que en los centros de trabajo existieran profesores asociados. Por el momento, la legislación actual no recoge estas necesidades.

Considero un avance que exista, por primera vez, personal técnico sanitario con formación reglada y titulación oficial para colaborar con el médico en la realización de necropsias. En ningún acto médico complejo, a excepción de las autopsias, el médico realiza su labor sin personal sanitario con la formación y titulación adecuadas y específicas.

La regularización educativa en esta materia permite disponer de más profesionales formados en necropsias, para que ésta siempre se realice con los medios óptimos necesarios, no sólo materiales sino también humanos.

## MUERTE NATURAL EN CASOS DE AUTOPSIA MEDICO-LEGAL

Hugo Argüello Martínez.(+)

Ernestina Cuadra Rocha (++)

\* Presidente Sociedad Latinoamericana de Patología.

Patólogo – Forense, Director General del Instituto de Medicina Legal, Corte Suprema de Justicia.

\*\* Patóloga - Forense

Instituto de Medicina Legal, Corte Suprema de Justicia.

Managua. Nicaragua.

**Autopsia** es el examen externo e interno del cadáver con el objetivo de determinar la causa de la muerte y en algunos casos, las circunstancias concurrentes en el momento de la muerte.

La palabra autopsia se deriva de los términos griegos *auto* que significa “uno mismo” o “por sí mismo” y *opsis*, “vista, observar o mirar”. Como sinónimos se utilizan necropsia, tanatopsia, o simplemente examen post-mortem, éste último para referirse sólo a un examen externo del cuerpo después de la muerte.

Existen dos tipos de autopsia:

- 1.- La **autopsia clínica**, cuando la causa de la muerte es conocida o cree conocerse y el examen está destinado a confirmar la presunción diagnóstica por interés académico, con propósitos de enseñanza e investigación.
- 2.- La **autopsia médico-legal**, la que se requiere, para efectos de ley, de la comprobación de la causa de la muerte, como es en los casos de muerte violenta (homicidio, suicidio, accidente), muerte súbita, muerte sospechosa, muerte ocurrida sin atención médica adecuada. Estas autopsias obedecen a la prescripción judicial del código penal o del procedimiento penal en los diferentes países o a la orden expresa de la autoridad competente por lo que difieren de la autopsia clínica u hospitalaria, tanto por sus objetivos como por su significado.

En consecuencia, ciertos procedimientos que son de poco o de ningún uso en la práctica hospitalaria de la patología, son aplicadas rutinariamente por el patólogo forense, por ello es importante resaltar que las autopsias médico-legales deben realizarlas únicamente patólogos que tengan experiencia y preparación en Patología Forense.

Médicos no patólogos, o aún, patólogos sin experiencia forense pueden llegar a situaciones infortunadas y alcanzar conclusiones y resultados incorrectos o injustificados. Recordemos que “una necropsia mal hecha no se puede rehacer” y que “una autopsia mal ejecutada puede ser peor que la falta de una”.

Es mejor y de menor riesgo para malograr la justicia, que el doctor admita que no sabe la respuesta o que sea cauteloso en sacar conclusiones de los hallazgos de la autopsia.

Es por todos estos aspectos que hablamos del reencuentro de la autopsia forense con la autopsia clínica, cuando estudiamos una muerte súbita o sospechosa de criminalidad y determinamos la presencia de una enfermedad natural y su contribución a la muerte, o, cuando la interpretación de cualquier otro trastorno no natural, incluidos aquellos relacionados con procedimientos médicos o quirúrgicos, nos explican la causa de la muerte.

