

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica



**ESTUDIO DE LA HISTORIA NATURAL DE LOS
CARCINOMAS PULMONARES NO MICROCÍTICOS
CON DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA OCULTA**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

María Cebollero Presmanes

Bajo la dirección del Doctor:

Emilio Álvarez Fernández

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2807-3



**ESTUDIO DE LA HISTORIA NATURAL DE LOS
CARCINOMAS PULMONARES NO MICROCÍTICOS CON
DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA OCULTA**

Autor: María Cebollero Presmanes

Director: Prof. Dr. Emilio Álvarez Fernández

**Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina**

**Hospital General Universitario "Gregorio Marañón"
Departamento de Anatomía Patológica**



INFORME DEL DIRECTOR DEL TRABAJO.

DON EMILIO ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y LABORATORIOS DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN,

CERTIFICA: Que Doña MARÍA CEBOLLERO PRESMANES ha realizado en este departamento y bajo mi dirección el trabajo “ESTUDIO DE LA HISTORIA NATURAL DE LOS CARCINOMAS PULMONARES NO MICROCÍTICOS CON DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA OCULTA”.

Considero que dicho trabajo presenta una hipótesis razonable, con un apoyo bibliográfico adecuado. El método utilizado es correcto y los hallazgos justifican suficientemente las conclusiones. Por todo ello considero que reúne las condiciones necesarias para su lectura y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste firmo el presente en Madrid, a 1 de mayo de 2004.

Fdo.: _____
(fecha y firma)

INFORME DEL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO.

DR. D. JULIAN SANZ ESPONERA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMO: Que una vez examinado el trabajo presentado por Doña MARIA CEBOLLERO PRESMANES, titulado “ESTUDIO DE LA HISTORIA NATURAL DE LOS CARCINOMAS PULMONARES NO MICROCÍTICOS CON DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA OCULTA”, dirigido por el Prof. Dr. D. Emilio Álvarez Fernández, este departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en publico con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo de Departamento

El director del Departamento

Fdo _____
(fecha y firma)

A mi familia

A Jesús

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar en estas líneas el profundo reconocimiento y gratitud que siento hacia todas las personas que han hecho posible este trabajo.

Al Prof. Dr. Emilio Álvarez Fernández, Director de esta Tesis, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica y Laboratorios del hospital “Gregorio Marañón” y profesor titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por ofrecerme la posibilidad de realizar esta tesis y mantener siempre una firme dedicación como director de la misma, así como por compartir conmigo su forma de entender la práctica de nuestra especialidad. Sin su constante supervisión y su permanente impulso habría sido imposible llevar a cabo este trabajo.

Esta tesis fue en su mayor parte elaborada durante mi formación como médico interno residente en el Servicio de Anatomía Patológica del hospital “Gregorio Marañón”. Por ello, quisiera expresar mi agradecimiento sincero a todos los miembros de este departamento, especialmente a todos y cada uno de los médicos especialistas y a mis compañeros residentes, por su apoyo y todas las experiencias adquiridas junto a ellos, sin olvidarme de los técnicos de laboratorio, sobre todo a José Manuel, Julio y Marisa, por su paciencia.

A los médicos especialistas y residentes del servicio de Cirugía Torácica del hospital, especialmente a los Dres. Federico González Aragonese y Nicolás Moreno, por toda la información clínica y estadística que me han ofrecido.

Finalmente, quisiera agradecer a mis padres, a mi abuela, a mi hermano y a Paloma, Jesús, Nurieta, etc, etc, su apoyo y cariño incondicionales. ¡Que no se me olvide!: gracias Nora por ese repaso final.

GLOSARIO

- ABC. Complejo Avidina-Biotina
- ADN. Acido desoxirribonucléico
- ARN. Acido ribonucléico
- APUD. Amine precursor uptake and decarboxylating
- ATP. Adenosin trifosfato
- B-SA. Sistema Biotina-Streptavidina amplificado
- CEA. Antígeno carcinoembrionario
- Cr-A. Cromogranina A
- DAB. Diaminobencidina
- EMA. Antígeno epitelial de membrana
- IC. Intervalo de confianza
- IHQ. Inmunohistoquímica
- NE. Neuroendocrino
- NEB. Neuroepithelial body
- NSE- ENS. Enolasa neural específica
- OMS. Organización mundial de la salud
- OR. Odds ratio
- PAP. Peroxidasa-antiperoxidasa
- PCR. Polymerase chain reaction
- PM. Peso molecular
- PNEC. Solitary pulmonary neuroendocrine cell
- QT. Quimioterapia
- RMN-RNM. Resonancia magnética nuclear
- RR. Riesgo relativo
- RT. Radioterapia
- SF. Sinaptofisina
- TAC. Tomografía axial computerizada

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

1. Relación entre subtipo histológico de carcinoma pulmonar y hábito tabáquico.....	4
2. Alteraciones moleculares más frecuentes en carcinomas pulmonares microcíticos y no microcíticos.....	10
3. Rasgos histológicos característicos de los carcinomas microcíticos y los carcinomas NE de célula grande.....	22
4. Valor de T, N y M en la clasificación TNM.....	40
5. Clasificación TNM	41
6. Relación de anticuerpos IHQ utilizados en el presente estudio.....	46
7. Valoración de la intensidad de la positividad	49
8. Valoración del porcentaje de positividad.....	49
9. Distribución de los casos de la serie por estadíos.....	55
10. Distribución de la serie por tipo histológico.....	56
11. Positividad global por marcadores.....	59
12. Promedio de porcentajes de positividad global por marcadores.....	59
13. Distribución de la serie por estadíos	60
14. Tumores que expresan o pierden la expresión de grupo por tipo histológico	63
15. Extensión e intensidad de la positividad por tipo histológico y grado de diferenciación.....	65

16. Expresión de gránulos con microscopía electrónica.....	69
17. Sensibilidad y especificidad de la IHQ frente a la microscopía electrónica.....	71
18. Distribución por sexo. Estadío I	72
19. Distribución por tipo histológico. Estadío I.....	72
20. Distribución por estadíos	73
21. Distribución de las muertes por causa tumoral	73
22. Distribución del estadío clínico en función de la supervivencia	74
23. Positividad para SF	74
24. Positividad para Cr-A	75
25. Positividad para Leu-7	75
26. Distribución de la expresión de grupo A en los pacientes en estadío I	76
27. Distribución de la expresión de grupo A en los tumores.....	76
28. Expresión de SF por tipo histológico.....	77
29. Expresión de Cr-A por tipo histológico.....	77
30. Expresión de Leu-7 por tipo histológico.....	78
31. Pérdida de expresión de grupo A.....	78
32. Recidiva vs. estadío	79
33. Recidiva vs. tipo histológico.....	80
34. Recidiva vs. expresión de SF.....	80
35. Recidiva vs. expresión de Cr-A	82
36. Recidiva vs. expresión de Leu-7.....	82

37. Recidiva vs. expresión de grupo sanguíneo A.....	83
38. Análisis multivariante	87
39. Relación entre SF y expresión de grupo sanguíneo A.....	88
40. Relación entre tamaño tumoral y expresión de SF	89
41. Relación entre tamaño tumoral y expresión de SF	89
42. Relación entre tamaño tumoral y expresión de grupo A	90
43. Relación entre tamaño tumoral y expresión de grupo A	90

FIGURAS

1. Expresión de marcadores NE según tipo histológico	64
2. Supervivencia por tipo histológico	92
3. Supervivencia en función del estadio	93
4. Supervivencia en función de la expresión de SF	94
5. Supervivencia en función de la pérdida de expresión de grupo sanguíneo A ...	95

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
GLOSARIO.....	III
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	V
ÍNDICE.....	IX

INTRODUCCIÓN_Y REVISIÓN HISTÓRICA.....	1
---	----------

I. Datos generales.....	2
1) Incidencia y mortalidad.....	2
2) Etiología y patogénesis.....	3
3) Tipos histológicos.....	4
II. Alteraciones moleculares en el cáncer de pulmón.....	6
III. Factores pronósticos en el carcinoma de pulmón.....	10
IV. Células neuroendocrinas del sistema respiratorio.....	13
1) Células neuroendocrinas en el pulmón normal.....	13
2) Origen embriológico de las células neuroendocrinas pulmonares.....	15
3) Hiperplasia de células neuroendocrinas pulmonares.....	16
V. Tumores neuroendocrinos de pulmón.....	17
1) Origen de los tumores neuroendocrinos de pulmón.....	17
2) Clasificación de los tumores neuroendocrinos pulmonares.....	18
VI. Pérdida de expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A.....	27
VII. Justificación del presente estudio.....	29

OBJETIVOS.....	31
MATERIAL Y MÉTODOS	34
I. MATERIAL	35
1. Sujetos de estudio.....	35
2. Muestras	36
II. MÉTODOS	37
1 Datos clínicos	37
2 Factores morfológicos.....	37
3 Estadío tumoral.....	39
4 Procesamiento de las muestras	41
5 Comparación de las ventajas y desventajas de los anticuerpos monoclonales y policlonales	46
6 Condiciones técnicas ideales	47
7 Valoración de las técnicas	49
8 Artefactos más frecuentes que pueden dar lugar a error en la interpretación de las técnicas.....	49
9 Técnicas ultraestructurales.....	50
10 Análisis estadístico	52

RESULTADOS	54
1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA TOTALIDAD DE LA SERIE	55
1.1. Datos clínicos	55
1.1.1. Sexo	55
1.1.2. Edad	55
1.2. Distribución por estadíos.....	55
1.3. Factores morfológicos.....	56
1.4. Factores inmunohistoquímicos	57
1.4.1. Marcadores neuroendocrinos	57
1.4.2. Positividad según marcador	57
1.4.3. Expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A.....	59
1.5. Positividad por tipo histológico	63
1.6. Extensión e intensidad de la positividad por tipo histológico	64
1.7. Factores ultraestructurales	68
2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE DE TUMORES EN ESTADÍOS PRECOCES (Ia Y Ib).....	72
2.1. Distribución por sexo	72
2.2. Distribución por tipo histológico	72
2.3. Distribución por estadio	73
2.4. Distribución de las muertes por causa tumoral.....	73
2.5. Distribución del estado clínico en función de la supervivencia.....	74

2.6.	Distribución del porcentaje de positividad de los distintos marcadores neuroendocrinos.....	74
2.6.1.	Distribución de la positividad para Sinaptofisina	74
2.6.2.	Distribución de la positividad para Cromogranina-A.....	75
2.6.3.	Distribución de la positividad para Leu-7.....	75
2.7.	Distribución de la expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A por parte de los pacientes (porcentaje de pacientes A+).....	76
2.8.	Distribución de la expresión de antígeno de grupo sanguíneo por parte de los tumores	76
2.9.	Tablas de contingencia.....	77
2.9.1.	Expresión de sinaptofisina en función del tipo histológico	77
2.9.2.	Expresión de cromogranina en función del tipo histológico	77
2.9.3.	Expresión de Leu-7 en función del tipo histológico	78
2.9.4.	Pérdida de expresión de grupo sanguíneo.....	78
3.	ANÁLISIS COMPARATIVO. TABLAS DE CONTINGENCIA.....	79
3.1.	Recidiva vs. Estadio	79
3.2.	Recidiva vs. tipo histológico	80
3.3.	Recidiva vs. expresión de marcadores neuroendocrinos	80
3.3.1.	Recidiva vs. expresión de Sinaptofisina	80
3.3.2.	Recidiva vs. expresión de Cromogranina-A	82
3.3.3.	Recidiva vs. expresión de Leu-7.....	82

3.4. Recidiva vs. pérdida de expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A	83
4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA. ESTADÍOS PRECOCES.....	84
4.1. Análisis univariante.....	84
4.1.1. Supervivencia global de la serie	84
4.1.2. Supervivencia en función del estadio.....	85
4.1.3. Supervivencia en función de la histología adenocarcinoma vs. epidermoide	85
4.1.4. Supervivencia en función de la expresión de marcadores neuroendocrinos.....	85
4.1.5. Supervivencia en función de la pérdida de expresión de histoantígeno de grupo A.....	86
4.2. Análisis multivariante.....	87
5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEUROENDOCRINOS, PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO A Y TAMAÑO TUMORAL	88
CURVAS DE SUPERVIVENCIA.....	91

DISCUSIÓN	96
1. Análisis de las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas.....	97
2. El valor de la realización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de rasgos neuroendocrinos en carcinomas pulmonares no microcíticos.....	107
3. Papel de la microscopia electrónica en la valoración de los carcinomas pulmonares. Heterogeneidad ultraestructural de estos tumores	111
4. Sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica frente a la microscopia electrónica para la detección de rasgos neuroendocrinos en carcinomas pulmonares no microcíticos	118
5. Incidencia y significado pronostico de la diferenciación neuroendocrina en el carcinoma pulmonar no microcítico	126
6. Marcadores inmunohistoquímicos más sensibles y específicos	134
7. Diferencias de expresión de marcadores NE según subtipo histológico.....	144
8. La diferenciación NE como factor pronóstico independiente.....	147
9. La diferenciación NE como factor predictivo de la respuesta a la quimioterapia	153
10. Significado pronóstico de la diferenciación neuroendocrina según el estadio tumoral	157
11. Otros factores de posible influencia en el pronóstico de los tumores no microcíticos: la pérdida de expresión de antígeno de grupo sanguíneo A.....	161

12. Diferenciación neuroendocrina y pérdida de expresión de antígeno de grupo sanguíneo A en carcinomas pulmonares no microcíticos. Comparación entre series publicadas.....	170
CONCLUSIONES	175
ICONOGRAFÍA	178
BIBLIOGRAFÍA	191

INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN HISTÓRICA

I. DATOS GENERALES

1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD

El cáncer de pulmón constituye uno de los mayores problemas de salud en el mundo. Según las estadísticas más recientes de los Estados Unidos, es la causa más frecuente de mortalidad por cáncer (28% de todas las muertes por cáncer cada año), tanto en hombres como en mujeres.

La incidencia del cáncer de pulmón mantiene una curva ascendente, si bien en los últimos años ha disminuido ligeramente. De modo global, en la población mundial se observa actualmente un incremento por año del 0,5%, con mayores frecuencias en las áreas urbanas con respecto a las rurales y de dos a seis veces más en varones que en mujeres (40).

En la Unión Europea se diagnostican anualmente más de 150.000 casos nuevos, que suponen el 20,7% de todos los tipos de cáncer en varones y el 5,6% en mujeres. En relación con la población europea, uno de cada 10-15 varones y una de cada 80 mujeres desarrollan cáncer de pulmón (40).

A pesar de los avances en las nuevas estrategias terapéuticas (introducción de las técnicas de anestesia actuales en la década de los 50) y diagnósticas, los porcentajes de supervivencia totales en estos pacientes oscilan entre el 10 y el 15%, sin diferencias importantes en los últimos años. Las tasas de mortalidad en Estados Unidos por 100.000 habitantes ajustadas a la población mundial se encuentran alrededor del 53,2 para los hombres y del 27,2 para las mujeres. En los

demás países del mundo las tasas son muy variables. En España, las tasas en el año 1997 eran del 58,6 para varones y del 6,4 para mujeres (96).

El pronóstico del cáncer de pulmón está directamente relacionado con el estadio en el momento del diagnóstico. Se han establecido una serie de pruebas de detección selectiva en individuos de alto riesgo (varones de más de 45 años que fuman 40 cigarrillos o más al día), que consisten en citología de esputo y radiografía de tórax cada 4 meses. El cáncer se detecta el 72% de las veces sólo con radiografía de tórax, el 20% sólo con citología y el 6% con ambos métodos. En contraste con los individuos no sometidos a estas técnicas de detección, el 90% de los pacientes seguidos de esta forma y que presenta cáncer son asintomáticos, el 62% tiene tumores resecables y el 53% corresponden a estadio I después de la cirugía. Sin embargo, en estudios prospectivos aleatorios y multiinstitucionales no se han demostrado diferencias entre la supervivencia de los sometidos a estas pruebas y la de los que no lo fueron. Esto se debe a la presencia de metástasis clínicamente silentes no detectadas en la mayoría de los enfermos, incluso cuando los tumores son detectados en estadios muy precoces. Por esta razón, las técnicas de detección precoz del cáncer de pulmón han fracasado y se ha abandonado su utilización (46).

2. ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS.

El consumo de tabaco es la principal causa relacionada con el desarrollo de los carcinomas pulmonares, existiendo además un incremento del riesgo dosis-dependiente para cualquier tipo histológico de carcinoma (40). Se aprecian sin

embargo variaciones en cuanto al subtipo histológico entre fumadores y no fumadores, siendo el carcinoma epidermoide y el microcítico los que muestran mayor asociación con el consumo de tabaco, como se resume en la siguiente tabla, modificada de Greenlee (40):

Subtipo histológico	Fumadores (%)	No fumadores (%)
Carcinoma epidermoide	98	2
Adenocarcinoma	81,6	18,4
Carcinoma bronquioloalveolar	70,6	29,4
Carcinoma microcítico	98,9	1,1
Carcinoma celula grande	93,3	6,7

Tabla 1. Relación entre tipo histológico y hábito tabáquico

La asbestosis también se considera responsable de al menos entre 4000 y 6000 muertes al año por carcinoma pulmonar, menos del 5% de todas las muertes por esta causa (40). También existe relación dosis-dependiente, pero no con el subtipo histológico.

Otras causas que también se han relacionado con el carcinoma pulmonar son: exposición a radiaciones ionizantes, dieta, nitrosaminas, cicatrices pulmonares, displasia epitelial alveolar, carcinomas broncogénicos previos...

3. TIPOS HISTOLÓGICOS.

Desde el punto de vista terapéutico el carcinoma de pulmón se clasifica en dos grandes grupos: carcinoma microcítico y carcinoma no microcítico. Este último grupo incluye desde la clasificación de la OMS de 1999 (112) a tres tipos

morfológicos: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes, que suponen el 75-80% de todos los tumores malignos de pulmón. Además hay que mencionar las variantes (rabdoide, etc) y los tumores no epiteliales, que no se van a incluir en nuestro estudio.

Existen diferencias en la incidencia de cada tipo histológico. El adenocarcinoma se describe con más frecuencia en las mujeres y en grupos de edades más jóvenes. El epidermoide es más frecuente en varones y en edades avanzadas. Asimismo, se describen variaciones geográficas, teniendo mayor prevalencia las regiones industrializadas (EEUU y Europa) (40).

El carcinoma de células grandes es un tipo de tumor indiferenciado que no presenta características diferenciales en microscopía óptica de carcinoma escamoso ni de adenocarcinoma. Es el de menor incidencia y su frecuencia ha ido disminuyendo en la medida en que las técnicas de estudio histopatológico complementarias (microscopía electrónica, inmunohistoquímica, etc) han permitido que tumores inicialmente incluidos en este grupo fueran clasificados posteriormente como adenocarcinomas o carcinomas epidermoides pobremente diferenciados, sobre todo cuando el muestreo de los mismos es lo suficientemente extenso.

Como en otras neoplasias epiteliales, se piensa que el cáncer de pulmón surge a partir de o asociado a una serie de lesiones preneoplásicas del epitelio bronquial. Hasta la nueva clasificación de la OMS sólo se consideraban cambios histológicos preneoplásicos para el carcinoma escamoso, y comprendían: la hiperplasia, la metaplasia escamosa, la displasia y el carcinoma in situ. Con frecuencia estas lesiones son extensas y multifocales, como consecuencia del

fenómeno de “cancerización de campo”. En la última clasificación de la OMS se incluyen además como lesiones preneoplásicas la hiperplasia adenomatosa atípica alveolar para el adenocarcinoma y la hiperplasia idiopática difusa de células neuroendocrinas para los tumores neuroendocrinos (**104, 112**).

Respecto al comportamiento clínico, los adenocarcinomas muestran generalmente mayor agresividad, con mayor índice de recidivas y con estadíos más altos en el momento del diagnóstico respecto a los epidermoides. La supervivencia es, sin embargo, similar en ambos tipos.

Estos aspectos (diferencias en la población afectada y en el comportamiento clínico, lesiones preneoplásicas diferentes y distinta morfología) llevan a pensar que, aunque estén agrupados por su mejor comportamiento y diferente respuesta a los tratamientos con respecto al carcinoma microcítico, cada uno de estos dos tipos histológicos puede tener mecanismos patogénicos diferentes.

II. ALTERACIONES MOLECULARES EN EL CÁNCER DE PULMÓN

Como en muchos otros tipos de tumores, el amplio desarrollo de la tecnología molecular ha permitido identificar múltiples alteraciones genéticas en el carcinoma de pulmón, en un intento de comprender mejor y caracterizar su patogenia. Estos hallazgos pueden ser útiles para la aplicación de métodos de

diagnóstico precoz en un futuro inmediato, nuevas estrategias de prevención y nuevas terapias basadas en la restitución de estas lesiones genéticas.

Algunos autores han intentado establecer un modelo de carcinogénesis en el carcinoma de pulmón. Sin embargo, aún no está claro el papel que estas alteraciones genéticas pueden desempeñar en los mecanismos de inducción y de progresión tumoral (104). La existencia de tumores con morfología combinada sugiere que todos los tipos histológicos de cáncer de pulmón pueden originarse a partir de una misma célula madre (54). Sin embargo, el comportamiento diferente de cada subtipo obliga a estudiar más a fondo otros factores que ayuden a disminuir en lo posible su incidencia y mortalidad.

Otros autores (4) sugieren que el cáncer se puede considerar como una enfermedad del ciclo celular, cuyo defecto puede ser en unos casos el factor inicial que predisponga a la malignización de la célula, mientras que en otros actuaría como factor contribuyente de la progresión tumoral en estadios más avanzados. Los genes implicados en la génesis de los carcinomas epidermoides y los adenocarcinomas corresponden tanto a oncogenes como a genes supresores que regulan, de modo directo o indirecto, el ciclo celular.

En cuanto a los genes supresores, para que favorezcan el desarrollo tumoral es necesario que las proteínas codificadas por ellos no sean funcionales, lo que supone que se alteren los dos alelos o bien que la mutación de uno de los alelos codifique una proteína que inactive la proteína del alelo normal. La detección de alteraciones en los genes supresores es más frecuente de lo que cabría esperar si la alteración de ambos alelos se debiera a mutaciones. Este hecho se explica por la presencia de un importante mecanismo genético: la pérdida de

heterocigosidad (pérdidas anormales de material genético en las células tumorales que dan lugar a la pérdida de una de las dos bandas de productos de la PCR, o cambio en las intensidades relativas de ambos alelos comparadas por PCR con respecto al tejido normal). En el carcinoma de pulmón, las deleciones y las pérdidas de heterocigosidad se producen con mayor frecuencia en el brazo corto del cromosoma 3. Se han encontrado 5 regiones delecionadas: tres en 3p21, una en 3p12-13 y otra en 3p14.2 (102). A pesar de haber estudiado de modo extenso la región 3p21.3 en busca de posibles genes supresores tumorales, no se han identificado todavía. Otros candidatos posibles a genes supresores localizados en 3p son el protooncogen c-RAF-1, el gen receptor del ácido retinoico y el gen de la fosfatasa-gamma de la tirosina (PTP-gamma) (102).

En lo que a oncogenes se refiere, en general codifican proteínas relacionadas con el crecimiento celular y su control: factores de crecimiento y sus receptores, transductores de señales citoplasmáticas, factores de transcripción, proteínas reguladoras del ciclo celular, etc. Son imprescindibles para el crecimiento, proliferación y supervivencia de las células no tumorales. Cuando uno de los alelos de estos genes se altera, como consecuencia de una mutación u otros mecanismos, se altera la vía metabólica en la que participan y se descontrola la regulación de los mecanismos normales de proliferación. El oncogen hiperfuncionante permite que la célula entre en un estado de continua estimulación, dando lugar a una proliferación clonal tumoral independiente de los factores de regulación.

En el carcinoma de pulmón se han detectado alteraciones en la familia de los proto-oncogenes MYC (c-MYC, N-MYC y L-MYC), que codifican una serie

de proteínas que intervienen en la replicación del ADN. Las alteraciones en N-MYC y L-MYC se describen en el carcinoma microcítico. El mecanismo de alteración del c-MYC es por amplificación del gen o por disminución de la regulación de la transcripción, dando lugar a sobreexpresión protéica. Según algunos autores, esto va asociado a mayor agresividad y peor pronóstico, si bien se observa con más frecuencia en tumores de pacientes que ya han sido tratados y en cultivos celulares obtenidos a partir de metástasis que en tumores primarios no tratados, lo que sugiere que se trata de un factor pronóstico tardío, que influye en el peor comportamiento de las metástasis y recidivas tumorales (56).

Otros oncogenes relacionados con el cáncer de pulmón son el BCL-2 (localizado en 18q21), relacionado con la inhibición de la apoptosis, que se encuentra sobreexpresado en carcinomas no microcíticos entre el 10 y el 46% de los casos; la ciclina-D1 (localizada en 11q13), implicada en la regulación del ciclo celular en el punto de restricción G1; y el C-MOS (localizado en 8q11-12), un inhibidor de la vía de las proteín-quinasa activadoras de mitógenos. Sin embargo, ninguno de estos oncogenes ha sido claramente relacionado con factores pronósticos o de supervivencia.

En la siguiente tabla se resumen las principales alteraciones genéticas descritas en el cáncer de pulmón.

Tipo de alteración	Microcítico	No microcítico
Mutaciones en RAS	<1%	15-30%
Amplificación de MYC	15-30%	80%
Sobreexpresión bcl-2	75-95%	10-35%
Mutación p53	75-100%	50%
Expresión anormal p53	40-70%	40-60%
Baja o ausente expresión de Rb	>90%	15-30%
Mutación p16	<1%	10-40%
Ausencia expresión p16	0-10%	30-70%
Pérdida heterocigosidad 3p	90-100%	90%
Perdida heterocigosidad 4p/q	50-80%	20-30%
Actividad telomerasa	100%	80-85%
Inestabilidad microsatelites	35%	22%
Sobreexpresión HER 2- neu	<1%	35%

Tabla 2. Alteraciones moleculares más frecuentes en carcinomas pulmonares

III. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA DE PULMÓN

La clasificación de los carcinomas pulmonares está basada en la detección morfológica o inmunohistoquímica de diferenciación escamosa, glandular o neuroendocrina. Cuando se definen de esta forma, se observan grandes diferencias en el comportamiento clínico de los distintos subtipos, sobre todo entre carcinomas microcíticos y no microcíticos. Sin embargo, dentro de cada subtipo histológico también podemos apreciar comportamientos muy variables.

En el carcinoma de pulmón no microcítico el estadio y los parámetros que lo definen (tamaño tumoral T, afectación ganglionar N y metástasis a distancia M)

son el factor pronóstico de mayor importancia. En los últimos años, sin embargo, diferentes estudios han demostrado diferencias en la supervivencia dentro de cada estadio, lo que ha conducido a la búsqueda de parámetros independientes del estadio que puedan influir en la evolución de estos tumores.

Dentro de estos parámetros se encuentran las alteraciones moleculares y las diferentes vías que contribuyen a la iniciación y progresión tumoral, así como los clásicos parámetros clinicomorfológicos. Entre estos últimos se encuentra la diferenciación neuroendocrina oculta y la pérdida de expresión de antígenos de grupo sanguíneo, en los que se va a centrar el presente estudio (**12, 16, 18, 21, 36, 37, 38, 39, 103, 109**).

Algunos autores (**58, 92, 64, 62**) han propuesto la hipótesis de que la alteración de los mecanismos de adhesión de las células producida por patrones o niveles anormales de expresión de moléculas de adhesión (NCAM) puede jugar un papel importante en la invasión y en el potencial metastásico de estos tumores.

Las moléculas de adhesión juegan un papel importante en la embriogénesis de algunos tumores, especialmente en aquellos de origen neuroectodérmico. Existen varias isoformas descritas de NCAM, algunas de las cuales (forma HIGHLY SIALYLATED) están implicadas en la migración de células embrionarias desde la cresta neural y son expresadas por algunos tumores de alta agresividad, entre los cuales destaca el carcinoma microcítico pulmonar (**62**). También se ha observado su expresión por parte de otro tipo de tumores, entre ellos los carcinomas pulmonares no microcíticos. Sin embargo, existe controversia en la literatura sobre el papel de la expresión de este marcador y también en cuanto a su pronóstico.

Así, Kibbelaar (58), emplea el anticuerpo monoclonal 123C3, que reconoce un polipéptido de la molécula NCAM. Según este autor, este monoclonal es fuertemente expresado en todos los tumores de naturaleza neuroendocrina y hasta en un 20% de los carcinomas pulmonares no microcíticos. Cuando relaciona la expresión de este anticuerpo con la supervivencia global y con la supervivencia libre de enfermedad, observa reducción de ambas en tumores positivos.

