

NEOPLASIAS II

Dr. Francisco Mucientes

Las neoplasias son entidades vitales, activas, funcionales y que cambian en el tiempo. Esta funcionalidad puede que tenga o no una expresión clínica. Es posible encontrar algunas sustancias producidas por las células tumorales y en cantidad suficiente para que sean usadas como marcadores tumorales en la sangre de esos pacientes. Estos marcadores pueden ser específicos o inespecíficos. El marcador tumoral ideal es el que permita la distinción inequívoca entre un tumor maligno y uno benigno, pero tal marcador aún no existe. Sin embargo se cuenta con marcadores de cierta especificidad y que son usados permanentemente en la práctica clínica como BHCG, CEA, CA125, CA19.9, AFP entre otros.

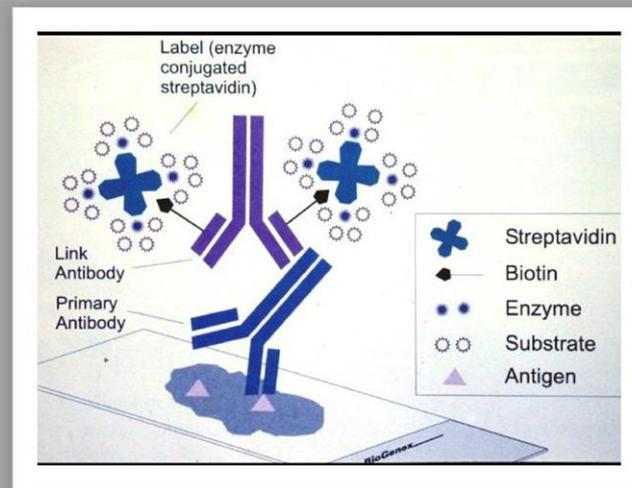
Algunas sustancias producidas por las células tumorales pueden ser detectadas en el tejido de la biopsia pero en cantidad insuficiente para ser encontradas en la sangre periférica o para producir un síndrome clínico paraneoplásico.

Anticuerpos monoclonales

Se trata de clones celulares (híbridos) obtenidos a partir de la fusión de dos líneas celulares diferentes. Teniendo aislado un antígeno, se lo puede inocular a un animal de experimentación, el cuál producirá una respuesta inmune ligada a linfocitos. Al mezclar estas células con una población de células tumorales que tienen capacidad de dividirse indefinidamente (ejemplo células de mieloma múltiple), se obtiene un híbrido que retiene las dos propiedades mencionadas. Estas son la de dividirse indefinidamente y la de producir el anticuerpo específico. Este anticuerpo es el que se aplica al tejido tumoral y la expresión positiva o negativa se usa como método auxiliar de diagnóstico.

Los anticuerpos monoclonales se usan para apoyar el diagnóstico histológico convencional basado en la correcta interpretación del tejido con tinción básica de Hematoxilina-Eosina (H&E). El anticuerpo monoclonal usado adecuadamente puede ser de gran utilidad, pero de ninguna manera viene a reemplazar el método clásico. Se debe recordar que los anticuerpos monoclonales están en permanente evolución, algunos dados inicialmente como específicos con posterioridad resulta que no lo son, por lo que hay que ser muy cuidadosos en su aplicación e interpretación. Se debe también señalar que el uso de esta técnica es bueno pero tiene sus bemoles que dependen de las condiciones de fijación, concentraciones y métodos usados.

Hay varias técnicas de inmunohistoquímica que usamos y que han evolucionado en el tiempo, como las técnicas ABC (complejo avidina-biotina), LAD (enzyme-labelled avidin D) o Envision. Los procedimientos se pueden hacer en forma manual o automatizada. Estas técnicas tienen un esquema general común. Una primera etapa de preparación de la muestra, fijación del tejido, inclusión en parafina y recuperación antigénica. Luego se continúa con la aplicación del anticuerpo monoclonal primario y posteriormente una cadena de anticuerpos secundarios que reaccionan con el anticuerpo primario. Finalmente se aplica un revelador que actúa bajo una reacción química simple. Su uso está en expansión, la técnica es válida y es un arma muy sensible si está bien realizada. Además permite localizar la célula y el sitio dentro de ella donde se produce la expresión positiva y cuantificarla (imagen 1).

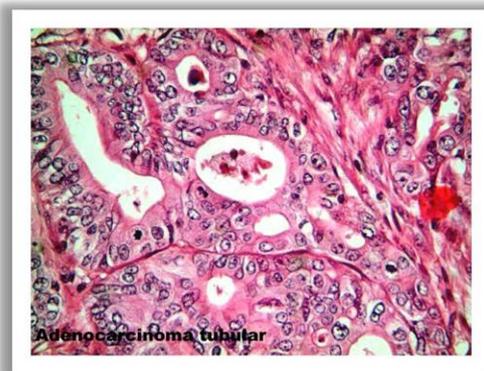


1

A continuación se muestran algunos ejemplos de neoplasias donde estos marcadores suelen ser usados. Lo que se hace de rutina es aplicar un panel básico de anticuerpos para ser analizados en conjunto. Esto se hace ya que hay tumores malignos que pueden tener expresión aberrante de marcadores que no se expresan clásicamente.

CARCINOMAS

De mayor importancia es la expresión positiva de Citoqueratina, que son filamentos intermedios de una familia multigénica de proteínas, que permite identificar carcinomas y adenocarcinomas (imágenes 2 y 3). Otros marcadores epiteliales son EMA (Antígeno de Membrana Epitelial) y el Ber-EP4 (Antígeno Epitelial).



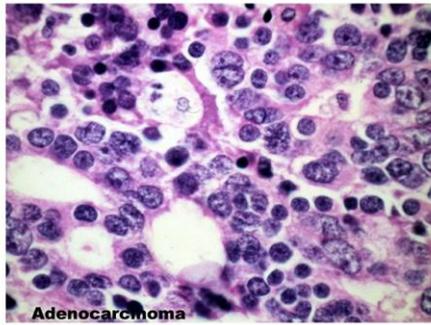
2



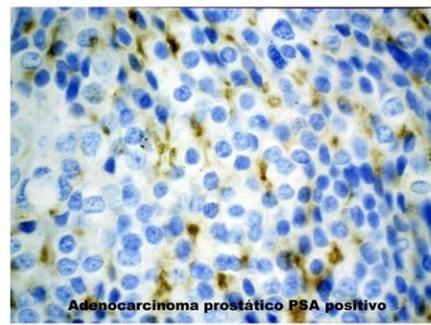
3

La metástasis de adenocarcinoma de origen desconocido (sin que se tenga un primario a la vista) es un gran desafío al diagnóstico histológico.

Se cuenta con dos marcadores órgano específico que son PSA y PSAP (Antígeno Prostático Específico-Fosfatasa Acida Prostática Específica) para adenocarcinoma próstata (imágenes 4 y 5) y Tiroglobulina para carcinoma de la tiroides (imagenes 6 y 7). Con estos marcadores y para estos casos solamente es posible determinar el órgano de origen de la metástasis.



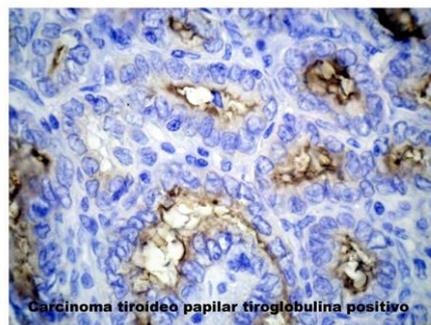
4



5



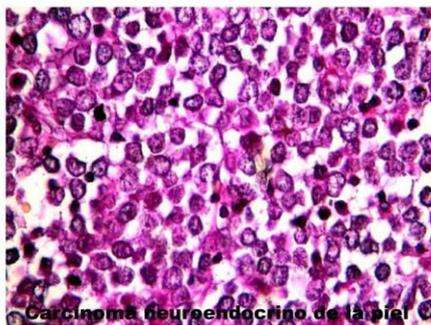
6



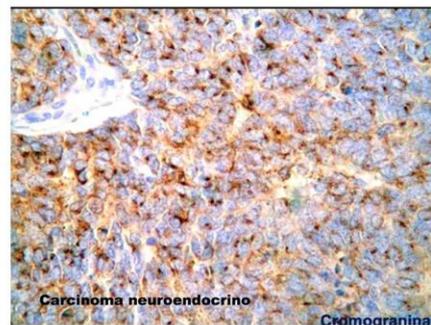
7

TUMORES NEUROENDOCRINOS

Comparten expresión positiva para citoqueratina (naturaleza epitelial) y expresión positiva para marcadores neuroendocrinos como Enolasa neurooespecífica (NSE), cromogranina y sinaptofisina (imágenes 8 y 9) Este hecho es característico de este grupo de neoplasias. También es posible detectar en ellas una serie de péptidos como gastrina, somatostatina, insulina, glucagón, serotonina entre otros, y que permiten una clasificación más específica.



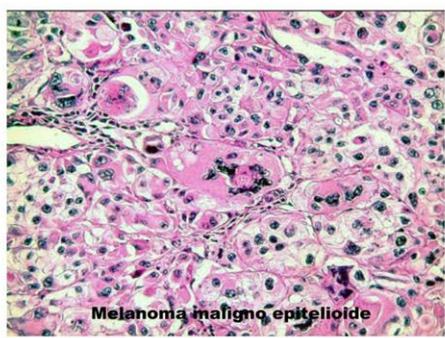
8



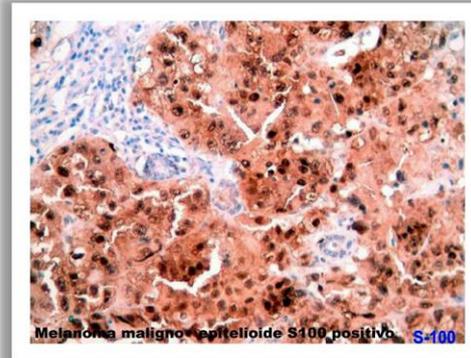
9

MELANOMA MALIGNO

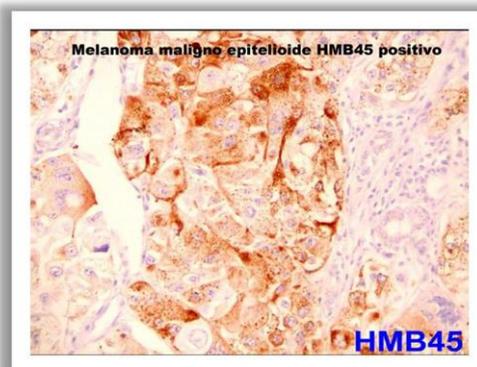
La producción de pigmentos de melanina es un rasgo característico de esta neoplasia, sin embargo existen formas no pigmentadas que constituyen un desafío diagnóstico, pudiendo simular cualquier otro tumor maligno de estirpe diferente. Son positivos para la proteína S-100, antígeno asociado a melanoma (HMB-45), Tirosinasa y Vimentina (imágenes 10, 11 y 12). Son generalmente negativos para citoqueratina.



