

Original

Carcinoma incipiente de vesícula biliar: la inmunohistoquímica como ayuda en el diagnóstico diferencial

M. Manrique, C. Valentí, E. Zozaya, M.C. Caballero, A. Córdoba,
M.J. Calasanz* y J.M. Martínez-Peñuela

*Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Navarra, Servicio Navarro de salud-Osasunbidea,
Departamento de Genética de la Universidad de Navarra, Hospital de Navarra, Pamplona.

SUMMARY

Background: In chronic cholecystitis histologic characteristics such as loss of general architecture, cellular atypia and/or metaplasia are sometimes found and suggest a diagnosis of carcinoma in situ. The aim of this work was to determine whether differential diagnosis of morphologically borderline lesions could be improved by staining with any of the following monoclonal antibodies (MAb): carcinoembryonic antigen (CEA), proliferation nuclear antigen (Mib-1), p53 protein and oncoproteins c-erbB-2 and bcl-2. Material and methods: We studied paraffin-embedded material from three groups of gallbladder lesions: 20 cases of adenocarcinoma, 20 chronic cholecystitis and 5 carcinoma in situ. Histologic slides were stained with MAb against the above listed markers and the staining intensity was evaluated using a semiquantitative scale. Results: It was shown that antigenic expression of CEA, Mib-1, p53 and c-erbB-2 differed very significantly ($p < 0.001$) between adenocarcinoma and chronic cholecystitis, and there was no difference ($p > 0.05$) for bcl-2. Adenocarcinoma and carcinoma in situ showed no significant differences ($p > 0.05$) for any of the markers. Finally, chronic cholecystitis and carcinoma in situ differed very significantly ($p < 0.001$) for CEA and Mib-1, revealing a trend toward significance ($p = 0.0506$) for c-erbB-2 and no statistical differences with p53 or bcl-2. Conclusions: In conclusion, we consider that CEA, Mib-1 and c-erbB-2 may be useful in the differential diagnosis of borderline lesions in the gallbladder, however, bcl-2 and p53 should not be considered as routine markers in these cases without further studies. Rev Esp Patol 1998; 31(1): 17-25.

Key words: Gallbladder - Chronic cholecystitis - Early carcinoma - Carcinoma *in situ* - Adenocarcinoma - CEA - Mib-1 - p53 - c-erbB-2 - bcl-2

RESUMEN

Planteamiento: En las colecistitis crónicas, en ocasiones, se encuentran características histológicas como pérdida de la arquitectura general, atipia celular y/o metaplasia, que sugieren el diagnóstico de carcinoma in situ. El objetivo de este trabajo es comprobar si alguno de los siguientes anticuerpos monoclonales frente a: el antígeno carcinoembrionario (CEA), el antígeno de proliferación nuclear (Mib-1), la proteína p53 y las oncoproteínas c-erbB-2 y bcl-2 puede ayudar en el diagnóstico diferencial de las lesiones morfológicamente límite. Material y métodos: Para ello, hemos realizado un estudio sobre material incluido en parafina, con AcM frente a los marcadores antes mencionados, en tres grupos de lesiones de vesícula biliar: 20 casos de adenocarcinoma, 20 colecistitis crónicas y 5 carcinomas in situ, valorando los resultados en una escala semicuantitativa. Resultados: Los resultados obtenidos muestran que la expresión antigénica entre los grupos de adenocarcinoma y colecistitis crónica difieren muy significativamente ($p < 0.001$) con

el CEA, Mib-1, p53 y c-erbB-2, y no se diferencian ($p>0.05$) con el bcl-2. Los adenocarcinomas y los carcinomas *in situ* no muestran diferencias significativas ($p>0.05$) para ninguno de los marcadores. Por último, las colecistitis crónicas y los carcinomas *in situ* difieren muy significativamente ($p<0.001$) con el CEA y Mib-1, muestran diferencias en el límite ($p=0.0506$) para la c-erbB-2 y ninguna diferencia estadística con la p53 ni la bcl-2. Conclusiones: Consideramos que para las lesiones dudosas de carcinoma *in situ* pueden ser de utilidad el CEA, el Mib-1 y la c-erbB-2, y no deben considerarse marcadores de elección la bcl-2 ni la p53. *Rev Esp Patol* 1998; 31(1): 17-25.