Sin embargo, Lantuejuol et al (64) no encuentran expresión de NCAM en carcinomas pulmonares no microcíticos y sí en tumores neuroendocrinos. Observan mayor expresión en tumores neuroendocrinos peor diferenciados y de comportamiento clínico más agresivo, de lo que puede derivar la menor supervivencia publicada por Kibeelaar.

Algo parecido publica Kwa (62), que no encuentra relación entre la expresión de NCAM y la supervivencia postoperatoria.

Por último, Pujol et al (92), emplean los monoclonales MOC-1 y S-L 11.14, y encuentran relación entre la expresión de NCAM y estadio nodal, pero también observa mayor expresión en tumores de menor grado de diferenciación.

Por lo tanto, la expresión de NCAM es muy variable por parte de carcinomas pulmonares no microcíticos, no está todavía bien estudiada su sensibilidad y especificidad en cuanto a capacidad de detección de diferenciación neuroendocrina y tampoco está clara su relación con el comportamiento biológico posterior en estos tumores.

IV. CÉLULAS NEUROENDOCRINAS DEL SISTEMA RESPIRATORIO

1. CÉLULAS NEUROENDOCRINAS EN EL PULMÓN NORMAL

El epitelio respiratorio posee células endocrinas con las características bioquímicas de las células del sistema APUD (amine precursor uptake and decarboxylating). Estas células fueron descritas por primera vez en el pulmón en 1949 por Fröelich, que las relacionó con las células claras del epitelio del tracto gastrointestinal.

El sistema neuroendocrino difuso pulmonar está constituido por dos tipos de células neuroendocrinas: 1) células neuroendocrinas aisladas (solitary pulmonary neuroendocrine cell, PNEC) que aparecen dispersas por el epitelio bronquial y bronquiolar, y 2) células neuroendocrinas que aparecen agrupadas en cuerpos neuroepiteliales (NEB). Estos últimos suelen estar formados por un número reducido de células neuroendocrinas (**15, 75, 76, 74**).

Las células neuroendocrinas producen y segregan una serie de péptidos activos, la mayor parte de ellos amidados en su extremo carboxi-terminal (**87, 88, 89**). Algunos ejemplos de estos péptidos son: el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (**33**), el péptido liberador de gastrina (GRP) (**34**), la calcitonina, etc. Estas células también producen y liberan aminas activas como la serotonina (5-HT). La mayor parte de las células neuroendocrinas pulmonares son argirófilas y positivas para técnicas inmunocitoquímicas frente a las hormonas peptídicas citadas y otros marcadores generales para células neuroendocrinas,

como sinaptofisina, criomogranina, enolasa neuronal específica, moléculas de adhesión neuronal (N-CAM), etc (31, 79).

También conocidas como células de Kulchitsky en el aparato respiratorio, se encuentran presentes de forma fisiológica en el epitelio de los bronquios y de los bronquiolos. Son mucho más numerosas en el feto y en el neonato que en el adulto (79). Estudios realizados en pulmones de conejos han demostrado la presencia de estas células en el epitelio de los bronquiolos respiratorios, conductos alveolares y alveolos (31). Las células neuroendocrinas son de morfología cilíndrica, no poseen cilios y se localizan individualmente en las porciones basales del epitelio. Tienen un citoplasma claro o débilmente eosinófilo, núcleo ovoide finamente granular de cromatina homogénea y ocasionalmente un pequeño nucleolo. Ultraestructuralmente se definen por la presencia en su citoplasma de gránulos electron-densos de naturaleza neurosecretora, que poseen un centro más oscuro rodeado de un halo claro y que miden entre 1400 y 1500 Å de diámetro (31). El citoplasma además contiene gránulos de lipofuchina, filamentos gruesos agrupados y microtúbulos. Se observan además expansiones citoplasmáticas a modo de pseudópodos que a veces contienen gránulos neurosecretores y vesículas de pinocitosis. Las células neuroendocrinas no son las únicas que pueden mostrar este aspecto al microscopio electrónico, pero sí son las únicas que además de ello reaccionan con tinciones argirófilas y con marcadores neuroendocrinos inmunohistoquímicos.

Actualmente se cree que estas células, tanto las aisladas como los NEB, ejercen varias funciones (88, 89):

- Juegan un papel importante en el desarrollo y el crecimiento intrauterino y postnatal de los pulmones, y son necesarias en el momento de la iniciación de la respiración en neonatos (33).
- Modulan la proliferación de las células del epitelio pulmonar de manera autocrina/paracrina a través de los péptidos y las aminas que secretan, e intervienen en la regeneración del epitelio bronquiolar tras una lesión aguda (75).
- Actúan como quimiorreceptores de los niveles de oxígeno y dióxido de carbono en el aire. Segregan a la circulación pulmonar moduladores que pueden regular el tono vascular y del músculo liso en las vías aéreas. En este sentido, constituyen el paralelo en el sistema respiratorio de los cuerpos carotídeos en el sistema circulatorio (15).
- Existe relación entre las células neuroendocrinas pulmonares y el sistema inmune, y que algunas de las sustancias segregadas por las células neuroendocrinas son quimiotácticas para macrófagos alveolares, células cebadas, neutrófilos y eosinófilos (75).

2. ORIGEN EMBRIOLÓGICO DE LAS CÉLULAS NEUROENDOCRINAS PULMONARES

Éste ha sido históricamente un apartado controvertido (33). Pearse introdujo el concepto de la presencia de células del sistema APUD en numerosos órganos, con un origen común en la cresta neural (88), basándose en sus características citoquímicas y ultraestructurales y en estudios de su posible migración desde la cresta neural en fetos en distintos estadios del desarrollo (89).

Sin embargo, este posible origen en la cresta neural no está completamente aceptado, ya que estudios posteriores realizados por Fontaine proponen un origen endodérmico para estas células, concretamente intestinal (25). Esta hipótesis está reforzada por la posibilidad diferenciación glandular que aparece en algunos tumores derivados de estas células.

3. HIPERPLASIA DE CÉLULAS NEUROENDOCRINAS PULMONARES

Como ya se ha referido anteriormente, la densidad de células neuroendocrinas en el pulmón fetal es más alta que en la edad adulta, aunque aparentemente el número total de NEB no varía excesivamente desde la etapa postnatal al pulmón adulto. En la edad adulta existen diversas situaciones fisiológicas y patológicas en las que se ha descrito hiperplasia de células neuroendocrinas pulmonares: hipoxia crónica, inflamación, enfisema pulmonar...

La hiperplasia NE pulmonar puede presentar tres patrones diferentes: 1) puede aparecer como un número anormalmente elevado de PNEC dispersas por el epitelio bronquiolar, 2) como una capa celular en la parte basal del epitelio bronquiolar y 3) como una hiperplasia nodular por proliferación de NEB.

Algunos autores consideran que estas células son el origen de los tumores neuroendocrinos pulmonares (33, 34). Las características ultraestructurales anteriormente descritas en teoría podrían demostrarse en cualquier tumor de naturaleza neuroendocrina. Este concepto tiene implicaciones no sólo en cuanto a la histogénesis, sino también en lo que a la clasificación se refiere. Los tumores

pulmonares neuroendocrinos son un grupo independiente dentro de los tumores pulmonares, con un amplio espectro de diferenciación y de comportamiento biológico, desde benignos hasta malignos de alta agresividad.

En la última revisión de la clasificación de carcinomas pulmonares de la OMS, la hiperplasia difusa de células neuroendocrinas está considerada como una lesión preneoplásica relacionada con los tumores neuroendocrinos (112). Es frecuente el hallazgo de focos de hiperplasia NE en la proximidad de carcinoides y tumorlets. Sin embargo, la secuencia de hiperplasia a carcinoide y a carcinoma NE no ha sido demostrada.

V. TUMORES NEUROENDOCRINOS DE PULMÓN

1. ORIGEN DE LOS TUMORES NEUROENDOCRINOS DE PULMÓN.

Hoy día no se conoce cual es el tipo celular que da origen a los carcinomas pulmonares. La detección tardía de la enfermedad y la rápida progresión de los tumores dificulta la identificación de las lesiones precoces que preceden a las lesiones malignas. En el caso de los tumores NE pulmonares, además, hasta ahora no se ha podido encontrar ningún modelo animal en el que se originen y desarrollen este tipo de neoplasias.

Existen dos hipótesis principales acerca del origen de los tumores NE pulmonares (25, 28). La primera de ellas sugiere que todos los tumores los tumores NE tienen un origen celular común. Esta hipótesis se basa en las similitudes que existen entre las células NE normales y los tumores NE. Según esta hipótesis, las células NE normales del sistema respiratorio son las que, tras sufrir hiperplasia, se transforman y dan origen al abanico de los distintos tumores NE. La segunda hipótesis sostiene que los tumores NE de grado bajo-intermedio (carcinoide típico y atípico) y de alto grado (carcinoma NE de célula grande y microcítico) tienen un origen diferente. De acuerdo con este planteamiento, los tumorlets y los carcinoides se originarían a partir de células NE hiperplásicas, mientras que los de alto grado provendrían de células no-NE indiferenciadas, que no adquirirían la diferenciación NE hasta después de transformarse. Existen muchos datos, tanto clínico-patológicos como referidos a la biología, expresión génica y protéica de los tumores, que apoyan esta hipótesis.

2. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES NEUROENDOCRINOS PULMONARES

La clasificación de los tumores neuroendocrinos pulmonares se ha modificado y desarrollado ampliamente en las últimas dos décadas. Durante muchos años sólo se reconocían dos categorías mayores: los carcinoides y los carcinomas microcíticos (5). A pesar de la publicación de artículos que hacían referencia al comportamiento agresivo de algunos carcinoides, no es hasta el año 1972 cuando Arrigoni et al (1) definen los criterios patológicos del carcinoide atípico. Numerosos estudios posteriores lo establecieron como una entidad

clinicopatológica independiente y desde entonces se distinguieron tres categorías de tumores neuroendocrinos: carcinoide, carcinoide atípico y carcinomas microcíticos.

Sin embargo, en años más recientes se comprobó que esta era una clasificación demasiado simple para cubrir la gran variabilidad fenotípica y clínica de estos tumores. En un intento por obtener una clasificación más acorde con la realidad y de mayor utilidad práctica, se propusieron numerosas categorías distintas por diferentes autores: tumor neuroendocrino de células grandes (**43**), carcinoma neuroendocrino de diferenciación intermedia (**114**), y carcinoma no microcítico con rasgos de diferenciación neuroendocrina (**82**). Esta diversidad en la terminología y la ausencia de criterios histopatológicos uniformes ha dificultado la labor de los patólogos a la hora de clasificar los tumores neuroendocrinos más agresivos.

Una revisión de una amplia serie de tumores pulmonares neuroendocrinos realizada por Travis et al en 1991 (**113**) dio como resultado la propuesta de una clasificación de la terminología a usarse en los tumores pulmonares con diferenciación neuroendocrina basada en cuatro categorías, que es la que continúa vigente en la actualidad:

- I. Lesiones neuroendocrinas mínimas.
 - a. Tumorlet
- II. Neoplasias frecuentes con apariencia neuroendocrina en microscopía óptica.
 - a. carcinoide típico
 - b. carcinoide atípico
 - c. carcinoma neuroendocrino de células grandes
 - d. carcinoma microcítico
- III. Carcinoma pulmonar no microcítico con rasgos de diferenciación neuroendocrina (no evidentes en microscopía óptica, pero que se ponen de manifiesto mediante inmunohistoquímica o microscopía electrónica).
- IV. Neoplasias neuroendocrinas primarias infrecuentes.
 - a. neoplasias anficrinas
 - b. blastomas con diferenciación NE focal
 - c. tumores neuroepiteliales primitivos
 - d. paraganglioma pulmonar primario
 - e. carcinoma rabdoide con fenotipo neuroendocrino

Como vemos, pues, la población celular neuroendocrina del pulmón puede mostrar numerosas reacciones patológicas, entre las que destacan la hiperplasia (tumorlet) o los tumores neuroendocrinos. Dentro del grupo de las neoplasias frecuentes con apariencia neuroendocrina en microscopía óptica, Travis et al proponen añadir el carcinoma neuroendocrino de células grandes a los ya

aceptados, para referirse a tumores neuroendocrinos de mayor agresividad que los carcinoides atípicos pero menor que la de los carcinomas microcíticos. Este tumor está caracterizado por: a) apariencia neuroendocrina en microscopía óptica; b) células de gran tamaño, de morfología poligonal, con bajo cociente núcleo-citoplasma, cromatina dispersa y frecuente presencia de nucleolo; c) alta tasa mitótica (>10 mitosis por 10 campos de gran aumento) y frecuente necrosis; y d) rasgos neuroendocrinos demostrables mediante microscopía electrónica o mediante inmunohistoquímica. Por lo tanto, con la aceptación de esta nueva categoría, cuando nos encontremos ante un tumor neuroendocrino de alto grado, el siguiente paso es distinguir si se trata de un carcinoma microcítico o de un carcinoma neuroendocrino de célula grande. Esta distinción no debe realizarse exclusivamente mediante el tamaño de la célula, sino en base a múltiples características morfológicas, que se resumen en la siguiente tabla (modificada de Travis et al, **99**):

Rasgo histológico	Microcítico	Carcinoma NE cel. grande
Tamaño celular	Pequeño	Grande
Relación N:C	alto	bajo
Cromatina	Uniforme, finamente granular	Granular grosera, vesicular. Menos uniforme
Nucleolo	ausente	Frecuente
Moldeamiento nuclear	característico	No característico
Células fusiformes	frecuentes	Infrecuentes
Cit. poligonal amplio	No característico	Característico
Artefacto de aplastamiento	frecuente	Raro
Tinción basófila de estroma y vasos	ocasional	Raro

Tabla 3. Rasgos histológicos característicos de los carcinomas microcíticos y los NE de célula grande

Por último, el carcinoma neuroendocrino de célula grande también debe diferenciarse de los carcinomas no microcíticos con rasgos de diferenciación neuroendocrina, que no tienen características neuroendocrinas mediante microscopía óptica y sí mediante inmunohistoquímica o microscopía electrónica.

El tumor carcinoide clásico es una neoplasia de indudable fenotipo neuroendocrino, que con frecuencia surge en el seno de la población celular neuroendocrina bronquial. Al contrario que en los tumores más frecuentes de pulmón, los factores etiológicos del carcinoide pulmonar no están bien establecidos; no existe asociación estadística con el tabaquismo o con la exposición al asbesto, entre otros. Se caracterizan por un patrón de crecimiento organoide, aunque pueden presentar patrones menores de crecimiento (sólido, fusocelular, glandular, papilar...). Las células tienen tamaño y morfología uniforme, las mitosis son infrecuentes y no suelen presentar áreas de necrosis.

Los carcinomas microcíticos también presentan diferenciación neuroendocrina y suponen aproximadamente el 20% de los tumores pulmonares malignos. Como la mayoría de ellos, ocurren en una población de edad avanzada y están asociados con factores ambientales, sobre todo el consumo de tabaco. Están compuestos por células de pequeño tamaño (la mayoría miden menos que el diámetro nuclear de tres linfocitos maduros), redondeadas o fusiformes, con un elevado cociente núcleo-citoplasma (el citoplasma con frecuencia es invisible), núcleos hipercromáticos de cromatina granular densa sin nucleolo, dispuestas en un patrón difuso, en nidos o en empalizada. Es casi constante la presencia de necrosis tumoral y la actividad mitótica es muy elevada.

Los carcinoides atípicos son muy poco frecuentes y algunos autores aceptan para ellos la denominación de carcinomas neuroendocrinos bien diferenciados. Se considera que tienen un comportamiento biológico intermedio entre los carcinoides típicos y los carcinomas microcíticos. Al igual que el carcinoide típico, el atípico tiene mayoritariamente un patrón de crecimiento organoide, pero puede crecer en forma sólida, pseudoglandular, trabecular u oncocítica pueden observarse focos de necrosis y la actividad mitótica oscila entre 3-4 y 10 mitosis por 10 campos de gran aumento (pero no más de 10 mitosis). La morfología celular es bastante uniforme, si bien no es raro encontrar mayor pleomorfismo nuclear que en los carcinoides típicos. Según los criterios de Arrigoni (1), el carcinoide atípico se define según los siguiente criterios: a) patrón neuroendocrino reconocible con incremento de la actividad mitótica entre 5-10 mitosis por 10 campos de gran aumento; b) pleomorfismo nuclear, hipercromatismo y relación anormal núcleo-citoplasma; c) áreas con incremento

de la celularidad y arquitectura desorganizada; y d) necrosis tumoral. Uno de los criterios más prácticos para distinguir entre carcinoide atípico y carcinoma neuroendocrino de célula grande es el número de mitosis: menos o más de 10 por 10 campos de gran aumento respectivamente (**113**).

El concepto de las neoplasias neuroendocrinas como un espectro de lesiones en el pulmón es útil desde el punto de vista histopatológico, pero probablemente tiene escasa relevancia clínica, ya que no hay evidencia de que estos tumores compartan la misma histogénesis o de que exista progresión de un caso individual desde un punto del espectro hasta el otro.

Un punto de particular importancia en la patología tumoral pulmonar ha sido el descubrimiento de los tumores pulmonares no microcíticos con rasgos de diferenciación neuroendocrina (**2, 6, 26, 57, 84**). La OMS, en 1999, también se refiere a estos tumores “algunos tumores pulmonares que no muestran rasgos morfológicos neuroendocrinos en microscopía óptica, presentan evidencia inmunohistoquímica o ultraestructural de diferenciación neuroendocrina. Esto es demostrable hasta en un 10-20% de carcinomas epidermoides, adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de célula grande. Existe controversia sobre si están asociados a un mejor o peor pronóstico o sobre si tienen mejor o peor respuesta al tratamiento quimioterápico que los que no presentan rasgos neuroendocrinos. Se requieren estudios más completos para definirlos como un grupo independiente”.

Sin embargo, existen problemas a la hora de identificar y definir estos tumores. En primer lugar, no se ha definido el “gold standard” de la diferenciación neuroendocrina. Por un lado está la detección mediante microscopía electrónica de gránulos citoplasmáticos densos de secreción NE. Por

otro, la utilización de algunos anticuerpos inmunohistoquímicos (CrA, SF y Leu-7 entre otros) relacionados con el sistema de neurosecreción. Más adelante se discutirá acerca de los anticuerpos más sensibles y específicos para establecer esta diferenciación: algunos autores (26, 35, 54, 73, 80, 91, 100, 110) han propuesto una serie de marcadores que configuren un panel de rutina, considerando NE sólo aquellas neoplasias positivas para dos o más de los marcadores utilizados. Sin embargo, como veremos posteriormente, los resultados varían sustancialmente dependiendo del tipo de anticuerpo, el laboratorio en el que se realice el proceso, el tipo de material utilizado y los criterios que se utilizan a la hora de la interpretación de las muestras.

Sin embargo, sí es un hecho generalizado el que la mayoría de los carcinomas microcíticos y algunos no microcíticos tengan positividad focal para estos marcadores, lo que refleja por un lado la escasa cantidad de gránulos neurosecretorios que poseen y por otro la heterogeneidad estructural de estos tumores.

Así pues, la posibilidad de no detectar una población celular minoritaria se plantea como un problema evidente, que puede dar lugar a resultados erróneos, sobre todo si se utiliza material inadecuado para el estudio, como por ejemplo el procedente de biopsias endoscópicas.

Por otro lado, las neoplasias pulmonares se caracterizan por su tendencia a la heterogeneidad intratumoral. Esto es evidente en los tumores mixtos, por ejemplo carcinomas microcíticos con áreas de carcinoma no microcítico o en los tumores mixtos no microcíticos, como los adenoescamosos. Cuando estudiamos tumores pulmonares mediante microscopía electrónica, puede detectarse esa

heterogeneidad hasta en 2/3 de los casos de los tumores que muestran diferenciación divergente (22).

Dentro de este contexto de heterogeneidad, no es sorprendente el hecho de que la diferenciación neuroendocrina pueda detectarse en todo el amplio espectro de las neoplasias pulmonares. La razón por la que el tema continúa siendo de actualidad es por la teórica implicación de este hallazgo en el pronóstico y en su comportamiento biológico. Quizá es más importante el hecho de que estos tumores sean más sensibles a la quimioterapia que los que no expresan rasgos neuroendocrinos (103, 39, 85).

Sin embargo, los resultados al respecto han sido contradictorios. No deja de ser algo inocente considerar que el comportamiento biológico y la excelente respuesta a la quimioterapia de los carcinomas microcíticos es consecuencia directa de sus propiedades neuroendocrinas. No todos los microcíticos exhiben esa diferenciación, mientras que la neoplasia neuroendocrina por excelencia, el tumor carcinoide, tiene un pronóstico excelente y no es sensible a la quimioterapia. Parece más probable que la clínica del microcítico derive de su rápido recambio celular y de las múltiples anomalías genéticas que pueden detectarse en este tumor.

Existen también artículos publicados a este respecto realizados in vitro en cultivos de líneas celulares de carcinomas microcíticos y no-microcíticos (6, 54). Berendsen defiende la hipótesis de que los tumores con rasgos NE no tienen peor comportamiento biológico, o que al menos no son más propensos a dar metástasis tempranas, ya que encuentra un porcentaje de casos positivos similar en las metástasis que en los tumores localizados.

Otra cuestión interesante es el hecho de que determinados tipos histológicos (por ejemplo los adenocarcinomas) expresen en mayor proporción estos marcadores, así como el hecho de comprobar la mejor o peor respuesta a la quimioterapia, observándose si tiene o no influencia en la supervivencia a largo plazo y, por último, si tiene relación con el estadio tumoral.

VI. PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE HISTOANTÍGENO DE GRUPO SANGUÍNEO A

Los determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH y antígenos relacionados residen en la porción terminal de las cadenas de carbohidratos de las glicoproteínas y glicolípidos. Están ampliamente distribuidos en tejidos humanos y animales, especialmente en epitelios y en sus secreciones. Numerosos estudios (16, 17, 18, 21, 68, 78, 97) han tratado de correlacionar la pérdida de expresión de los histoantígenos de grupos sanguíneos A, B y H con una mayor agresividad de los tumores (al asociarse con mayor invasividad y potencial metastásico), o con el hecho de que en su desarrollo biológico acumulen cada vez más aberraciones.

La reducción o supresión de epitopos de histoantígenos de grupo A o B en tumores se describió por primera vez en el cáncer gástrico (77). Estudios posteriores sobre inmunoadherencia en tumores pulmonares y de cérvix uterino demuestran que las propiedades de invasión y metástasis se correlacionan con el grado de delección de los antígenos de grupo A y B (17, 18). Lee et al (68) observan en el cáncer de pulmón correlación entre pérdida de expresión de grupo

A (no con el grupo B) y menor supervivencia. De la misma forma, Graziano (37) publica un estudio en 1997 realizado en tumores pulmonares no microcíticos, donde concluye que la pérdida de histoantígeno de grupo A es un potente marcador predictivo negativo de la supervivencia.

Sin embargo, también existen artículos cuyos resultados generan confusión en este aspecto, como los de Rice y Dresler (97, 21), en los que se concluye que la pérdida o la reducción de expresión de histoantígeno de grupo A carece de relación con la supervivencia o con la mayor agresividad o capacidad metastásica de estos tumores.

Deben existir numerosos cambios fenotípicos diferentes asociados a la delección de los grupos A/B en las células tumorales, puesto que la glicosilación de grupo A/B en estas células se produce por medio de varias enzimas y receptores que controlan la proliferación, adhesión, motilidad y otras funciones de relación de las células.

De forma similar, la pérdida de expresión de histoantígenos de grupo A se puede correlacionar con la acumulación de aberraciones fenotípicas conforme progresa el tumor, de manera que tumores en estadios avanzados o tumores de mayor tamaño expresen marcadores y pierdan de forma concomitante la expresión de grupo A. Pujol et al, 1993 (92): “la diversificación fenotípica de los carcinomas pulmonares conduce a la aparición de subclones más agresivos (que expresarían marcadores neuroendocrinos) que favorecen la progresión tumoral”.

Por lo tanto, todos los estudios que ayuden a diferenciar los distintos mecanismos funcionales que se afectan en la glicosilación de grupo sanguíneo son importantes para comprender mejor la malignidad de las neoplasias.

VII. JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO

Como hemos visto en la introducción, el cáncer de pulmón constituye la causa de mortalidad por cáncer más frecuente en el mundo y su incidencia se mantiene en aumento.

Una de las principales causas de su elevada mortalidad es el fracaso de las técnicas de diagnóstico precoz, que hace que la mayoría de estos tumores se diagnostiquen en estadios localmente avanzados o diseminados.

Por otra parte, con el avance de las técnicas quirúrgicas y anestésicas que se produjo a partir de los años 50 en nuestro país, tampoco se ha conseguido incrementar significativamente la supervivencia de estos pacientes.

Por lo tanto, cualquier trabajo que sirva para descubrir parámetros que permitan conocer mejor el comportamiento biológico de estos tumores o influir en su pronóstico será bienvenido, sobre todo si pueden ser utilizados como base para la realización de ensayos terapéuticos.

Esta es la finalidad del presente estudio y para ello nos centraremos en los rasgos de diferenciación neuroendocrina y en la pérdida de expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A, con especial interés en la supervivencia de

los tumores en estadios precoces, que son los que permiten mayor margen terapéutico.

OBJETIVOS

1. Determinar la incidencia de positividad para marcadores neuroendocrinos en los tumores pulmonares no microcíticos, su correlación con el subtipo histológico y con el estadio.
2. Valorar la significación de la expresión de estos marcadores en cuanto al comportamiento biológico posterior del tumor intentando establecer un posible factor pronóstico. Comprobar si existen diferencias entre tumores en estadios precoces y en estadios avanzados.
3. Realizar una correlación ultraestructural para evaluar la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica con respecto a la microscopía electrónica. Estudiar qué porcentaje de casos con diferenciación neuroendocrina detectable mediante técnicas ultraestructurales no se identifican con inmunohistoquímica y viceversa.
4. Si de los resultados anteriores se dedujera un comportamiento biológico diferente en estos tumores, comprobar si la expresión de las proteínas vinculadas a la neurosecreción se asocia a anomalías en otras formas de expresión protéica, mediante el estudio inmunohistoquímico del determinante antigénico del grupo sanguíneo A. Se trata de establecer la posible repercusión clínica de la pérdida de expresión de este antígeno en tumores de pacientes positivos para grupo A. Serían hallazgos adicionales potencialmente la expresión de antígenos incompatibles (expresión aberrante de antígeno de grupo A por parte del tumor) o la acumulación de precursores.

5. Valorar si se produce una variación en la expresión de marcadores inmunohistoquímicos de neurosecreción y/o del determinante de grupo sanguíneo A en la progresión tumoral, comparando los estadios precoces con los avanzados y, dentro del grupo de estadios iniciales (Ia y Ib), los tumores de menor tamaño con los de mayor tamaño.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL

1. SUJETOS DE ESTUDIO

La serie original es de 391 casos que se seleccionan a partir de una serie de 550 casos de tumores pulmonares resecados quirúrgicamente en el HGU Gregorio Marañón entre 1993 y 2001. Tras la recepción de la muestra en el laboratorio se definen los siguientes aspectos para la inclusión de cada caso en el grupo de estudio:

- Confirmación de la naturaleza tumoral de la lesión resecada mediante estudio anatomopatológico
- Clasificación por tipo histológico. Los tipos histológicos más frecuentes son:
 - carcinomas epidermoides
 - adenocarcinomas
 - carcinomas bronquioloalveolares (que se incluyen dentro del grupo de adenocarcinomas)
 - carcinomas microcíticos (puros o mixtos, con porcentaje variable de otro componente). Se excluyen del estudio.
 - carcinomas indiferenciados de célula grande
 - carcinomas mixtos adenoescamosos
 - carcinomas pobremente diferenciados (sin tipo histológico definible)

- Distribución por estadios. El estudio de la supervivencia se realiza posteriormente en un subgrupo homogéneo de adenocarcinomas y epidermoides en estadio Ia y Ib.
- Ausencia de tratamiento preoperatorio, tanto con quimioterapia como con radioterapia.