10



11



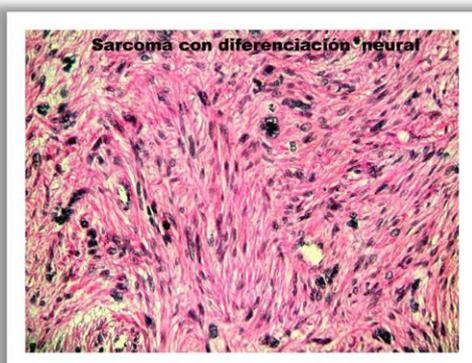
12

SARCOMAS

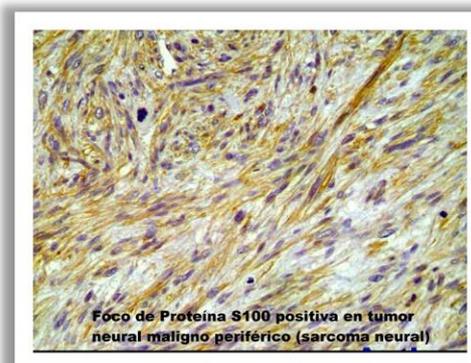
Expresan positividad para el filamento intermedio vimentina. Como la vimentina es expresada por muchos tumores mesenquimáticos, esta positividad tiene valor en un panel junto a otros marcadores como por ejemplo desmina, actina, caldesmon, calponina, mioglobina que permiten demostrar diferenciación muscular lisa o estriada o la expresión positiva para proteína S-100 como marcador neural.

TUMORES NEURALES Y GLIOMAS

Neurofilamento es positivo en neuroblastomas. Proteína gliofibrillar (GFAP) es positiva en astrocitomas y glioblastomas cerebrales. La S-100 es positiva en tumores neurales como neurilemomas y sarcomas neurales (imágenes 13 y 14).



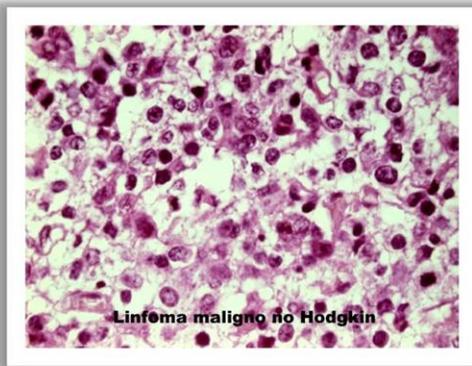
13



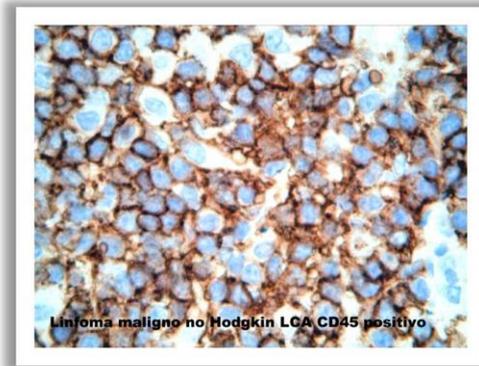
14

LINFOMAS

Expresan positividad para antígeno leucocitario común (LCA o CD45). Los marcadores para linfoma-leucemia se denominan en forma genérica sistema CD. Hay más de 100 de éstos, los que permiten clasificar y subclasificar linfomas T, B, Null y diversas leucemias. La diferenciación entre hiperplasia ganglionar reactiva versus linfoma folicular puede ser a veces difícil. En este caso se usa expresión del Bcl-2 y restricción monoclonal para cadenas kappa o para lambda (imágenes 15 y 16).



15



16

TUMORES VASCULARES

Existen marcadores endoteliales como Factor VIII, Ulex europeus, CD31 y CD34 que son positivos en hemangiomas y otros tumores vasculares benignos y malignos como hemangiomas y angiosarcomas.

OTROS MARCADORES

Receptor Estrogénico, Receptor de progesterona, Cerb-2: marcadores de pronóstico y terapia para carcinomas mamarios.

Ki67, Proex, p16 son marcadores de proliferación y de diferenciación de neoplasias in situ del cuello uterino versus lesiones reactivas del epitelio cervical producto de la inflamación en ese mismo sitio.

TTF-1(+), Napsina (+), CDX-2 (-), Queratina 20 (-), marcadores que ayudan a diferenciar adenocarcinomas primarios del pulmón versus metástasis de adenocarcinoma de otros sitios.

Glipican y Hepar: ayudan a diferenciar carcinoma hepatocelular versus adenocarcinoma primario (colangiocarcinoma) y metástasis de adenocarcinoma de otros sitios al hígado.

CD117 (c-kit) y DOG-1 permiten diagnosticar Gist versus otras neoplasias fusocelulares como leiomioma, sarcomas neurales, fibromatosis y otras neoplasias.

WT1 permite una aproximación diagnóstica para reconocer los carcinomas serosos del ovario versus otras neoplasias similares. Este producto se expresa también en una variada gama de tumores por lo que no es muy específico.

INMUNOHISTOQUIMICA EN NEOPLASIAS INDIFERENCIADAS

En general los sarcomas tienden a tener células fusadas y los carcinomas células poligonales o redondeadas. Existen neoplasias indiferenciadas, en general un 5% de los tumores malignos, en que no es posible determinar solo por morfología el origen histogenético. En este caso se aplicarán métodos auxiliares como inmunohistoquímica y microscopía electrónica. El siguiente panel de inmunohistoquímica es útil para el diagnóstico de neoplasias indiferenciadas, permitiendo reconocerlos como carcinoma, sarcomas, linfomas o melanoma. Se debe tener en cuenta que estos marcadores permiten solo orientación hacia el origen histogenético de la neoplasia, pero no hacen diagnóstico de malignidad.

NEOPLASIA	CITOQUERATINA	LCA/CD45	S-100	VIMENTINA
Carcinoma	X			
Linfoma		X		
Melanoma			X	
Sarcoma				X

Microscopía Electrónica

Tuvo su época de oro en el diagnóstico de tumores indiferenciados y en gran medida ha sido remplazado por los anticuerpos monoclonales ya que su aplicación necesita menos infraestructura. Sin embargo, por un lado, su aplicación es aún necesaria como complemento a las técnicas de inmunohistoquímica y por otro, todavía hay tumores que sin la microscopía electrónica no pueden ser diagnosticados correctamente. Bajo el microscopio electrónico de transmisión se pueden visualizar estructuras celulares que permiten un diagnóstico preciso como: epiteliofibrillas en carcinomas escamosos, vellosidades y lúmenes intracelulares en adenocarcinoma, bandas densas en rhabdomyosarcoma; gránulos neuroendocrinos en paragangliomas, carcinoides o carcinomas neuroendocrinos, premelanomas en melanomas, componentes mitocondriales en oncocitomas y carcinomas renales cromóforos, etc. Este instrumento es de gran ayuda en la investigación y para complementar el conocimiento de la neoplasia. También se puede mezclar su uso con anticuerpos monoclonales y realizar inmunoelectromicroscopía para visualizar el sitio ultraestructural exacto en donde se observa la positividad en la célula tumoral. Esta técnica que requiere de gran rigurosidad y experiencia.

Diagnóstico Molecular

Se está aplicando un número creciente de técnicas moleculares a los tumores. Algunas son diagnósticas y otras de valor pronóstico. Se usa con frecuencia la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La transcripción de BCR-ABL en leucemia mieloide, la monoclonalidad, expresión de Bcl2 y mutaciones específicas en linfomas, amplificación de gen

HER-2 y N-MYC en cáncer de mama y neuroblastomas, mutaciones específicas para sarcomas de partes blandas son algunos ejemplos emergentes. Se cuenta ya con numerosos chips de sondas moleculares, lectores láser automatizados que permiten en 1 cm cuadrado, la lectura de miles de genes simultáneamente. La técnica de Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) es de utilidad para determinar el HER-2 en cáncer mamario. Se espera que estas técnicas sean complementarias al diagnóstico histológico convencional aunque algunos han pronosticado que la huella dactilar molecular de los tumores (fingerprints) estará disponible en los próximos años y que influirá notablemente en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer.

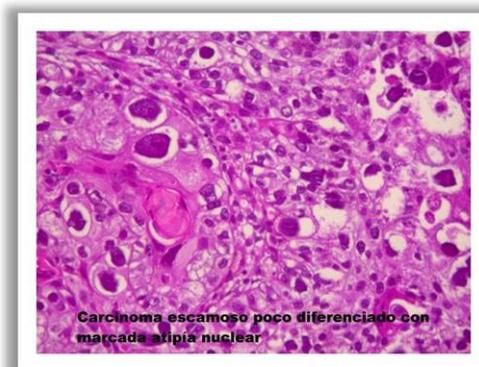
Diferenciación (Grading)

Como la neoplasia tiende a imitar al tejido de origen, es posible reconocer estructuras microscópicas que permitirán la clasificación histogenética de un tumor. En general, la mayor parte de los tumores corresponden a carcinomas, sarcomas, linfomas y melanomas. Estos grupos tumorales muestran patrones arquitecturales distintivos.

Según las células neoplásicas se asemejen o no al tejido de origen se ha propuesto cuatro grados I, II, III, IV según sea el orden creciente de anaplasia: bien diferenciado, moderadamente diferenciado, poco diferenciado e indiferenciado (imágenes 17 y 18).