## **PATOLOGIA FORENSE E INSTITUTOS DE MEDICINA LEGAL . OPORTUNIDAD PARA UN REENCUENTRO CON LA PATOLOGIA CLÍNICA.**

Aso J, Teijeira R\*

Neurocirujano. Medico Forense. Director del I.A.F. de Zaragoza

\*Medico Forense. Director Del Instituto Navarro de Medicina Legal

### **INTRODUCCIÓN**

La medicina forense en España clásicamente ha huido de la patología clínica como la patología clínica lo ha hecho de la medicina forense por lo que quizá el título de la ponencia debería hablar más de encuentro que de reencuentro, ya que salvo excepciones y en general todas ellas recientes no ha habido contacto entre las dos especialidades.

La presente exposición trata de hacer un repaso del pasado reciente y del presente de la medicina legal en España y las previsiones de futuro de la misma y como ese futuro debe pasar en el campo de la patología por una relación entre la patología forense y clínica.

### **UNA REVISIÓN CRITICA DEL EJERCICIO DE LA MEDICINA LEGAL EN ESPAÑA.**

La medicina legal y forense en España se ejerce por tres tipos de profesionales (1):

- Los Catedráticos y Profesores de Medicina Legal: realizan la labor docente e investigadora en las Universidades. En algunas de las Cátedras hay Escuelas Profesionales encargadas de la formación de especialistas en Medicina Legal y Forense. Suelen practicar labores periciales oficiales (solicitadas por organismos de la Administración de Justicia) y de parte. Dependen orgánicamente del Ministerio de Educación y Cultura.
- Los Especialista en Medicina Legal y Forense: Se trata de una especialidad no hospitalaria a la que se accede actualmente mediante la vía MIR en plazas de Escuela Profesional. La formación dura tres años y posteriormente o se incorporan a las distintas cátedras o se dedican al ejercicio privado.
- Los Médicos Forenses : se accede al Cuerpo Nacional de Médicos Forenses tras aprobar una oposición que consta de dos ejercicios teóricos y uno práctico y realizar posteriormente un periodo de formación, actualmente de 6 meses, en el Centro de Estudios Jurídicos en Madrid. Dependen orgánicamente del Ministerio de Justicia o las Consejerías de las Comunidades Autónomas con transferencias.

La medicina forense “oficial” la realizan los médicos forenses. La práctica habitual supone realizar labores de clínica (reconocimiento de lesionados y detenidos, valoraciones de imputabilidad, internamientos psiquiátricos, incapacidades,...) y de patología (práctica de autopsias médico-legales) entre otras.

El hecho de que orgánicamente pertenezcan los distintos colectivos a Organismos distintos ha dificultado enormemente el contacto entre unos y otros propiciando en muchos casos una nula relación entre ellos. Por otro lado previamente a la aplicación de la ley de incompatibilidades era práctica habitual que el ejercicio de la medicina forense se compatibilizara con otras actividades, siendo la de médico forense en la mayoría de los casos la segunda o tercera actividad, lo que propiciaba que no hubiera salvo excepciones un interés especial en promocionarla. Si además asociamos a ésto el hecho de que la medicina legal y forense se encuentra fuera del ámbito del S.N.S. se puede entender porque la medicina forense en España no se ha situado a la altura de otras especialidades. Este fenómeno, que sin embargo no es único en el ámbito Europeo como se desprende de los resultados de una encuesta publicada recientemente (2), en otros países esta parcialmente resuelto dado que tienen claramente separadas la labor de patología forense de otras actividades médico-legales (aunque las controlan, al menos, indirectamente en gran parte) (2)

### **PATOLOGIA FORENSE Y PATOLOGIA CLÍNICA**

La actividad médico-forense además de otras cuestiones como hemos comentado previamente incluye la realización de las autopsias médico-legales.