2. MUESTRAS.

Las muestras estudiadas proceden de los especímenes quirúrgicos del hospital consignados en el Departamento de Anatomía Patológica del hospital. El material corresponde a neumonectomías, lobectomías, bilobectomías o resecciones en cuña como se ha indicado anteriormente. Tanto en las neumonectomías como en las lobectomías el material se recibe en fresco. El primer paso es pesar y medir la pieza y seleccionar bloques de tumor que se fijarán en formaldehído, en Carnoy y se congelarán. El resto de la pieza se fija mediante instilación transbronquial de formol tamponado y se deja en el fijador 24 horas. Tras esto, la pieza se secciona ampliamente y se incluye en parafina la totalidad del tumor, en bloques de aproximadamente 4-6 cm², procesándose rutinariamente en la forma que se describirá más adelante. De las muestras fijadas e incluidas en parafina se seleccionan las secciones más representativas para el estudio inmunohistoquímico.

II. MÉTODOS

1. DATOS CLÍNICOS

De cada paciente seleccionado se recopilaron los datos clínicos mediante la revisión de las historias clínicas correspondientes, con especial interés en edad, sexo, datos profesionales que pudieran tener relación con el cáncer de pulmón, antecedentes personales relacionados con neoplasias primarias de otros órganos y con enfermedades sistémicas que pudieran influir en la supervivencia del paciente, así como los casos con neoplasias no metastásicas desarrolladas posteriormente.

2. FACTORES MORFOLÓGICOS.

Todas la preparaciones histológicas fueron revisadas por tres observadores al menos dos veces para confirmar el tipo histológico. Se clasificaron según la clasificación de la OMS más reciente, del año 1999. Se identificaron todas las variedades histológicas descritas anteriormente, si bien el estudio se centra en los adenocarcinomas y en los carcinomas epidermoides, incluyendo el resto de tipos histológicos en un grupo de “otros” (carcinomas adenoescamosos y otros tumores mixtos, carcinomas indiferenciados de célula grande, carcinoides, carcinomas microcíticos y carcinomas indiferenciados). Todos los casos fueron tipificados según el componente más diferenciado observado en el conjunto de todas las secciones estudiadas de cada tumor. Los criterios que se siguieron a la hora de tipificar los dos tipos histológicos principales del estudio se resumen así:

- Carcinomas epidermoides. Se subclasificaron en bien, moderadamente y pobremente diferenciados siguiendo los criterios de la OMS. Se establecen según la presencia de puentes intercelulares y la formación de queratina. Se consideraron tumores bien diferenciados los que presentan abundante queratinización y numerosos puentes intercelulares. Se identificaron además las siguientes variantes histológicas: carcinoma epidermoide de célula pequeña, de células claras, mixto de célula pequeña y escamosa y fusocelulares. Únicamente la presencia de áreas bien definidas de un componente glandular o de un componente anaplásico de célula pequeña se consideró válido para incluirlo en el grupo de los tumores mixtos. Los carcinomas adenoescamosos (aquellos con componente glandular y escamoso patentes y el menos predominante constituye al menos un 10% del tumor) se incluyeron en el grupo heterogéneo de “otros”.

- Adenocarcinomas: constituyen un grupo heterogéneo de tumores. La OMS en su clasificación de 1999 reconoce 4 variedades:
 - Acinar (tubular)
 - papilar
 - bronquioloalveolar
 - sólido (con producción de mucina)

Dentro de cada tipo tumoral se describió el grado de diferenciación observado en las muestras estudiadas. Todos los casos fueron clasificados según el componente

más diferenciado observado en el conjunto de todas las secciones estudiadas de cada tumor.

Además se estableció el grado de diferenciación en bien, moderada y pobremente diferenciado atendiendo a la regularidad arquitectural de las glándulas, la proporción de áreas sólidas, el grado de atipia citológica y la presencia o no de necrosis así como su extensión:

- Bien diferenciado: escasa necrosis y atipia, patrón arquitectural regular y predominantemente glandular con mínimas áreas de crecimiento sólido.
- Moderadamente diferenciado: moderada atipia, considerables áreas de necrosis, irregularidad arquitectural y presencia en numerosos focos de áreas de crecimiento sólido entre otras de predominio glandular.
- Pobremente diferenciado: extensas áreas de necrosis, marcada atipia citológica y escasas áreas de componente glandular, de arquitectura muy irregular y con predominio de áreas sólidas.

3. ESTADÍO TUMORAL

El estadio tumoral se determinó siguiendo el sistema TNM, propuesto por Mountain en 1986 y actualizado por la Unión Internacional Contra el Cáncer en 1997. Los datos se obtuvieron a partir de la pieza quirúrgica, complementados con los estudios radiológicos para establecer el tamaño y la extensión del tumor (T), así como para la afectación ganglionar (N). El estudio de las metástasis a distancia (M) se realiza mediante criterios clinico-radiológicos (TAC y ecografía sobre todo), con

confirmación histológica en los casos posibles. Los valores del TNM y las clasificación por estadíos se resume en las siguientes tablas:

T_{IS}	carcinoma in situ
T1	Tamaño < o igual 3 cm
T2	Tamaño > 3 cm y/o afectación bronquio principal con distancia a carina > o igual a 2 cm y/o invasión de la pleura visceral y/o atelectasia parcial de parénquima no tumoral
T3	Afectación de la pared torácica, diafragma, pericardio, pleura mediastínica y/o bronquio principal a <2 cm de carina y/o atelectasia total de parénquima no tumoral
T4	Afectación de mediastino y/o corazón, grandes vasos, carina, tráquea, esófago y/o vértebras. Presencia de nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo. Derrame pleural neoplásico
N0	Ausencia de metástasis ganglionares
N1	Metástasis en ganglios peribronquiales y/o hiliares ipsilaterales
N2	Metástasis en ganglios mediastínicos y/o subcarinales ipsilaterales
N3	Metástasis en mediastínicos y/o subcarinales contralaterales, y/o en escalenos o supraclaviculares
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis (incluyendo nódulos tumorales en uno o más lóbulos diferentes al afectado por el tumor primario)

Tabla 4. Valor de T, N y M en la clasificación TNM

Estadio 0		TIS	N0	M0
Estadio I	IA	T1	N0	M0
	IB	T2	N0	M0
Estadio II	IIA	T1	N1	M0
	IIB	T2	N1	M0
		T3	N0	M0
Estadio III	IIIA	T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1,2	M0
	IIIB	Cualquier T	N3	M0
		T4	Cualquier N	M0
Estadio IV		Cualquier T	Cualquier N	M0

Tabla 5. Clasificación TNM

4. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

4.1. Tumores

Todos los especímenes son fijados en Carnoy durante dos horas y en formol tamponado durante 24 horas y se muestrean ampliamente, incluyéndose en parafina la totalidad del volumen tumoral, obteniéndose suficiente material para realizar el diagnóstico en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina y para completar el panel de técnicas inmunohistoquímicas.

Al incluir abundante material se consiguen dos objetivos inmediatos: primero se facilita el diagnóstico histológico y se reduce el número de tumores diagnosticados de carcinoma indiferenciado de célula grande y segundo se selecciona la zona más representativa para realizar las técnicas IHQ.

Los bloques de parafina se cortan en secciones de 3 μm y se montan en portas bañados en silano, incubándose toda la noche a 60°C. Se desparafinan con

xileno (2x5 minutos) y se rehidratan utilizando alcoholes de graduación sucesiva (100%, 96% y 70% respectivamente) durante 5 minutos, y posteriormente se lavan en agua destilada 5 minutos. Finalmente se tiñen con hematoxilina-eosina. El método que se emplea en nuestro laboratorio de forma rutinaria es el de Harris, que comprende los siguientes pasos:

- Los portas se colocan en cestillos de tinción que se introducen durante 8 o 15 minutos en la fórmula de tinción de Harris.
- Se retira el exceso de hematoxilina con agua del grifo.
- Posteriormente se diferencia utilizando una mezcla de ácido hidrociorhídrico al 1% y etanol 70% durante 5 o 10 segundos.
- Se aclara con agua.
- Se azulean los portas durante 30 o 90 segundos en una solución de amoniaco débil o en una solución de carbonato de litio.
- Se lavan en agua 5 o 10 minutos.
- Se introducen durante 15 segundos a tres minutos en la solución de eosina
- Se deshidratan en etanol al 95% (2x2 minutos) y de 100% (2x2 segundos)
- Finalmente, se introducen en xileno y se montan.

4.2. Anticuerpos y técnicas inmunohistoquímicas

El procesamiento inicial de las muestras para la inmunohistoquímica es similar al que se sigue para la tinción rutinaria con hematoxilina-eosina.

En algunas técnicas se utiliza un tratamiento enzimático, con proteinasa K durante 10 minutos. En otras, como se indicará, se utiliza un tratamiento térmico que consiste en incubación de la muestra en una olla a presión en solución de citrato trisódico 0,01 M a pH 6,00.

Tras todo ello, se ponen en contacto con los distintos anticuerpos, cada uno de ellos a su concentración apropiada, utilizándose para la detección del anticuerpo primario el sistema ABC o el B-SA.

A cada tumor se le realiza una batería de técnicas IHQ, la misma para todos los tipos histológicos, que incluye:

A. Marcadores para detectar diferenciación neuroendocrina: cromogranina-A, Leu-7 y sinaptofisina.

- Las **cromograninas** son una familia de glicoproteínas ácidas cuyo peso molecular oscila entre 20 y 100 kD, que se localizan en la fracción soluble de los gránulos neurosecretorios. La más abundante es la cromogranina A (75 kD). Las otras dos son la cromogranina B (secretogranina I) y la cromogranina C (secretogranina II). Se utiliza para el estudio un anticuerpo monoclonal que se extrae de ratón, el NCL-CHROM, clon LK2H10, que es específico para la cromogranina A (**DAKO. California, EEUU**). Es válido en tejidos congelados y en los conservados en parafina. La dilución de trabajo es 1:2 y se requieren 60 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los controles positivos son las células neuroendocrinas de médula adrenal, de intestino delgado y de tiroides. El patrón de tinción es citoplasmático, granular y fino. La aplicación es para

tumores de origen neuroendocrino (carcinoideas, tumores endocrinos pancreáticos, feocromocitomas y carcinomas medulares de tiroides).

- **Leu-7 (CD 57).** Reconoce una glicoproteína de 110 kD que se expresa en linfocitos NK y en linfocitos T. El antígeno es un carbohidrato asociado a la glicoproteína asociada a la mielina. El antígeno Leu-7 está presente en el 10-20% de las células mononucleares sanguíneas de la circulación periférica. También se expresa en una subpoblación de linfocitos NK y linfocitos T, así como en tejidos neuroectodérmicos y en los carcinomas microcíticos de pulmón. Se utiliza para el estudio el clon HNK-1, anticuerpo monoclonal derivado de la hibridación de células del mieloma en el ratón (**BECTON-DICKINSON. California, EEUU**). Es útil en material congelado y en conservado en parafina. Se realiza la técnica a una dilución de 1/20, con tratamiento enzimático. El control positivo son los nervios periféricos y el patrón de tinción es citoplasmático con ausencia de reactividad nuclear. Las aplicaciones básicas son: estudios de citotoxicidad mediados por linfocitos NK, estudio de glicoproteínas de tejidos neurales y estudios de tumores de origen neuroendocrino, como el carcinoma microcítico de pulmón.

- **Sinaptofisina.** Es una glicoproteína transmembrana de 38 kD que se ha aislado de las vesículas presinápticas de las neuronas. También se expresa en las células endocrinas de los islotes pancreáticos y en un elevado porcentaje de tumores neuroendocrinos. Se utiliza el anticuerpo policlonal 223 M, en una dilución de 1/8, obtenido a partir de péptido sintético de sinaptofisina humana

(BIOMEDA. California, EEUU). Es válido tanto en material congelado como en parafina. Para este último se realiza una incubación a 37° C durante 30 minutos. Su especificidad son las células NE de la médula adrenal y otros órganos, así como las neuronas del cerebro y de la médula espinal. El control positivo son las células endocrinas pancreáticas. El patrón de tinción es citoplasmático y dentro de sus aplicaciones está la tinción de las células NE normales y las neoplasias de estirpe NE.

B. Antígeno de grupo sanguíneo A (BG-2,A. Cadenas tipo 1 y 2)

El BG-2 pertenece a una serie de anticuerpos monoclonales que detectan las especificidades de grupo del sistema ABH. Los antígenos relacionados con el grupo sanguíneo representan un grupo de determinantes tipo carbohidrato que poseen tanto los glicolípidos como las glicoproteínas. Generalmente suelen ser tipo mucina y son detectables en eritrocitos, algunas células epiteliales y en determinados productos de secreción.

Utilizamos el clon T36 que posee especificidad para las cadenas 1 y 2 del grupo sanguíneo A **(DAKO. California, EEUU).** Es válido el tejido en parafina y se recomienda una dilución de 1/60 e incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tratamiento enzimático. El control positivo recomendado es el riñón normal o el uréter.

Anticuerpo	Policlonal (P) / Monoclonal (M)	Clon	Casa Comercial	Dilución
Cr-A	M	LK2H10	DAKO. California, EEUU	1:2
Leu-7	M	HNK-1	Becton - Dickinson. California, EEUU	1:20
Sinaptofisina	P		Biomeda. California, EEUU.	1:8
Ag grupo A	M	T36	DAKO. California, EEUU	1:60

Tabla 6. Relación de anticuerpos utilizados en el presente estudio

5. COMPARACIÓN DE LAS VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES.

Los anticuerpos monoclonales tienen una alta homogeneidad y elevada especificidad, pero para que rindan resultados óptimos hay que tener en cuenta dos puntos básicos: en primer lugar, los métodos de screening de los clones utilizados y del control de calidad deben ser idénticos a los métodos para los cuales el anticuerpo fue diseñado. De ahí que se obtienen mejores resultados y de mayor fiabilidad cuando la técnica de procesamiento se realiza siempre de la misma forma, controlando el procesamiento, a ser posible en el mismo laboratorio y con el mismo clon. En segundo lugar, la caracterización de este tipo de anticuerpos se realiza en tejidos congelados, pero su utilización se aplica a muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, por lo que el epitopo debe necesariamente sobrevivir a la fijación.

Los anticuerpos policlonales son, por el contrario, más fáciles de producir y poseen mayor sensibilidad que los monoclonales, pero la tinción resulta más

inespecífica. Además tienen tendencia a producir gran tinción de fondo, lo que puede provocar un aumento del número de falsos positivos. Esto da lugar a mucha variabilidad en los resultados, lo que invalida la posibilidad de homogeneizarlos en estudios multicéntricos.

6. CONDICIONES TÉCNICAS IDEALES

El estudio del tejido pulmonar obtenido quirúrgicamente (neumonectomía, lobectomía, segmentectomía...) representa para el patólogo una buena oportunidad para el diagnóstico y el trabajo de investigación en la patología de este órgano. Muchas de las dificultades asociadas tradicionalmente con el estudio de la patología pulmonar tienen su origen en un manejo inadecuado de las muestras.

En nuestro laboratorio se siguen los siguientes pasos en el tratamiento de estos especímenes:

- Recogida de material no contaminado y posterior congelación en nitrógeno líquido para el estudio de posibles enfermedades virales y realización de técnicas de biología molecular.
- Si el cirujano no lo ha hecho, debe reservarse material representativo para cultivos fúngicos y bacteriológicos. El mejor material en estos casos se obtiene a partir de improntas secadas al aire de las lesiones de aspecto infeccioso visibles macroscópicamente.
- Secciones de 1 mm cúbico de tejido en fresco y fijados posteriormente en glutaraldehído para estudios ultraestructurales.

- Material en fijadores especiales (si se requiere): aparte del Carnoy, B5 o Zenker en lesiones linfoides, alcohol absoluto para glucógeno, Bouin o Zenker para el estudio de lesiones edematosas...
- Finalmente, el resto de la pieza quirúrgica se fija y se muestrea para el análisis histológico convencional con las técnicas de rutina. En la práctica, el fijador que se utiliza es el formol (más adelante se comentarán los beneficios y prejuicios de los distintos fijadores), que se infunde en el pulmón por medio de una cánula o un tubo de goma a través del bronquio. Las áreas de la pieza que no puedan insuflarse debido a obstrucciones tumorales bronquiales u otras causas pueden fijarse inyectando directamente formol con una jeringa. La duración óptima del proceso de fijación varía según la pieza, si bien la recomendación general es de 2-3 días, pudiendo seccionarse la pieza tras 24 horas para una fijación correcta **(101)**.

El material que se incluye en parafina es muy abundante, generalmente la totalidad del tumor, de forma que pueda realizarse un correcto diagnóstico anatomopatológico y se obtenga suficiente cantidad de tejido para la realización de todas las técnicas de IHQ, microscopía electrónica y otras.

La posibilidad de positividad parcheada, con áreas del tumor positivas y áreas negativas, como ocurre con el Leu-7, invalida la utilización de material procedente de biopsia endoscópica.

7. VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS.

Las técnicas se valoran en función de la intensidad de la positividad y del porcentaje de células positivas, de la siguiente forma:

INTENSIDAD	DEBIL	MODERADA	FUERTE
VALOR	+	++	+++

Tabla 7. Valoración de la intensidad de la positividad

PORCENTAJE	1-25%	26-50%	51-75%	76-100%
VALOR	1	2	3	4

Tabla 8. Valoración del porcentaje de positividad

En el caso del antígeno de grupo sanguíneo se valora también la expresión de este marcador en los tejidos pulmonares normales, tanto alvéolos como endotelio y hematíes, sirviendo además de control interno.

8. ARTEFACTOS MÁS FRECUENTES QUE PUEDEN INDUCIR A ERROR EN LA INTERPRETACIÓN DE LAS TÉCNICAS

- Reactividad cruzada con el moco. Con el Leu-7 es frecuente que en los adenocarcinomas se tiña el producto de secreción y las células adyacentes presenten positividad citoplasmática que no es real, sino que se trata de difusión del antígeno. Esto puede dar lugar a falsos positivos en la valoración.

- Difusión del antígeno. Es frecuente que ocurra con la sinaptofisina y también da lugar a la aparición de falsos positivos. Se observa una tinción con mucho fondo, donde el tumor tiene los citoplasmas celulares teñidos, pero además se observa positividad de otras células que normalmente no lo son: fibroblastos, células endoteliales, alveolos...
- Mala recuperación del antígeno durante el proceso de realización de la técnica. Se observa una tinción anómala citoplasmática.

9. ANÁLISIS DE LAS TÉCNICAS ULTRAESTRUCTURALES UTILIZADAS

- **Material de rutina.** Debido a que los cambios morfológicos secundarios a la anoxia aparecen rápidamente, los tejidos seleccionados para el análisis ultraestructural deben tallarse muy finos e introducirse lo más pronto posible en un fijador apropiado. Si no pueden fijarse en el momento, debe conservarse en una gasa empapada de solución salina isotónica y conservado a 4°C. Nunca debe dejarse secar al aire. El procesamiento de la muestra comprende los siguientes pasos:
 - **Fijación e inclusión:** La elección del fijador inicial es importante. En nuestro caso se utiliza glutaraldehído tamponado (pH 7,4) al 2% que fija por reticulación de proteínas. La solución tamponada asegura el mantenimiento de la presión osmótica durante el proceso de fijación. La fijación se realiza al menos durante 24 horas. Tras la fijación, la muestra se lava en buffer fosfato y se procede al tallado en cubos de 1 mm de espesor. Después, se introduce en tetróxido de osmio y buffer a partes iguales durante 24 horas. Al día siguiente, se lava en el buffer y se deshidrata con alcoholes de graduación sucesiva (de 70° a 100°) mediante pasos de media hora cada uno. Tras

esto, se aclara con xilol durante 30 minutos y se coloca en resina de preinclusión (spurr) durante 24 horas. Al día siguiente se hace el bloque con resina de bloque y se introduce en estufa a 70° C durante 17 horas para su polimerización.

- **Corte:** Se realiza en ultramicrotomo. Primero se obtiene un corte semifino de 1 micra con cuchilla de cristal. Este corte se deposita sobre un portaobjetos con una gota de agua timolada y lo llevamos bajo una fuente de calor (lámpara), para que el corte se adhiera al porta y se estire. Tras ello se procede a su tinción con azul de toluidina y se estudia al microscopio óptico para seleccionar la zona en la que se realizará el corte ultrafino. Este se hace con ultramicrotomo utilizando cuchilla de diamante, a 800 Å de espesor. Se recoge con rejilla de cobre o de níquel y se procede a la tinción.

- **Tinción:** Las rejillas se colocan una solución saturada de acetato de uranilo durante 30 minutos en estufa a 60° C. Seguidamente se lavan durante 5 minutos en agua bidestilada y se introducen las rejillas en solución de citrato de plomo durante 10 minutos. Se lavan otros 10 minutos en agua bidestilada y se secan en papel de filtro para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión.

- **Material incluido en parafina:** A veces, bien porque no se seleccionó material para microscopía electrónica o bien porque el tumor indiferenciado sólo estaba presente en el material en parafina, se utiliza éste. No es la situación ideal, pero igualmente puede llegar a hacerse un diagnóstico. Los mejores resultados se obtienen cuando el tumor se talla del bloque de parafina, se desparafina en una solución al 1% de tetroxido de osmio en xileno y se procesa posteriormente para el microscopio electrónico igual que el material de rutina.

- **Material en congelación:** Pueden obtenerse preparaciones sorprendentemente buenas si se recupera el material y se introduce en glutaraldehído tamponado y enfriado. Una vez obtenidas las preparaciones, se observan al microscopio electrónico de transmisión y se obtienen fotografías a distintos aumentos.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los datos se introdujeron en una base de datos. El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación SPSS para Windows (v 9.0).

La normalidad de las variables cuantitativas se estudió mediante el test de normalidad de Shapiro-Wilks.

Las variables cualitativas se presentan con la frecuencia. Las cuantitativas se presentan como media (error típico) cuando siguen una distribución normal y como mediana (rango intercuartílico) en caso de variables de distribución distinta a la normal.

Para la comparación de variables cuantitativas independientes se utilizó el test de la t de Student si la variable seguía una distribución normal y la prueba de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis en caso de distribución no-normal.

La asociación entre variables cualitativas se estudió mediante test de contingencia (chi cuadrado de Pearson). La asociación entre dos variables cuantitativas se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson, si ambas seguían distribuciones normales o mediante el coeficiente de correlación de Rho de Spearman si alguna de las dos seguía una distribución no normal. Como test de comparaciones múltiples se utilizó la regresión logística.

El análisis de supervivencia se realizó mediante las curvas actuariales de Kaplan-Meier. Cuando los supuestos de riesgos eran proporcionales a lo largo de las curvas, con una evolución de las mismas similar a corto, medio y largo plazo, se utilizó la prueba de Mantel-Cox (Log-Rank). Cuando la evolución de las curvas a lo largo del tiempo mostraba una inversión y/o una evolución diferente a largo y medio plazo, respecto a la misma a corto plazo, se tuvieron en cuenta las pruebas de Wilcoxon-Breslow.

En el análisis de supervivencia global de tumores estudiados, se han tomado los valores de las curvas ajustados por el tipo tumoral.

El análisis de supervivencia para variables cuantitativas se realizó por el método de regresión de Cox univariante.

En todas las pruebas el límite del valor de p para establecer relaciones estadísticamente significativas es menor a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA TOTALIDAD DE LA SERIE

1.1. DATOS CLÍNICOS

1.1.1. Sexo

La distribución por sexos mostró un claro predominio de varones (90,09%) respecto a las mujeres (9,9%).

1.1.2. Edad

Los pacientes en el momento del diagnóstico tenían edades comprendidas entre los 35 y los 80 años, con una media de 65 años y una mediana de 67. La media de edad en varones era de 64,1 años y en las mujeres ligeramente menor, de 58,3 años.

1.2. DISTRIBUCIÓN POR ESTADÍOS

La distribución por estadíos es la siguiente:

	ESTADÍO I	ESTADÍO II	ESTADÍO III	ESTADÍO IV
Epidermoides	76	42	31	13
Adenocarcinomas	78	37	29	19
Otros	20	15	18	13

Tabla 9. Distribución de la serie por estadíos

1.3. FACTORES MORFOLÓGICOS

La frecuencia de los distintos tipos se resume en la siguiente tabla:

TIPO HISTOLOGICO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Epidermoide	162	41,4
Adenocarcinoma	163	41,6
Microcitico (puro/mixto)	3	0,7
Ca indif. cel. Grande	17	4,3
Adenoescamoso	10	2,5
Otros mixtos	13	3,3
Indiferenciados	23	5,8

Tabla 10. Distribución de la serie por tipo histológico

- **Carcinomas epidermoides.**

La gran mayoría corresponden a epidermoides puros, sin otros componentes ni rasgos morfológicos distintos. De forma ocasional se podían observar vacuolas de mucina aisladas (3,3%), pero su presencia no varió el diagnóstico.

- **Adenocarcinomas.**

Se observaron las siguientes variedades: acinar, bronquioloalveolar, papilar y de células claras.

1.4. FACTORES INMUNOHISTOQUÍMICOS

1.4.1. Marcadores neuroendocrinos

Los marcadores neuroendocrinos (cromogranina A, leu-7 y sinaptofisina) tiñen fuertemente las células endocrinas pulmonares que se localizan aisladamente o en pequeños grupos (cuerpos neuroepiteliales) en la mucosa bronquial, lo que demuestra la especificidad de estos marcadores. Se utilizan además como control interno de la técnica. La tinción es citoplásmica en todos los casos, no existiendo reactividad nuclear.

En el caso de la sinaptofisina, se observa además positividad aislada para fibras nerviosas y para células ganglionares intrapulmonares, lo que demuestra la menor especificidad de esta técnica.

La positividad global para cualquier tipo de marcador neuroendocrino es del 37,85% (para cualquier tipo histológico e independientemente del grado de diferenciación, sin especificar el estadio).

1.4.2. Positividad según marcador

Sinaptofisina

- 25,97% de todos los tumores (sin diferenciar por tipo histológico) son positivos para sinaptofisina.
- Si consideramos el global de la muestra, el 27% del total de adenocarcinomas, el 23,45% de carcinomas epidermoides y 33,9% de “otros” muestran positividad para sinaptofisina.

El patrón de tinción es citoplásmico y ocasionalmente de membrana, difuso y en general de escasa intensidad.

Cromogranina

- 12,71% de todos los tumores son positivos para cromogranina.
- De igual forma que con la sinaptofisina, el 14,11% del total de adenocarcinomas, el 11,11% del total de epidermoides y el 21,56% del grupo de “otros” son positivos para cromogranina.

El patrón de tinción es asimismo citoplasmático, con algún caso de positividad de membrana, finamente granular y de intensidad variable.

Leu-7

- 7,18% de todos los casos son positivos para Leu-7.
- El 11,04% del total de adenocarcinomas, el 2,46% del grupo de epidermoides y el 12,6% del grupo de otros expresan Leu-7.

El patrón es citoplasmático y de membrana en un mayor porcentaje de casos que en las técnicas anteriores. Se observa intensidad variable, pero la mayoría de los casos son de baja intensidad, apreciándose también un menor porcentaje de células tumorales teñidas.

Tipo histológico	SF -	SF+	Cr-A-	Cr-A+	Leu-7-	Leu-7+	Total
Epidermoides	124	38	144	18	158	4	162
Adenocarcinomas	119	44	140	23	145	18	163
Microcíticos(puro/mixto)	1	2	1	2	2	1	3
Indif cel grande	9	8	10	7	7	3	17
Adenoescamosos	8	2	10	0	10	0	10
Otros mixtos	10	3	13	0	12	1	13
Indiferenciados	19	4	23	0	22	1	23

Tabla 11. Positividad global por marcadores

	SF	Cr-A	Leu-7
Epidermoides	23,4	11,1	2,46
Adenocarcinomas	27	14,11	11,04
Microcíticos(puro/mixto)	66,6	66,6	33,33
Indif cel gr	47,05	41,18	17,65
Adenoescamosos	20	0	0
Otros mixtos	23,08	0	7,69
Indiferenciados	13,04	0	4,35
Global	25,97	12,71	7,18

Tabla 12. Promedio de porcentajes de positividad global por marcador

1.4.3. Expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A

Del total de los tumores del trabajo se selecciona un subgrupo de 296 tumores con al menos dos años de seguimiento. De este subgrupo, un total de 145 se encuentran en estadio limitado (Ia y Ib).

	I	II	III	IV	total
Epidermoides	76	40	18	23	157
Adenocarcinomas	78	7	10	12	107
Otros	20	4	3	5	32
Total	174	51	31	40	296

Tabla 13. Distribución de la serie por estadíos

Tras la realización de la técnica IHQ, la lectura se evalúa siguiendo los siguientes parámetros:

- **Primer parámetro:** se valora en primer lugar la positividad para antígeno de grupo sanguíneo A en los tejidos sanos incluidos en la muestra, principalmente hematíes, endotelio y alveolos. De todo ello se deduce que los antígenos ABH se expresan en células endoteliales de vasos sanguíneos de múltiples tejidos y en el epitelio estratificado de numerosas glándulas, expresión que puede variar según el estado de secreción de dichas glándulas. En el siguiente esquema se resumen los tejidos normales del sistema circulatorio y respiratorio que expresan antígenos de grupo sanguíneo:

Órganos y tejidos que expresan antígenos ABH.