17



18

Para establecer esta gradación se considera el porcentaje de células diferenciadas, el pleomorfismo celular, la presencia de células tumorales bizarras, la celularidad y las mitosis. Es importante hacer gradación de los tumores ya que por un lado se relaciona con el pronóstico y por otro con el tratamiento a efectuar. El grado varía según los diferentes tumores. Así en la piel hay un acuerdo tácito para hacer sólo tres grados en los carcinomas escamosos (bien, moderado y poco diferenciado). Algunos sarcomas se gradúan en alto grado en forma automática según resulte el subtipo histológico, ejemplo el rhabdomyosarcoma pasa a ser inmediatamente un sarcoma de alto grado.

En general se dice que los tumores poco diferenciados e indiferenciados tienen un peor pronóstico. Esto se relaciona por una parte con la velocidad de duplicación de la población tumoral, capacidad de permeación linfovascular, potencial de invasión y metástasis y por otro con la sensibilidad que tenga la neoplasia frente a tratamientos radiantes o de quimioterapia. Sin embargo no se debe olvidar que hay neoplasmas bien diferenciados pero que pueden tener un comportamiento biológico agresivo.

Etapificación (Staging)

Se refiere hasta donde se ha extendido un tumor localmente y si ha dado metástasis ganglionares o metástasis a órganos distantes. Existen dos sistemas. **El sistema TNM** : T tumor primario, N: ganglios linfáticos regionales, M: metástasis a distancia.

La letra T: considera el tamaño progresivo del tumor primario de un órgano sólido o la profundidad de invasión progresiva en víscera hueca (T1, T2, T3, T4).

La N: número y distribución de metástasis ganglionares linfáticas (N0, N1, N2, N3).

La M: presencia o ausencia de metástasis a distancia (M0, M1).

El otro es el sistema AJC (American Joint Committee) donde los cánceres se dividen en estadios de 0 al IV teniendo en cuenta la clasificación TNM. El sistema varía según el órgano afectado. La valoración se hace clínicamente incluyendo la etapificación quirúrgica, estudio de imagen TAC y RNM y los datos aportados por la biopsia.

En algunos órganos el **T** cobra mucha importancia. En algunos tumores adrenales y en tumores del estroma gastrointestinal, el tamaño de **T** puede ayudar a predecir el comportamiento biológico y ayudar al cirujano a decidir la aplicación de una conducta quirúrgica oncológica amplia. En tumores del tubo digestivo, mientras más profunda es la invasión de la pared, peor es el pronóstico. Para estas mismas neoplasias existen barreras ganglionares linfáticas cuyo compromiso tiene valor pronóstico. Si mayor es el número de ganglios linfáticos comprometidos, o si el tumor ha comprometido más barreras o simplemente se ha saltado alguna de estas barreras ganglionares, peor es el pronóstico.

Invasión y Metástasis

El cáncer tiene dos propiedades que lo caracterizan, invadir localmente y dar metástasis. El proceso depende sobre todo de las siguientes seis capacidades adquiridas por la célula neoplásica.

1. Continuidad de señales positivas de proliferación por activación de oncogenes.
2. Pérdida de señales negativas de crecimiento por inactivación de genes supresores.
3. Escape de la apoptosis por producción de factores de supervivencia IGF
4. Inmortalización atribuible a la activación de la telomerasa.
5. Angiogénesis sustentada por factores angiogénicos
6. Alteración de las moléculas de adhesión celular.

Invasión Local

La mayor parte de los carcinomas se inician en un estado neoplásico limitado al epitelio del que se originan. Este estado se llama carcinoma in situ. Los epitelios están limitados por una lámina basal que los separa del estroma. En este estado son silentes y curables. Cuando el carcinoma in situ adquiere propiedades invasoras y se extiende al estroma, puede dar metástasis e infiltrar órganos y estructuras adyacentes. En el proceso de invasión directa, la

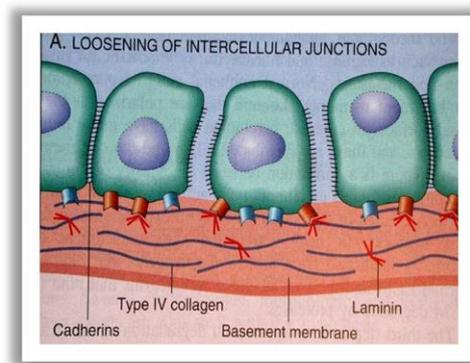
neoplasia se puede extender por planos naturales de clivaje, a través de vainas, nervios y rodeando a vasos sanguíneos o glándulas preexistentes. El tumor va comprometiendo así las diferentes estructuras y planos anatómicos. Un glioma cerebral puede invadir el tronco cerebral y los acueductos cerebrales. Un cáncer puede ocupar todo un órgano produciendo insuficiencia como ocurre con el carcinoma hepatocelular del hígado. Algunos tumores pueden erosionar grandes vasos sanguíneos y producir hemorragia masiva. Un cáncer de cuello uterino puede invadir los ureteres y producir insuficiencia renal.

En neoplasias que se originan en tejidos no limitados por láminas basales como hepatocitos, tejido linfático y tejido conjuntivo, no se ha definido el estado de neoplasia in situ. Sin embargo, a veces, es posible identificar nódulos displásicos y neoplasias pequeñas iniciales originadas en estos tejidos.

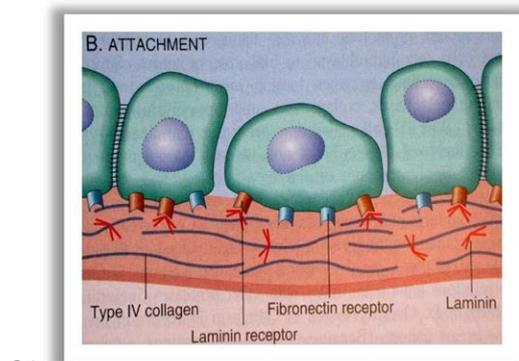
Invasión desde Carcinoma in situ (imágenes 19, 20, 21, 22, 23 y 24):



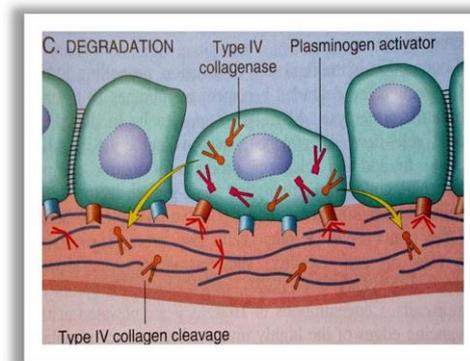
19



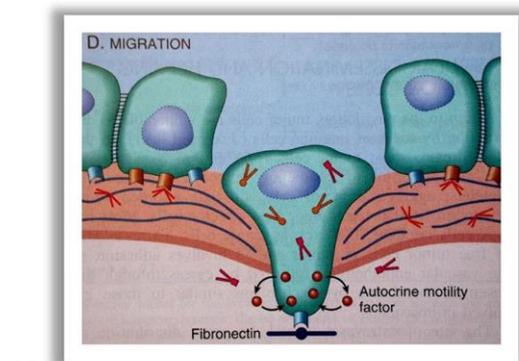
20



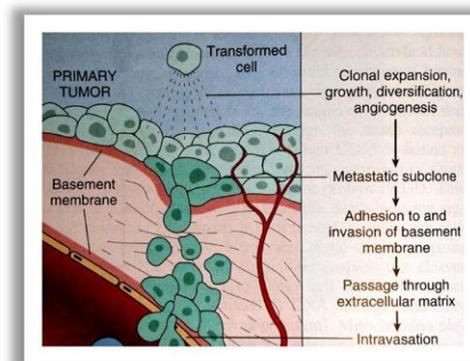
21



22



23



24

Se define una población celular genéticamente transformada. La lámina basal es formada por la célula epitelial. La célula epitelial transformada tiene tres opciones: la de producir normalmente la lámina basal, no producirla o producirla en forma defectuosa. Esto último es lo que ocurre con frecuencia. La lámina basal está formada por laminina, glicoproteínas, proteoglicanos y tipos de colágena).

Pérdida de Cohesión Celular y Unión a la matriz extracelular

La Cadherina-E actúa como adhesivo intercelular y su porción citoplásmica se une a la Catenina Beta intercambiando y transmitiendo señales de anti crecimiento. En casi todos los tumores epiteliales malignos, se pierde la función de la Cadherina-E por una mutación de los genes correspondientes o por activación de los genes de la Catenina Beta. Así la catenina Beta libre, activa la transcripción de genes que estimulan el crecimiento celular.

Lo primero que hace la célula neoplásica es unirse a la matriz extracelular por medio de receptores celulares para laminina. La célula epitelial normal tiene receptores para laminina orientados hacia la lámina basal. Las células neoplásicas tienen más receptores y orientados en toda su superficie. Otras moléculas de unión importantes son las integrinas. La unión a la matriz extracelular en la célula tumoral es varias veces más fuerte que la que ocurre en un tejido normal.

Degradación de la matriz extracelular.

Luego se produce una disolución enzimática de la matriz y lámina basal generalmente defectuosa, a través de metaloproteinasas: colagenasas, trombinas, tromboplastinas, plasminas, estromelinas, Catepsina D y varias proteasas producidas por las células tumorales y por las células del estroma. Además las células tumorales tienen movimientos con formación de pseudopodios producidos por un factor autocrino de movilidad y se introducen en el estroma subyacente. La célula neoplásica tiene movimiento en el tejido estromal con uniones repetidas a la matriz extracelular y disolución enzimática de la misma. Como los sarcomas son originarios de esta zona, las células de estos tumores siguen el proceso de invasión y metástasis a partir de esta etapa.

Estroma tumoral

Por décadas la atención se centró en la célula neoplásica. El estroma quedó olvidado. Actualmente es considerado parte integral de la neoplasia, en especial en los procesos de la invasión y metástasis. El estroma juega dos roles:

1º Rol en la Angiogénesis

La mayoría de los tumores debe inducir su propia vascularización para asegurar su crecimiento. Excepcionalmente este fenómeno no es del todo necesario como es el caso de la propagación neoplásica en las membranas serosas y en el epéndimo. El proceso parte por degradación de la membrana basal de los vasos existentes, proliferación y migración dirigida de células endoteliales por estímulos angiogénicos y diferenciación final de vasos capilares maduros con establecimiento de una circulación funcional.