Clásicamente las autopsias médico-legales en España se han practicado en los depósitos de cadáveres de los cementerios del lugar del fallecimiento y aunque todavía en muchos lugares, especialmente en

destinos rurales, se sigue realizando dicha práctica por carecer de otras posibilidades, de un tiempo a esta parte hay una tendencia a agrupar la práctica de las autopsias medico-legales en las cabeceras de los partidos judiciales o incluso en las capitales de la provincia o de la Comunidad Autónoma. Este fenómeno que provocaba la dispersión y falta de medios, asociado al hecho de que en la práctica forense las autopsias que se realizaban eran las de muerte violenta y raramente se hacían autopsias de muertes naturales (esto era debido a que existía la figura del Médico del Registro Civil, hoy en gran parte en el Cuerpo Nacional de Médicos Forenses, y porque raramente se negaban los médicos de cabecera a firmar certificados) suponía que no se planteaba en la mayoría de los casos la necesidad desde el punto de vista forense de recurrir al examen microscópico de un cadáver, aunque si se planteara la necesidad de otros exámenes complementarios, eventualidad que se cubría recurriendo al Instituto Nacional de Toxicología (I.N.T) creado con este nombre en 1.935 y regulado posteriormente por Decreto 1789/1967 (3).

La función entonces del I.N.T., aunque también incluía los estudios histopatológicos era principalmente toxicológica y a este aspecto dedicaba principalmente sus recursos.

De unos años a esta parte, como ocurre desde hace tiempo en muchos otros países occidentales (4) el número de autopsias catalogadas como muertes naturales van aumentando en el ámbito médico-legal llegando a ser la segunda e incluso primera causa de autopsia médico-legal según el lugar objeto de estudio, fenómeno que se asocia a una disminución de autopsias clínicas en la mayoría de los centros hospitalarios. Se ha planteado entonces la necesidad de recurrir a los estudios histopatológicos casi rutinarios que son remitidos por el prosector a la sección de histopatología del Departamento del Instituto Nacional de Toxicología que corresponde a cada forense según su dependencia funcional del Tribunal Superior de Justicia correspondiente (5).

El incremento de solicitudes de estudios histopatológicos al I.N.T. planteó la necesidad de cubrir un campo al que nunca se le había dado prioridad y ante la ausencia en España de patólogos forenses tal como se entienden en otros países occidentales, se recurrió a contratar a especialistas en Anatomía Patológica que comenzaron a desarrollar su labor profesional como facultativos del I.N.T. Este creemos, salvo excepciones, es el primer contacto serio entre la patología forense y la clínica que en España se produjo en los años 80. Este sistema ha permitido conseguir en muchos casos solucionar en parte el problema planteado de los estudios histopatológicos pero creemos que no puede satisfacer a ninguna de las dos partes. La lejanía física de los I.N.T. y la tardanza en resolver los estudios enviados, por sobrecarga de trabajo, ha planteado en algunos casos el envío de muestras de autopsias médico-legales a Servicios de Anatomía Patológica cercanos geográficamente basados siempre en relaciones personales y no institucionales, como ha sido el caso del alguno de nosotros, estableciéndose una relación entre médico forense y anatomopatólogo pero no entre patología forense y patología clínica dado que en muchos casos se entendía por los patólogos clínicos que esa no era una labor suya, por otra parte cierto, y que inmiscuirse en asuntos médico-legales puede suponer problemas posteriores. En ocasiones esa “colaboración” ha dado lugar a algunos resultados también de interés clínico: publicaciones, comunicaciones, aumento del número de autopsias en centros clínicos,...

La organización clásica de la medicina legal en España que suponía el aislamiento profesional del médico forense en un partido judicial se ha visto que dificulta enormemente la calidad pericial. Esto llevó a crear a partir de los años 60 Institutos Anatómicos Forenses y Clínicas Médico-Forenses inicialmente en las más importantes capitales de provincia (Madrid, Barcelona...) y posteriormente en otras muchas. Estos Institutos sirvieron inicialmente para sustituir a los depósitos municipales con algún medio material más y posteriormente iniciaron la tendencia a centralizar los estudios necrópsicos de distintos partidos judiciales habitualmente en la capital de la provincia. La modificación de la Ley Orgánica del Poder Judicial de 1.985 (6) y la publicación de un nuevo Reglamento del Cuerpo Nacional de Médicos Forenses (7) proporcionaron una normativa legal que tiene como finalidad crear los Institutos de Medicina Legal (I.M.L.) (8), entendiéndose que dichos Institutos agruparan toda la práctica forense de un Tribunal Superior de Justicia tanto en el ámbito clínico como en el patológico, así como en otros complementarios, permitiendo mejorar la labor pericial encomendada a la medicina legal y forense.