Sistema circulatorio

- Vasos sanguíneos: células endoteliales
- Eritrocitos

Sistema respiratorio

- Laringe: epitelio escamoso y células mucosas
- Tráquea: epitelio de superficie y células mucosas
- Bronquios

Epitelio estratificado

- Cavityad oral
- Lengua
- Esófago
- Tracto respiratorio
- Tracto urinario
- Cérvix

Glándulas salivales

- Ductos estriados e interlobulares

Estómago e intestino delgado

- Células parietales
- Glándulas pilóricas
- Glándulas de Brunner

Páncreas

- Acinis exocrinos

Órganos y tejidos que no expresan antígenos ABH.

Glándula pituitaria

- parte anterior, lóbulo posterior

Adrenal

- corteza y médula

Tiroides

- células foliculares

Páncreas

- islotes de Langerhans

Hígado

- hepatocitos

Hueso

Cartílago

Sistema nervioso central

Músculo liso y estriado

Tendones, fascia y otros tejidos conectivos

Testículo, ovario

Colon distal

Además, el patrón de expresión de esos isoantígenos en tejidos normales varía con respecto al de los tejidos neoplásicos (ver apartado XI de la discusión).

- **Segundo parámetro:** posteriormente se valora la positividad del tejido tumoral, conforme a los valores de porcentaje e intensidad anteriormente comentados.
- **Tercer parámetro:** de esta forma se obtiene en cada caso la positividad de los tejidos (o del paciente propiamente dicho) y la del tumor, pudiéndose identificar fácilmente la pérdida de expresividad del antígeno por parte del tumor.

	Nº CASOS A+	TEJIDO+ TUMOR+	TEJIDO+ TUMOR-	TOTAL
Epidermoides	86 (32,21%)	54 (62,79%)	32 (27,21%)	151
Adenocarcinomas	41 (15,36%)	27 (65,85%)	14 (34,14%)	84
Otros	21 (7,87%)	13 (61,9%)	8 (38,1%)	32
Total	148 (55,43%)	94 (63,51%)	54 (36,49%)	296

Tabla 14. Tumores que expresan o pierden la expresión de grupo sanguíneo por tipo histológico

De todo lo anterior se deduce que la pérdida de expresión de antígeno de grupo sanguíneo A se produce aproximadamente en 1 de cada 3 pacientes. Además, esta pérdida de expresión es menos frecuente en los carcinomas epidermoides que en los adenocarcinomas.

1.5. POSITIVIDAD POR TIPO HISTOLÓGICO

- Los carcinomas epidermoides y los adenoescamosos son los tumores que expresan estos marcadores en menor proporción:
 - Adenoescamosos y otros mixtos: 26,9%
 - Epidermoides: 27%
- Los adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de célula grande son los que expresan en un porcentaje mayor:
 - Adenocarcinomas: 45,04%
 - Carcinomas de célula grande: 45,4%

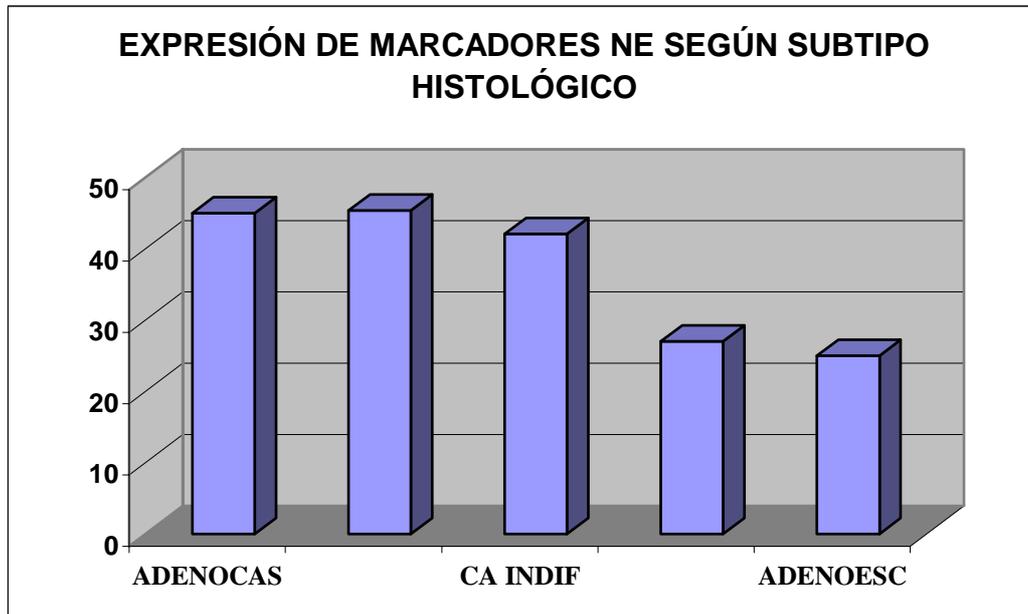


Figura 1. Expresión de marcadores NE según tipo histológico

1.6. EXTENSIÓN E INTENSIDAD DE LA POSITIVIDAD POR TIPO HISTOLÓGICO

En la siguiente tabla se resume la intensidad de la positividad de los marcadores neuroendocrinos en los distintos tipos histológicos de carcinomas estudiados, donde se observa que los tumores que muestran mayor intensidad de tinción y mayor porcentaje de células tumorales positivas son los adenocarcinomas, junto con los carcinomas indiferenciados. Sin embargo, dentro de un tipo histológico definido, no se observan diferencias en cuanto a intensidad o porcentaje dependiendo del grado de diferenciación histológica de la neoplasia.

Caso	Tipo histologico	SF %	SF int.	Cr-A %	Cr-A int	Leu-7 %	Leu-7 int
1	Epid mod	2	+	2	++	0	0
2	Epid mod	0	0	0	0	2	++
3	Epid mod	2	+	1	++	0	0
4	Epid mod	2	+	0	0	0	0
5	Epid mod	2	+	0	0	0	0
6	Epid mod	2	++	1	++	1	+
7	Epid mod	3	+	0	0	0	0
8	Epid mod	3	+	0	0	0	0
9	Epid bien	1	+	0	0	0	0
10	Epid bien	0	0	0	0	1	++
11	Epid mod	1	+	0	0	0	0
12	Epid mod	3	+	0	0	0	0
13	Epid mod	2	++	0	0	0	0
14	Epid bien	2	+	0	0	0	0
15	Epid pob	2	+	0	0	0	0
16	Epid pob	0	0	1	+	0	0
17	Epid pob	3	+	0	0	0	0
18	Epid bien	0	0	0	0	1	++
19	Epid mod	3	++	0	0	0	0
20	Epid mod	2	++	0	0	0	0
21	Epid mod	2	++	0	0	0	0
22	Epid mod	2	+	0	0	0	0
23	Epid bien	2	+	0	0	0	0
24	Epid bien	2	+	0	0	0	0
25	Epid mod	2	+	0	0	0	0
26	Epid mod	0	0	2	+	0	0
27	Epid mod	1	+	0	0	0	0
28	Epid bien	1	+	0	0	0	0
29	Epid pob	1	++	0	0	0	0
30	Epid mod	1	++	0	0	0	0
31	Epid bien	0	0	1	+	0	0
32	Epid bien	1	+	0	0	0	0
33	Epid mod	0	0	2	++	0	0
34	Epid mod	0	0	1	+	0	0
35	Epid mod	2	+	0	0	0	0
36	Epid bien	2	+	0	0	0	0
37	Epid mod	2	+	0	0	0	0
38	Epid bien	2	+	0	0	0	0
39	Epid mod	2	+	0	0	0	0
40	Epid mod	2	+	0	0	0	0
41	Epid pob	2	++	0	0	0	0
42	Epid pob	0	0	1	+	0	0
43	Epid bien	0	0	1	++	0	0
44	Epid mod	1	+	0	0	0	0
45	Epid mod	1	+	0	0	0	0
46	Epid mod	1	++	0	0	0	0

Caso	Tipo histologico	SF %	SF int.	Cr-A %	Cr-A int	Leu-7 %	Leu-7 int
47	Epid mod	0	0	1	+	0	0
48	Epid bien	1	+	0	0	0	0
49	Epid pob	0	0	1	++	0	0
50	Epid mod	0	0	2	++	0	0
51	Epid mod	0	0	2	++	0	0
52	Epid mod	0	0	1	+	0	0
53	Epid bien	0	0	1	+	0	0
54	Epid mod	0	0	1	+	0	0
55	Adeno mod	2	++	0	0	0	0
56	Adeno mod	2	++	0	0	0	0
57	Adeno mod	2	++	2	++	2	++
58	Adeno mod	3	+++	0	0	0	0
59	Adeno pob	1	++	0	0	0	0
60	Adeno pob	2	++	3	+++	0	0
61	Adeno bien	0	0	2	++	0	0
62	Adeno bien	2	++	0	0	0	0
63	Adeno pob	3	++	0	0	0	0
64	Adeno bien	0	0	3	++	0	0
65	Adeno mod	2	+++	3	++	2	++
66	Adeno mod	2	++	2	+++	0	0
67	Adeno bien	0	0	1	++	0	0
68	Adeno mod	3	++	2	++	0	0
69	Adeno pob	0	0	2	++	0	0
70	Adeno bien	2	++	0	0	0	0
71	Adeno pob	1	++	0	0	0	0
72	Adeno bien	0	0	1	+	0	0
73	Adeno mod	1	++	2	++	2	++
74	Adeno mod	2	+++	0	0	0	0
75	Adeno bien	1	++	0	0	0	0
76	Adeno pob	3	+++	0	0	0	0
77	Adeno bien	0	0	2	++	0	0
78	Adeno mod	0	0	2	++	0	0
79	Adeno mod	0	0	0	0	2	+
80	Adeno bien	2	++	2	++	0	0
81	Adeno mod	2	++	0	0	0	0
82	Adeno mod	2	++	0	0	0	0
83	Adeno pob	0	0	2	++	0	0
84	Adeno bien	2	++	0	0	0	0
85	Adeno bien	0	0	0	0	2	++
86	Adeno pob	3	+++	3	++		
87	Adeno bien	0	0	0	0	1	+
88	Adeno mod	1	+	0	0	0	0
89	Adeno mod	2	+++	0	0	0	0
90	Adeno mod	3	++	0	0	0	0
91	Adeno pob	2	++	2	++	0	0
92	Adeno pob	0	0	0	0	2	++

Caso	Tipo histológico	SF %	SF int.	Cr-A %	Cr-A int	Leu-7 %	Leu-7 int
93	Adeno bien	2	++	0	0	0	0
94	Adeno bien	2	++	0	0	2	++
95	Adeno mod	0	0	1	+	0	0
96	Adeno mod	1	+	0	0	0	0
97	Adeno pob	3	+++	0	0	0	0
98	Adeno mod	2	++	0	0	0	0
99	Adeno pob	2	++	0	0	0	0
100	Adeno pob	0	0	2	++	0	0
101	Adeno bien	0	0	0	0	1	+
102	Adeno pob	2	++	0	0	0	0
103	Adeno bien	2	+++	0	0	0	0
104	Adeno pob	0	0	0	0	1	+
105	Adeno bien	2	++	3	+++	0	0
106	Adeno pob	0	0	0	0	2	+
107	Adeno bien	3	++	0	0	0	0
108	Adeno mod	0	0	0	0	2	+
109	Adeno pob	2	++	0	0	2	++
110	Adeno pob	0	0	0	0	2	++
111	Adeno bien	3	+++	0	0	2	++
112	Adeno pob	0	0	0	0	1	+
113	Adeno mod	2	++	0	0	0	0
114	Ind cel gr	2	++	0	0	0	0
115	Ind cel gr	2	++	3	+++	0	0
116	Ind cel gr	4	++	2	++	0	0
117	Ind cel gr	2	++	0	0	0	0
118	Ind cel gr	2	++	2	++	2	++
119	Ind cel gr	0	0	0	0	2	++
120	Ind cel gr	0	0	2	++	0	0
121	Ind cel gr	3	+	3	++	0	0
122	Ind cel gr	0	0	2	+	0	0
123	Ind cel gr	4	++	3	++	2	++
124	Ind cel gr	2	++	0	0	0	0
125	Ind cel gr	4	++	2	++	0	0
126	Adenoesc	1	+	0	0	0	0
127	Adenoesc	1	++	0	0	0	0
128	Otro mixto	1	+	0	0	0	0
129	Otro mixto	0	0	0	0	2	+
130	Otro mixto	2	++	0	0	0	0
131	Indifer.	1	+	0	0	0	0
132	Indifer.	1	++	0	0	0	0
133	Indifer.	0	0	0	0	2	+
134	Indifer.	3	++	0	0	0	0
135	Indifer.	2	++	0	0	0	0

Tabla 15. Extensión e intensidad de la positividad por tipo histológico y grado de diferenciación

1.7. FACTORES ULTRAESTRUCTURALES

En nuestro estudio se han comparado los resultados obtenidos de la tinción con IHQ con los obtenidos de la microscopía electrónica, que se ha realizado en el subgrupo de 154 carcinomas epidermoides y adenocarcinomas en estadio Ia y Ib. Además se estudian con microscopía electrónica 53 carcinomas pulmonares no microcíticos en los que no se ha realizado estudio inmunohistoquímico. La distribución de los casos es como sigue, y los resultados en los tumores con marcadores inmunohistoquímicos positivos se resumen en la tabla:

- 56 tumores positivos para algún marcador NE:
 - 34 adenocarcinomas
 - 22 epidermoides
- 98 tumores negativos para todos los marcadores IHQ
 - 54 epidermoides
 - 44 adenocarcinomas
- 53 tumores sin IHQ realizada:
 - 18 adenocarcinomas
 - 32 epidermoides
 - 3 carcinomas adenoescamosos
- grupo control de tumores NE:
 - 3 carcinoides
 - 1 microcítico

CASO	TIPO AP	INMUNOHISTO- QUIMICA			CARACTERÍSTICAS GRÁNULOS (ME)		
		Leu-7	Crg-A	SF	Cantid.	Localiz.	Tamaño (nm)
1	Adeno	--	+ 20%	--	3	Difusa	100-150
2	Adeno	--	+ 20%	--	1	Periferica	290-350
3	Adeno	--	+ 30%	+ 40%	2	Periferica	110-160
4	Adeno	--	--	+ 70%	1	Periapical	400-480
5	Adeno	+ <5%	--	+ 60%	3	Periapical	80-350
6	Adeno	--	--	+ 90%	1	Paranucl.	340-580
7	Adeno	+ 60%	--	+ 70%	2	Irregular	280-420
8	Adeno	--	--	+ 60%	2	Apical	140-230
9	Adeno	--	--	+ 5%	2	Paranucl.	140-300
10	Adeno	--	+ 40%	+ 90%	2	Periferica	115-300
11	Adeno	+ 5%	--	--	1	Parcheada	210-260
12	Adeno	--	--	+ 80%	2	Periferica	350-520
13	Adeno	--	--	+ 100%	1	Periferica	140-210
14	Adeno	--	+ 90%	+ 60%	3	Periferica	90-280
15	Adeno	+ 5%	--	--	0	-	-
16	Adeno	+ 5%	--	--	0	-	-
17	Adeno	--	--	+ 5%	0	-	-
18	Adeno	--	--	+ 5%	0	-	-
19	Adeno	+ 10%	--	--	0	-	-
20	Adeno	+ 10%	+ 10%	+ 5%	0	-	-
21	Adeno	--	--	+ 5%	0	-	-
22	Adeno	--	--	+ 20%	0	-	-
23	Adeno	--	--	+ 60%	2	apical	200-250
24	Adeno	--	+ 30%	+ 20%	1	Perif.	90-160
25	Adeno	+ 20%	--	+ 30%	3	Difusa	150-220
26	Adeno	+ 15%	+ 20%	--	1	paranucl	90-160
27	Adeno	+ 30%	--	+ 40%	2	Perif.	160-220
28	Adeno	--	--	+ 80%	3	parched	190-260
29	Adeno	--	--	+ 70%	2	Perif	100-150
30	Adeno	--	--	+ 70%	1	Perif.	100-120
31	Adeno	--	--	+ 80%	2	parched	110-200
32	Adeno	--	--	+ 40%	2	perif	120-190
33	Adeno	--	+ 50%	+ 90%	1	dif	100-200
34	Adeno	--	+ 30%	+ 70%	0	--	--
35	Epid	--	--	+ 40%	2	Parched	120-250
36	Epid	--	--	+ 30%	0	--	--
37	Epid	--	--	+ 40%	2	Irregular	140-280
38	Epid	--	--	+ 50%	3	apical	200-250
39	Epid	--	--	+ 30%	2	parched	180-260
40	Epid	--	+ 30%	--	2	paranucl	110-250
41	Epid	--	+ 20%	--	2	Apical	150-220
42	Epid	--	+ 30%	+ 40%	3	difusa	130-210
43	Epid	+ 10%	+5%	+ 30%	2	Perif	120-180
44	Epid	--	--	+80%	2	Parched	122-200

CASO	TIPO AP	INMUNOHISTO- QUIMICA			CARACTERÍSTICAS GRÁNULOS (ME)		
		Leu-7	Crg-A	SF	Cantid.	Localiz.	Tamaño (nm)
45	Epid	--	--	+ 50%	0	--	--
46	Epid	--	--	+ 80%	1	Perif	90-110
47	Epid	--	--	+ 40%	0	--	--
48	Epid	--	--	+ 90%	2	Parched	120-180
49	Epid	--	--	+ 30%	1	Perif	150-200
50	Epid	--	--	+ 40%	2	Irregular	120-180
51	Epid	--	--	+ 90%	3	difusa	130-210
52	Epid	--	--	+ 30%	1	Perif	90-110
53	Epid	--	--	+ 40%	2	Parched	120-180
54	Epid	--	--	+ 80%	2	Irregular	140-280
55	Epid	--	+ 30%	+ 70%	1	Parched	110-190
56	Epid	--	+ 40%	+ 60%	1	Perif	150-200

Tabla 16. Expresión de gránulos en microscopía electrónica

De los 34 adenocarcinomas estudiados con algún marcador neuroendocrino positivo mediante IHQ, el 74% (25 casos) presenta gránulos ultraestructuralmente y el 26% (9 casos) no lo hace. El porcentaje de coincidencia es superior al 70%, si bien es posible que la especificidad aumente al considerar positividad para dos o más marcadores (6 de 7 casos en nuestro estudio). En el caso de los epidermoides, este porcentaje de coincidencia es más elevado, ya que 19 de los 22 (86%) tumores con algún marcador NE positivo presentan gránulos de neurosecreción ultraestructuralmente. De los 98 casos negativos con IHQ, tres adenocarcinomas y dos carcinomas epidermoides demostraron gránulos con microscopía electrónica (5% en total). En 6 de los 53 casos sin inmunohistoquímica realizada (11%) se detectó la presencia de gránulos.

El cálculo de la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica se resume en la siguiente tabla:

IHQ/ME	positivo	negativo	total
positivo	47	9	56
negativo	5	93	98
total	52	102	154

Tabla 17. Sensibilidad y especificidad de la IHQ frente a la microscopía electrónica

Sensibilidad: 0,9038 (0,7826-0,9638)

Especificidad: 0,9118 (0,8351-0,9562)

Valor predictivo positivo: 0,8393

Valor predictivo negativo: 0,9490

Se observa pues que la inmunohistoquímica es un método altamente sensible y específico. Con la microscopía electrónica podemos recuperar aproximadamente un 5% de casos que la inmunohistoquímica no detecta, probablemente por la escasa cantidad de gránulos que poseen las células de estos tumores. Por lo tanto, la forma más sensible y específica de detectar la diferenciación neuroendocrina es utilizar ambas técnicas. Si debemos elegir una de las dos, lo mejor en ese caso es emplear la inmunohistoquímica.

Por otro lado, con la microscopía electrónica se subclasificaron una serie de tumores con diagnóstico de carcinoma indiferenciado de célula grande y algunos adenocarcinomas, en los que se observó la presencia de células de Clara, igual que la presencia de luces intracelulares observadas ultraestructuralmente en un carcinoma epidermoide, con lo que se incluyó en el grupo de tumores mixtos.

2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE DE TUMORES EN ESTADIOS PRECOCES (EXCLUSIVAMENTE Ia Y Ib)

Como se explicó previamente, se trata de un subgrupo de tumores muy homogéneo, del que se excluyen todos los que no sean carcinomas epidermoides o adenocarcinomas. Ninguno de ellos tiene tratamiento previo con quimio ni radioterapia. La serie está depurada, el seguimiento de los pacientes es completo excepto en los casos que se indican. Las características del grupo son las siguientes:

2.1. DISTRIBUCIÓN POR SEXOS

Sexo	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
varón	137	89,0	89,0
mujer	17	11,0	100,0
total	154	100,0	

Tabla 18. Distribución por sexo. Estadío I

Se mantiene la tendencia general de la serie completa, siendo varones la gran mayoría de los enfermos.

2.2. DISTRIBUCIÓN POR TIPO HISTOLÓGICO

Tipo histológico	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
epidermoide	76	49,4	49,4
adenocarcinoma	78	50,6	100,0
total	154	100,0	

Tabla 19. Distribución por tipo histológico. Estadío I.

Como se ve, es un grupo muy homogéneo, con aproximadamente la mitad de los tumores en cada tipo histológico.

2.3. DISTRIBUCIÓN POR ESTADÍOS

Estadio	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Ia	49	31,8	31,8
Ib	105	68,2	100,0
total	154	100,0	

Tabla 20. Distribución por estadios

2.4. DISTRIBUCIÓN DE LAS MUERTES POR CAUSA TUMORAL

Muerte por causa tumoral	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
no	18	11,7	11,7
si	28	18,2	29,9
se desconoce	3	1,9	31,8
no ha muerto	105	68,2	100,0
total	154	100,0	

Tabla 21. Distribución de las muertes por causa tumoral

En el total de la serie se producen 28 muertes atribuibles directamente al tumor, mientras que 18 de las muertes se deben a otras causas, en general complicaciones post-quirúrgicas, infecciones u otras.

2.5. DISTRIBUCIÓN DEL ESTADO CLÍNICO EN FUNCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA

Estado clínico	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
vivo y libre enfermedad	92	59,7	59,7
perdido	2	1,3	61,0
muerto	49	31,8	92,9
vivo con recidiva	11	7,1	100,0
total	154	100,0	

Tabla 22. Distribución del estado clínico en función de la supervivencia

2.6. DISTRIBUCIÓN DEL PORCENTAJE DE POSITIVIDAD DE LOS DISTINTOS MARCADORES NEUROENDOCRINOS

2.6.1. Distribución de la positividad para sinaptofisina

Sinaptofisina	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
negativo	107	69,5	69,5
positivo	47	30,5	100,0
total	154	100,0	

Tabla 23. Positividad para SF

Independientemente del tipo histológico y del grado de diferenciación, el porcentaje de tumores que expresan sinaptofisina es del 30,5%.

2.6.2. Distribución de la positividad para cromogranina-A

Cromogranina-A	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
negativo	137	89,0	89,0
positivo	17	11,0	100,0
total	154	100,0	

Tabla 24. Positividad para Cr-A

De igual forma, el porcentaje de tumores que expresan Cromogranina-A es del 11%, independientemente del grado de diferenciación.

2.6.3 Distribución de la positividad para Leu-7

Leu-7	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
negativo	143	92,9	92,9
positivo	11	7,1	100,0
total	154	100,0	

Tabla 25. Positividad para Leu-7

Vemos pues que la tendencia es la misma que la de la serie global. El marcador que se expresa con mayor frecuencia en carcinomas epidermoides y en adenocarcinomas en estadíos I es la sinaptofisina, seguida de la cromogranina y el Leu-7.

2.7. Distribución de la expresión de antígenos de grupo sanguíneo A por parte de los pacientes

Pacientes grupo- A	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
negativo	76	49,4	49,4
positivo	78	50,6	100,0
total	154	100,0	

Tabla 26. Distribución de la expresión de grupo A en los pacientes en estadio I

La mitad de los pacientes de la totalidad de la muestra pertenecen al grupo sanguíneo A, dato que concuerda con los resultados obtenidos a partir de la población general.

2.8. DISTRIBUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE GRUPO SANGUÍNEO POR PARTE DE LOS TUMORES

Tumores grupo- A	Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje acumulado
negativo	108	70,1	470,1
positivo	46	29,9	100,0
total	154	100,0	

Tabla 27. Distribución de la expresión de grupo A en los tumores

En esta tabla se han incluido los tumores de los pacientes de todos los grupos sanguíneos. Posteriormente se identificará la pérdida de expresión de grupo A por parte de los tumores de pacientes exclusivamente de este grupo sanguíneo.

2.9. TABLAS DE CONTINGENCIA

2.9.1 Expresión de sinaptofisina en función del tipo histológico

Histología		Sinaptofisina		
		Negativo	Positivo	Total
epidermoide	Frecuencia	56	20	76
	Porcentaje	36,36%	12,98%	49,35%
adenocarcinoma	Frecuencia	51	27	78
	Porcentaje	33,11%	17,53%	50,6%
	Frecuencia	107	47	154
	Porcentaje	69,48%	30,51%	100%

Tabla 28. Expresión de SF por tipo histológico

p 0,263

2.9.2. Expresión de cromogranina en función del tipo histológico

Histología		Cromogranina-A		
		Negativo	Positivo	Total
epidermoide	Frecuencia	69	7	76
	Porcentaje	44,8%	4,5%	49,35%
adenocarcinoma	Frecuencia	68	10	78
	Porcentaje	44,15%	6,49%	50,64%
	Frecuencia	137	17	154
	Porcentaje	88,96%	11,03%	100%

Tabla 29. Expresión de Cr-A por tipo histológico

p 0,475

2.9.3 Expresión de Leu-7 en función del tipo histológico

Histología		Leu-7		Total
		Negativo	Positivo	
epidermoide	Frecuencia	75	1	76
	Porcentaje	48,7%	0,65%	49,35%
adenocarcinoma	Frecuencia	68	10	78
	Porcentaje	44,15%	6,49%	50,64%
	Frecuencia	143	11	154
	Porcentaje	92,85%	7,14%	100%

Tabla 30. Expresión de Leu-7 por tipo histológico

p 0,006

Al igual que ocurría con la serie global, los adenocarcinomas expresan con mayor frecuencia marcadores neuroendocrinos, independientemente de su grado de diferenciación histológica.

2.9.4 Pérdida de expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A

Paciente grupo A	Tumor grupo A		total
	negativo	positivo	
negativo	76	0	76
positivo	32	46	78
total	108	46	154

Tabla 31. Pérdida de expresión de grupo A

p 0,870

No encontramos en ninguno de los casos expresión aberrante de grupo sanguíneo, y observamos pérdida de expresión en 32 de 78 tumores positivos, es decir, un porcentaje de pérdida del 41,02%, algo superior al encontrado en la serie global.

3. ANÁLISIS COMPARATIVO. TABLAS DE CONTINGENCIA

El análisis comparativo y el cálculo de la supervivencia se ha realizado exclusivamente en el subgrupo homogéneo de 154 tumores en estadio Ia y Ib. En este apartado se comparan distintas variables con la posibilidad de recidiva.

3.1 . RECIDIVA VS. ESTADÍO

Recidiva		estadio		
		Ia	Ib	total
No	Frecuencia	38	77	115
	Porcentaje	24,67%	50%	74,67%
Si	Frecuencia	11	28	39
	Porcentaje	7,14%	18,18%	25,32%
Total	Frecuencia	49	105	154
	Porcentaje	31,8%	68,18%	100%

Tabla 32. Recidiva vs. Estadio

Los tumores en estadio Ib parecen recidivar con mayor frecuencia, sin embargo, la relación carece de significación estadística (Chi cuadrado de Pearson, significación 0,575)

3.2. RECIDIVA VS. TIPO HISTOLÓGICO

Recidiva		histologia		total
		epidermoide	adenocarcinoma	
no	Frecuencia	55	60	115
	Porcentaje	35,7%	38,96%	74,67%
si	Frecuencia	21	18	39
	Porcentaje	13,63%	11,68%	25,32%
Total	Frecuencia	76	78	154
	Porcentaje	49,35%	50,6%	100%

Tabla 33. Recidiva vs. tipo histológico

No se aprecian claramente tendencias de comportamiento diferente entre ambos grupos (Chi-cuadrado de Pearson, significación 0,516).