Palabras clave: Vesícula biliar - Carcinoma incipiente - Carcinoma *in situ* - Colecistitis crónica - Adenocarcinoma - CEA - Mib-1 - p53 - c-erbB-2 - bcl-2

INTRODUCCIÓN

En la vesícula biliar, los diferentes grados de displasia y el carcinoma *in situ* son reconocidos y admitidos actualmente y considerados como precursores del carcinoma invasor (1, 2).

Albores-Saavedra y cols. (2) describen dos tipos de carcinoma *in situ*. El tipo papilar se caracteriza por estructuras papilares o vellosas de tamaño variable con un eje fibrovascular y tapizadas por células columnares a veces con pseudoestratificación, con cierto parecido al adenoma vellosa del intestino grueso. Las células tienen un núcleo grande, hiperromático o vesicular con uno o dos nucléolos claramente visibles y citoplasma eosinófilo y/o con vacuolas PAS positivas. El segundo tipo de carcinomas *in situ* muestra en la mucosa un epitelio pseudoestratificado o poliestratificado constituido por células columnares o poligonales pequeñas con características celulares semejantes a las del tipo papilar. En ambos tipos hay una pérdida de la polaridad celular, algunas mitosis atípicas y ausencia de invasión del estroma. La diferenciación entre hiperplasia epitelial atípica y carcinoma *in situ* puede plantear problemas de diagnóstico diferencial, especialmente en lesiones límite.

Las alteraciones inflamatorias crónicas de la vesícula biliar con hiperplasia epitelial y cambios metaplásicos pueden compartir rasgos morfológicos con el carcinoma *in situ*. Con el objeto de diferenciar estas lesiones, se han aplicado tinciones para mucinas y marcadores histoquímicos en lesiones metaplásicas de la vesícula biliar (3, 4). Actualmente se han empleado marcadores inmunohistoquímicos frente a diferentes antígenos y proteínas oncofetales, sobre todo de manera aislada (5-13).

El propósito de este trabajo es comprobar si los marcadores inmunohistoquímicos CEA, Mib-1, p53, c-erbB-2

y bcl-2 son útiles en el diagnóstico diferencial de las lesiones morfológicamente límite de la mucosa de la vesícula biliar. Para ello, hemos estudiado la expresión de los anticuerpos frente a estos marcadores en tres grupos de lesiones anatomopatológicas de vesícula biliar: 20 adenocarcinomas, 20 colecistitis crónicas y 5 carcinomas *in situ*. Hemos valorado los resultados en escala semicuantitativa y aplicado los métodos estadísticos enfocados a realizar todas las comparaciones posibles entre los tres grupos de diagnóstico para cada uno de los marcadores inmunohistoquímicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material corresponde a piezas quirúrgicas de colecistectomías realizadas entre 1980 y 1996 procedentes del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital de Navarra. En este periodo, sobre un total de 2038 vesículas biliares encontramos 55 carcinomas y 5 carcinomas *in situ* de vesícula biliar.

En el trabajo incluimos los 5 carcinomas *in situ* diagnosticados en ese periodo, según los criterios utilizados por Albores-Saavedra (2); 20 adenocarcinomas, elegidos aleatoriamente, y un tercer grupo de 20 colecistitis crónicas (también elegido al azar) del que descartamos aquellas que no tenían mucosa o se encontraba excesivamente artefactada.