Simultáneamente se ha planteado desde los colectivos de médicos forenses la necesidad de acceder a una mejor formación en los distintos campos de la medicina legal: valoración del daño corporal, patología forense, toxicología forense, psiquiatría forense,...

Es en este ámbito de creación del los I.M.L. y en la demanda de formación del colectivo de médicos forenses donde entendemos que se debe producir el contacto futuro entre la patología forense y la patología clínica.

Los médicos forenses reclaman mayor formación solicitando planes específicos de “expertización”, (término poco afortunado), en distintas áreas de la práctica médico-legal. En este campo algunas comunidades autónomas como la C.A.V, ha desarrollado un programa de formación en patología forense que incluye un periodo de formación rotando por servicios clínicos. Otras como Madrid, en colaboración con el Centro de Estudios Jurídicos, pretende desarrollar programas similares.

A nuestro juicio esta formación no es excluyente en la relación con la patología clínica. Lo que no tiene sentido en el siglo XXI es seguir con un sistema anclado en criterios superados tanto en formación médica como en patología autopsica . Los reglamentos de los I.M.L. y del I.N.T. permiten la incorporación de otros especialistas mediante la superación de la oportuna oposición o concurso oposición a los I.M.L. y creemos que es ahí donde se debe producir el “encuentro” entre la patología forense y la clínica de tal modo que el patólogo clínico se incorpore a los I.M.L. como facultativo especialista. Así los estudios necrópsicos se practican por el médico-forense y por el patólogo clínico, requiriéndose del primero un nivel de formación mayor que el actual en el ámbito de la patología, que bien se podría conseguir mediante los programas llamados de “expertización”, pero consensuados a nivel nacional, y del segundo conocimientos específicos a nivel de patología forense. Esto permitiría por un lado el cumplimiento de la Recomendación 3/99 del Consejo de Ministros de la C.E. para la armonización de las autopsias médico-legales (9,10) y por otro como mínimo el aumento del caudal autopsico en los centros clínicos con el beneficio que eso supone para la formación de médicos residentes, en especial en lo que se refiere al campo de la muerte súbita.

#### REFERENCIAS

- (1) Frontela L, Gisbert JA, Hernandez C, Hinojal R, Martínez P, Martínez M, Martí JB, Villalain JD, Romero JL, Abenza JM. Presente y futuro de la Medicina Legal en España ¿Futuro imperfecto?. ¿Quo vadis?. *Ciencia Forense*. 1999; 1: 151-228.
- (2) Special Issue: The Harmonisation of Medico.legal Autopsy Rules: Steering committee on Bioethics (CDBJ), *Forensic Sci Int* 2000; 111:87-118.
- (3) Gisbert JA, Verdu FA. Organización de la medicina legal en España. En Gisbert JA Eds: *Medicina Legal y Toxicología* 5ª Ed. Masson. Barcelona 1998: 13-20.
- (4) Di Maio VI, Dana SE. Introduction to medico-legal casework. En Di Maio VI, Dana SE Eds. *Forensic Pathology*. Landes Bioscience. Texas. 1998: 1-11
- (5) RD 862/1998 por el que se aprueba el Reglamento del Instituto Nacional de Toxicología.
- (6) Ley 6/1985, de 1 de Marzo, Ley Orgánica del Poder Judicial.
- (7) RD 296/1996, de 23 de Febrero por el que se aprueba el Reglamento Orgánico del Cuerpo de Médicos Forenses.
- (8) RD 386/1996, de 1 de Marzo, por el que se aprueba el Reglamento de los Institutos de Medicina Legal.
- (9) Brinkmann B. Harmonisation of Médico-legal Autopsy Rules. *Int. J Legal Med*. 1999; 113:1-14
- (10) Special Issue: The Harmonisation of Medico-legal, Autopsy Rules. Recommendation N° R (99) on the harmonisation of medico-legal autopsy rules. *Forensic Sci Int*. 2000; 111:5-29.