3.3. RECIDIVA VS. EXPRESIÓN DE MARCADORES NEUROENDOCRINOS

3.3.1. Recidiva vs. expresión de Sinaptofisina

Recidiva		sinaptofisina		total
		negativo	positivo	
no	Frecuencia	85	30	115
	Porcentaje	55,19%	19,48%	74,67%
si	Frecuencia	22	17	39
	Porcentaje	14,28%	11,03%	25,32%
Total	Frecuencia	107	47	154
	Porcentaje	69,5%	30,5%	100%

Tabla 34. Recidiva vs. expresión de SF

Se observa clara tendencia a la recidiva en los tumores que expresan sinaptofisina. Además, la asociación es estadísticamente significativa (Chi-cuadrado de Pearson, significación 0,040). Al resultar este dato estadísticamente significativo, calculamos el riesgo relativo (RR) y el odds ratio (OR), es decir, cuantificamos el

riesgo que tienen los tumores que expresan sinaptofisina en sufrir una recidiva. Los resultados se resumen en las siguientes tablas, siendo la celda 1 la que incluye tumores sinaptofisina negativos que no recidivan, la celda 2 la de los tumores positivos que no recidivan, la celda 3 la de los tumores negativos que recidivan y la celda 4 la de los tumores positivos que recidivan:

celda	RR	IC 95% inf	IC 95% sup
1	1,2445	0,9831	1,5755
2	0,8035	0,6347	1,0172
3	0,5684	0,3339	0,9676
4	1,7592	1,0335	2,9945

Es decir, los tumores que expresan sinaptofisina tienen un riesgo 1,7592 veces mayor de recidivar que los que no la expresan. Con el odds ratio se obtiene una probabilidad de 2,1894 veces:

celda	OR	IC 95% inf	IC 95% sup
1	2,1894	1,0264	4,6700
2	0,4567	0,2141	0,9742
3	0,4567	0,2141	0,9742
4	2,1894	1,0264	4,6700

3.3.2. Recidiva vs. expresión de cromogranina-A

Recidiva		cromogranina		total
		negativo	positivo	
no	Frecuencia	101	14	115
	Porcentaje	65,58%	9,09%	74,67%
si	Frecuencia	36	3	39
	Porcentaje	23,37%	1,94%	25,32%
Total	Frecuencia	137	17	154
	Porcentaje	89,0%	11,0%	100%

Tabla 35. Recidiva vs. expresión de Cr-A

Parece existir cierta tendencia a recidivar más si los tumores no expresan cromogranina, asociación que no es estadísticamente significativa (Chi-cuadrado de Pearson, significación 0,440).

3.3.3. Recidiva vs. expresión de Leu-7

Recidiva		Leu-7		total
		negativo	positivo	
no	Frecuencia	109	6	115
	Porcentaje	70,77%	3,89%	74,67%
si	Frecuencia	34	5	39
	Porcentaje	22,07%	3,24%	25,32%
Total	Frecuencia	143	11	154
	Porcentaje	92,9%	7,1%	100%

Tabla 36. Recidiva vs. expresión de Leu-7

También parecen recidivar menos los tumores que no expresan Leu-7, pero tampoco se alcanza la significación estadística (Chi-cuadrado, significación 0,111).

3.4. RECIDIVA VS. PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE HISTOANTÍGENO DE GRUPO SANGUÍNEO A

En la siguiente tabla se estudian los tumores que expresan grupo A o que pierden la expresión del mismo, todos ellos en pacientes que pertenecen a ese grupo sanguíneo.

Recidiva		Tumor		
		Grupo A -	Grupo A +	total
no	Frecuencia	19	37	56
	Porcentaje	12,33%	24,02%	36,36%
si	Frecuencia	13	9	22
	Porcentaje	8,44%	5,84%	14,28%
Total	Frecuencia	32	46	78
	Porcentaje	41,03%	58,97%	100%

Tabla 37. Recidiva vs. expresión de grupo A

Como se deduce de la tabla anterior, **los tumores que pierden expresión de grupo A tienen mayor tendencia a la recidiva (celda 3) que los que no la pierden. A pesar del reducido número de casos en cada apartado, la diferencia es estadísticamente significativa (Chi-cuadrado, significación 0,0402).** Posteriormente se calcularon el riesgo relativo (RR) y el odds ratio (OR), que se resumen en los siguientes cuadros:

Localización	RR	IC 95% inf	IC 95% sup
Celda 1	0,7328	0,5360	1,0166
Celda 2	1,3547	0,9836	1,8657
Celda 3	2,0764	1,0104	4,2670
Celda 4	0,4816	0,2344	0,9897

Localización	OR	IC 95% inf	IC 95% sup
Celda 1	0,3555	0,1290	0,9801
Celda 2	2,8129	1,0203	7,7546
Celda 3	2,8129	1,0203	7,7546
Celda 4	0,3555	0,1290	0,9801

El riesgo relativo de sufrir una recaída si el tumor pierde la expresión de grupo A es 2,07 veces superior que si no la pierde.

4. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA. ESTADIOS PRECOCES

4.1. ANÁLISIS UNIVARIANTE

4.1.1. Supervivencia global de la serie

Para el cálculo de la supervivencia de la serie se han computado como censurados los muertos de causa no tumoral y los no fallecidos por la enfermedad (total casos censurados: 31).

- Estadío I: porcentaje de supervivencia a los 5 años: 71,97% .
- Supervivencia media de todos los pacientes: 97 meses (IC al 95%: 88-105).

4.1.2. supervivencia en función del estadio

- Estadío Ia: porcentaje de supervivencia a los 5 años: 74,12%. Supervivencia media: 90 meses (IC al 95%: 78-102).
- Estadío Ib: porcentaje de supervivencia a los 5 años: 71,30%. Supervivencia media: 95 meses (IC al 95%: 85-105).
- Significación estadística de la diferencia (log Rank): p:0,5677.

4.1.3. supervivencia en función de la histología adenocarcinoma vs. epidermoide

- Epidermoide: supervivencia media: 92 meses. IC al 95%: 83-102.
- Adenocarcinoma: supervivencia media: 97 meses. IC al 95%: 84-105.
- Significación estadística de la diferencia (log Rank): p:0,08.

4.1.4. supervivencia en función de la expresión de marcadores neuroendocrinos

Los únicos resultados estadísticamente significativos son los que se obtienen con la sinaptofisina. Con el resto de marcadores los grupos son reducidos en cuanto al número de casos.

Con la sinaptofisina, los resultados obtenidos se resumen así:

- Supervivencia media de los pacientes sinaptofisina negativos: 103 meses. IC al 95%: 95-112. El porcentaje de supervivencia a los 5 años es del 78,61%.

- Supervivencia media de los pacientes sinaptofisina positivos: 68 meses. IC al 95%: 54-83. El porcentaje de supervivencia a los 5 años es del 52,84%.

Riesgo relativo: 2,5482. Significación estadística de la diferencia, p: 0,0104. IC al 95%: 1,2462-5,2102.

4.1.5. supervivencia en función de la pérdida de expresión de histoantígeno de grupo a.

- La supervivencia media de los pacientes con grupo sanguíneo A que tienen tumores también A positivos es de 78 meses, con un intervalo de confianza al 95%: 69-88. El porcentaje de supervivencia a los 5 años es del 76,25%.
- La supervivencia media de los pacientes A positivos con tumores que han perdido la expresión de grupo A es de 72 meses. El intervalo de confianza al 95% es entre 51 y 92. El porcentaje de supervivencia a los 5 años es del 45,67%.
- **La probabilidad de tener una reducción de la supervivencia cuando el tumor pierde la expresión de grupo sanguíneo A (RR) es 3,1496 veces superior que cuando no la pierde. El intervalo de confianza al 95% está entre 1,2522 y 7,9221. La relación es estadísticamente significativa: p 0,0148.**

4.2. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

En el análisis multivariante de supervivencia (regresión de Cox) se incluyen los siguientes factores: sinaptofisina, edad, Leu-7, cromogranina-A, tipo histológico, tamaño tumoral, pérdida de expresión de grupo A y estadio. Respecto a la supervivencia global y la probabilidad de recidiva, la expresión de sinaptofisina resulta ser un factor pronóstico independiente. No se observan diferencias de supervivencia estadísticamente significativas en función de la expresión de cromogranina o de leu-7 individualmente, así como tampoco en lo que se refiere a la pérdida de expresión de grupo sanguíneo A, si bien este último factor queda próximo a la significación (p 0,0592). Probablemente se alcanzará al aumentar el número de casos, ya que se estudia exclusivamente en los pacientes que pertenecen al grupo A (78 casos):

Variable	RR	p	IC 95%	
			Inferior	Superior
Sinaptofisina	2,9421	0,0062	1,3589	6,3702
Edad	0,9825	0,4306	0,9403	1,0266
Leu-7	2,5571	0,1279	0,7634	8,5647
Cromogranina-A	0,6800	0,5544	0,1894	2,4417
Histología	0,5100	0,0972	0,2312	1,1279
Tamaño tumoral	0,9211	0,4844	0,7316	1,1597
Estadio	1,9498	0,1668	0,7566	5,0247
Pérdida grupo A	2,5039	0,0592	0,9648	6,4979

Tabla 38. Análisis multivariante

5. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES NEUROENDOCRINOS, PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO A Y TAMAÑO TUMORAL

Según lo expuesto, los adenocarcinomas y carcinomas epidermoides pulmonares en estadio Ia y Ib que expresan sinaptofisina o que pierden expresión de grupo A son tumores de mayor grado de agresividad biológica, con mayor riesgo de recidiva y menor supervivencia. Estudiamos la relación que puede existir entre ambas variables, para tratar de establecer si los tumores que expresan sinaptofisina pierden más la expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo, es decir, tratamos de comprobar si estos carcinomas acumulan aberraciones a medida que se desarrollan. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

sinaptofisina		Tumor grupo A		
		negativo	positivo	total
negativo	Recuento	19	33	52
	tumor grupo A	59,4%	71,7%	66,7%
positivo	Recuento	13	13	26
	tumor grupo A	40,6%	28,3%	33,3%
Total	Recuento	32	46	78
	tumor grupo A	100%	100%	100%

Tabla 39. Relación entre SF y expresión de grupo sanguíneo A

En el grupo de pacientes A +, se ha observado que los tumores que pierden expresión de grupo A no expresan sinaptofisina en mayor porcentaje (40,6% frente a 59,4%), luego parece que los tumores no acumulan aberraciones en su desarrollo. La relación no alcanza la significación estadística ($p = 0,330$), probablemente debido al reducido número de casos en cada subgrupo.

De igual forma, hemos tratado de establecer si estos carcinomas son agresivos desde su origen o si adquieren los factores de agresividad con el tiempo de

evolución. Para ello hemos relacionado la expresión de sinaptofisina y la pérdida de grupo A con el tamaño del tumor, de manera que si la agresividad viniera determinada desde el origen del tumor, estos factores serían más frecuentes en tumores de pequeño tamaño y, si adquirieran los factores de agresividad con el desarrollo, serían más frecuentes en tumores más grandes. Se ha comparado estableciendo primero dos grupos de tumores, diferenciando entre tumores mayores y menores de 3 cm. Posteriormente, se han establecido 4 grupos de tamaño que se corresponden con los tamaños de T de la OMS:

		sinaptofisina			
			negativo	positivo	total
tamaño	0-3	Recuento	56	29	85
		%	65,9%	34,1%	100,0%
	>3	Recuento	50	18	68
		%	73,5%	26,5%	100,0%
Total		Recuento	106	47	153
		%	69,3%	30,7%	100,0%

Tabla 40. Relación entre tamaño tumoral y expresión de SF

		sinaptofisina			
			negativo	positivo	total
Tamaño	0-1,9	Recuento	16	12	28
		%	57,1%	42,9%	100,0%
	2-4,9	Recuento	63	29	92
		%	68,5%	31,5%	100,0%
	5-6,9	Recuento	19	4	23
		%	82,6%	17,4%	100,0%
	> 0 = 7	Recuento	8	2	10
		%	80,0%	20,0%	100,0%
Total		Recuento	106	47	153
		%	69,3%	30,7%	100,0%

Tabla 41. Relación entre tamaño tumoral y expresión de SF

		tamaño					
		0-1,9	2-4,9	5-6,9	> 6 = 7	total	
Tumor grupo A	negativo	Recuento	7	19	2	3	31
		% tamaño	50,0%	37,3%	33,3%	50,0%	40,3%
	positivo	Recuento	7	32	4	3	46
		% tamaño	50,0%	62,7%	66,7%	30,0%	59,7%
total		Recuento	14	51	6	6	77
		% tamaño	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 42. Relación entre tamaño tumoral y expresión de grupo A

		tamaño			
		0-3	>3	total	
Tumor grupo A	negativo	Recuento %	16	15	31
		tamaño	40,0%	40,5%	40,3%
	positivo	Recuento %	24	22	46
		tamaño	60,0%	59,5%	59,7%
total		Recuento %	40	37	77
		tamaño	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla 43. Relación entre tamaño tumoral y expresión de grupo A

En ninguno de los casos se alcanza la significación estadística, pero no parece observarse tendencia a acumular rasgos de agresividad conforme aumenta el tamaño del tumor, de lo que puede deducirse que estos carcinomas tienen una agresividad que viene determinada desde el origen tumoral.

CURVAS DE SUPERVIVENCIA

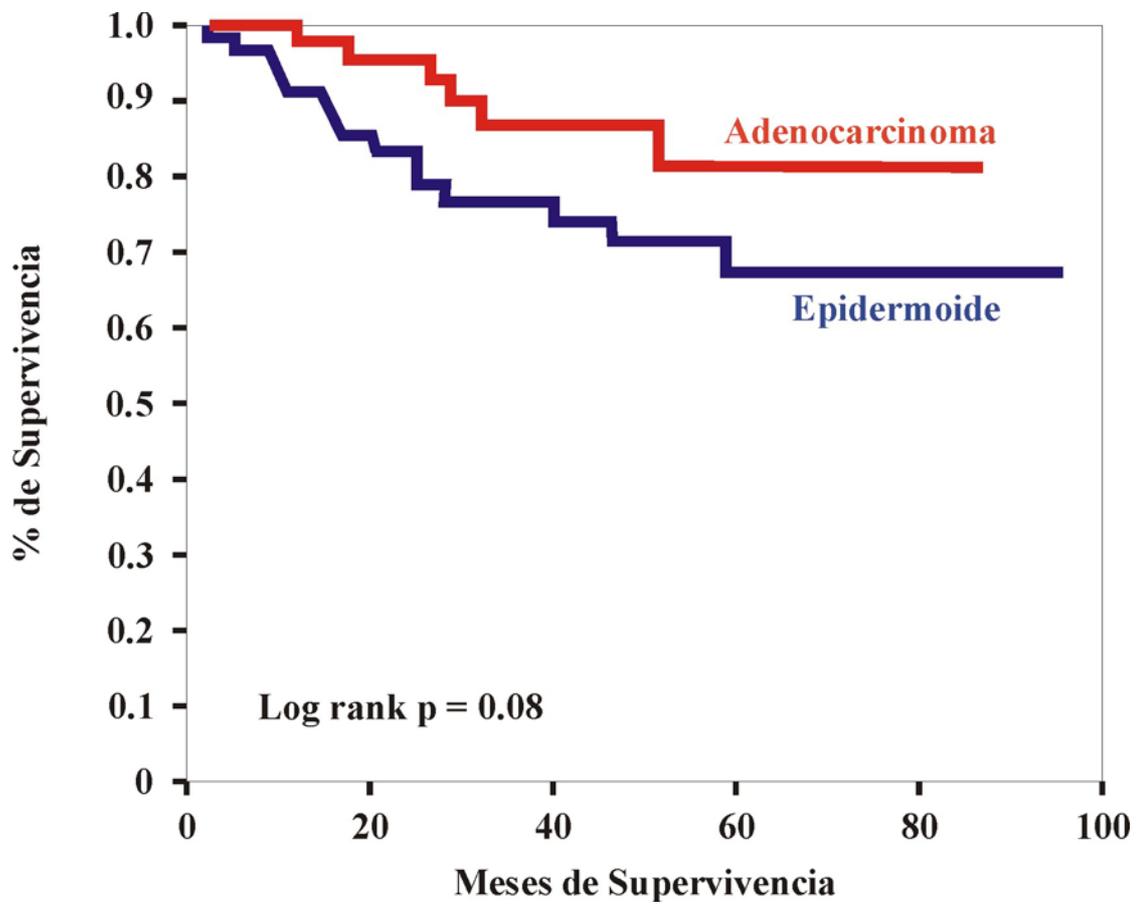


Figura 2. Curva de supervivencia por tipo histológico

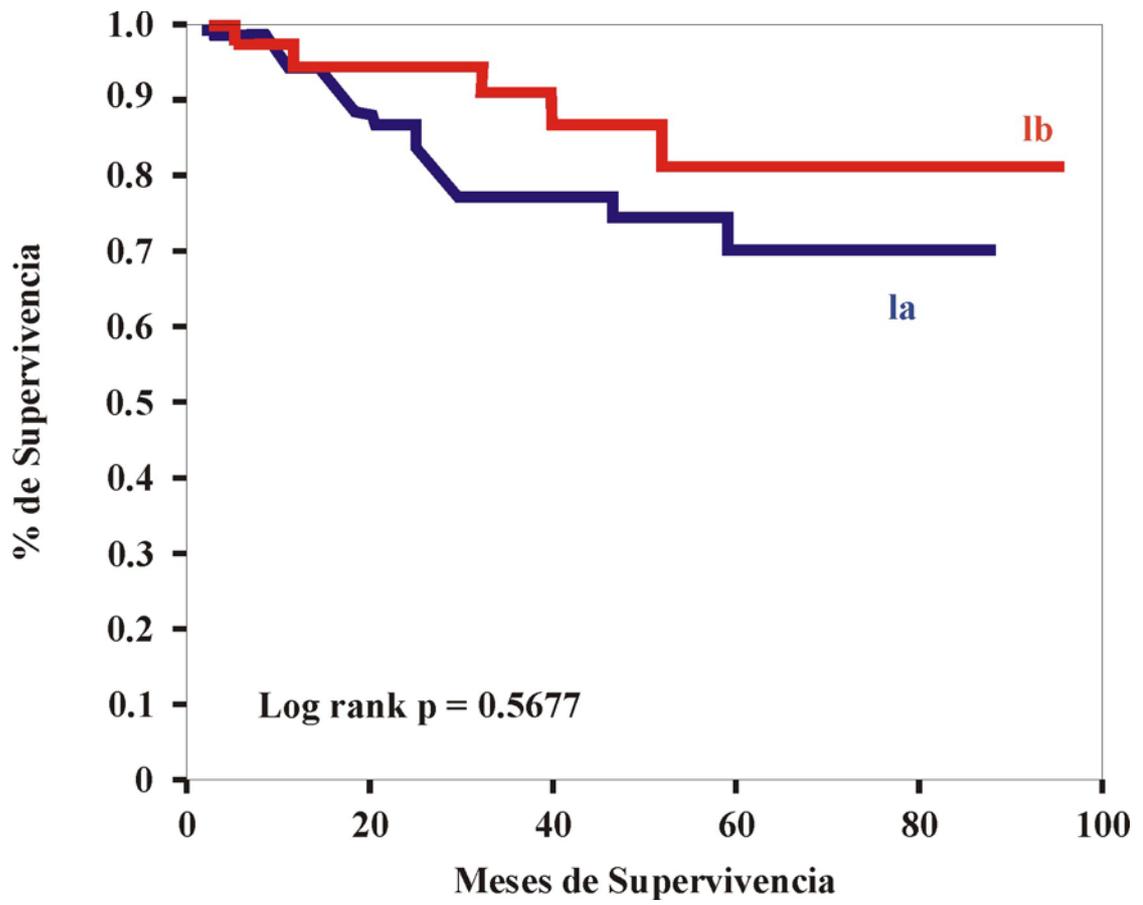


Figura 3. Supervivencia en función del estadio

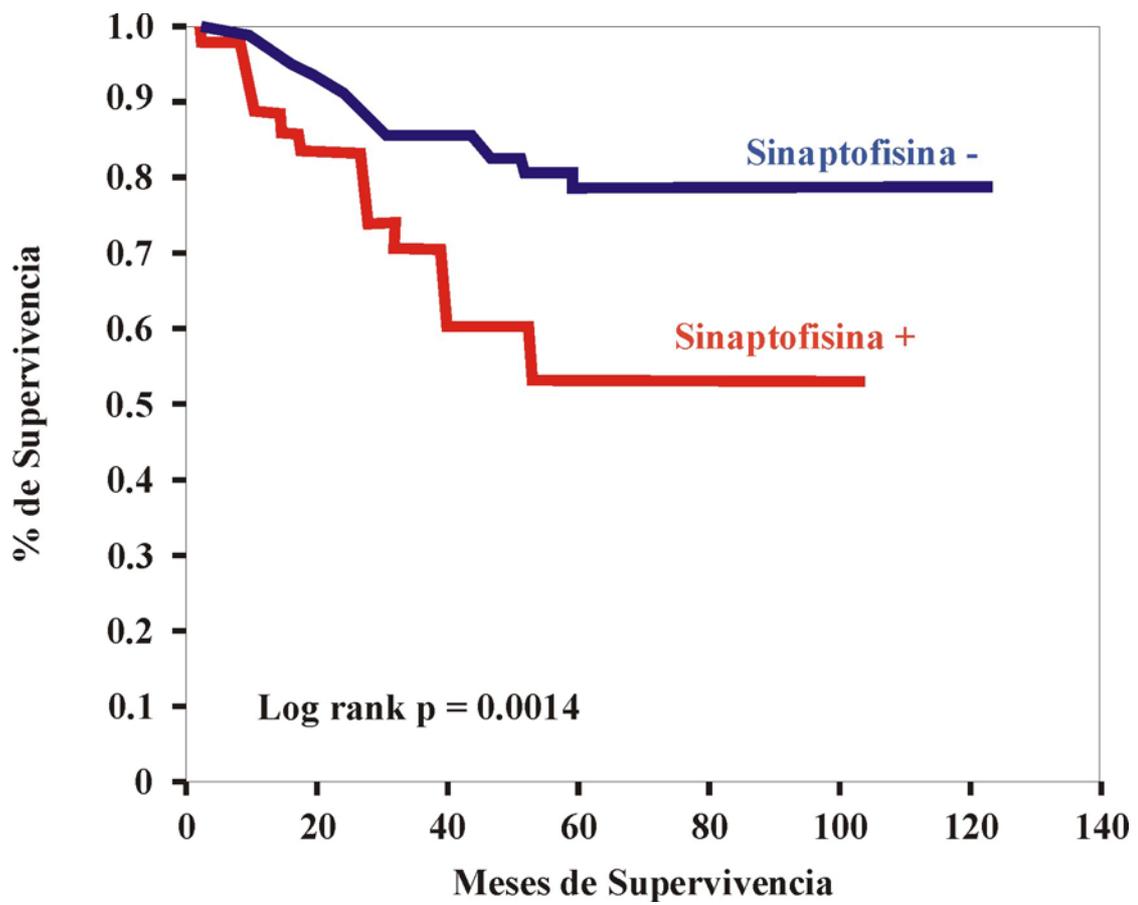


Figura 4. Supervivencia en función de la expresión de Sinaptofisina

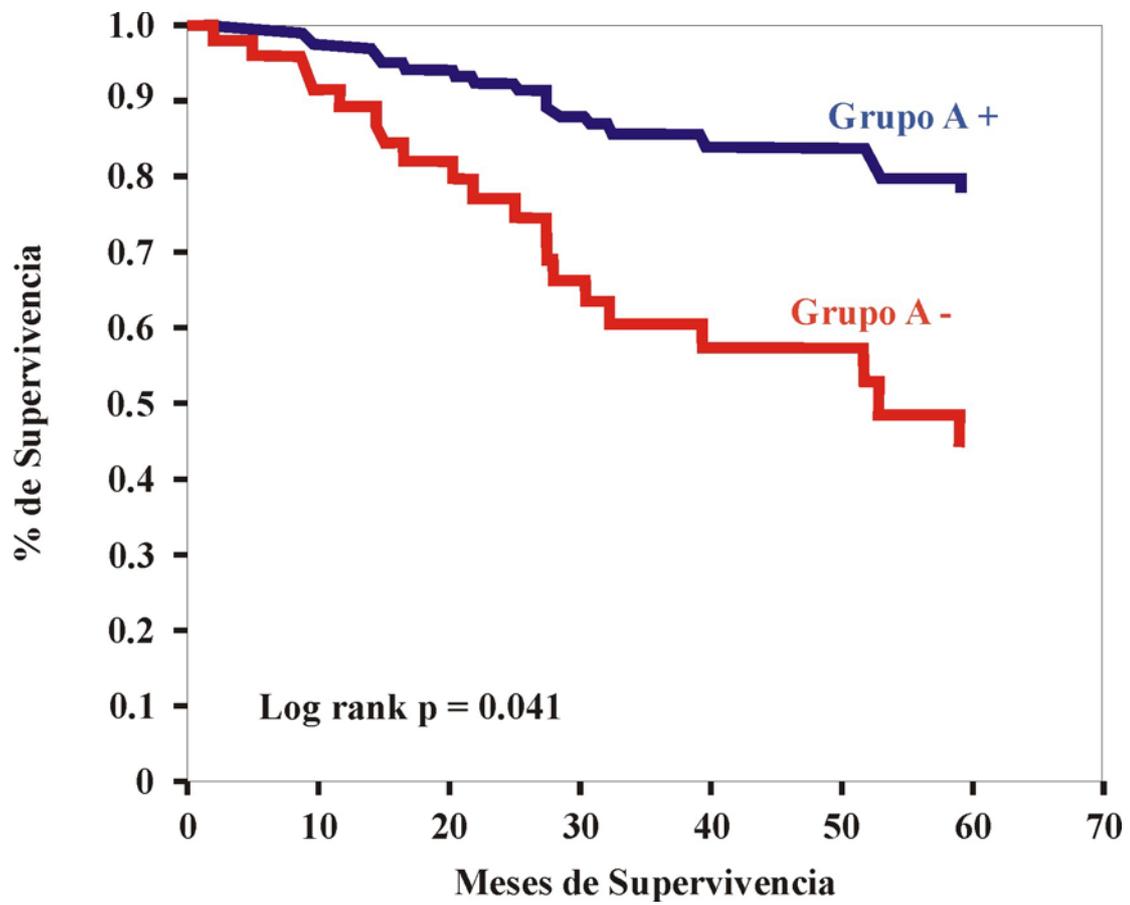


Figura 5. Supervivencia en función de la pérdida de expresión de grupo sanguíneo A

DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA UTILIZADA

La inmunohistoquímica ha sido uno de los avances más significativos en la patología diagnóstica durante la última década. Los estudios inmunohistoquímicos han sido extremadamente útiles en la evaluación de los tumores pobremente diferenciados y en el esclarecimiento de otras patologías en base a sus diferencias antigénicas. El rápido desarrollo de la inmunohistoquímica en el diagnóstico procede, entre otras causas, del descubrimiento de nuevas moléculas del citoesqueleto y de la superficie celular y de la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra ellos, así como del desarrollo de técnicas inmunoenzimáticas de detección sumamente sensibles y que se pueden visualizar al microscopio.

La inmunodetección de antígenos es un proceso en dos pasos que requiere en primer lugar la unión de un anticuerpo al antígeno que queremos demostrar, y en segundo lugar, la detección y visualización del anticuerpo unido, por medio de un sistema de enzimas cromogénicos.

El reactivo común y principal de todas las técnicas inmunohistoquímicas es el anticuerpo. Los antiseros que contienen anticuerpos específicos para un número cada vez mayor de antígenos tisulares con utilidad clínica han aumentado enormemente la cantidad y la calidad del repertorio inmunohistológico.

Para explotar plenamente la utilidad de los métodos inmunohistoquímicos de tinción es necesario un conocimiento previo de los anticuerpos y sus potenciales y también de sus limitaciones.