De los bloques de parafina más representativos de los 45 casos seleccionados se realizaron cinco cortes a 4 μ , desparafinados en portas silanizados para estudio inmunohistoquímico aplicando el método avidina-biotina-peroxidasa. Estos cortes se procesaron con anticuerpos monoclonales comerciales frente a: el antígeno carcinoembrionario (CEA), el marcador de proliferación celular

Tabla 1. Anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico con el método avidina-biotina-peroxidasa.

Anticuerpos monoclonales	Dilución	Tiempo	Temperatura	Aparato
CEA (Biogenex)	1/50	30'	39 °C	"Ventana" Atom
Mib-1 (Zymed)	Prediluido	30'	39 °C	"Ventana" Atom
p53 (Biogenex)	Prediluido	30'	Ambiental	"Optimax" Menarini
c-erbB-2 (Biogenex)	Prediluido	30'	Ambiental	"Optimax" Menarini
bcl-2 (Dako)	1/5	30'	Ambiental	"Optimax" Menarini

Mib-1, la proteína p53, la proteína c-erbB-2 y la proteína bcl-2 (Tabla 1).

Para el CEA se considera positiva la inmunotinción citoplasmática, siendo negativa la inmunorreactividad apical. Con el marcador de proliferación Mib-1 la expresión positiva debe ser nuclear. Para la p53 se considera positivo un marcador fundamentalmente nuclear, aunque en ocasiones difunde también al citoplasma. La c-erbB-2 es positiva si presenta una expresión citoplasmática con refuerzo en el borde de la membrana celular; y con la bcl-2 se considera positiva la tinción citoplasmática.

Para el CEA se empleó como control material en parafina de adenocarcinoma de colon; para la c-erbB-2 y la p53, controles de carcinoma de mama, y para la bcl-2 y el Mib-1 cortes correspondientes a linfadenitis.

La valoración se realizó de manera semicuantitativa otorgando valores del 1 al 4: 1, cuando no había ninguna célula que expresara el antígeno; 2, si el número de células era mayor de 0 y menor o igual a 1/3; 3, para valores mayores de 1/3 y menores o iguales a 2/3; y 4,

cuando el número de células que expresaban positividad se encontraba entre valores mayores de 2/3 y menores o iguales a 3/3.

Por lo que respecta a la metodología estadística empleada, dada la naturaleza de la variable en estudio (escala semicuantitativa de 1 a 4), se han realizado tests no paramétricos de comparación de dos medias independientes (test de la U de Mann-Whitney). El test se ha considerado significativo cuando la probabilidad asociada ha sido menor que $\alpha=0,05$. Para el estudio estadístico se ha utilizado el programa SPSS para Windows.

RESULTADOS

Uno de los casos de carcinoma *in situ* correspondía morfológicamente al tipo papilar y los cuatro restantes a la forma no papilar (Fig. 1). Los datos inmunohistoquímicos obtenidos de los tres grupos de lesiones de vesícula biliar