En las primeras etapas de crecimiento, la mayor parte de los tumores no inducen angiogénesis y permanecen in situ hasta que aparecen factores que terminan con la fase de reposo vascular.

Para esto o bien aparecen factores angiogénicos o bien se frenan los antiangiogénicos o ambos hechos simultáneamente. Los procesos moleculares a este nivel son poco conocidos.

Las neoplasias no superan 1 a 2 mm de diámetro sin tener angiogénesis para asegurar su nutrición. Superado este tamaño se produce hipoxia, hecho que a su vez gatilla la apoptosis vía p53. La neoangiogénesis tiene un doble efecto. Por un lado la perfusión aporta nutrientes y oxígeno y por otro, las células endoteliales neoformadas estimulan la proliferación de las células neoplásicas vía secreción de factores de crecimiento tipo insulínicos, PDGF, GM-CSF, IL1, VEGF (factor de crecimiento endotelial), FGF (factor de crecimiento fibroblástico).

Además del efecto estimulante sobre la proliferación y migración de las células endoteliales, estos factores muestran un efecto semejante a la histamina con extravasación de proteínas plasmáticas incluyendo fibrinógeno, produciendo un fenómeno semejante a la formación del tejido de granulación. Así el estado final vascular de un tumor resulta del equilibrio o predominio entre estos factores.

2º Rol en la invasión

a) la degradación de la matriz extracelular. El miofibroblasto estromal produce la mayor cantidad de enzimas comprometidas en la degradación de la matriz extracelular aunque en menor grado también lo hacen las células neoplásicas. El Ets1 ha sido implicado en la mediación de las señales en este proceso. Las proteasas de degradación (colagenasa 1, colagenasa 4, estromelisina 1 y 3) se secretan como proenzimas que deben ser activadas localmente por el sistema UPA (urokinasa plasminogen activator). La activación de plasminógeno a plasmina y las diferentes metaloproteinasas degradan finalmente la matriz extracelular.

b) Migración de células neoplásicas: La célula tumoral necesita de movilidad y de cambios en la adhesión a la matriz extracelular. Varios complejos han sido involucrados en la inducción de migración de las células neoplásicas, entre los que se cuentan SF/HGF (scatter hepatocyte growth factor), integrinas, tenascina y CD44, entre otros.

3º Rol en la proliferación: Se ha establecido la existencia de estímulos para la proliferación de la neoplasia desde el estroma. La matriz extracelular puede traducir señales que modifican la proliferación celular neoplásica además de servir de reservorio para factores de crecimiento.

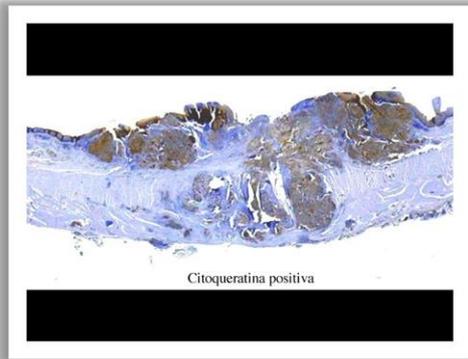
A modo de ejemplo se usa el Carcinoma Escamoso Esofágico para explicar el proceso de invasión (imágenes 25, 26, 27, 28, 29 y 30), permeación tumoral linfovascular y metástasis.



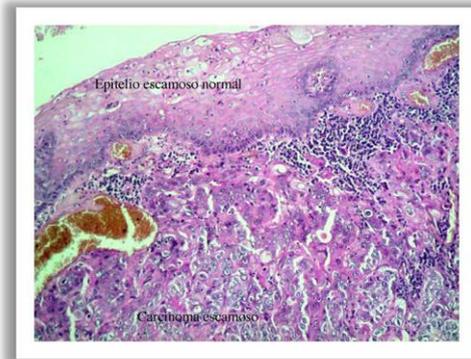
25



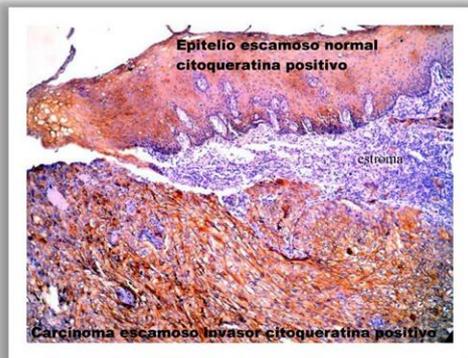
26



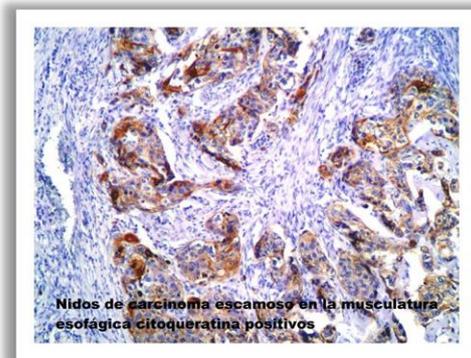
27



28



29



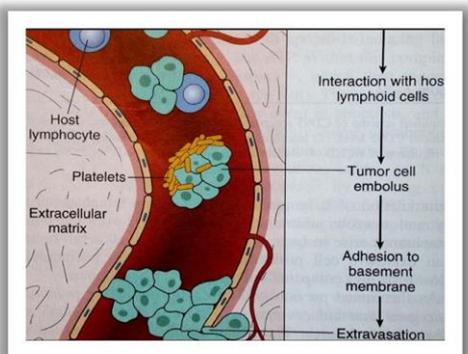
30

Permeación Tumoral Linfovascular (imágenes 31, 32, 33 y 34)

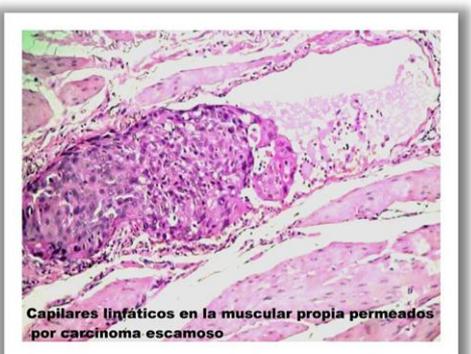
El ataque neoplásico a los vasos sanguíneos y linfáticos ocurre en el estroma y es de importancia mayor. Por eso que en etapa de carcinoma in situ no ocurren metástasis. El proceso se llama permeación tumoral linfovascular o embolización neoplásica. Se trata de la presencia de células neoplásicas en el lumen vascular, usualmente adheridas al endotelio.

El proceso es característico de los tumores malignos aunque con algunas restricciones. Debemos recordar que el trofoblasto intermedio permea las paredes vasculares como un hecho fisiológico.

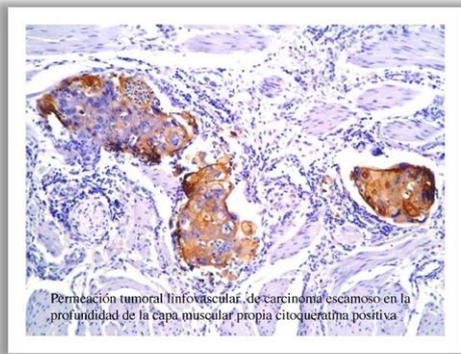
Desde el punto de vista de la biología tumoral, la presencia de permeación tumoral linfovascular puede significar a lo menos recidiva local y a lo más buena probabilidad de metástasis. Si tomamos como ejemplo un carcinoma escamoso del esófago que ha sido resecado, al quedar células neoplásicas dentro de vasos linfáticos en sitios adyacentes al tumor, los microémbolos tumorales se van anclando en la pared cercana a la anastomosis y pueden producir una recidiva tumoral.



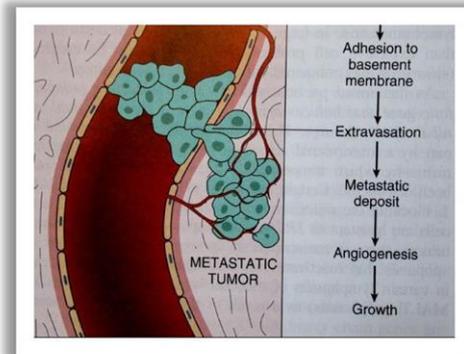
31



32



33



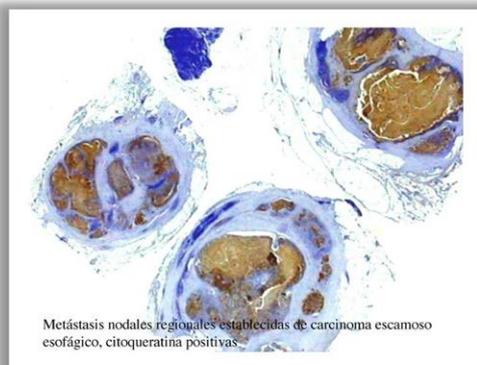
34

Metástasis (imágenes 35 y 36)

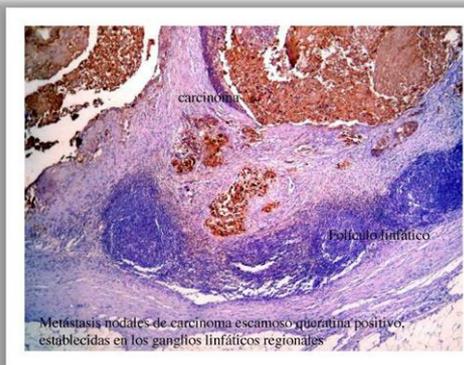
Se trata de la transferencia de células neoplásicas malignas desde un sitio a otro no conectado directamente e identifica a un tumor como maligno. A partir de la permeación tumoral linfovascular, la célula neoplásica puede diseminarse a sitios u órganos distantes. Ocasionalmente la metástasis puede ser la primera manifestación de un tumor maligno.