En nuestro estudio se han utilizado anticuerpos monoclonales excepto en el caso de la sinaptofisina, que es policlonal. Los anticuerpos policlonales son producidos por medio de la inmunización de un animal con un antígeno determinado. Un anticuerpo policlonal reconoce múltiples antígenos diferentes y distintos epitopos del mismo antígeno. Los anticuerpos policlonales son más fáciles de producir y son más sensibles que los monoclonales, sin embargo, hay que tener en cuenta también que: 1) La tinción puede ser inespecífica. 2) Existe cierta tendencia a producir gran tinción de fondo que puede dar lugar a interpretaciones erróneas que aumenten el número de falsos positivos. 3) No se pueden realizar estudios multicéntricos por la gran variabilidad de resultados. Los anticuerpos monoclonales frente a los anticuerpos policlonales se caracterizan por su alta homogeneidad, ausencia de anticuerpos inespecíficos, fácil caracterización y ausencia de variabilidad en los distintos lotes. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales también presentan una serie de inconvenientes: 1) Los métodos de screening de los clones utilizados y de control de calidad deben ser idénticos a los métodos para los cuales el anticuerpo fue diseñado. 2) Muy frecuentemente los anticuerpos monoclonales se caracterizan utilizando tejidos congelados y posteriormente se utilizan en muestras fijadas. 3) El epitopo diana debe sobrevivir a la fijación. En algunos casos, un antígeno puede soportar los efectos de la fijación, por ejemplo en formaldehído, pero el epitopo particular con el que reacciona el anticuerpo monoclonal no. De forma similar la reactividad de un epitopo tras unas condiciones óptimas de fijación no asegura necesariamente su supervivencia bajo condiciones diferentes. 4) El epitopo elegido debe ser único en el antígeno.

Una de las mayores ventajas que ofrecen los anticuerpos monoclonales se perderá si el anticuerpo se utiliza contra un epitopo compartido por dos o más antígenos diferentes.

Las condiciones en las que se realiza la fijación repercuten de manera esencial en el resultado de las técnicas inmunohistoquímicas. El fijador ideal no existe, por lo que a la hora de elegir el fijador para llevar a cabo cualquier tipo de estudio, hay que considerar detenidamente la estructura que queremos demostrar, su localización histológica, celular y anatómica y sus características bioquímicas. Conviene señalar que:

- Los fijadores que actúan por precipitación de proteínas - como los fijadores ácidos de Bouin o Carnoy-, el alcohol etílico y los compuestos a base de metales pesados –como el B5 o el líquido de Zenker-, suelen producir mejores resultados que los fijadores que actúan por reticulación –como el formaldehído- o los que contienen oxidantes, como la solución de Helly (Zenker-formol).
- El tiempo de fijación debe ser el necesario para preservar la imagen histológica: un exceso de fijación reduce la inmunorreactividad de los tejidos.
- El efecto de cada fijador sobre un antígeno puede ser distinto según la localización histológica y anatómica de dicho antígeno.
- En muestras de gran volumen la fijación por inmersión en la solución fijadora proporciona resultados variables en cuanto a la positividad inmunohistoquímica, ya que las zonas periféricas mejor fijadas se teñirán más que las situadas más profundamente.

Este último punto se relaciona con nuestro caso, ya que se incluye generalmente la totalidad del tumor en el fijador.

En cuanto al fijador utilizado, las muestras son fijadas de manera rutinaria en formaldehído e incluidas en parafina. La fijación con formol y posterior procesamiento en parafina da lugar a ciertas dificultades técnicas para la identificación de antígenos **(81)**. El formaldehído disminuye la inmunorreactividad de los antígenos tisulares porque produce reacciones cruzadas entre los grupos aminoterminales de las proteínas que se encuentran fundamentalmente en los residuos de lisina.

La digestión enzimática es útil principalmente para los métodos realizados sobre los tejidos fijados en formaldehído. La pérdida de antigenicidad ocasionada por este fijador puede compensarse de dos formas: o bien utilizando un procedimiento inmunoenzimático de máxima sensibilidad o bien mediante digestión proteolítica con enzimas.

Con el tratamiento enzimático de duración óptima se reduce en gran medida la tinción no específica; en parte, porque se suprimen algunas de las moléculas proteicas responsables de la misma, y en parte porque el aumento de la antigenicidad con esta técnica facilita el uso más diluido de los antisueros.

La digestión enzimática tiene algunos inconvenientes: 1) si es excesiva puede llegar a producir la destrucción del tejido; 2) por digestión del antígeno puede debilitarse la tinción o crear falsos negativos; y 3) la digestión proteolítica excesiva de antígenos tisulares puede desenmascarar fragmentos proteicos comunes de diversos antígenos y, por tanto, incrementar la tinción no específica.

Pero incluso con la ayuda de la tripsina y otras enzimas proteolíticas, el número de anticuerpos primarios útiles está limitado (**52**). Los principales reactivos incluyen anticuerpos que reaccionan con citoqueratinas, proteína S-100 y desmina. Sin embargo, con el advenimiento de la recuperación de antígenos mediante microondas, el número de antígenos detectables en la actualidad en secciones en parafina se ha incrementado.

Este método de recuperación de antígeno está plenamente establecido en todos los Laboratorios de Anatomía Patológica y son muchos los distribuidores que recomiendan este método de desenmascaramiento antigénico en la hoja de datos de sus anticuerpos.

El método de recuperación de antígenos con microondas es el siguiente:

1. Cortar las secciones de parafina y secar a 50-60° durante un mínimo de 1 hora.
2. Tras la desparafinización de los cortes, se inhibe la actividad de peroxidasa endógena con un preparado reciente de peróxido de hidrógeno en metanol al 0,5% durante 10 minutos.
3. Los cortes se lavan abundantemente en agua del grifo, luego se aclaran en agua destilada y se colocan en una jarra de coplin (o un recipiente equivalente) con una solución buffer de citrato sódico 0,1 M (pH 6,0). El recipiente se cubre con un film de plástico (ventilado) y se calienta en el horno microondas de 600 W durante 10 minutos a máxima potencia, parando el proceso únicamente para reponer el líquido perdido por evaporación.

4. Tras el calentamiento, se saca el recipiente del horno y se colocan los cristales en agua destilada. Una vez enfriados se aclaran en una solución salina y se procede a la inmunotinción.

La elección del método de tinción es el segundo punto a tener en cuenta antes de realizar cualquier técnica inmunohistoquímica.

Tradicionalmente los métodos de detección inmunohistoquímica se han clasificado en dos grandes grupos: métodos directos y métodos indirectos.

Métodos directos:

Son los procedimientos más sencillos, de un solo paso; se aplica un anticuerpo específico frente al antígeno que deseamos demostrar. Dicho anticuerpo se halla conjugado con un marcador (fluorocromos o metales electrodenso), el cual, directamente o tras una serie de reacciones histoquímicas se hace "visible" al microscopio.

La ventaja de este método es que la aplicación de una sola incubación con anticuerpo reduce la posibilidad de aparición de uniones específicas; además es una técnica de rápida ejecución. El inconveniente fundamental es que la utilización de anticuerpos conjugados con marcadores podrían alterar la molécula de inmunoglobulina, pudiéndose ver afectadas su afinidad o su especificidad. Otro aspecto negativo es la necesidad de disponer de tantos anticuerpos marcados como antígenos queramos demostrar.

Métodos indirectos:

En ellos se utiliza un primer anticuerpo específico para el antígeno que queremos demostrar y que no se encuentra conjugado con el marcador (aunque en algunas variantes de estos métodos se encuentra conjugado con diversas sustancias, con el fin de poder prolongar la cadena de enlaces específicos entre el antígeno y el marcador), por lo que debemos utilizar un segundo anticuerpo (inmunoglobulina) desarrollado en un animal de diferente especie que el primer anticuerpo, frente al primer anticuerpo. El segundo anticuerpo puede estar marcado o no; e este último caso se prolonga la cadena utilizando un nuevo anticuerpo, desarrollado de la misma especie animal que el primero, el cual nos permitirá alcanzar el último eslabón, es decir, el marcador.

Los métodos indirectos son más sensibles que los directos, y no se requiere disponer de una batería de anticuerpos primarios marcados. Sin embargo, la aplicación de diferentes anticuerpos en una misma técnica aumenta el riesgo de uniones inespecíficas y además son más laboriosos.

Dentro de los procedimientos indirectos, y partiendo de la forma más simple (dos capas de anticuerpo), se han descrito diversas variantes, debiendo elegir en cada caso el procedimiento más idóneo.

En nuestro trabajo hemos utilizado dos métodos indirectos en tres pasos: el ABC y el B-SA.

El método de detección por medio del complejo Avidina-Biotina (ABC) es un procedimiento muy sensible que se basa en la elevada afinidad que poseen entre sí las moléculas de biotina y las de avidina, de forma que se genera un fuerte enlace no inmune.

La avidina es una glicoproteína de Pm 68.000 con una gran afinidad por la molécula de la vitamina Biotina **(9)**. Puesto que esta afinidad es más de un millón de veces superior que la de los anticuerpos por muchos antígenos, la unión de la Avidina a la Biotina es esencialmente irreversible.

Además de la elevada afinidad, el sistema ABC se puede utilizar con gran efectividad debido a que los 4 sitios de unión que presenta la avidina para la biotina y otras proteínas (que incluyen anticuerpos y enzimas) pueden conjugarse con distintas moléculas de biotina.

Este método fue introducido en 1981 para localizar una gama de antígenos histológicamente significativos y otros marcadores de interés biológico **(45,51)**.

La técnica emplea anticuerpos primarios no marcados, seguidos de un anticuerpo secundario biotinado y en un tercer paso utiliza un complejo macromolecular preformado con avidina y peroxidasa de rábano picante biotinada. La elevada sensibilidad y los cortos tiempos de incubación que se requieren se podrían atribuir al número de moléculas activas de peroxidasa asociadas al complejo y a la rápida e irreversible interacción de dicho complejo con el anticuerpo biotinado.

La escasa tinción de fondo que proporciona el sistema se debe probablemente a las elevadas diluciones del antisuero primario y los demás reactivos utilizados en el método.

A diferencia de la técnica PAP (peroxidasa-antiperoxidasa), la cual requiere el uso de anticuerpos peroxidasa-antiperoxidasa obtenidos de diferentes especies, el método ABC utiliza un anticuerpo secundario biotinado general y un complejo avidina-peroxidasa universal **(50)**. Este hecho es importante ya que los anticuerpos antiperoxidasa obtenidos de distintas especies no están siempre disponibles. Además,

en la técnica PAP, el anticuerpo "puente" o de "unión" debe presentar al menos uno de sus dos sitios de unión al anticuerpo disponible para reaccionar con el complejo PAP, por lo que se requiere un exceso de este reactivo para obtener la máxima sensibilidad. Puesto que la biotina unida al anticuerpo secundario sirve como "puente" en la técnica ABC, se necesita mucha menos cantidad de anticuerpo y además, a diferencia de la unión antígeno-anticuerpo, la unión Avidina-Biotina es irreversible.

El segundo sistema de detección utilizado en nuestro estudio es el B-SA (sistema Biotina-Streptavidina amplificado). Este sistema es una modificación del método anterior (ABC), utilizando la streptavidina como sustituto de la Avidina. Esta sustitución presenta las siguientes ventajas: 1.- La Streptavidina no contiene hidratos de carbono que podrían unirse inespecíficamente a sustancias semejantes a lectinas que se pueden encontrar en tejidos normales como riñón, hígado, cerebro o células gigantes (3, 24). 2.- El punto isoeléctrico de la Streptavidina está próximo a la neutralidad, mientras que la Avidina tiene un punto isoeléctrico de 10; como consecuencia, los conjugados de Streptavidina no exhibirían los efectos de las uniones inespecíficas características de los conjugados de Avidina, los cuales presentan cargas positivas en condiciones fisiológicas (10, 86). Además, en el sistema B-SA la enzima está directamente conjugada con la Streptavidina, lo que da como resultado un reactivo más estable (con una vida media que sobrepasa el año) en contraste con el sistema ABC que debe prepararse inmediatamente antes del uso.

El sistema utilizado en nuestro trabajo (StraviGen Super sensitive detection System; Laboratorios BioGenex; 4600 Norris Canyon Road, San Ramón CA 94583) utiliza un anticuerpo puente modificado de tal forma que permite la unión de un

mayor número de moléculas de biotina sin que esto afecte a la afinidad de unión; por otra parte el procedimiento de conjugación de la enzima marcadora a la streptavidina permite el máximo marcaje de dicha molécula con varias enzimas. El efecto combinado de estos dos hechos incrementa notablemente la señal generada por la unión antígeno-anticuerpo con respecto a cualquier otro sistema indirecto de detección.

Para una máxima sensibilidad se prefiere utilizar como enzima marcadora la Fosfatasa Alcalina a la peroxidasa, ya que los sustratos utilizados con la primera tienen un turnover y un coeficiente de extinción mayor **(111)**.

Los sistemas de revelado son el último paso en cualquier técnica inmunohistoquímica.

El revelado de la peroxidasa se lleva a cabo mediante la producción de un precipitado insoluble local, por acción de la enzima con su sustrato, el peróxido de oxígeno, para formar un complejo PR-H₂O, el cual reacciona sobre una sustancia, el cromógeno, capaz de ceder electrones, originándose una molécula coloreada, que es el precipitado observado al microscopio. Completado el ciclo, de nuevo la peroxidasa reacciona con más sustrato, produciendo de nuevo precipitado coloreado, amplificándose así la reacción.

Como cromógeno se pueden utilizar distintas sustancias; en nuestro trabajo hemos utilizado la Diaminobencidina (DAB).

En el método de tinción de la Fosfatasa alcalina, la enzima hidroliza los ésteres de naftol fosfato (sustrato) a compuestos fenólicos y fosfatos. Los compuestos fenólicos se unen a sales de diazonio incoloras (cromógenos) para dar lugar a estructuras azo insolubles y coloreadas.

En conclusión, en nuestro trabajo se han empleado condiciones uniformes de fijación (muestras de volumen similar sometidas a un tiempo de fijación controlado) y técnica (procesamiento del tejido, procedimientos inmunohistoquímicos) en todos los casos, por lo que los resultados obtenidos son fiables y solo comparables a estudios realizados en condiciones similares.

2. EL VALOR DE LA REALIZACIÓN DE TÉCNICAS IHQ PARA LA DETECCIÓN DE RASGOS NEUROENDOCRINOS EN CARCINOMAS PULMONARES NO MICROCÍTICOS

El cáncer de pulmón es uno de los tumores malignos más frecuentes y está considerado como una de las principales causas de mortalidad por neoplasias malignas en el mundo. Comprende un grupo heterogéneo de tumores con diferentes morfologías, fenotipos inmunohistoquímicos y comportamiento biológico.

La diferencia de comportamiento entre tumores microcíticos y no microcíticos está bien establecida. El carcinoma microcítico clásico es un tumor quimiosensible, que se caracteriza en microscopía electrónica por la presencia de gránulos densos citoplasmáticos característicos de la secreción neuroendocrina y en la IHQ por la expresión de varias hormonas, neuropéptidos y marcadores específicos de superficie celular (113).

Se ha observado, sin embargo, que líneas celulares de tumores no microcíticos pueden expresar rasgos neuroendocrinos in vitro (44,27,51). Estos

hallazgos han sido confirmados posteriormente en material procedente de biopsia (59,71).

Esto supone un descubrimiento interesante en cuanto a la histogénesis y el comportamiento biológico de estos tumores, pero existe además evidencia de que los tumores pulmonares no microcíticos con diferenciación NE parecen tener mejor respuesta a la quimioterapia (38,39,40).

Disponemos básicamente de tres herramientas para el diagnóstico de la diferenciación neuroendocrina en los tumores:

1. **Métodos histoquímicos.** Se han utilizado dos tinciones de plata para la detección de la diferenciación neuroendocrina: el método de tinción de Grimelius, que se basa en la argirofilia de las células con gránulos neuroendocrinos (se tiñen con plata metálica tras añadir un agente reductor exógeno) (71); y el método de Masson-Fontana, que se basa en la capacidad de estas células para reducir el nitrato amoniacal de plata (reacción argentafin) (23). Muchos tumores neuroendocrinos bien diferenciados son positivos con una o ambas técnicas. Sin embargo, cuando el número de gránulos neuroendocrinos que posee el tumor es pequeño (como ocurre en el caso de los tumores no microcíticos), estas técnicas no son capaces de detectarlos.

2. **Métodos inmunohistoquímicos.** Aparte de las dificultades técnicas y de los errores que pueden producirse en su interpretación (como los falsos positivos o la tinción inespecífica), la inmunohistoquímica tiene la ventaja de que puede aplicarse en material de biopsia de forma rutinaria. Los marcadores NE más comúnmente utilizados y que se distribuyen comercialmente son la cromogranina-A (crA), el Leu-

7, la enolasa neural específica (ENS) y la sinaptofisina (SF). La **Cr-A** se ha descrito como el marcador inmunohistoquímico universal para células neuroendocrinas que contienen gránulos neurosecretorios, incluyendo las de la médula adrenal, células C tiroideas, páncreas endocrino y tubo digestivo (20). El **Leu-7** es un antígeno expresado por una subpoblación de linfocitos, tejido nervioso y por la mayoría de células neuroendocrinas y las neoplasias que derivan de ellas. La **enolasa neural específica** se describió como el marcador más específico de tejido nervioso, si bien se ha comprobado después que reacciona también con células normales y neoplásicas del sistema neuroendocrino difuso. Por último, la sinaptofisina se expresa de forma variable por distintos tipos de tumores neuroendocrinos. Aparte de estos marcadores neuroendocrinos generales, se han detectado un gran número de hormonas y neuropéptidos que son expresados por carcinoides y microcíticos y, en menor medida, por carcinomas pulmonares no microcíticos (59). Los productos NE específicos incluyen sustancias eutópicas (que se encuentran también en tejido pulmonar normal) como bombesina, calcitonina y serotonina, y sustancias ectópicas como ACTH, vasopresina y neurotensina. La expresión de estos productos por parte de los tumores pulmonares es muy variable. Se debe realizar un panel que incluya a la mayoría de ellos, ya que más del 95% de los tumores se clasifican correctamente si se estudian los índices de positividad (con intensidad de tinción y porcentaje de células marcadas) para al menos tres de estos marcadores.

Algunos autores han propuesto el panel de anticuerpos que debe utilizarse, considerando neuroendocrinos aquellos tumores con positividad para 2 o más (32). El panel propuesto varía según los autores. Los más importantes en este campo son

Kiriakogiani, Linnoila, Loy y Jensen (59, 70, 65, 72). Los resultados de sus trabajos serán expuestos posteriormente.

Conviene señalar que la positividad de los tumores puede ser focal o parcheada, considerándose positivo cuando al menos un 5% del total de las células tumorales lo son. De ahí que se haya propuesto la hibridación in situ para mRNA de péptidos hormonalmente activos como el método más sensible de detección, pero hay que tener en cuenta que es un procedimiento excesivamente costoso sobre todo aplicado a grandes series quirúrgicas (8). El hecho de que la positividad sea parcheada invalida la utilización del material procedente de biopsia endoscópica para la realización de estos estudio, porque imposibilita un adecuado muestreo de la pieza y la selección de las zonas para la realización de la técnica inmunohistoquímica, de forma que se puede incrementar el número de casos falsamente negativos.

3. **Microscopía electrónica.** Con frecuencia la detección ultraestructural de diferenciación en los tumores es posible en aquellos casos que se diagnostican como indiferenciados mediante microscopía óptica convencional. En el caso de las neoplasias pulmonares, la microscopía electrónica es superior a la óptica en lo que se refiere a la detección de diferenciación, por su mayor poder de resolución, y además resulta un procedimiento más económico si para la detección de la diferenciación NE se requieren más de dos anticuerpos (42, 83). Las células neuroendocrinas y los tumores que derivan de ellas se caracterizan por la presencia en su citoplasma de gránulos secretores que son en general fácilmente identificables por su tamaño y morfología ultraestructural (la definición clásica consiste en gránulos ovalados de núcleo denso, halo claro periférico y rodeados de membrana, con tamaño variable

entre 50 y 450 nm). Este punto tiene valor en el diagnóstico de los tumores, sobre todo cuando la histología no permite identificar morfología neuroendocrina y cuando la inmunohistoquímica tampoco demuestra positividad para marcadores neuroendocrinos.

Posteriormente (apartado IV) se discutirán ampliamente las características ultraestructurales de los tumores endocrinos y no microcíticos con rasgos de diferenciación neuroendocrina.

3. PAPEL DE LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA EN LA VALORACIÓN DE LOS CARCINOMAS PULMONARES. HETEROGENEIDAD ULTRAESTRUCTURAL DE ESTOS TUMORES

La microscopía electrónica ha incrementado su reconocimiento en las últimas décadas como herramienta útil en la tipificación histológica de numerosos tumores (28, 29, 30, 47, 49, 94, 98). Se puede llegar a la identificación de diferenciación en tumores que son “indiferenciados” con microscopía óptica gracias al mayor poder de resolución de esta técnica. Resulta especialmente útil en los carcinomas pulmonares, ya que su gran heterogeneidad histológica hace difícil en ocasiones su tipificación. Así, conocer las características ultraestructurales de los carcinomas pulmonares permite disminuir el tamaño del grupo de carcinomas diagnosticados como indiferenciados de célula grande u otros indiferenciados.

Carcinomas epidermoides: los carcinomas epidermoides pueden mostrar grados variables de diferenciación, pero por definición presentan áreas de queratinización o uniones intercelulares “peculiares” (desmosoma pentalaminar).

Ultraestructuralmente, los carcinomas epidermoides bien diferenciados tienen en la superficie celular microvellosidades cortas que están orientadas en un ángulo de 45° aproximadamente con respecto a la membrana, y que no se asocian con ninguna red filamentosa terminal en el citoplasma celular subyacente. Sí presentan numerosos desmosomas que conectan estos procesos unos con otros, de forma similar a lo que ocurre en la epidermis. La característica citoplasmática principal de estos tumores es la presencia de haces de tonofilamentos que con frecuencia se insertan en los desmosomas.

Por otra parte, en los carcinomas epidermoides moderada o pobremente diferenciados, las células expresan menor cantidad de microvellosidades (o no las expresan en absoluto), y cuando lo hacen muestran menos uniones desmosómicas. También contienen menor cantidad de tonofilamentos.

Adenocarcinomas: ultraestructuralmente muestran gran variabilidad y un amplio espectro de diferenciación. La mayoría de los adenocarcinomas están compuestos por células de núcleo grande, con nucleolo prominente y citoplasmas amplios, redondeados, ovalados o de morfología cuboidea o poligonal. Se suelen organizar en ductos o glándulas, conectándose unas a otras mediante complejos de unión intercelulares.

Estas células poseen microvellosidades en la superficie de membrana que son relativamente cortas y se proyectan hacia la luz glandular. Suelen estar rodeadas de un glicocálix difuso.

El citoplasma contiene numerosos orgánulos, entre los que cabe destacar abundante RER, un aparato de Golgi prominente y un grado variable de vesículas, vacuolas y gránulos de secreción.

Existen estudios recientes que han subdividido los adenocarcinomas en tres categorías, en virtud de los hallazgos ultraestructurales (27, 112):

- **Adenocarcinomas de células mucosas:** compuestos por células que contienen gran cantidad de gránulos mucosectores, con abundante RER y un aparato de Golgi prominente. Estas células contienen numerosos filamentos intermedios e incluso haces de tonofilamentos.
- **Adenocarcinomas de células de Clara:** están compuestos por células columnares en forma “de chincheta”, con núcleos convolutos de gran tamaño y nucleolo prominente. En su citoplasma se observa gran cantidad de REL (sobre todo en la porción apical de la célula), glucógeno y un número variable de gránulos apicales electrón-densos.
- **Adenocarcinomas de origen en neumocitos tipo II:** células de morfología columnar o acampanada, de núcleos grandes e irregulares, con nucleolo prominente y citoplasmas que contienen cuerpos lamelares (hay que hacer diagnóstico diferencial de estas estructuras con lisosomas secundarios degenerados) y multivesiculares. Las células de este tipo de

tumor pueden desarrollar inclusiones intranucleares, que les da un aspecto en “vidrio esmerilado” en microscopía óptica. Ultraestructuralmente se corresponden con inclusiones tubulares complejas que surgen a partir de la membrana nuclear interna (41).

Carcinomas indiferenciados de célula grande: constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias, la mayor parte de las cuales muestran rasgos de diferenciación epitelial (glandular o escamosa). Cuando se estudian ultraestructuralmente, aproximadamente el 50% se clasifican como adenocarcinomas, el 15% como carcinomas adenoescamosos y el 11% como carcinomas epidermoides (106). El porcentaje de incidencia de diagnóstico de carcinoma indiferenciado de célula grande (aproximadamente 19%, según series) se reduciría si se estudiaran más bloques de tejido mediante microscopía óptica y electrónica. Así, la presencia de gránulos secretorios (algunos de los cuales pueden ser identificados como gránulos de células de Clara), de retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, pequeños espacios intercelulares y espacios intracitoplásmicos que contienen microvellosidades deben considerarse rasgos de diferenciación hacia células glandulares. Por otro lado, la presencia de desmosomas relativamente bien desarrollados con tonofibrillas asociadas hace patente su diferenciación escamosa.

Carcinomas microcíticos: los carcinomas microcíticos, al igual que los indiferenciados de célula grande, son un grupo heterogéneo de neoplasias, aunque la mayoría son de origen neuroendocrino (41,42). Por lo tanto, la característica mas

importante de estos tumores es el hallazgo de gránulos secretorios rodeados de membrana (en el siguiente apartado se discutirá más ampliamente su morfología). El resto de orgánulos están pobremente desarrollados, pero pueden presentar escaso número de tonofibrillas asociadas a la existencia ocasional de desmosomas. De forma poco frecuente algunas células pueden formar pequeños espacios glandulares e incluso pueden verse microvellosidades y complejos de unión.

En nuestro trabajo se han subclasificado siete tumores con diagnóstico mediante microscopía óptica de carcinoma indiferenciado de célula grande en carcinoma epidermoide (4 casos) o adenocarcinomas (3 casos). También hemos observado 7 casos de adenocarcinomas con cuerpos lamelares indicativos de diferenciación tipo neumocito tipo II, y la existencia de luces intracelulares en un carcinoma epidermoide, que se incluyó en el grupo de los tumores mixtos.

Hammar (41, 42) ha demostrado que aproximadamente el 80% de los carcinomas indiferenciados de célula grande son en realidad adenocarcinomas ultraestructuralmente, siendo el resto carcinomas epidermoides y carcinomas neuroendocrinos de célula grande. Este autor también señala el hecho de que los estudios con inmunohistoquímica no siempre son efectivos para la subclasificación de los carcinomas indiferenciados de célula grande, ya que tanto los epidermoides como los adenocarcinomas pueden expresar citoqueratinas de alto y bajo peso molecular y generalmente también CEA y EMA.

Sin embargo, la técnica requiere la utilización de porciones muy pequeñas del tumor, por lo que algunos autores se han planteado si los resultados son representativos (83). El fenómeno de heterogeneidad histológica en los carcinomas pulmonares hace que coexistan diferentes subtipos histológicos en distintas zonas de

la misma neoplasia. Según el muestreo y los criterios de heterogeneidad utilizados, los tumores heterogéneos constituyen entre el 13% y el 66% del total **(49, 98)**.

De cualquier modo, la heterogeneidad de expresión de diferentes antígenos relacionados con la diferenciación es un hallazgo constante en estos tumores e incluso se ha llegado a afirmar que, basándose en hallazgos inmunohistoquímicos y ultraestructurales, todos los tumores pulmonares son heterogéneos **(22)**.

Sin embargo, el término “heterogéneo” se ha empleado en diferentes contextos:

- Algunos autores se refieren a él para expresar la presencia de más de un tipo de diferenciación celular en el mismo tumor **(29, 30)**.
- Otros, para indicar diferencias entre áreas distintas dentro de un tumor en concreto **(47, 98)**.
- Y otros (OMS) para hablar de las diferencias entre los tumores del mismo subtipo **(14, 112)**.

El problema del muestreo en anatomía patológica es consecuencia directa del segundo de los puntos mencionados anteriormente.

Se ha observado que, en tumores homogéneos, la posibilidad de que dos preparaciones distintas del mismo tumor muestren el mismo tipo de diferenciación predominante es del 90%. Sin embargo, cuando el tumor no es homogéneo y se observa más de un tipo de diferenciación en el mismo corte histológico, la probabilidad de que otra preparación obtenida de otra zona del tumor muestre el mismo tipo de diferenciación predominante cae al 55%.

Como conclusión, cabe decir que la tipificación ultraestructural de un tumor pulmonar cuando se utilizan preparaciones obtenidas de áreas del tumor suficientemente alejadas entre sí rinde un resultado consistente y fiable en aproximadamente 1/3 de los casos.