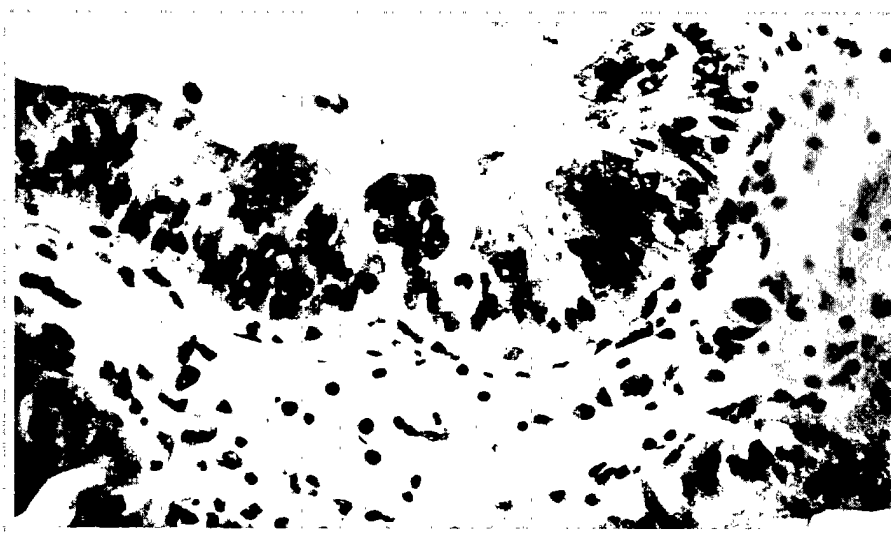


Figura 1. Carcinoma *in situ* de vesícula biliar. Pérdida de la arquitectura general, pseudoestratificación celular, atipia y presencia de mitosis (original, HE $\times 200$).

Tabla 2. Datos obtenidos de los tres grupos de lesiones de vesículas biliares, indicando el número de casos que expresan el antígeno, con el porcentaje, valorando la expresión de 1 a 4.

	Adenocarcinoma				Carcinoma <i>in situ</i>				Colecistitis crónica			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
CEA	1/20 (5%)	3/20 (15%)	9/20 (45%)	7/20 (35%)	0/5 (0%)	3/5 (60%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	17/20 (85%)	3/20 (15%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
Mib-1	2/20 (10%)	1/20 (5%)	15/20 (75%)	2/20 (10%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	12/20 (60%)	8/20 (40%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
p53	0/20 (0%)	9/20 (45%)	9/20 (45%)	2/20 (10%)	1/5 (20%)	3/5 (60%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	9/20 (45%)	7/20 (35%)	4/20 (20%)	0/20 (0%)
c-erbB-2	0/20 (0%)	0/20 (0%)	17/20 (85%)	3/30 (15%)	0/5 (0%)	1/5 (10%)	2/5 (40%)	2/5 (40%)	4/20 (20%)	7/20 (35%)	9/20 (45%)	0/20 (0%)
bcl-2	19/20 (95%)	0/20 (0%)	1/20 (5%)	0/20 (0%)	4/5 (80%)	0/5 (0%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	20/20 (100%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)

1: ninguna célula presenta expresión del antígeno; 2: cuando el número de células es mayor de 0 y menor o igual a 1/3; 3: valores mayores de 1/3 y menores o iguales a 2/3; 4: cuando el número de células positivas está entre valores mayores de 2/3 y menores o iguales a 3/3.

se muestran en la Tabla 2, indicando el número de casos que muestran positividad antigénica, expresado de 1 a 4. Los resultados con el CEA, el Mib-4, la p-53 y la c-erbB-2 se muestran en las Figs. 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

Los resultados de los tests estadísticos se presentan en la Tabla 3.

CEA

Las comparaciones entre el grupo de adenocarcinomas y el de colecistitis crónicas, y entre colecistitis crónicas y

carcinomas *in situ*, respecto a la expresión antigénica para este marcador, son muy significativas ($p=0.0000$ y $p=0.0005$, respectivamente). Las diferencias entre adenocarcinoma y carcinoma *in situ* no son significativas ($p=0.2431$).

Mib-1

Las diferencias entre los grupos de adenocarcinoma y colecistitis crónica son muy significativas ($p=0.0000$).



Figura 2. Carcinoma *in situ* de vesícula biliar que muestra una intensa expresión del antígeno carcinoembrionario en el citoplasma, delimitándose muy bien de las zonas de epitelio normal que muestran una ligera positividad apical (original, CEA $\times 100$).



Figura 3. Carcinoma *in situ* de vesícula biliar. Tinción nuclear en las zonas de proliferación celular (original, Mib-1 $\times 100$).