## INMUNOPATOLOGÍA.

### **DETERMINACIÓN DEL PERFIL MOLECULAR EN CÁNCER EN UN EXPERIMENTO ÚNICO. APLICACIONES CLÍNICAS.**

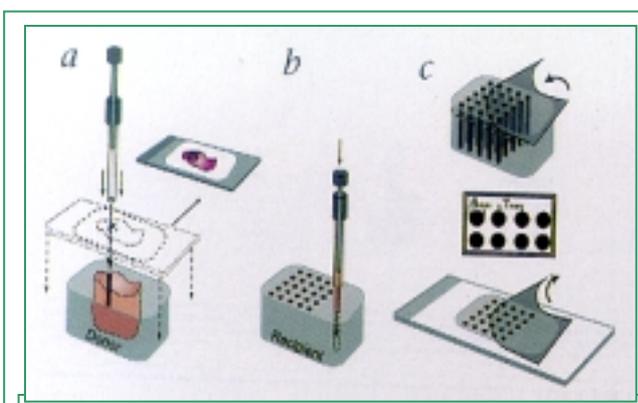
Gemma Moreno-Bueno. CNIO. Madrid

Las nuevas tecnologías están permitiendo el acercamiento eficiente a los análisis masivos de expresión en tumores. Los *microarrays* de c-DNA son ya hoy un arma consolidada que permiten el estudio de miles de genes en amplias series tumorales. Su desarrollo ha sido paralelo a la aparición de sólidos métodos matemáticos, que han demostrado ser capaces de manejar de un modo eficiente la abundante información generada por los *microarrays*. Los análisis de agrupamiento están permitiendo descubrir nuevos perfiles de expresión génica asociados a tipos tumorales previamente particularizados, o nuevos subtipos identificados a la luz de relaciones establecidas entre estos análisis y el estatus clínico de los pacientes.

Estos ensayos están basados en el estudio de los niveles de expresión de RNA. Se conocen numerosos mecanismos de regulación de la expresión génica que tienen lugar tras la transcripción del ADN. Estos mecanismos de regulación post-transcripcional exigen el re-análisis, teniendo en consideración los niveles de proteína, de los hallazgos surgidos de la tecnología de los *microarrays* de c-DNA.

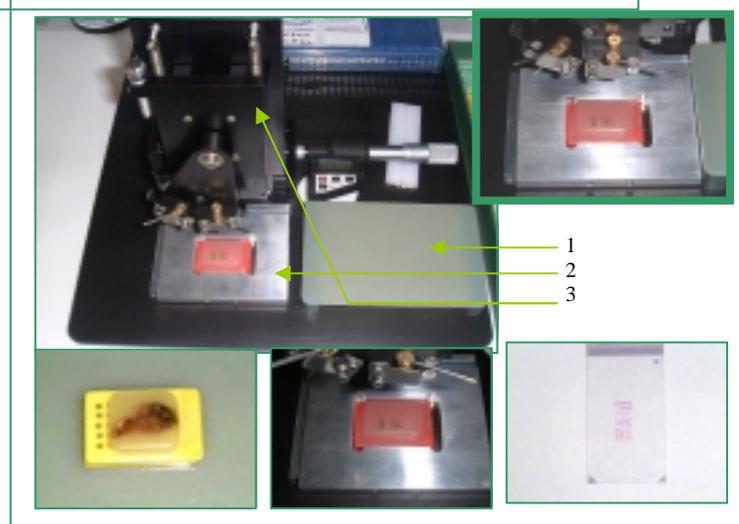
De un modo paralelo y con entidad propia, se ha venido desarrollando en los últimos años un método sencillo de análisis de expresión fundamentado en la realización de “biopsias” cilíndricas a tejidos tumorales embebidos en parafina. Los **TISSUE ARRAYS** se han erigido como un método efectivo para el estudio, en series tumorales amplias, de perfiles de expresión génica deducidos mediante el análisis del DNA (mediante FISH), del RNA (mediante ISH) o de la expresión de proteína (mediante Inmunohistoquímica). Permiten el análisis de cientos de marcadores tumorales en secciones consecutivas del tumor, con un mínimo de requerimiento tisular. Toda la serie tumoral es analizada a la vez, de modo que se garantiza la homogeneidad de las técnicas entre las muestras y se evitan los sesgos.