De particular interés desde el punto de vista diagnóstico es asegurar la presencia o ausencia de gránulos neuroendocrinos en los tumores pulmonares (84). La heterogeneidad a este respecto es, sin embargo, mucho menor. El mayor problema es determinar con seguridad la naturaleza de los gránulos intracitoplasmáticos observados. Hay que tener en cuenta que, incluso en tejido tumoral bien preservado, puede resultar imposible determinar si el tumor tiene o no gránulos NE. Los gránulos NE están presentes en células normales del sistema neuroendocrino difuso, así como en las neoplasias que derivan de ellas (28). Estos gránulos pueden identificarse por cuatro métodos:

1. Microscopía electrónica de transmisión. Como técnica de rutina.
2. Técnicas de citoquímica ultraestructural. Por medio de la reacción uranafin, los gránulos neuroendocrinos se tiñen de negro en virtud de su contenido en polifosfatos y /o nucleótidos. Permite el diagnóstico diferencial con otros gránulos (por ejemplo, lisosomas).
3. Técnicas de inmunohistoquímica.
4. Antisueros específicos.

La inmunohistoquímica y la microscopía electrónica son técnicas potentes para la identificación de la diferenciación neuroendocrina, ambas con ventajas y desventajas.

TÉCNICA	VENTAJAS	DESVENTAJAS
INMUNOHISTOQUÍMICA	Rapidez. Utilidad en clínica. Más económica.	Dificultad de interpretación en casos focalmente positivos. Variabilidad de resultados por dificultades técnicas.
M. ELECTRONICA	Alta sensibilidad y especificidad en tumores pobremente diferenciados (que aumenta con la citoquímica ultraestructural)	Costosa. Mayor lentitud. Errores de muestreo.

4. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA IHQ FRENTE A LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA LA DETECCIÓN DE RASGOS NE EN ESTOS TUMORES

El diagnóstico de los tumores neuroendocrinos por medio de la microscopía electrónica se basa en el reconocimiento del elemento más característico de estos tumores: el gránulo neurosecretor (44), que es un gránulo denso (secretor de polipéptidos neuroendocrinos) localizado en el citoplasma de las células tumorales o ligado a la membrana citoplasmática, ya que este hallazgo coincide con el concepto original de célula neuroendocrina. El tamaño de estos gránulos oscila entre 50 y 450 nm. Dentro de un mismo tumor, el tamaño y la morfología de los mismos es bastante

uniforme. Es de principal importancia, pues, definir la morfología de estos gránulos.

Sin embargo, no existe una característica que defina con exactitud la presencia de diferenciación neuroendocrina en tumores pulmonares no microcíticos y no neuroendocrinos. Utilizando el mismo criterio, consideramos diferenciación neuroendocrina la existencia de este tipo de gránulos en el citoplasma de las células de estos carcinomas. En estos tumores debemos tener en cuenta que la morfología de éstos puede estar modificada.

Numerosos estudios (42, 43, 44, 30, 94) han demostrado el amplio espectro de variaciones morfológicas que presentan según el órgano o el tumor del que proceden. Existe un rango establecido de las formas ultraestructurales de los gránulos neurosecretorios más comunes. Dentro de los tumores neuroendocrinos, el tamaño y la morfología suele ser uniforme, y además son fácilmente distinguibles de otros gránulos secretorios de naturaleza diferente (por ejemplo, los gránulos de secreción mucosos y serosos), principalmente por el tamaño y la morfología ultraestructural (ver más adelante el diagnóstico diferencial de los gránulos).

Existen también gránulos neurosecretorios con morfología característica, de forma que pueden por sí mismos identificar un tipo celular o un tumor, como los gránulos de insulina del insulinoma o los de noradrenalina del feocromocitoma (30).

Los carcinomas microcíticos pulmonares presentan gránulos aunque no siempre en cantidad elevada y son pequeños y redondeados, con una zona central muy densa, un halo periférico más claro y un tamaño que varía entre 50 y 70 nm. Estos gránulos se localizan en la periferia del citoplasma de las células tumorales o en el interior de procesos celulares. Los carcinomas, al contrario que los tumores neuroendocrinos de bajo grado como los carcinoides, poseen unos gránulos que

carecen de cualquier característica ultraestructural que permita identificar su producto de secreción. Los carcinomas con rasgos neuroendocrinos poseen además otros rasgos ultraestructurales propios de carcinomas, como la presencia de desmosomas y uniones tipo ocludens **(30)**.

En general, los tumores de menor grado de diferenciación contienen gránulos de menor tamaño y en menor cantidad que los bien diferenciados. El resto de orgánulos de secreción citoplasmáticos (Golgi, retículo endoplásmico rugoso) están igualmente disminuidos.

Históricamente se consideraba que todas las células neuroendocrinas se originaban en la cresta neural **(20)**, pero en la actualidad se considera que **(30)**: 1) algunas células neuroendocrinas (por ejemplo melanocitos, células de Merckel, células C del tiroides, células de la médula adrenal y células de los paraganglios) tienen efectivamente su origen en la cresta neural; 2) otras (por ejemplo células de la glándula pineal, adenohipófisis e hipotálamo) derivan del tubo neural y 3) finalmente, las hay (células neuroendocrinas bronquiales, tracto gastrointestinal, páncreas y paratiroides) que provienen de lo que Pearse y Takor **(88)** denominaron “ectodermo neuroendocrino-programado”, aunque también se acepta para ellas un origen endodérmico, igual que las células epiteliales bronquiales o intestinales.

En el pasado, a las células neuroendocrinas se les ha dado múltiples nombres, dependiendo de su localización y de su afinidad tintorial. Así, se hablaba de células argentafines, células argirófilas y células cromafínicas. Los tumores derivados de ellas incluyen: carcinoides, tumores de los islotes y otros tumores pancreáticos endocrinos, adenomas de pituitaria, adenomas paratiroides, carcinomas medulares de tiroides, feocromocitomas y quemodectomas. Por lo tanto, el término de tumor

neuroendocrino engloba neoplasias muy diversas. La microscopía electrónica es de gran utilidad en el diagnóstico de certeza de estos tumores, especialmente cuando fallan la microscopía óptica y la inmunohistoquímica, probablemente por el escaso número de gránulos que presentan algunos de ellos. De hecho, los conceptos con respecto a la histogénesis de algunas neoplasias han cambiado gracias a los estudios ultraestructurales (30). Por ejemplo, sabemos que el carcinoma medular de tiroides es un carcinoma neuroendocrino de células C que produce calcitonina (55), y que el carcinoma microcítico pulmonar es un carcinoma neuroendocrino con comportamiento y pronóstico diferente al del resto de carcinomas pulmonares. Esto ha sido posible gracias a que estos tumores contienen gránulos fácilmente identificables, entre los que cabe destacar:

- Gránulos de morfología redondeada, uniformemente electrón-densos, con un tamaño que oscila entre 100 y 250 nm. Es especialmente importante la uniformidad de densidad.
- Gránulos de centro más denso con halo claro periférico estrecho, cuyo tamaño está entre 100 y 250 nm.
- Gránulos uniformemente electrón-densos, sin halo claro, de mayor tamaño: entre 200 y 400 nm.
- Uniformemente electrón-densos, de morfología más pleomórfica: redondeados, elongados, ovalados, en forma de “campana” o de “pera”.
- Gránulos “electro-lúcidos” que contienen un centro denso cristalino (gránulos de insulina o de las células beta).

- Gránulos “electro-lúcidos” de tamaño grande (entre 200 y 450 nm) con centro denso desplazado a la periferia (gránulos de noradrenalina).
- Gránulos de células de Clara.

No siempre resulta sencillo identificar la naturaleza neuroendocrina de los gránulos intracitoplasmáticos, lo que obliga a establecer el diagnóstico diferencial con las siguientes estructuras:

- Lisosomas. Los gránulos neuroendocrinos presentan mínimas variaciones en el tamaño y en la forma, mientras que los lisosomas tienden a ser más pleomórficos, tanto en el tamaño como en su densidad.
- Gotas lipídicas “osmiófilas”. No suelen estar rodeadas de membrana y su textura es diferente. Son también más variables en cuanto a su tamaño.
- Gránulos de secreción serosos. Son también electrón-densos y muy homogéneos, sin embargo son mucho más numerosos, pudiendo ocupar gran parte del citoplasma celular, de mayor tamaño y con mayor variación en el tamaño y en la forma.

Si el número de gránulos neuroendocrinos presentes en el tumor es abundante, su diagnóstico no suele plantear problemas. Pero cuando existen muy pocos, puede resultar imposible el diagnóstico diferencial con cualquiera de las estructuras mencionadas anteriormente, debiendo realizarse en este caso técnicas de inmunohistoquímica o de citoquímica estructural (reacción uranafin). Vemos, pues como ambas técnicas se complementan.

Las estructuras positivas en la reacción uranafin (son las que se tiñen con uranilo) son el núcleo (en virtud de su contenido en DNA cromatínico), el nucleolo (por su contenido en ARN), los ribosomas (ARN) y los gránulos neuroendocrinos (se piensa que debido a su alto contenido en ATP). Los ribosomas se pueden utilizar de forma sencilla como control interno positivo de la técnica, de manera que consideremos positivo cualquier gránulo con la misma densidad que ellos y negativo cualquier gránulo de menor densidad.

Un estudio comparativo **(105)** de la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica y la reacción uranafin realizado en tumores neuroendocrinos pobremente diferenciados demostró que 7 de 16 fueron negativos para todos los antisueros utilizados, pero todos mostraron gránulos neuroendocrinos mediante la reacción uranafin. La sensibilidad de las técnicas inmunohistoquímicas está relacionada con la cantidad de gránulos que posea el tumor.

En nuestro trabajo hemos estudiado mediante microscopía electrónica 133 casos de tumores pulmonares no neuroendocrinos, y hemos observado lo siguiente: la morfología, cantidad y distribución de los gránulos en estos tumores es muy variable. En primer lugar, no todos los gránulos citoplasmáticos densos son neuroendocrinos y nos obliga a establecer el diagnóstico diferencial con las estructuras mencionadas anteriormente. En segundo lugar, los gránulos de los tumores no neuroendocrinos pueden tener morfología atípica: gránulos revestidos de membrana pero sin halo claro periférico, gránulos de contenido aparentemente granular o gránulos con apariencia de vesícula membranosa carente de contenido o con contenido granular. Así mismo, la localización de estos gránulos es muy variable, observándose en disposición paranuclear, dispersos por el citoplasma, o en

localización apical. Esta última localización no apoya el hecho de que sean gránulos neuroendocrinos, pero tampoco lo excluye, sobre todo si el hallazgo se acompaña de expresión de marcadores neuroendocrinos mediante inmunohistoquímica. En la siguiente tabla se resumen las características morfológicas de los gránulos neuroendocrinos en los tumores neuroendocrinos típicos (carcinoideas y microcíticos), en los carcinomas indiferenciados de célula grande y en los carcinomas no microcíticos.

	Carcinoide	Microcítico	No microcítico	Indiferenciado de célula grande
Número	Abundante	Variable	Variable-escasos	Variable-abundantes
Tamaño (nm)	90-450	50-70	80-580	90-490
Localización	Difusa	Periférica	Difusa, paranuclear, periférica	periférica
Morfología	Redondeada, ovalada	Redondeada homogénea	pleomórficos	pleomórficos
Otros	Filamentos intermedios, RER...	Orgánulos poco desarrollados	Desmosomas, microvellosidades, orgánulos...	Evidencia diferenciación glandular o escamosa

La IHQ tiene limitaciones a la hora de valorar la diferenciación neuroendocrina en cuanto a la falta de sensibilidad de algunos marcadores o la posibilidad de falsos positivos. Es importante establecer la correlación con la microscopía electrónica y comparar la sensibilidad de ambas técnicas. Con la electrónica existe también la posibilidad de falsos positivos al considerar como gránulos neurosecretorios lo que no son en realidad.

Existen estudios que relacionan la IHQ con la microscopía electrónica. Uno de los que aportan el mayor número de casos estudiados es el realizado por Shen L. et al en 1993 (105). Se estudian 80 tumores pulmonares utilizando 5 marcadores IHQ para la detección de rasgos NE y comparan los resultados con los obtenidos del mismo estudio realizado con microscopía electrónica:

- Entre el 100% y el 94% de tumores microcíticos expresan marcadores IHQ para detección de rasgos NE.
- Hasta un 24% de tumores no microcíticos también lo hacen
- Todos los tumores que tienen gránulos NE mediante microscopía electrónica expresan marcadores IHQ NE.

Concluyen que el estudio de los tumores pulmonares mediante técnicas IHQ para marcadores NE es práctico y suficientemente sensible si lo comparamos con la microscopía electrónica.

En nuestro caso hemos comparado los resultados de la realización de técnicas de microscopía electrónica en 123 carcinomas pulmonares con los resultados obtenidos a partir del estudio inmunohistoquímico. Los hallazgos, anteriormente expuestos, se resumen en la siguiente tabla:

IHQ +	IHQ -	SIN IHQ	GRANULOS	% CORRELACION
29 adenocas.			21	72,4
15 epid.			12	80
	22 adenos y epid		1	4,55
		53 adenos y epid	6	11

De nuestros resultados se deduce que la microscopía electrónica es una técnica de menor sensibilidad que la inmunohistoquímica, ya que globalmente pierde la capacidad de detección de aproximadamente un 35% de los tumores con rasgos de diferenciación neuroendocrina. Su principal problema viene del error de muestreo y de la heterogeneidad de los carcinomas pulmonares (29, 30, 47, 98). Sin embargo, es capaz de “rescatar” el 4,55% de los tumores que no detectamos mediante inmunohistoquímica, probablemente por el escaso número de gránulos que éstos presentan. De tal forma, el método ideal de detección de la diferenciación neuroendocrina es aquel que combine ambas técnicas. Si debemos decantarnos por alguna de ellas, la inmunohistoquímica es la de mayor sensibilidad.

5. INCIDENCIA Y SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA EN EL CARCINOMA PULMONAR NO MICROCÍTICO

Los artículos publicados con anterioridad a este estudio sobre la incidencia de la diferenciación neuroendocrina, su relación con el tipo histológico, estadio y pronóstico han dado lugar a resultados variables y en algunos casos incluso contradictorios. Por ejemplo, en algunos artículos se habla de un mejor pronóstico para los tumores no microcíticos que no expresan marcadores neuroendocrinos (92), y por el contrario, en otras series se ha demostrado un mejor pronóstico para pacientes con tumores en estadio avanzado que sí los expresan (39). En parte, las diferencias pueden explicarse por la heterogeneidad de los estudios publicados, ya

sea desde el punto de vista técnico (clonos utilizados, procesamiento de las muestras en el laboratorio), desde el punto de vista del material empleado (algunos autores utilizan material procedente de biopsia endoscópica) o desde el punto de vista de la valoración de las técnicas. Por ello, un análisis de los datos publicados hasta el momento y la comparación con los resultados obtenidos de una única institución (en la que pueden minimizarse las diferencias secundarias a la técnica empleada) es condición previa necesaria para esclarecer ambas hipótesis. Esto es lo que proponemos en el presente estudio.

Se han comparado un total de 14 artículos (**39, 59, 72, 54, 2, 92, 70, 109, 115, 73, 103, 12, 38, 6**). Estas series comprenden un total de 895 casos. Los resultados se comparan con los obtenidos en nuestro trabajo, realizado en 362 casos de tumores pulmonares no microcíticos. Según estos trabajos, la incidencia de diferenciación neuroendocrina en carcinomas pulmonares no microcíticos (excluyendo los carcinomas neuroendocrinos de célula grande) oscila en un rango entre 3% y 24,3% (**73,115**). Se observan también importantes diferencias al considerar los marcadores individualmente. Así, la positividad para cromogranina varía entre un 4,7% y 21%, y para sinaptofisina entre un 3 y un 24,3%. En nuestra serie se obtiene una positividad para cromogranina del 13,65%, del 27,02% para sinaptofisina y del 7,52% para Leu-7. El porcentaje global de tumores positivos alcanza el 37,85%.

Si establecemos la relación en función del tipo histológico pueden considerarse 7 trabajos previos (**59, 2, 115, 73, 103, 38**). Según ellos, la positividad para epidermoides es del 13%, del 41% para adenocarcinomas y del 40% para carcinomas indiferenciados de célula grande. En nuestro estudio, los porcentajes para estos tipos histológicos son del 27%, 45% y 45,4% respectivamente.

Cuando la comparación se establece entre la expresión de los marcadores neuroendocrinos, el estadio al diagnóstico y la supervivencia, en algunos artículos encontramos menor supervivencia en tumores positivos (92), mejor respuesta a tratamientos con quimioterapia en tumores positivos (38), mientras que otros autores no observan diferencias en cuanto al pronóstico (39, 2). En nuestro estudio, los tumores negativos en estadios precoces (Ia y Ib) muestran una media de supervivencia de 81 meses a los 5 años, frente a los 70 meses de los positivos.

Todo lo expuesto anteriormente se resume en la siguiente tabla, donde se expone la comparación de todos los trabajos publicados en este campo. En los siguientes puntos, se comentarán exhaustivamente, comparándolos con nuestro estudio.

AUTOR	NºCASOS	TIPO AP	ESTADIOS	MARCADOR	OBJETIVOS	CONCLUSIONES
Graziano, 1989 (39)	52	40adenocas. 5 epiderm. 2 cel grande 5 adenoesc.	¿?	SF Leu-7 Cr-A	Predecir la respuesta al tratamiento con QT en tumores no microcíticos según positividad para marcadores NE	<p>EN TUMORES QUE RESPONDEN A QT: 54% + para SF 12% + para Cr-A 44% + para Leu-7</p> <p>EN TUMORES QUE NO RESPONDEN A QT: 26% + para SF 0% + para Cr-A 19% + para Leu-7</p> <p>La presencia de marcadores NE se asocia con una mejor respuesta a QT.</p>
Kiriakogiani 1994 (59)	51	Tumores pulmonares no microcíticos	¿?	NSE Cr-A Leu-7	Utilidad de los distintos marcadores para detectar la diferenciación NE	<p>47% + para NSE (el marcador más sensible) 18% + para Cr-A (el más específico), en cualquier subtipo histológico.</p>
Loy, 1995 (72)	47	26 adenos 10 epiderm. 11 indif. 13 microcit. 16 indif. Con rasgos NE	¿?	NSE Cr-A Leu-7 SF	Papel de la IHQ en el diagnóstico de tumores pulmonares con diferenciación NE	<p>EN TUMORES NO NE: 60%+ NSE 7,9%+Leu-7 1,7%+Cr-A 62%+ SF</p> <p>EN TUMORES NE: 74%+NSE 7,5%+Leu-7 37%+Cr-a</p> <p>La mayoría de los anticuerpos comercializados no son específicos en el diagnóstico de los tumores NE.</p>

AUTOR	NºCASOS	TIPO AP	ESTADIOS	MARCADOR	OBJETIVOS	RESULTADOS
Jensen, 1990 (54)	29	4 carcinoid. 7 microcític. 18 no microcíticos	¿?	SF Cr-A L-dopa decarboxil.	Evaluar la sensibilidad y especificidad de los distintos marcadores	100%+ SF en carcinoides 75%+ Cr-A en carcinoides 70%+ SF en microcíticos 50%+ Cr-A en microcíticos La SF es el marcador más sensible y específico. Los tumores de menor grado de diferenciación son los que expresan estos marcadores en mayor porcentaje.
Baldi, 2000 (2)	200	80 epiderm. 85 adenos. 30 indif. 5 adenoesc.	¿?	Cr-A Leu-7 NSE Serotonina, bombesina, calcitonina, ACTH...	Estudio de la expresión de estos marcadores en tumores pulmonares no microcíticos	>50% de los carcinomas no microcíticos contienen subpoblaciones de células que expresan marcadores NE. Sólo de forma ocasional, los no microcíticos tienen un patrón IHQ igual a los microcíticos.
Pujol, 1993 (92)	97	64 epiderm. 21 adenos 3 cel grande 9 microcit.	No microc.: 30 I 13 II 40 III 5 IV Microcit: 2 I 6 III 1 IV	NCAM (MOC1, SL11-14)	Relacionar la expresión de estos marcadores con el pronóstico de los tumores resecados quirúrgicamente	+ para ambos: 100% en los microcíticos y 18% en los no microcíticos. Más porcentaje de + en los pobremente diferenciados. Tumores + para NCAM: menor supervivencia. NCAM es sólo uno de los múltiples factores biológicos que favorecen la progresión tumoral. Hipótesis: la diversificación fenotípica en estos tumores conduce a la aparición de un clon más agresivo (que expresaría diferenciación NE) que favorece la progresión tumoral.

AUTOR	NºCASOS	TIPO AP	ESTADIOS	MARCADOR	OBJETIVOS	RESULTADOS
Linnoila, 1998 (103)	113	39 adenos 23 epiderm. 32 microcit. 15 cel gr. 4carcinoides	¿?	Cr-A Leu-7 NSE	Diferenciación NE en carcinomas pulmonares no microcíticos	7,8%+ Cr-A 22%+ Leu-7 52%+ NSE La mayoría de los tumores no microcíticos que expresan algún marcador NE son los adenocarcinomas y los anaplásicos de célula grande.
Sundaresan 1991 (109)	315	218 epiderm. 65 adenos. 51 adenoesc 25 indif cel grande	¿?	NSE bombesina neurotensina Cr-A SF	Estudio de la expresión de marcadores NE y su relación con el comportamiento biológico en tumores pulmonares no microcíticos	Observa correlación estadísticamente significativa (p=0,05) entre la diferenciación NE y el estadio tumoral o la presencia de ganglios afectados. Los tumores+ metastatizan con mayor frecuencia. No observa relación con la supervivencia.
Wertzel 1997 (115)	47	Cas indif de cel grande	27,7% I 10,6% II 31,9% IIIa 19,1% IIIb 10,6% IV	NSE SF Cr-A	Papel de la expresión de estos marcadores en el pronóstico de estos tumores	La expresión de NSE parece estar relacionada con un comportamiento menos agresivo. No obtiene resultados estadísticamente significativos.
Lyda,2000 (73)	142	44 NE (38 microcíticos, 6 cel grande) 33 adenos 37 epiderm. 9 cel gr. 6 indif	¿?	B 72,3 CK 34bE12 CK 7,14,17 SF Cr-A	Determinar la utilidad de estos marcadores en el diagnóstico diferencial de los tumores pulmonares	NE: 84%+ Cr-A 64%+ SF 5%+ CK 34 9% + CK7 No NE: 5% +Cr-A 3%+ SF >97%+ CK La IHQ es útil para el dd de estos tumores.

AUTOR	NºCASOS	TIPO AP	ESTADIOS	MARCADOR	OBJETIVOS	RESULTADOS
Schleusener 1996 (103)	107	62 adenos 22 epiderm. 18 cel gr 5 adenoesc.	Todos III y IV	Cr-A Leu-7 SF	Valor pronóstico de la diferenciación NE en carcinomas no microcíticos	4,7%+ Cr-A 18,7% + Leu-7 24,3%+ SF 34,6%+ para al menos 1 marcador No observa correlación entre + y respuesta a QT o progresión de la enfermedad.
Carles,1993 (12)	97	58 epiderm. 28 adenos. 11 cel gr	1 II 35 IIIa 19 IIIb 42 IV	NSE SF Cr-A Leu-7	Valor pronóstico de la diferenciación NE en carcinomas no microcíticos Significado pronóstico de la expresión de marcadores NE en tumores no microcíticos en estadios iniciales	Mediante análisis multivariante demuestra que la mejor combinación de factores pronósticos independientes es el “performance status” y la positividad para NSE. 70%+ NSE 14,2%+ Cr-A 7,7%+ Leu-7 11,2%+ SF
Graziano 1994 (38)	260	109 adenos 73 epiderm. 42 cel gr. 27 adenoesc	193 I 67 II	NSE Leu-7 Cr-A SF CEA	Significado pronóstico de la expresión de marcadores NE en tumores no microcíticos en estadios iniciales	No observa relación significativa entre la positividad para los marcadores y el pronóstico La diferenciación NE se reconoce con mayor frecuencia en adenocarcinomas.
Berendsen 1989 (6)	141	86 epiderm. 40 adenos. 14 cel gr. 1 adenoesc. 30 metástasis	¿?	Ac monoclonales MOC 1,21,32,51 y 52	Tumores no microcíticos con rasgos de diferenciación NE y correlación pronóstica	Hasta un 30% de tumores no microcíticos expresan marcadores NE. Grupo + intensa para MOC-1= peor pronóstico. No valora efectos sobre respuesta a QT.

Como se puede apreciar en la tabla anterior, los resultados son muy variables e incluso contradictorios, tanto en los que exponen resultados de sensibilidad y especificidad de marcadores, en los porcentajes de positividad observados por tipo histológico o en lo que se refiere a significado pronóstico de la expresión de marcadores neuroendocrinos. Esto puede deberse a la gran heterogeneidad de los estudios reseñados:

- Heterogeneidad temporal. La mayoría de ellos son trabajos retrospectivos.
- Heterogeneidad del material empleado. Baldi (2) y Carles (12) emplean material procedente de biopsia endoscópica. El resto de los trabajos utilizan material quirúrgico exclusivamente.
- Estadios y tipos histológicos. Respecto a este punto, la heterogeneidad es mayor. La mayoría de los trabajos utiliza carcinomas en todos los estadios y que se incluyen en cualquier subtipo histológico de carcinoma no microcítico, incluyendo carcinomas indiferenciados de célula grande.
- Heterogeneidad de los marcadores. El panel de marcadores no está bien establecido, de ahí que algunos autores empleen la enolasa neural específica, que tiene escasa especificidad y otros utilicen marcadores específicos, que tienen expresividad variable incluso en tumores neuroendocrinos.

Para tratar de reducir al máximo la heterogeneidad de estos estudios, deben realizarse en una sola institución, en un solo laboratorio y en lo posible empleando los mismos clones. En nuestro trabajo, además, hemos tratado de conseguir la mayor

homogeneidad. Para ello, depuramos una serie de 111 casos en los que se realizó el estudio de supervivencia, relación con el pronóstico y con la recidiva:

- Estudio prospectivo, con un seguimiento medio de 37 meses
- Exclusivamente adenocarcinomas y carcinomas epidermoides
- Exclusivamente carcinomas en estadio Ia y Ib.
- Material de pieza quirúrgica, ampliamente muestreado, con selección de las zonas en las que se realiza la técnica inmunohistoquímica.
- Realización de la técnica bajo las mismas condiciones de procesamiento, en el mismo laboratorio y con los mismos criterios de valoración.

De esta manera, se irán comparando los resultados obtenidos en la literatura con los de nuestro trabajo.

6. MARCADORES IHQ MÁS SENSIBLES Y ESPECÍFICOS

En los últimos años se han realizado un buen número de estudios para evaluar el porcentaje de tumores no microcíticos que expresan marcadores NE y si este hecho puede tener implicaciones pronósticas y de tratamiento.

Los marcadores NE específicos en el carcinoma pulmonar comprenden un gran número de hormonas y neuropéptidos, tanto eutópicos (péptido liberador de gastrina, calcitonina, serotonina) como ectópicos (H: adrenocorticotropa, vasopresina, neurotensina). Sin embargo, estos productos NE son poco útiles

generalmente para el diagnóstico, ya que su expresión por parte del tumor es muy variable y específica del subtipo (71).

Entre los marcadores neuroendocrinos comercialmente disponibles con mayor utilidad a la hora de la investigación y el diagnóstico se encuentran los siguientes: Leu-7, CrA, SF, NSE y L-dopadecarboxilasa. Previamente en este estudio se ha discutido con mayor detalle las características bioquímicas de cada uno de ellos.

Los resultados de los estudios más significativos se resumen en la siguiente tabla:

AUTOR	Nº DE CASOS	MARCADORES	RESULTADOS
Kiriakogiani et al, 1994 (59)	51 no microcíticos	Enolasa Leu-7 Cromogranina A Bombesina	47% positividad global 47% enolasa 21,5% leu-7 18% Cr A La enolasa es el más sensible y la CrA el más específico. Juntos son el mejor indicador de diferenciación NE.
Linnoila et al, 1988 (71)	77	Enolasa Cromogranina A Leu-7	CrA 8% de positividad. 22% leu-7 52% enolasa.
Loy et al, 1995 (72)	66	Enolasa Cromogranina Leu-7 sinaptofisina	62% positividad para SF 60% para enolasa 17% CrA 9% leu-7
Jensen et al , 1990 (54)	18 no microcíticos, 4 carcinoides y 7 microcíticos	Sinaptofisina Cromogranina A L-dopa decarboxilasa	En carcinoides: 100% de + para SF y 75% para CrA. Con material fijado en formol y conservado en parafina disminuye la reactividad si se compara con los fijados en etanol.