Del mismo modo también lo es la comparación entre colecistitis crónica y carcinoma *in situ* ($p=0.0122$). Por el contrario, entre adenocarcinoma y carcinoma *in situ* las diferencias no son significativas ($p=0.7671$).

p53

La comparación entre los grupos de adenocarcinoma y colecistitis crónica presenta diferencias muy significativas ($p=0.0014$). Entre adenocarcinoma y carcinoma *in situ* y entre colecistitis crónica y carcinoma *in situ* los

resultados no son significativos ($p=0.2431$ y $p=0.4467$, respectivamente).

C-erbB-2

La diferencia entre los grupos de adenocarcinoma y colecistitis crónica es muy significativa ($p=0.0005$); entre adenocarcinoma y carcinoma *in situ* no es significativa ($p=0.8180$). Por último, la comparación entre colecistitis crónica y carcinoma *in situ* muestra una probabilidad en el límite ($p=0.0506$).

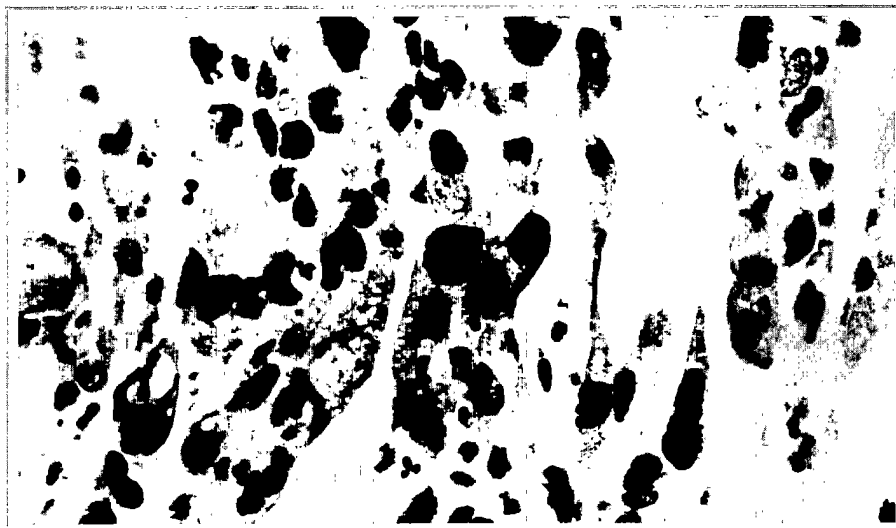


Figura 4. Adenocarcinoma de vesícula biliar. Intensa expresión de la proteína p53 nuclear y ligera citoplasmática (original, p53 $\times 600$).



Figura 5. Adenocarcinoma de vesícula biliar. Expresión citoplasmática más intensa en el área próxima a la membrana celular (original, c-erbB-2 ×200).

Bcl-2

Las comparaciones entre adenocarcinoma-colecistitis crónica, carcinoma *in situ*-adenocarcinoma y colecistitis crónica-carcinoma *in situ* no son significativas (p=0.7994, p=0.6210 y p=0.5304, respectivamente).

DISCUSIÓN

En 1980 Albores-Saavedra y cols. (2) sugieren que un pequeño número de hiperplasias de vesícula biliar evolucionan hacia una hiperplasia atípica, y que las hiper-

plasias atípicas pueden progresar hacia carcinoma *in situ*, convirtiéndose finalmente en un carcinoma invasor. Los diferentes grados de displasia y el carcinoma *in situ* son ampliamente aceptados en la actualidad (1). Estas lesiones, que asientan sobre mucosa no polipoide, se consideran las precursoras del carcinoma invasor, y son la vía principal de transformación hacia carcinomas invasores, mientras que sólo un pequeño número de carcinomas se desarrolla sobre un adenoma preexistente, al igual que en la mucosa del estómago y a diferencia de lo que ocurre en el colon (1).

Debemos considerar que aunque la frecuencia y la distribución geográfica del carcinoma de vesícula biliar

Tabla 3. Resultados de los tests estadísticos entre los tres grupos de lesiones de vesícula biliar.