### CONSTRUCCIÓN DEL *TISSUE ARRAY*.



La construcción de *arrays* es una operación precisa y sencilla. Del denominado “bloque donador” se obtiene un cilindro de tejido de aproximadamente 0.6 mm de diámetro del área tumoral previamente seleccionada (a). Se construye un bloque de parafina nuevo a modo de recipiente. En este “bloque receptor” se realizan huecos cilíndricos con una aguja de menor diámetro. Después se traslada el cilindro del bloque donador al receptor. La diferencia de diámetros favorece su anclaje (b).

Acabado el bloque con el *array*, se procede a su corte seriado en el microtomo y al depósito de las secciones en portas, con la ayuda de una película adhesiva que asegura la integridad de cada sección (c).



Para la confección de los *tissue arrays*, el CNIO ha dado formación especializada a su personal técnico mediante la estancia en un centro experimentado y ha adquirido el aparataje necesario.

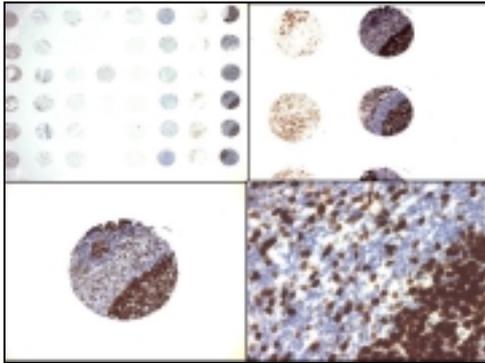
El *Tissue arrayer* consta de un armazón metálico que contiene un receptáculo para el bloque del *array* (1), una pletina para el bloque donador (2) y un instrumento dinámico donde se sitúan las diferentes agujas y el soporte mecánico

que permite su movimiento(3). Cada uno de los elementos se beneficia de la existencia de unas guías en los ejes XY que otorgan la precisión necesaria a cada operación.

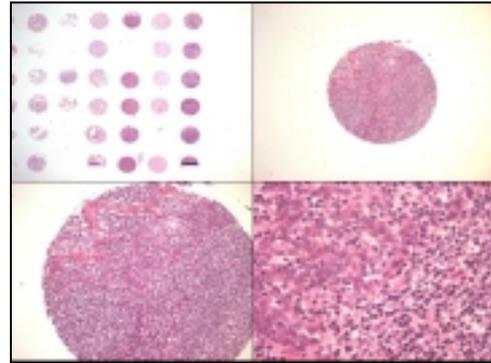
En la actualidad, el personal técnico ha demostrado poder realizar *arrays* de 400 cilindros de aproximadamente 0,6 mm de diámetro cada uno, distanciados unos de otros por 1 mm, usando bloques con un grosor de tejido de al menos 0,2 cm.

Sobre las secciones se han realizado técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas con un resultado óptimo, ya que no sólo es posible un perfecto reconocimiento de la morfología celular, sino que además no existe alteración alguna en la preservación antigénica del bloque.

Así mismo, se está trabajando en la puesta a punto de técnicas de ISH y FISH.



IHO: ki-67



H&E