Desde el estroma las células tumorales disuelven enzimáticamente la lámina basal del capilar, se hacen espacio entre las células endoteliales sin necesidad de lizarlas y llegan al flujo sanguíneo o linfático. La célula neoplásica trata de escapar rápidamente de este medio ya que le es muy desfavorable, puesto que aquí ocurre la mayor respuesta celular antitumoral. La mayoría de las células tumorales circulan solas en forma aislada pero también pueden formar émbolos tumorales junto a plaquetas circulantes. A distancia, por medio de mecanismos muy semejantes a los de entrada al capilar y mediada por receptores, la célula tumoral se adhiere al endotelio. La célula endotelial, por mecanismos no muy bien conocidos, se encoge y le da paso. Así penetra la pared disolviendo enzimáticamente la lámina basal del capilar del órgano blanco y llega al intersticio donde puede producir metástasis. En este nuevo ambiente es necesario que las células neoplásicas tengan nueva irrigación para la formación de la llamada microesfera tumoral que es un microconjunto de células tumorales rodeando a un capilar de nutrición. Aquí intervienen factores angiogénicos, factores de crecimiento y factores autocrinos.

Si se hace un resumen de las barreras físicas que debe atravesar la célula neoplásica desde un carcinoma in situ son: Lámina basal epitelial - estroma - lámina basal capilar - célula endotelial - flujo vascular - endotelio - lámina basal endotelial - estroma órgano blanco.



35



36

Organos blanco de metástasis

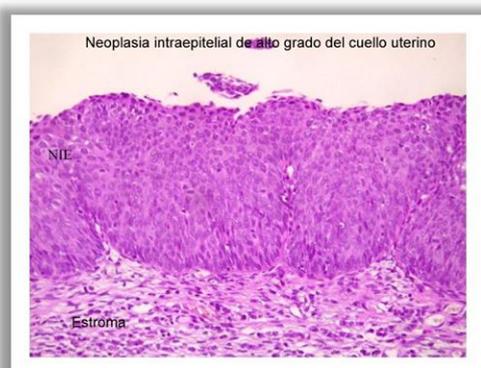
Se sabe desde hace más de un siglo que ciertos tumores dan metástasis preferentemente a determinados órganos. Cánceres gastrointestinales dan con frecuencia metástasis hepáticas. Cánceres de tiroides, renal, próstata y mama dan metástasis al hueso. Cánceres de pulmón dan metástasis cerebrales y adrenales. Se ha intentado explicar y demostrar este hecho involucrando al flujo sanguíneo anatómico, lo que en algunos casos es incuestionable, pero no explica totalmente el proceso. Por ejemplo el músculo estriado y el bazo, sitios de gran flujo sanguíneo no reciben muchas metástasis. Así se han propuesto factores específicos en estos órganos blanco, como son los receptores de integrinas y quimocinas, que hacen de nexo para producir la metástasis. Se sabe también que hay tumores que preparan el sitio de metástasis para tener un territorio más favorable donde proliferar.

Se dice clásicamente que los carcinomas dan metástasis por vía linfática y que los sarcomas lo hacen por vía sanguínea. No se debe confiar mucho en esta aseveración ya que hay múltiples anastómosis entre los sistemas vascular y linfático y es posible encontrar lo opuesto. La importancia de este concepto es para conocer los sitios clásicos de drenaje de metástasis y por ejemplo reseca apropiadamente barreras linfáticas o buscar un cáncer primario desconocido a partir de la metástasis.

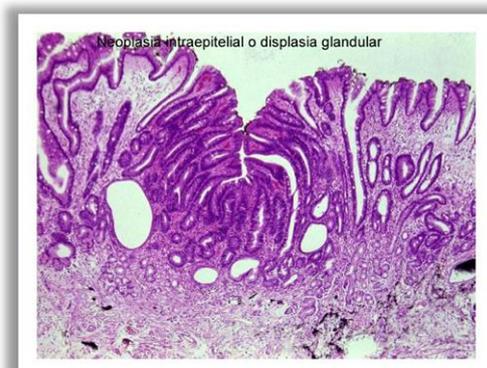
PRECANCER

Son lesiones morfológicamente identificables que preceden a cánceres invasores. En teoría la identificación y eliminación de estos precursores debería llevar a la erradicación de la mayoría de los cánceres humanos. En USA, la introducción del Papanicolaou con coberturas adecuadas, ha llevado a una reducción del 70% de la mortalidad ajustada por edad del cáncer de cuello uterino. Ningún otro esfuerzo en el tratamiento de este tipo de cáncer puede mostrar tales logros (imagen 37).

El rango de estas lesiones es amplio. Los adenomas de colon y el nevo atípico pueden ser removidos efectivamente. Sin embargo otros como la leucoplaquia displásica de la mucosa oral, esófago de Barrett con displasia de alto grado (imagen 38) y la anemia refractaria con exceso de blastos son un gran desafío.



37



38

En estos momentos hay un amplio interés por el estudio de estas lesiones. Un punto interesante es que estas lesiones precancerosas pueden regresar. Generalmente son más

frecuentes que los cánceres invasores. El estudio de inhibidores de estas lesiones puede hacerse con más facilidad en estas precancerosis. Además, las nuevas técnicas de imagen tienen el potencial de llegar a un nivel molecular y por otro las técnicas de biología molecular están caracterizando perfiles los moleculares. Estos hechos que hacen promisoría una mezcla de técnicas que pueden ser aplicadas a la investigación de los estados pre neoplásicos y planear terapias para su eventual erradicación.

EDAD, HERENCIA y CANCERES FAMILIARES

En general el cáncer aumenta con edad probablemente por la acumulación de mutaciones somáticas asociadas a cáncer y por otro a la baja de la inmunocompetencia que ocurre con la edad. En muchos cánceres es muy importante la influencia medioambiental a lo que se suma la predisposición hereditaria. Es el caso del cáncer de pulmón entre parientes cercanos de fumadores con este tipo de cáncer y que tienen una mortalidad cuatro veces mayor por cáncer pulmonar que los controles.

Síndrome de Cáncer Hereditario: Se produce por transmisión hereditaria de un único gen mutante por patrón autosómico dominante. Tienen un fenotipo marcador específico. El retinoblastoma infantil tiene un 40% de formas hereditarias. En los portadores de este gen el riesgo es de diez mil veces mayor que la población general y con frecuencia muestras formas bilaterales. Además estos pacientes tienen mayor riesgo de tener un segundo cáncer como osteosarcoma.

Otro tipo es la Poliposis Adenomatosa Familiar del colon. Las personas que heredan esta mutación autosómica dominante del gen APC hacen precozmente adenomas poliposos del colon y luego cáncer colorectal a edad muy temprana.

Cáncer Familiar: Hay ejemplos de aparición espontánea para casi todos los tipos de cánceres frecuentes. Lo que define a este grupo es la edad temprana de aparición, tumores que afecten a dos o más parientes del caso que se presentó y a veces presencia de tumores bilaterales o múltiples. No tienen un fenotipo marcador específico, probablemente sea una herencia multifactorial. En casos particulares se asocian con herencia de genes mutantes como el BRCA1 y BRCA 2 en cáncer familiar de mama y ovario.

Síndrome autosómico recesivo de reparación defectuosa del DNA: Se caracterizan por inestabilidad de DNA cromosómico y reparación defectuosa del DNA. El caso del xeroderma pigmentosum.

Cerca de un 5-10% de los cánceres humanos entran en las categorías antes mencionadas. El resto, la mayoría, tienen una herencia indirecta o sutil. En estos tumores, el genotipo puede influir en el desarrollo de cánceres a los que se suman los factores ambientales.

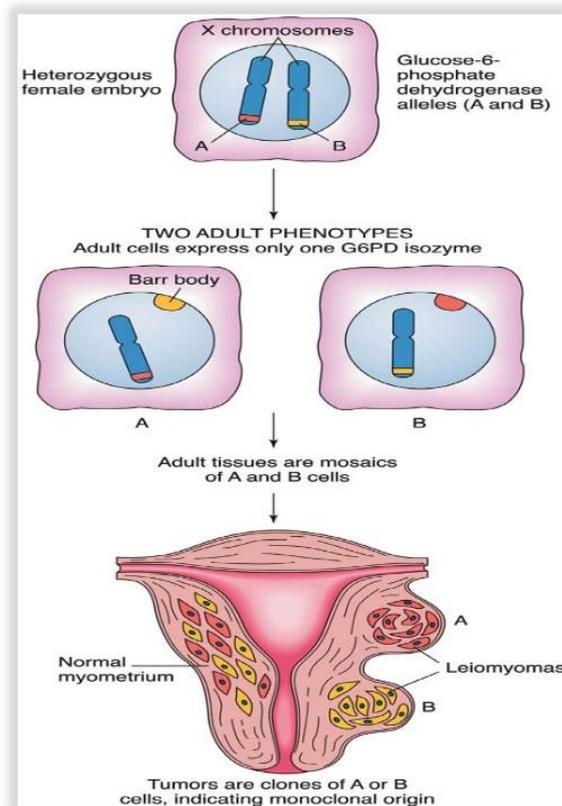
FACTORES CLINICOS ADQUIRIDOS

Son asociaciones que pueden verse con mayor o menor frecuencia. Carcinoma escamocelular en los bordes de una fístula o en zonas de quemadura. Carcinoma hepatocelular en cirrosis. Hiperplasia endometrial atípica y adenocarcinoma endometrial. Displasia broncogénica en fumador y carcinoma broncogénico. Gastritis crónica atrófica tipo A con tumores carcinoides y

adenocarcinoma gástrico. Colitis ulcerosa idiopática y carcinoma colorectal. Leucoplaquia de mucosa bucal, vulvar o del pene con carcinoma escamocelular.

ORIGEN MONOCLONAL DEL CANCER

Estudios en humanos y en modelos de experimentación entregan fuerte evidencia para decir que la mayoría de los cánceres parten de una célula única transformada. La evidencia más fuerte es aportada por neoplasias de plasmacélulas (plasmocitoma-mieloma múltiple) que producen una inmunoglobulina monoclonal. Este pique monoclonal es evidencia conclusiva de enfermedad neoplásica. En linfomas B la expresión exclusiva monoclonal de cadenas kappa o lambda en la superficie celular es otra evidencia clásica del origen monoclonal. En leiomiomas del útero se ha evidenciado la expresión de isoenzimas A o B de la glucosa 6 fosfatasa dehidrogenasa pero no ambas, en mujeres heterocigotas para estas dos isoenzimas. Esto indica que cada tumor se originó de una sola célula progenitora (imagen 39).