	Adenocarcinoma	Colecistitis crónica	Carcinoma <i>in situ</i>
Adenocarcinoma	-	-	-
Colecistitis crónica	CEA* MIB-1* p53* c-erbB-2* bcl-2 NS	-	-
Carcinoma <i>in situ</i>	CEA NS Mib-1 NS p53 NS c-erbB-2 NS bcl-2 NS	CEA* Mib-1* p53 NS c-erbB-2 Al límite bcl-2 NS	

NS: no significativo (p>0.05). *Muy significativo (p<0.001).

son variables (10, 12, 13), la metaplasia y las lesiones precursoras del carcinoma de vesícula biliar son focales o parcialmente confluentes, por lo que una sección histológica al azar podría detectar menos de un tercio de las hiperplasias, displasias o carcinomas *in situ* (15). En consecuencia, si la frecuencia de estas lesiones pudiera ser mayor de lo que nos encontramos en la práctica, tal vez deberíamos replantearnos la valoración del estudio macroscópico de las vesículas biliares, incluyendo en parafina un mayor número de fragmentos.

Hemos aplicado técnicas inmunohistoquímicas frente a cinco marcadores para tratar de establecer el diagnóstico diferencial de las lesiones límite, y vamos a analizarlos por separado.

CEA

El patrón de distribución del CEA en las vesículas biliares es similar al de otras mucosas del tracto digestivo. El CEA en el epitelio normal está limitado a la superficie apical, y en las displasias y en los carcinomas está abundantemente presente en el citoplasma y en la luz (5). Nuestro trabajo corrobora estos datos al encontrar diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre los grupos de adenocarcinomas y colecistitis crónicas, entre los carcinomas *in situ* y las colecistitis crónicas, y no encontrando diferencias entre los grupos de adenocarcinoma y carcinoma *in situ* ($p > 0.05$).

Mib-1

El antígeno de proliferación celular nuclear (PCNA) y el antígeno Mib-1 se han utilizado como marcadores de proliferación en carcinomas del tracto biliar extrahepático (7). El PCNA (PC-10) está presente en concentraciones máximas en las fases G1 y S del ciclo celular, tiene una vida media más larga que el Mib-1, persiste después de las mitosis, puede detectarse en algunas células que no están en el ciclo celular y durante la regeneración del DNA. Por lo tanto, el PCNA muestra un índice más elevado que otros marcadores de proliferación. Hemos utilizado el Mib-1, que, aunque muestra un índice de proliferación menor que el PCNA, es más preciso ya que está presente en concentraciones máximas durante las fases G2 y M y no se expresa en G0 ni en la parte inicial de G1; tiene una vida media más corta que el PCNA, y se pierde rápidamente después de las mitosis (7).

Lee (7) indica que la expresión de PCNA y Mib-1 en los tumores de vesícula, ampolla de Vater y ductos biliares es significativamente mayor que en los carcinomas *in situ* y en las lesiones no neoplásicas. Nuestros resultados coinciden parcialmente con sus aportaciones porque aunque encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre el grupo de los adenocarcinomas y el de las lesiones no neoplásicas representadas por las colecistitis crónicas, por otra parte también encontramos diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre el grupo de carcinomas *in situ* y el de colecistitis crónicas, y no encontramos diferencias ($p > 0.05$) entre los adenocarcinomas y los carcinomas *in situ*. Consideramos que estas discordancias pueden ser debidas al escaso número de carcinomas *in situ* en ambas series, lo que afecta a la sensibilidad del test estadístico.

p53

Algunos autores consideran que la expresión de la proteína p53 es un indicador de progresión de la enfermedad desde la displasia al carcinoma *in situ* y de éste al carcinoma invasor (8, 9).

Wistuba y cols. (10) ponen de manifiesto que el epitelio normal y el metaplásico no expresan p53. Los autores encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión de p53 entre carcinomas invasores y lesiones no neoplásicas, entre displasias y carcinomas *in situ*, y entre lesiones premalignas y epitelio normal o metaplásico. Así mismo, no observan diferencias de expresión de la p53 en lesiones premalignas asociadas o no a carcinoma invasor (10).

En nuestros casos, encontramos expresión de p53 en los adenocarcinomas, con diferencias muy significativas ($p < 0.001$) entre este grupo y el de las colecistitis crónicas. Sin embargo, no apreciamos diferencias significativas entre los adenocarcinomas y los carcinomas *in situ* ni entre las colecistitis crónicas y los carcinomas *in situ* ($p > 0.05$).

Los diferentes resultados entre estos trabajos pueden deberse a la heterogeneidad de ambas series: diferentes tamaños de muestra y diferente forma de clasificación y comparación entre los diferentes grupos.

C-erbB-2

La expresión de productos de oncogenes y factores de crecimiento en carcinomas de vesícula biliar (iniciales y

avanzados) y en colecistitis crónicas ha sido estudiada por Yukawa y cols. (11). Estos autores encontraron que en el grupo de cánceres de vesícula (tanto en los precoces como en los tardíos) existía una mayor expresión de factor de crecimiento epidérmico, factor-beta de transformación del crecimiento, c-erbB-2, ras p21 y c-myc, en comparación con el grupo de colecistitis crónicas. Otros autores (12) que han estudiado el gen y la proteína c-erbB-2 en carcinomas de vesícula biliar consideran que podrían tener relación con la capacidad de invasión tumoral, pero no tienen aplicación como factores pronóstico.

En nuestro estudio observamos diferencias muy significativas ($p < 0.001$) en la expresión del c-erbB-2 entre el grupo de adenocarcinomas y el de colecistitis crónicas, y no encontramos diferencias ($p > 0.05$) entre el grupo de adenocarcinomas y el grupo de carcinomas *in situ*. En la interpretación de la comparación entre colecistitis crónica y carcinoma *in situ* nos hallamos con el problema de no poder analizar el valor de p corregido por empates (por el escaso tamaño del grupo de carcinoma *in situ*), y que la probabilidad asociada al valor de U está en el límite ($p = 0.0506$). Creemos que el resultado sería estadísticamente significativo aumentando el tamaño de la muestra del grupo de carcinoma *in situ*. Con los datos obtenidos no podemos afirmar que los dos grupos sean significativamente diferentes, aunque sí se puede decir que hay una tendencia a que lo sean.

bcl-2

Sasatomi y cols. (13) han estudiado la apoptosis espontánea en carcinomas de vesícula en relación con factores clinicopatológicos, expresión de E-Cadherina, el protooncogén *bcl-2* y el gen oncosupresor *p53*. Entre otros resultados, los autores obtienen una expresión de *bcl-2* y de *p53* en un 18,4% y un 34,7% de los casos, respectivamente, pero no encuentran relación entre la apoptosis y la expresión aumentada de *bcl-2* ni *p53*.

En el estudio que aportamos no encontramos diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguna de las tres comparaciones realizadas.

Como conclusiones queremos resaltar la utilidad y el carácter complementario de estas técnicas inmunohistoquímicas para la confirmación de los casos límite de carcinomas incipientes de vesícula biliar. El estudio in-