39

Se debe recordar que a pesar del origen monoclonal del cáncer, las neoplasias a medida que progresan tienen una tremenda inestabilidad genética. Las células neoplásicas son más susceptibles que la población celular normal de hacer roturas cromosómicas, no disyunciones, intercambio de cromátidas hermanas etc. Esta inestabilidad genética se asocia a la progresión del cáncer a fenotipos más agresivos con propiedades invasoras.

A pesar que el cáncer puede ser causado por muchos agentes, químicos, físicos y virales o bacterianos, todos tienen una vía final común, el DAÑO DEL DNA CELULAR.

BASES MOLECULARES DEL CANCER y ONCOGENES

Las alteraciones genéticas no letales son la base de la carcinogénesis. En general se trata de mutaciones que pueden ser adquiridas por diversos factores ambientales tales como virus, sustancias químicas, radiación o bien pueden heredarse en la línea germinal.

La hipótesis genética propone que un tumor se debe a la expansión clonal de una sola célula progenitora que ha sufrido una lesión genética. Es decir los tumores son de origen monoclonal.

Esta hipótesis ha sido confirmada en la mayoría de los tumores. La carcinogénesis es un proceso que incluye varias etapas en el plano fenotípico y en el genotípico. Las características de proliferación excesiva, la infiltración local y la capacidad de dar metástasis se adquieren en forma gradual y es lo que se denomina progresión tumoral.

La lesión genética se debe a tres clases de genes reguladores:

1. Los protooncogenes que estimulan el crecimiento (los alelos mutantes de los protooncogenes se llaman oncogenes).
2. Los genes supresores del cáncer (antioncogenes).
3. Los genes que regulan la muerte celular programada o apoptosis.
4. Una cuarta categoría interviene en la carcinogénesis y es la de genes que regulan la reparación del DNA.

La célula humana normal tiene secuencias de DNA que intervienen en el crecimiento y diferenciación. Estas secuencias potencialmente oncogénicas son denominadas oncogenes. Cuando estas secuencias son transformadas en tumorigénicas se las llama oncogenes activados. En la célula normal la expresión de estas secuencias está altamente controlada o reprimida y la pérdida de este control resultaría en la transformación neoplásica.

En los virus de transformación aguda se producen tumores en corto tiempo debido a transducción de genes virales y que son llamados oncogenes virales (v-onc) y los genes celulares de donde se han derivado se llaman oncogenes celulares (c-onc) o proto-oncogenes. Se ha establecido que, los virus en su paso por el ser humano y debido a infecciones ancestrales, se llevaron consigo la copia de estos oncogenes celulares humanos. Los virus de transformación lenta no poseen oncogenes y al integrar el provirus (copia DNA del genoma viral RNA) en sitios críticos del genoma desregulan oncogenes celulares.

Activación y mecanismos de acción de oncogenes

Los oncogenes celulares se activan por: 1. alteración estructural del proto-oncogene lo que da origen a un producto génico anormal. Aquí se han descritos puntos de mutación en la secuencia, deleciones, translocaciones cromosómicas. 2. Sobreexpresión del proto-oncogene con sobreproducción del producto génico. Aquí se ha descrito transcripción aumentada por mutagénesis insercional, translocación cromosómica, amplificación, deleción de secuencias, promoción alterada de RNA polimerasa.

Los oncogenes se clasifican según su función en la contrapartida celular normal en cuanto a la señal de transducción que regule el crecimiento y la diferenciación celular (proto-oncogenes). La unión de un factor de crecimiento a su receptor activa a ese receptor.

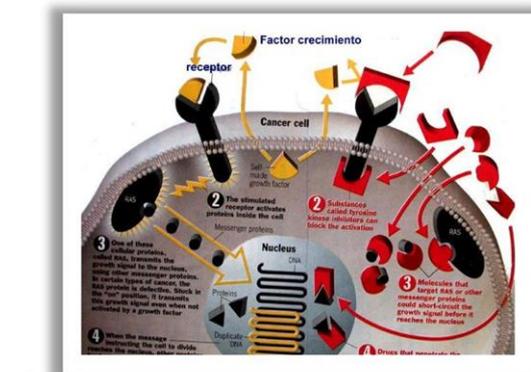
Oncogenes y Factores de Crecimiento

La célula tumoral requiere de factores ambientales para sobrevivir. Muchos de estos factores actúan vía receptores celulares (Rc). Estos se localizan en la membrana celular, núcleo y citosol. Grandes ligandos como péptidos, lípidos y glicoproteínas, virus y agentes farmacológicos son reconocidos por Rc de superficie. Ligandos pequeños como hormonas esteroidales, tiroideas, aminoácidos son reconocidos por Rc del citosol y del núcleo.

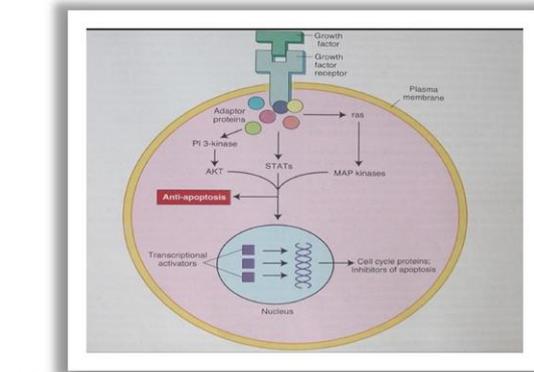
Cinco hechos son necesarios para que esto ocurra: 1 Unión de un factor de crecimiento a su receptor específico en la membrana celular. 2. Activación transitoria y limitada del factor de crecimiento, que a su vez activa proteínas de señales en la parte interna de la membrana. 3 Transmisión de señales por el citosol hasta el núcleo por medios de segundos mensajeros. 4. Inducción y activación de factores reguladores nucleares que inician la transcripción del ADN. 5. Entrada y progresión de la célula al ciclo de división.

Transformación Inducida Autocrina (imágenes 40 y 41)

"La célula neoplásica secreta sus propios factores de crecimiento, los que estimulan el propio crecimiento celular actuando sobre Rc específicos". Los factores de crecimiento pueden generar señales mitóticas potentes. Ellos tienen un potencial oncogénico porque cuando se activan pueden sobrepasar los mecanismos de control normal de las señales de división celular.

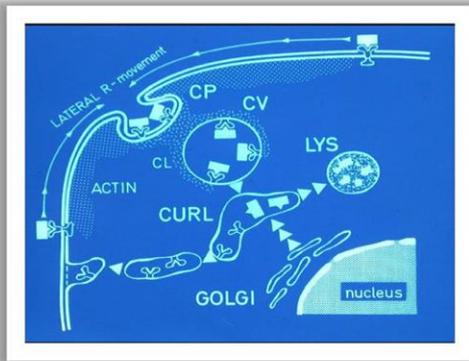


40

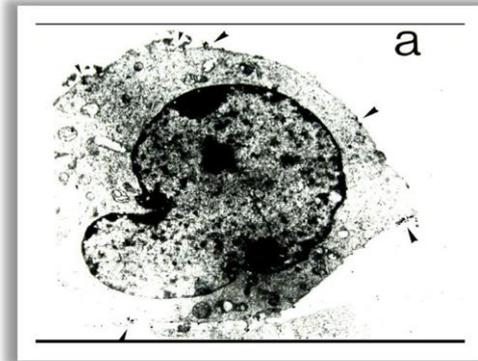


41

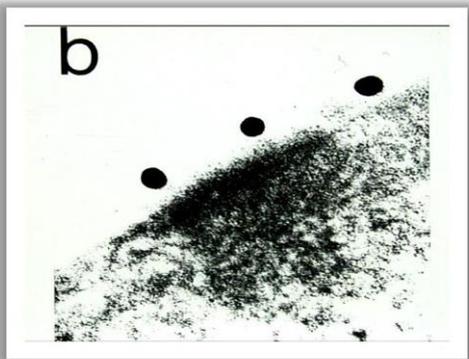
Receptores de superficie. Intervienen proteínas de membrana como adenilciclase, proteínquinasa, fosfodiesterasa, calcio y proteínas de unión. Se produce así un proceso llamado endocitosis mediada por Rc y que consume mucha energía celular. La mayor parte de los ligandos son destruidos en los lisosomas. La proteína Rc es reciclada para ahorrar energía. El pre requisito es que la célula exprese su receptor Rc. Este proceso de endocitosis vía receptor se ha demostrado por inmuno electrón microscopía (imágenes 42, 43, 44 y 45).



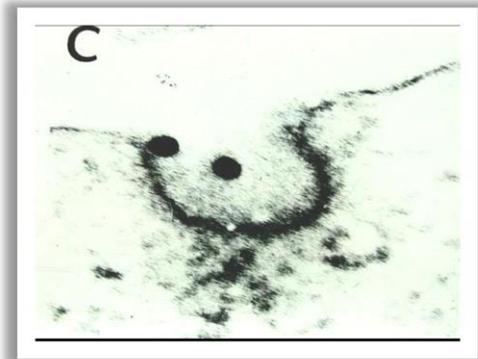
42



43



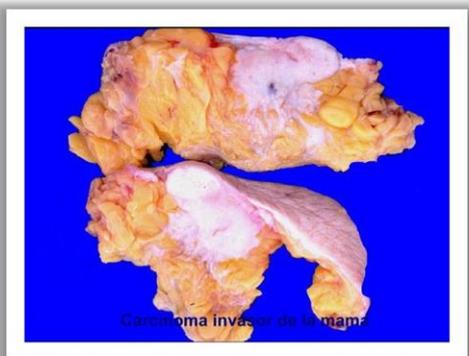
44



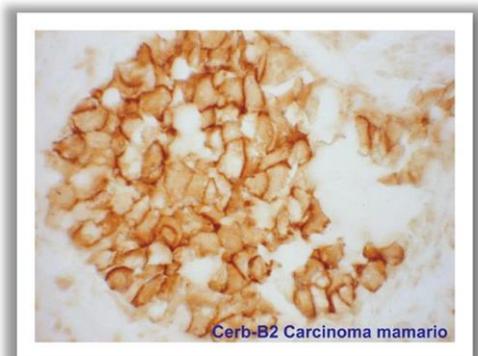
45

El número de señales mediadas por Rc vía humoral o local es muy alto. Hormonas de la hipófisis, hipotálamo, insulina, hormonas gastrointestinales, calcitonina, PTH, ACTH entran en este grupo. Sin embargo hay regiones del DNA que no son transmitidas en las células normales y que pueden activarse en la célula tumoral y que inducen síntesis de hormonas Rc que no estaban presentes en la célula madre. Esto se llama "expresión Rc paraneoplásica".