munohistoquímico nos ha permitido corroborar los diagnósticos histopatológicos de carcinomas *in situ*, puesto que el patrón del grupo de carcinomas *in situ* ha sido similar al de los adenocarcinomas, y por el contrario los carcinomas *in situ* han mostrado un patrón diferente en la expresión de algunos marcadores con el grupo de colecistitis crónicas. Entre los marcadores utilizados cabe destacar que los de mayor utilidad son el Mib-1 y el CEA, que muestran diferencias muy significativas entre los carcinomas *in situ* y las colecistitis crónicas ($p < 0.001$). En cuanto a la c-erbB-2, aunque no podemos llegar a una conclusión definitiva con nuestros datos, el análisis estadístico parece indicar que también podría ser de utilidad. Por último, la expresión de *bcl-2* y *p53* no serían útiles para ayudarnos en el diagnóstico diferencial de estas lesiones límite de vesícula biliar.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento por sus aportaciones y experiencia con mucinas en lesiones de vesícula biliar a la Dra. M.L. Gómez-Dorransoro, y a I. Martín por el manejo de los datos estadísticos. Este trabajo ha sido parcialmente presentado como comunicación oral en el Congreso Nacional de Anatomía Patológica de 1997 celebrado en Málaga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH. *The WHO histological classification of tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts*. Cancer 1992; 70: 410-414.
2. Albores-Saavedra J, Alcántra-Vázquez A, Cruz-Ortiz H, Herrera-Goepfert R. *The precursor lesions of invasive gallbladder carcinoma. Hyperplasia, atypical hyperplasia and carcinoma in situ*. Cancer 1980; 45: 919-927.
3. Tsutsumi Y, Nagura H, Osamura Y, Watanabe K, Yanaihara N. *Histochemical studies of metaplastic lesions in the human gallbladder*. Arch Pathol Lab Med 1984; 108: 917-921.
4. Albores-Saavedra J, Nadji M, Henson DE, Ziegels-Weissman J, Mones JM. *Intestinal metaplasia of the gallbladder: A morphologic and immunocytochemical study*. Hum Pathol 1986; 17: 614-620.
5. Albores-Saavedra J, Nadji M, Morales AR, Henson DE. *Carcinoembryonic antigen in normal, preneoplastic and neoplastic gallbladder epithelium*. Cancer 1983; 52: 1069-1072.
6. Maxwell P, Davis RI, Sloan JM. *Carcinoembryonic antigen (CEA) in benign and malignant epithelium of the gallbladder, and extrahepatic bile ducts, and ampulla of Vater*. J Pathol 1993; 170: 73-76.
7. Lee CS. *Differences in cell proliferation and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen immunoreacti-*

- vity in *in situ* and invasive carcinomas of the extrahepatic biliary tract. *Cancer* 1996; 78: 1881-1887.
8. Wee A, Teh M, Raju GC. *Clinical importance of p53 protein in gallbladder carcinoma and its precursor lesions*. *J Clin Pathol* 1994; 47: 453-456.
 9. Kamel D, Paako P, Nuorva K, Vahakangas K, Soini Y. *p53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gall bladder*. *J Pathol* 1993; 170: 67-72.
 10. Wistuba II, Gazdar AF, Roa I, Albores-Saavedra J. *p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: An immunohistochemical study*. *Hum Pathol* 1996; 27: 360-365.
 11. Yukawa M, Fujimori T, Hirayama D y cols. *Expression of oncogen products and growth factors in early gallbladder cancer, advanced gallbladder cancer, and chronic cholecystitis*. *Hum Pathol* 1993; 24: 37-40.
 12. Suzuki T, Takano Y, Kakita A, Okudaira M. *An immunohistochemical and molecular biological study of c-erbB-2 amplification and prognostic relevance in gallbladder cancer*. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 283-292.
 13. Sasatomi E, Tokunaga O, Miyazaki K. *Spontaneous apoptosis in gallbladder carcinoma. Relationships with clinicopathologic factors, expression of E-Cadherin, bcl-2 protooncogen, and p53 oncosuppressor gene*. *Cancer* 1996; 78: 2101-2110.
 14. Henson DE, Albores-Saavedra J, Corle D. *Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates*. *Cancer* 1992; 70: 1493-1497.
 15. Duarte I, Llanos O, Domke H, Harz C, Valdivieso V. *Metaplasia and precursor lesions of gallbladder carcinoma. Frequency, distribution, and probability of detection in routine histologic samples*. *Cancer* 1993; 72: 1878-1884.