Por otro lado la célula neoplásica puede sobreexpresar receptores para factores de crecimiento, lo que la hace muy sensible a pequeñas concentraciones de estos factores. Es el caso de la sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y cuyo gen ERBB1 se ha encontrado aumentado en una mayoría de los carcinomas escamosos del pulmón. Lo mismo sucede con el HER2 (HRBB2 CerbB2) que se encuentra amplificado en un 30% de los cánceres de la mama, adenocarcinomas del pulmón, ovario y glándulas salivales. Un buen ejemplo de la importancia de estos mecanismos es la terapia actual con anticuerpos anti-HER2 en el carcinoma de la mama (imágenes 46 y 47).



46



47

Receptores del citosol y nucleares

Este tipo de Rc une ligandos pequeños. RC-ligando se une al citosol y activa la proteína G, luego se mueve hacia el núcleo y se une a la proteína Rc-cromosómica. Esto induce activación de las regiones transcriptoras del DNA.

El estrógeno y la progesterona tienen actividad estimulante en carcinomas endometriales, mamarios y tumores hepáticos (imágenes 48 y 49). Sucede lo mismo con los andrógenos para el cáncer de próstata; glucocorticoides en la leucemia; vitamina D3 en el melanoma; carcinoma bronquial, osteosarcoma y tumores paratiroides. Antiestrógenos como el tamoxifeno se ha usado como terapia antineoplásica en cáncer de mama, bloqueando los Rc a nivel nuclear.



48

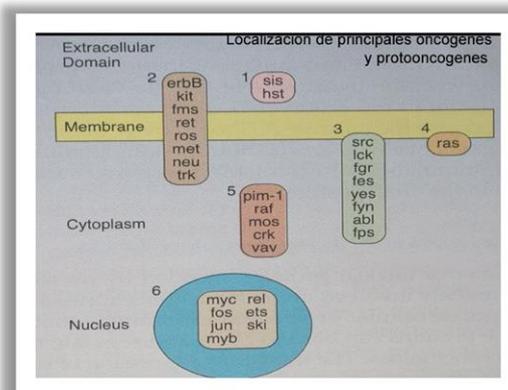


49

PROTEINAS TRANSMISORAS DE SEÑALES

Las células tumorales también adquieren autonomía por mutaciones de genes que codifican componentes de señalización celular. Muchas de estas proteínas se encuentran en la capa interna de la membrana celular donde reciben señales de los factores de crecimiento para ser enviadas al núcleo celular. Entre estos se cuentan al RAS y el ABL. Otros se encuentran en el núcleo como el MYC, MYB, JUN, FOS.

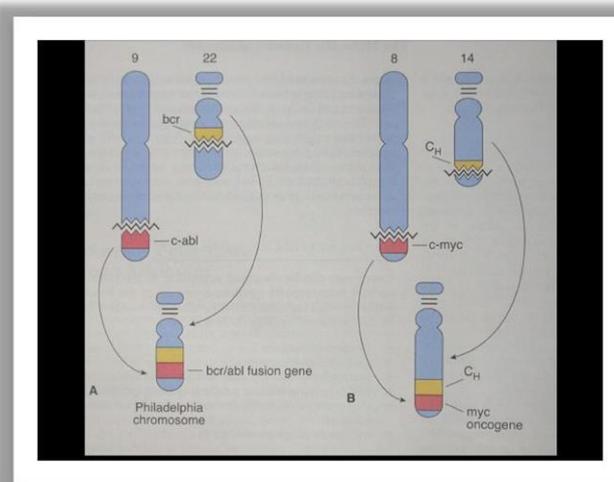
Oncogen RAS: un 30% de los cánceres humanos tienen formas mutadas del RAS. La proteína RAS se une al GTP, GDP y proteína G. El RAS varía de un estado excitado a uno de reposo. Cuando la célula es estimulada por un factor de crecimiento, el RAS se activa cambiando el GDP a GTP y también estimula la cascada mitógena RAF-MAP-Quinasas, enviando cortas y múltiples señales de división al núcleo. La acción del RAS activado también aumenta el efecto de las proteínas activadoras GAP. Las proteínas RAS puntualmente mutadas pueden unirse a GAP y quedar atrapadas en estado activo haciendo que la célula continúe proliferando (imagen 50).



50

ABL: el proto-oncogen ABL tiene actividad tirosina-quinasa suave por dominios reguladores negativos. Cuando el gen ABL ha tenido una translocación desde el cromosoma 9 al 22, como es el caso de la Leucemia mielocítica crónica, se produce fusión BCR-ABL. El gen híbrido tiene potente actividad Tirosina-Quinasa activando las vías mitóticas RAS-RAF. La importancia de estos eventos ha sido demostrada por el éxito de la terapia anti ABL quinasa llamado ST1571 (Glivec). Otro hecho importante es que el ABL tiene una función nuclear semejante al TP53. Al producirse la mutación, el ABL se queda secuestrado en el citoplasma y pierde su capacidad apoptótica. Este evento también se corrige con la terapia anti ABL.

MYC: El proto-oncogen MYC se encuentra en casi todas las células y la proteína MYC aparece al momento que la célula recibe una señal de división. La proteína MYC se une al ADN activando la transcripción de varios genes del crecimiento dependientes de la ciclina CDK. En células normales, el MYC disminuye a valores basales cuando se inicia el ciclo celular. La forma oncogénica del MYC muestra una expresión persistente o una sobre expresión que contribuye a mantener la proliferación celular. En el linfoma de Burkitt se ve una translocación t(8;14) que altera la regulación del MYC. En el cáncer de mama, colon y pulmón se encuentra una amplificación del MYC (imagen 51).



51

CICLINAS Y CINASAS

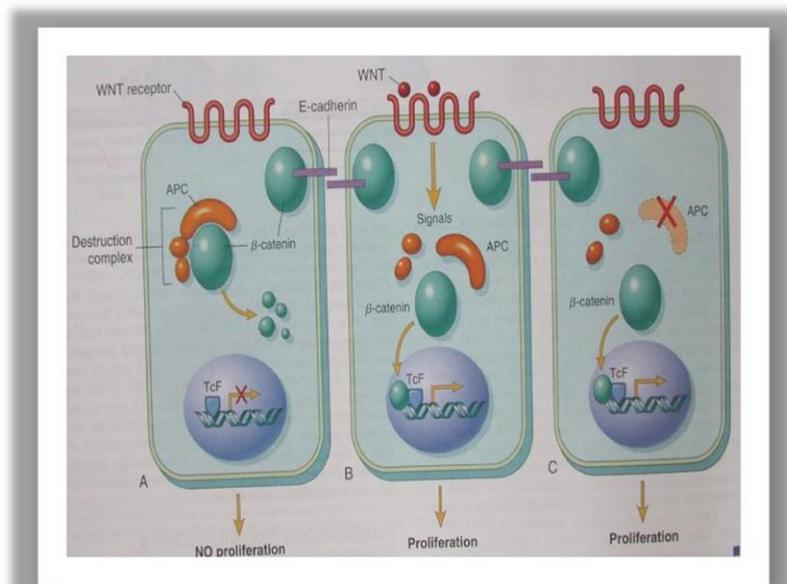
Las células normales tienen una familia de ciclinas dependientes de Quinasas (CDK) que actúan como cascadas regulando el ciclo celular en forma positiva o negativa. Una familia inhibidora es la formada por el p21, p27 y p57. Mutaciones que alteran la regulación de las ciclinas y las CDK favorecen la proliferación celular como es lo habitual con la ciclina D en la transformación neoplásica. Cánceres de la mama, hígado, linfomas, esófago e hígado tienen expresión aumentada de los genes ciclina D. Glioblastomas, melanomas y sarcomas muestran amplificaciones del gen CDK4 (imágenes 52 y 53).

FACTOR TRANSFORMADOR DEL CRECIMIENTO BETA (TGF-B)

Miembro de una familia de factores de crecimiento. En la mayoría de las células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas normales actúa como un gran inhibidor de la proliferación mediado por tres receptores. Ejerce su acción regulando las vías RB a través de ciclinas A, D y E. Detiene el ciclo celular en G1. En varios cánceres la mutación de TGF-B altera la inhibición del ciclo celular. La mayoría de los cánceres de páncreas y del colon muestran mutaciones en al menos un componente de esta vía.

VIA APC-CATENINA BETA

Ejerce funciones antiproliferativas en forma inusual. El producto del gen APC es una proteína citoplasmática que regula las funciones intracelulares de la Catenina Beta que tiene funciones múltiples. Por un lado se une a la Cadherina E involucrada en la adhesión celular. Por otro puede pasar al núcleo y activa la proliferación celular. La Catenina Beta es un componente importante en la vía de señalización WTN. Este factor desencadena proliferación celular transmitiendo señales que evitan la degradación de la Catenina Beta, así esta proteína pasa al núcleo y activa la transcripción. En las células en reposo no expuestas al estímulo WTN, la catenina B se degrada vía APC. Al perderse el APC en las células malignas, la catenina beta no se degrada y la señalización WTN se mantiene abierta en forma permanente (imagen 56).



56

La pérdida del APC es habitual en cáncer colorectal. Las personas que nacen con un alelo mutante hacen poliposis adenomatosa del colon a edades muy tempranas y varios de estos adenomas se malignizan. Como pasa con otros genes supresores, es necesario que ambos genes se encuentren mutados dando origen a adenomas. El carcinoma aparecerá con mutaciones adicionales.

Gen TP53 (p53)

Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y su producto proteico está presente en prácticamente todos los tejidos normales. Su vida media es muy corta por eso no se

evidencia en los cortes de tejidos normales. Está implicado en la proliferación y diferenciación celular, reparación y síntesis del DNA y en la muerte celular programada. Es un regulador negativo de la división celular. Frente a un daño del DNA, el TP53 nativo actúa deteniendo el ciclo en fase G1 y dando tiempo para que el DNA se repare antes de entrar en fase S. Es un guardián del genoma restringiendo la proliferación celular descontrolada donde una anomalía del DNA pudiera propagarse. La pérdida de este punto de control podría resultar en replicación de DNA dañado, generar inestabilidad genómica, fijación de las mutaciones a las células en división y entrar en un camino unidireccional de transformación maligna.

El TP53 es reconocido como gen supresor de tumores y cuya delección y/o mutación es oncogénica. La mayor parte de las mutaciones del p53 son de tipo "mutaciones point" Este hecho alarga la vida media de la proteína siendo posible detectarla por inmunohistoquímica, indicando frecuentemente mutación aunque no siempre es así. A veces sólo se trata de una sobre expresión. Para estar seguros de la existencia de una mutación del p53 se debe aplicar técnicas adicionales de biología molecular, las que requieren de mayor infraestructura y son más costosas. La mutación de p53 lleva a una sobreproducción de proteína mutada y a formar complejos con la proteína normal inactivando su función supresora. Es decir el TP53 mutado hace lo contrario de su función normal y se lo encuentra en la mayoría de los cánceres humanos como pulmón, mama y colon. En algunos es considerado un factor pronóstico adverso.

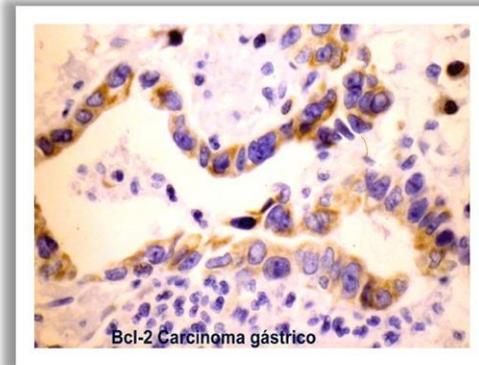
En cuanto a la herencia, en la mayoría de los casos, es necesario que los dos alelos del TP53 adquieran mutaciones desactivadoras en las células somáticas. Con menor frecuencia, algunos heredan un alelo TP53 mutado, lo que predispone a la aparición de tumores malignos, porque solo hace falta un golpe adicional para desactivar el segundo alelo normal, que puede ser dado por virus DNA como HBV,EBV, HPV.

ESCAPE DE LA APOPTOSIS y Bcl-2

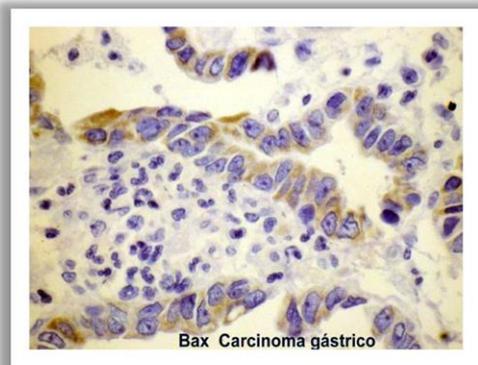
El índice de crecimiento de un tumor es generalmente menor que el esperado al considerar la cinética celular. La apoptosis o muerte celular programada viene en parte a explicar este hecho. Al igual que en las células normales, se han identificado genes que estimulan o inhiben la apoptosis. Las células apoptóticas pueden ser reconocidas bajo el microscopio y también evidenciadas con marcadores monoclonales. El fenómeno de apoptosis es regulado por eventos moleculares. Entre estos se destacan el receptor FAS CD95, la familia de Caspasas, la interacción de la familia Bcl2 / Bax y el citocromo c. El oncogene Bcl-2 inicialmente clonado desde el breakpoint de la translocación t(14:18), es el más estudiado y su acción bloquea la muerte celular apoptótica. Se ha determinado que se trata de una familia de proteínas que incluyen Bax, Bcl-x, Bag, Bak, Bad, Bcl-xl, en que unos promueven la apoptosis y otros frenan este mecanismo. Altos niveles de Bcl-2 favorecen la sobrevivencia celular es decir tiene una acción antiapoptótica. La interacción con el p53 es importante ya que altos niveles de p53 nativo producen aumento del Bax y disminución del Bcl-2 empujando el reostato celular hacia la muerte apoptótica.(imágenes 57, 58, 59 y 60)



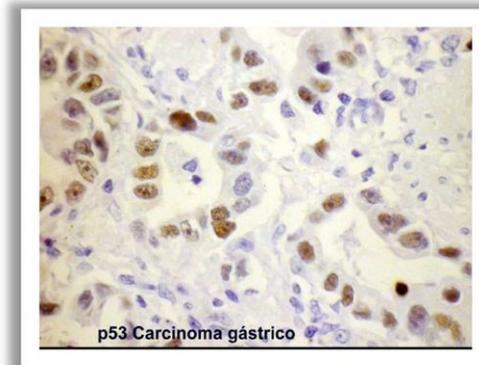
57



58



59



60

MUPLICACION CELULAR ILIMITADA y EROSION DE TELOMEROS

La mayor parte de las células humanas normales pueden duplicarse 60 a 70 veces luego de lo cual pierden su capacidad de dividirse y pasan a un estado de senescencia sin nuevas multiplicaciones. Múltiples mecanismos parecen gatillar el envejecimiento celular. Una de estas vías es el acortamiento de los telómeros. Los telómeros son elementos genéticos localizados en los extremos de los cromosomas. Son replicados por la enzima telomerasa, que se encuentra activa en las células germinales y pluripotenciales normales y está reprimida en la mayoría de los tejidos somáticos. Cuando la célula se divide, una parte pequeña del telómero no es copiada, por lo tanto, los telómeros se acortan progresivamente con las divisiones celulares. De alguna forma este acortamiento irreversible induce inhibición de la síntesis de DNA y envejecimiento celular. A partir de cierto punto el acortamiento de los telómeros induce aparición de anomalías cromosómicas masivas y muerte celular. Las células tumorales conservan sus telómeros por activación de la telomerasa. La mayoría de los cánceres humanos muestra este mecanismo aunque no es el único observado. Se ha postulado por un lado que la erosión de los telómeros, y por otro las lesiones genómicas espontáneas son detectadas como señales de daño del DNA, lo que activa al p53 nativo, el que frena el crecimiento celular hasta que el daño se repare. Si se produce mutación del p53 se altera este mecanismo de control de la proliferación celular.

En resumen hay una enorme cantidad de factores que intervienen en la histogénesis, invasión y metástasis, lo que hace sostener que se trata de eventos multifactoriales en la permanencia de un tumor maligno.

MEDICION DE LA PROLIFERACION CELULAR

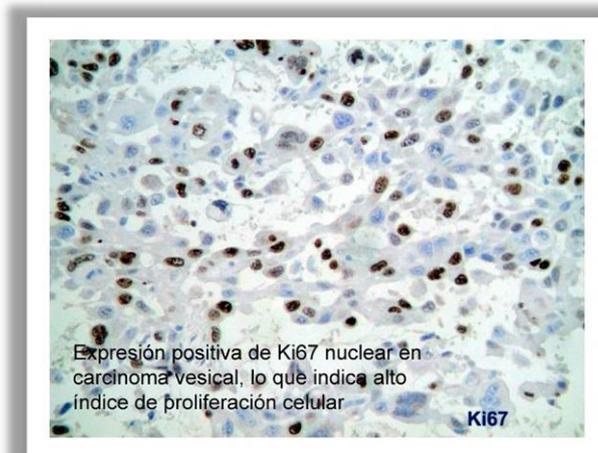
Se ha mencionado que la clasificación de los tumores debe incluir la mayor cantidad de parámetros pronósticos. Se cuenta con el TNM y el grado de diferenciación del tumor. Estos parámetros son muy sólidos y deben ser usados. Sin embargo se hacen necesarios otros parámetros que indiquen el grado biológico de la neoplasia y su comportamiento clínico.

1. Conteo de mitosis. Es una técnica simple y económica pero hay problemas en hacer el conteo mismo. Se debe recordar que la figura mitótica corresponde a una parte pequeña del ciclo celular. La automatización del conteo de mitosis ofrece avances en éste tópico. El número de mitosis por campo mayor sigue siendo de valor pronóstico en varios tumores. Especialmente en leiomiomas y leiomiomas uterinos permite decidir si el tumor en cuestión es benigno o maligno

2. Detección celular en metafase. Requiere exposición in vitro a la Vincristina con cultivo in vitro de las células tumorales. Al detener la célula en metafase se logran algunas ventajas para la evaluación del ciclo pero el método es complicado y caro.

3. Incorporación de nucleótidos al DNA. Se usa timidina tritiada o bromodeoxiuridina u otros. Se puede incorporar estos marcadores in vivo pero algunos los cuestionan por posibles efectos adversos en los pacientes. Se los detecta luego en el tumor con autoradiografía o anticuerpos monoclonales. El análisis es complejo y dependiente de varios parámetros. No es un método de uso habitual.

4. Antígenos asociados a la proliferación celular. Se usa Ki 67, p 105, DNA-DNA polimerasa alfa etc. Indican la activación del ciclo celular y permiten evaluar la fase más larga del ciclo celular y poder así correlacionar la cantidad de células biológicamente activas con el pronóstico. Aparecen muy promisorios para estimar el comportamiento biológico de los tumores. El método es sencillo y de relativo bajo costo. También se puede automatizar el conteo de los núcleos positivos logrando mejores resultados (imagen 61).



61

5. Antígenos de las regiones del organizador nucleolar (Ag NOR). El RNA ribosomal es transcrito desde genes localizados en los brazos cortos de los 5 cromosomas acrocéntricos humanos. Estos genes y sus proteínas forman el AgNOR. Requiere tinción de plata que es delicada y ofrece problemas de interpretación.

6. Citometría de flujo. Se usa en tejidos frescos o en material infiltrado en parafina. Los núcleos son teñidos con colorantes fluorescentes que se unen al DNA en forma estequiométrica. Se

mide el DNA de cada núcleo. La fracción de crecimiento S + G2M permite construir un histograma del DNA. Aparecen dificultades al existir muchas células no tumorales y poblaciones aneuploides. El costo del equipo es alto y la interpretación puede ser variable. La gran contribución es la objetividad y el gran número de núcleos que son medidos en un tiempo muy corto. Sin embargo no ha contribuido como se esperó a separar neoplasias de pronóstico incierto y a predecir con la misma seguridad el comportamiento biológico de los tumores. El estudio de aneuploidía y porcentaje de la fase S comienza a aparecer en algunos protocolos como significativo en el pronóstico.