Kiriakogiani (59) estudia en 1994 51 tumores no microcíticos distribuidos de la siguiente forma: 25 epidermoides, 16 adenocarcinomas y 10 carcinomas indiferenciados de célula grande. Además completa el estudio con 15 carcinoides y 5 microcíticos como control para probar la sensibilidad de los anticuerpos. También analiza 4 grupos de tumores no neuroendocrinos ni neurales para determinar la especificidad de los marcadores (adenocarcinomas de mama, próstata y colon y carcinomas epidermoides de la región de cabeza y cuello). En todos los casos utiliza material procedente de piezas quirúrgicas, con gran cantidad de tejido tumoral disponible. Emplea los siguientes anticuerpos: NSE de Dakopatts A/S Glostrup, Dinamarca (1:400), Bombesina de Boehringer Manheim Biochemica, Alemania (1:40), Leu-7 / HNK-1 de Becton Dichinson, California (1:40), CrA de Boehringer Manheim Biochemica, Alemania (1:200), Neurofilamentos de Dakopatts A/S Glostrup, Dinamarca (1:50).

Como control interno positivo utiliza las células endocrinas pulmonares o las estructuras nerviosas presentes en los cortes. Obtiene los siguientes porcentajes de positividad:

	NSE	BOMBESINA	LEU-7	CRA	NFTP
Epidermoides	48	16	20	16	16
Adenocarcinomas	44	25	25	19	13
Cels grandes	50	30	20	20	20
Microcit. Control	100	40	60	60	20

Con estos resultados, establece los siguientes valores diagnósticos:

	%SENSIBILIDAD	%ESPECIFICIDAD
NSE	100	95
CrA	90	100
Leu-7	90	90
Bombesina	70	85
NFTP	30	75

Este autor demuestra que todos los tipos histológicos de carcinoma pulmonar no microcítico expresan en mayor o menor medida positividad para algún marcador NE.

Sin embargo, la existencia de positividad para alguno de estos marcadores no refleja sistemáticamente la naturaleza neuroendocrina de ese tumor. Es más, un tumor que no exprese ningún marcador no significa ausencia de diferenciación. Sus resultados están en concordancia con los de la literatura, excepto en el caso de la enolasa neural específica. Con este anticuerpo es frecuente que ocurran muchas reacciones cruzadas. Además, en su estudio encuentra positividad para enolasa en tumores no neurales y no neuroendocrinos, así como en células normales de naturaleza no neuroendocrina. Por lo tanto, la positividad para enolasa no debe ser asimilada a rasgo de diferenciación neuroendocrina, y debe evaluarse e interpretarse con cautela, sobre todo en ausencia de positividad para otros marcadores neuroendocrinos.

Jensen (54) realiza en 1990 un estudio a partir de líneas celulares obtenidas de 4 tumores carcinoides, 17 microcíticos y 11 carcinomas no microcíticos, sin especificar subtipo histológico.

Utiliza los siguientes marcadores: Sinaptofisina de Boehringer Mannheim. Indianápolis (1:10), CrA (LK2H10), L-dopa decarboxilasa (DDC).

Los resultados, expresados en porcentajes, se resumen en la siguiente tabla:

	SF	CRA	DDC
Carcinoides	100	75	75
Microcíticos	67	48	48
No microcíticos	28	28	33

Encuentra que la inmunorreactividad de la sinaptofisina es más difusa y menos intensa que la de la cromogranina, pero que la concordancia con respecto a la expresión de cromogranina es estadísticamente significativa en todas las líneas celulares. Sus resultados indican que la sinaptofisina es un marcador sensible y específico para determinar la diferenciación neuroendocrina en las líneas celulares de carcinoma pulmonar. Se expresa con más frecuencia que la CrA en tumores de naturaleza neuroendocrina, por lo que es un marcador de mayor sensibilidad. Recomienda que debe ser incluido en el panel general de marcadores NE. Además demuestra positividad para algún marcador NE hasta en un 20% de las líneas celulares de tumores no microcíticos. Este estudio es una base de apoyo a la hora de elegir un marcador, pero sus resultados no son comparables al resto dado que se realiza en líneas celulares de tumores.

Linnoila (71), en su estudio de 1998, compara 113 neoplasias pulmonares primarias, entre ellas 4 carcinoides y 32 microcíticos. Sólo utiliza material quirúrgico, de forma que posee suficiente material para realizar múltiples tinciones IHQ. Emplea una batería de 14 anticuerpos: CrA, Leu-7, NSE, Serotonina,

bombesina, calcitonina, ACTH, vasopresina, neurotensina, CEA, citoqueratinas, vimentina y neurofilamentos.

Según este autor, los marcadores CrA, Leu-7 y NSE demostraron teñir fuertemente las células neuroendocrinas del epitelio bronquial. Leu-7 y enolasa además tiñen fibras nerviosas y células ganglionares. Todos ellos marcaron la totalidad de los tumores carcinoides del estudio.

Para él, los marcadores más sensibles y específicos para conseguir una aceptable clasificación de estos tumores son los siguientes (resultados en porcentajes):

	Nº	CRA	LEU-7	NSE
Carcinoides	4	100	100	100
Microcíticos	32	56	59	100
No-microcítico	77	8	22	52

La expresión de productos NE eutópicos (como bombesina, serotonina, etc) fue muy variable incluso dentro del carcinóide. Concluye que la mayoría pero no todos los carcinoides y microcíticos expresan múltiples marcadores neuroendocrinos. Evaluando múltiples marcadores, 7 de 77 (9%) carcinomas no microcíticos tienen un patrón indistinguible de los microcíticos.

Finalmente, Loy en 1995 (72) incluye en su estudio 66 carcinomas no microcíticos (26 adenocarcinomas, 10 epidermoides y 11 carcinomas indiferenciados de célula grande) y los compara con un grupo control de tumores neuroendocrinos (13 microcíticos, 4 carcinomas neuroendocrinos de bajo grado y 2 carcinomas NE de célula grande).

Emplea un panel IHQ que incluye CrA, Leu-7, enolasa y sinaptofisina. Todos los carcinomas NE utilizados como control se tiñen para al menos uno de estos marcadores. De los no-NE, el porcentaje de positividad para uno o más marcadores asciende al 79%.

	CGA	LEU-7	ENOLASA	SINAPTOFISINA
Epidermoides	40	0	60	60
Adenoc.	12	15	58	62
Cels grandes	9	0	64	64

Este autor concluye que los resultados de su estudio no avalan la especificidad de estos anticuerpos para detectar la diferenciación NE. Sin embargo, no se plantea la posibilidad de que en realidad esté detectando esa diferenciación.

En nuestro estudio, realizado en 362 tumores pulmonares no microcíticos, se obtiene una positividad global para cualquier tipo de marcador NE del **37%**. No utilizamos la enolasa neural específica (gamma-isoenzima de la enzima glicolítica enolasa que se encuentra preferentemente en las neuronas y en las células neuroendocrinas) porque suelen ocurrir múltiples e inesperadas reacciones cruzadas. Se ha observado positividad para enolasa en tumores no neurales y no neuroendocrinos. Tampoco utilizamos los neurofilamentos, ya que según los artículos (59), la sensibilidad ronda el 30%.

Si discriminamos por marcador, los resultados son los siguientes:

- 7,18% de positividad para Leu-7
- 12,71% para CrA
- 25,97% para SF

Para la selección de los marcadores, hemos utilizado criterios de sensibilidad y especificidad basándonos en los artículos más importantes al respecto anteriormente comentados. Nuestros resultados están dentro del rango de positividad que reseñan los artículos comparables con nuestro trabajo tanto en el material empleado como en la realización técnica de las inmunotinciones. Por lo tanto, globalmente, se concluye que el porcentaje de positividad para marcadores NE en tumores pulmonares no microcíticos oscila entre un 27% y un 47%, según distintos autores. El marcador más sensible es la enolasa, seguido de la sinaptofisina (que parece ser de mayor utilidad en tumores que expresan menor número de marcadores) y que la cromogranina es el más específico.

De todo lo anterior se deduce que la sinaptofisina es un marcador sensible y específico para detectar la diferenciación neuroendocrina en estos tumores. La reactividad para sinaptofisina se observa en mayor porcentaje de casos que la cromogranina A en todos los subtipos histológicos.

A este respecto, Gould et al (35) en su estudio de 270 tumores encuentran positividad para SF en el 88% de los carcinoides pulmonares y el 43% de los carcinomas no microcíticos. Mayor porcentaje de incidencias es el que presentan Lee et al (67), que obtienen un 89% de positividad para SF en tumores pulmonares neuroendocrinos (sin especificar subtipo histológico). Kaiser et al (57) encuentra un 79% de expresión en carcinomas microcíticos y un 74% para los no microcíticos. Por último, Jensen et al (54), un 70% para microcíticos y un 94% para no microcíticos.

Estos estudios sugieren que todos o la gran mayoría de los tumores NE pulmonares contienen SF, pero algunos no la expresan o somos incapaces de detectarla con los medios IHQ utilizados.

El gen de la SF en humanos ya ha sido clonado. El m-RNA que genera codifica una proteína precursora de 30700 aminoácidos **(69)**. El peso molecular (PM) de esta molécula de prepro-SF es de 33312 kD. Sin embargo, se han publicado múltiples formas según el tejido estudiado, de ahí que el PM oscile en un rango que va desde 38000 a 40000 **(69)**. Se ha atribuido esta heterogeneidad en el PM del precursor de la SF al grado de glicosilación que se produce durante las modificaciones post-traduccionales. Por ejemplo, estudios de Navone et al **(86)** y de Rehm et al **(95)** concluyen que la deglicosilación química o la inhibición de la glicosilación “de novo” dan lugar a un precursor de 34000 kD.

En el trabajo de Jensen **(54)** la caracterización de proteínas de SF inmunorreactivas en líneas celulares de tumores pulmonares dio lugar a una forma con mayor PM, entre 43000 y 45000 kD. Esto está en concordancia con la menor motilidad electroforética de esta proteína según el tumor del que provenga la línea celular estudiada, sobre todo se ha observado en carcinoides bronquiales, paragangliomas y retinoblastomas **(116, 80, 60)**. Los carcinomas microcíticos convencionales de pulmón y los extrapulmonares expresan una forma de mayor peso molecular (45000 kD) que los microcíticos-varientes y los carcinoides (43000 kD). Estos datos dan a entender que, además de la glicosilación de la molécula de SF, debe existir algún tipo de selectividad tumoral asociada a los procesos post-traduccionales en líneas celulares de tumores de pulmón y extrapulmonares.

En cuanto a la cromogranina, se expresa en el ser humano (entre otras) en las células pulmonares neuroendocrinas normales y displásicas, siendo la reacción mucho más fuerte si se utiliza el clon LK2H10, que es el que utilizamos en nuestro estudio **(66,100)**. Se puede demostrar reactividad, aunque de menor intensidad, en

carcinomas microcíticos. La menor intensidad se debe probablemente y en parte a el escaso número de gránulos NE que poseen sus células. Mediante radioinmunoensayo, la presencia de cromogranina se ha podido demostrar en el 100% de los carcinomas microcíticos estudiados, mientras que por métodos de IHQ, la positividad para cromogranina en estos tumores es menor **(19)**. Por lo tanto, la cromogranina debe considerarse un marcador muy específico de rasgos NE, si bien su baja sensibilidad no lo convierte en el marcador de elección. De todas formas, siempre debe incluirse en estos paneles de detección de tumores neuroendocrinos.

Por último, el Leu-7 muestra reactividad con nervios, células neuroendocrinas pulmonares normales y displásicas, carcinoides y la mayoría de carcinomas microcíticos, así como hasta un 22% de carcinomas no microcíticos, según las series publicadas **(11,65)**. Su utilidad y su significancia aumenta considerablemente cuando se utiliza en asociación con los anticuerpos anteriormente mencionados.

De lo anteriormente expuesto se deduce que en nuestro estudio hemos empleado los marcadores para la detección de rasgos neuroendocrinos con mayor sensibilidad y especificidad, excluyendo la enolasa neural específica y los marcadores neuroendocrinos específicos. Las herramientas que utilizamos, pues, son válidas y están avaladas por los autores con los trabajos publicados más importantes al respecto. Hay que tener en cuenta que el hecho de emplear la sinaptofisina policlonal puede dar lugar a un aumento del porcentaje de falsos positivos, que no se producirá si el procesamiento y la valoración de la técnica son adecuados. De hecho, al comparar nuestros resultados de positividad para sinaptofisina con los de otros autores que utilizan el anticuerpo monoclonal, podemos ver que son superponibles **(103)**.

7. DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES NE SEGÚN SUBTIPO HISTOLÓGICO

Una vez señalados los porcentajes de positividad globales, el siguiente punto a tener en cuenta sería discriminar estos porcentajes por subtipo histológico. Los artículos publicados en la literatura a este respecto no son muchos. De ellos, los que aportan mayor número de casos son los siguientes:

AUTOR	Nº CASOS	CONCLUSIONES
		Los adenocarcinomas y los carcinomas de célula grande son los que expresan marcadores NE en mayor porcentaje (30-60%).
Baldi et al, 2000 (2)	200 carcinomas no microcíticos	Los epidermoides y los BA son los que lo hacen en menor proporción (20%).
		Los tumores bien diferenciados en general rara vez expresan estos marcadores.
		Expresan más los adenocarcinomas y los carcinomas de célula grande.
Linnoila et al, 1988 (70)	77 carcinomas no microcíticos	Los epidermoides, con menor frecuencia.

El estudio original de Linnoila comprende 113 tumores pulmonares reseca- dos quirúrgicamente y ampliamente muestreados. Todos ellos son evaluados por tres patólogos independientemente y tras una reunión de consenso se incluyen en los distintos tipos de tumores pulmonares aceptados en la clasificación de la OMS. Con ello obtienen:

- 39 adenocarcinomas
- 32 microcíticos
- 23 epidermoides
- 15 carcinomas indiferenciados de célula grande
- 4 carcinoides

A todos ellos se les realiza una batería IHQ para diferenciación NE, que incluye Enolasa neural específica, cromogranina y Leu-7. No realizan sinaptofisina. Para la valoración de las técnicas emplean un método similar al que utilizamos en nuestro estudio, con tres niveles de intensidad. No valoran el porcentaje de células positivas dentro de cada tumor.

Obtienen que todos los carcinoides son positivos para todos los marcadores. Los microcíticos son todos positivos para enolasa, mientras que <60% son positivos para los otros dos marcadores. La intensidad de positividad de los microcíticos es menor que la de los carcinoides. En cuanto a los no microcíticos, los porcentajes de positividad se resumen en la tabla expuesta anteriormente. Las mayores diferencias con respecto a nuestros resultados se producen en la cromogranina (8% de carcinomas no microcíticos positivos). Utilizan el mismo anticuerpo y el mismo clon que en nuestro laboratorio. Sin embargo, no encuentran ningún epidermoide positivo para este marcador y en el resto de los casos observan positividad débil y siempre asociada a la positividad para otro marcador. Interpretan los resultados como la existencia de subpoblaciones minoritarias de células neuroendocrinas en el seno de los tumores no microcíticos.

En el otro estudio mencionado (2) utilizan material de biopsia endoscópica y de resecciones quirúrgicas. No se especifica la valoración de la positividad. Este estudio obtiene resultados difícilmente comparables.

En nuestro estudio de 362 casos, el porcentaje de positividad por subtipo histológico se distribuye de la siguiente forma:

- 27% epidermoides
- 45% adenocarcinomas
- 45% carcinomas indiferenciados de célula grande

Nuestros resultados están en concordancia con los publicados por Baldi (2) siendo los adenocarcinomas y los carcinomas indiferenciados de célula grande los tumores que más expresan estos marcadores. El estudio de expresión de marcadores se ha realizado en la serie global de 362 carcinomas pulmonares no microcíticos. Observamos mayor intensidad de positividad (2 y 3 cruces) con la cromogranina, y mayor extensión de positividad (entre 3 y 4, es decir de más del 50%) con la sinaptofisina. Por tipo histológico, los adenocarcinomas son los tumores que expresan marcadores no sólo en mayor porcentaje, sino también con mayor intensidad y porcentaje de células positivas. Lo mismo ocurre con los carcinomas indiferenciados de célula grande. Los carcinomas epidermoides muestran en general una positividad más parcheada, con extensa áreas del tumor que permanecen negativas y la intensidad de la positividad suele estar en torno a una o dos cruces. La expresión de marcadores neuroendocrinos no tiene relación con el grado de diferenciación en adenocarcinomas y carcinomas epidermoides, ya que tanto los bien

diferenciados como los pobremente diferenciados expresan marcadores en porcentajes similares. Sin embargo, sí se aprecia mayor expresión en carcinomas indiferenciados no encuadrables en ningún subtipo histológico y en carcinomas indiferenciados de célula grande.

8. LA DIFERENCIACIÓN NE COMO FACTOR PRONÓSTICO INDEPENDIENTE EN TUMORES PULMONARES NO MICROCÍTICOS

Hay un número limitado de estudios que se refieran a la posible implicación pronóstica de la expresión de marcadores neuroendocrinos en tumores pulmonares no microcíticos. Se ha planteado que el comportamiento biológico de los tumores microcíticos con diferenciación NE se situaría entre medias de los no microcíticos convencionales y los microcíticos, más cerca de estos últimos (70).

Los principales estudios que relacionan la expresión de marcadores neuroendocrinos con el pronóstico se resumen en la siguiente tabla:

Autor	Nº casos	Tipo histológico	Estadio	Material
Sundaresan (109)	315	NSCLC	¿?	Pieza quirúrgica
Wertzel (115)	47	Indif cel grande	Todos	Pieza quirúrgica
Carles (12)	97	NSCLC	III y IV	Biopsia endoscópica
Graciano (38)	260	NSCLC	I y II	Pieza quirúrgica
Pelosi (90)	220	NSCLC	Ia y Ib	Pieza quirúrgica
Nuestro trabajo	154	Epidermoides y adenocarcinomas	Ia y Ib	Pieza quirúrgica

Como se comentó previamente, estos estudios son muy heterogéneos y escasamente comparables entre sí. Por ello, los resultados son en ocasiones contradictorios.

Sundaresan et al (**109**), en un estudio realizado en 1991, dispone de una amplia serie de carcinomas pulmonares no microcíticos que comprende los siguientes tumores: 218 epidermoides, 65 adenocarcinomas, 51 adenoescamosos y 25 indiferenciados de célula grande. La expresión global de marcadores NE es del 30%.

Observa diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de marcadores NE, las metástasis ganglionares y el estadio de la enfermedad. Los tumores que expresan marcadores NE tienen mayor capacidad de dar metástasis que los que no los expresan, comportándose así de forma análoga a los carcinomas microcíticos. Por lo tanto, la expresión de marcadores neuroendocrinos parece relacionarse con un comportamiento clínico más agresivo.

Sin embargo, en este estudio no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia.

Wertz el al (**114**), en un estudio de 1997, se refieren exclusivamente a los carcinomas indiferenciados de célula grande. Sugieren que el potencial agresivo de estos tumores es muy superior al del resto de tumores no microcíticos, expresen o no marcadores NE. Encuentran reducciones muy marcadas de la supervivencia, sobre todo en estadios avanzados, cuando los comparan con el grupo de tumores no microcíticos.

Señalan una expresión focal de enolasa en aproximadamente un 31% de estos tumores y no encuentran expresión de cromogranina A ni de SF. Por lo tanto, consideran que estos tumores no deben ser clasificados como tumores NE. Sugieren

que probablemente subpoblaciones de células tumorales, en el curso de la desdiferenciación, activan genes previamente inactivos, que son los responsables de la expresión de enolasa (hipótesis parecidas han sido señaladas previamente por Pujol JL et al, **(91)**).

Sin embargo, sí admiten la denominación de carcinoma indiferenciado de célula grande con rasgos NE. En este caso, no encuentran diferencias en lo que se refiere al comportamiento biológico de estos tumores:

- Supervivencia media de tumores enolasa positivos: 25,6 meses
- Supervivencia media de tumores enolasa negativos: 13,8 meses

Tampoco encuentran diferencias en cuanto a la distribución por estadíos y concluyen que los resultados de su estudio no justifican la realización de un panel de IHQ para NE en el carcinoma indiferenciado de célula grande. Independientemente de la significación estadística, este autor concluye que la expresión de enolasa parece asociarse a una conducta biológica menos agresiva en los carcinomas indiferenciados de célula grande.

Carles **(12)** publica una serie de 97 casos cuyo material procede exclusivamente de biopsia endoscópica. Probablemente por el material empleado, obtienen resultados de positividad para los marcadores muy variables. Dentro de los factores pronósticos más importantes incluyen el índice Karnofsky y el estadío. Relacionan (sin significación estadística) la expresión de enolasa con un comportamiento biológico menos agresivo.

Por último, Graciano (38), realiza un estudio en una amplia serie de 260 casos, con carcinomas pulmonares no microcíticos en estadíos I y II pero no demuestra relación entre la expresión de estos marcadores y el significado pronóstico.

Además de los artículos mencionados anteriormente, existen trabajos relacionados que también contribuyen a la confusión en cuanto a las conclusiones:

Berendsen et al (6) estudian la expresión de marcadores NE utilizando anticuerpos monoclonales en 141 carcinomas no microcíticos y encuentran expresión de éstos en aproximadamente un 31% de tumores, siendo los más frecuentes los adenocarcinomas (43,6%). Una positividad muy intensa con MOC-1 identificó un subgrupo con peor pronóstico tras el tratamiento quirúrgico, lo que explican como posibles similitudes en cuanto al comportamiento biológico de estos tumores y los carcinomas microcíticos.

Un estudio de Skov et al (106) se realiza en 114 pacientes con adenocarcinomas broncogénicos inoperables que son tratados con un protocolo quimioterápico y observaron que un 44% de los pacientes con tumores que respondían a quimioterapia tenían al menos un 10% de células positivas para enolasa y un 17% de ellos tenía menos de un 10% de células positivas ($p < 0,05$). Para cromogranina los valores fueron de 30% los que respondían frente a un 19% de los que no lo hacían. Sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la supervivencia.

El estudio realizado por Ruckdeschel (98), recopila más de 200 casos y no encuentra diferencias en cuanto a la supervivencia, relaciona la positividad para enolasa con una peor respuesta a la QT en tumores con gran extensión.

Finalmente, el estudio recientemente publicado (2003, **90**) realizado por Pelosi et al es el único que emplea material quirúrgico de tumores en estadio clínicos exclusivamente iniciales (Ia y Ib). En él analizan 220 casos de carcinomas pulmonares no microcíticos en estadio I empleando un panel IHQ que incluye cromogranina A, sinaptofisina y una serie de hormonas relacionadas con el tracto respiratorio (serotonina, calcitonina, bombesina y ACTH entre otras). De todos ellos, encuentran positividad para algún marcador neuroendocrino en 28 casos (15 adenocarcinomas y 13 carcinomas epidermoides), es decir, en el 13% global de la serie. En este pequeño grupo es en el que realiza el estudio estadístico de supervivencia en función de la expresión de marcadores, y a pesar del escaso volumen de la serie, obtiene resultados estadísticamente significativos, que se están en concordancia con los obtenidos en nuestro trabajo: los carcinomas no microcíticos en estadio I que expresan marcadores neuroendocrinos son un subgrupo de tumores más agresivo, con una supervivencia menor y un periodo libre de enfermedad más corto.

En nuestro estudio hemos tratado de reducir los sesgos por escasa depuración de la serie o por la heterogeneidad del material empleado. Junto con el de Pelosi, el nuestro es el único trabajo realizado exclusivamente en estadio I, pero el nuestro se centra en los tipos histológicos mayoritarios: adenocarcinomas y carcinomas epidermoides. Los resultados fueron expuestos anteriormente, pero se resumen a continuación: los adenocarcinomas expresan con mayor frecuencia marcadores neuroendocrinos, y con una intensidad y porcentaje de células tumorales positivas también mayores que los de los carcinomas epidermoides. Los porcentajes de positividad de los adenocarcinomas son: 34,6% para sinaptofisina, 12,8% para

cromogranina y 12,8% para Leu-7. Para los carcinomas epidermoides, los porcentajes son: sinaptofisina 26,3%; cromogranina-A 9,2%; Leu-7 1,3%. La expresión es independiente del grado histológico de diferenciación del tumor. No se han encontrado preferencias de distribución de las células tumorales positivas en áreas perivasculares, centrales o periféricas. Cuando el porcentaje de células positivas dentro del tumor es inferior al 10%, éstas se distribuyen aleatoriamente, mientras que si el porcentaje es superior, tienden a agruparse formando nidos de tamaño variable. El estudio de supervivencia realizado demuestra que los pacientes con adenocarcinomas y con carcinomas epidermoides que expresan sinaptofisina tienen peor evolución clínica que aquellos con carcinomas que no la expresan, lo que se evidencia en reducción de la supervivencia (p 0,0104), con un riesgo relativo (RR) de reducción de supervivencia 2,5482 veces mayor (IC 95% 1,2462-5,2102) y mayor porcentaje de recidivas (p 0,03), con un odds ratio (OR) de incremento en las recidivas de 2,1894 (IC 95% 1,0264-4,6700). Además, en nuestro trabajo hemos estudiado también otros factores que pueden tener influencia en el comportamiento biológico del tumor, como la pérdida de expresión en el grupo sanguíneo A. Encontramos dentro del grupo 78 pacientes de grupo sanguíneo A. 32 carcinomas (41,03%) pierden la expresión de este antígeno. Pues bien, observamos que estos tumores también tienen peor curso clínico que los que no la pierden, con reducción global de la supervivencia (p 0,0148). El riesgo relativo (RR) es de 3,1496, con un intervalo de confianza (IC) al 95% entre 1,2522-7,9221, y mayor porcentaje de recidivas (p 0,0420), con un odds ratio (OR) de 2,8129 (IC 95% 1,0203-7,7546). En el análisis multivariante, la expresión de sinaptofisina en epidermoides y adenocarcinomas en estadio I resulta ser un factor pronóstico independiente (p

0,0062). El riesgo relativo (RR) de tener menor supervivencia es 2,9421 mayor para los tumores que expresan sinaptofisina, con un IC al 95% entre 1,3589 y 6,3702. Sin embargo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el curso clínico y la expresión de cromogranina o Leu-7.

9. LA DIFERENCIACIÓN NE COMO FACTOR PREDICTIVO DE LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA

La respuesta de los carcinomas microcíticos a la quimioterapia parece estar relacionada con la expresión de marcadores NE (91), pero ¿hasta qué punto este factor es importante a la hora de predecir una eventual respuesta a la quimioterapia de los tumores no microcíticos con rasgos NE?

Graziano realizó un estudio a este respecto en 1989 (73). Analiza retrospectivamente pacientes con tumores no microcíticos tratados con quimioterapia previa a la cirugía.

Son 52 tumores en total, de los cuales 26 responden a la QT y 26 no lo hacen. Los resultados de positividad para marcadores NE en estos tumores se resumen en la siguiente tabla:

RESPONDEN A QT	MARCADOR	NO RESPONDEN A QT
54%	ENOLASA	27%
44%	LEU-7	0%
12%	CROMOGRANINA A	0%

Los pacientes que responden a QT y son positivos para 2 o más marcadores tienen mayor supervivencia (media de 79 semanas) que los que son positivos sólo para un marcador (media de 51 semanas) y que los que no responden (media de 27 semanas).

Todos estos resultados sugieren que la expresión de marcadores NE se asocia con incremento de la respuesta a tratamiento quimioterápico.

Un estudio más reciente es el realizado por Schleusener JT et al en 1996 **(103):**

107 casos de tumores no microcíticos de pacientes en estadíos III y IV tratados antes de la cirugía con QT son analizados con los siguientes marcadores NE: cromogranina A, Leu-7 y sinaptofisina, comparando los resultados con el comportamiento clínico de los mismos.

- 34,6% de casos tienen al menos un marcador NE positivo
- 11,3% son positivos para 2 o más
- con CgrA, el porcentaje de + es de 4,7%
- 18,7% con Leu-7
- 24,3% con SF
- La supervivencia global es de 257 días
- 294 días para tumores que no expresan marcadores
- 311 días para tumores que expresan un marcador
- 464 días para tumores que expresan 2 o más

Encuentran mayores supervivencias en tumores con marcadores NE + (el estudio incluye únicamente tumores en estadios avanzados). Sin embargo, señalan que no existe relación en cuanto a la respuesta a la QT. Además, la mayoría de los pacientes que sobreviven a largo plazo tienen tumores con diferenciación NE.

El efecto de la diferenciación NE sobre la supervivencia de los tumores no es atribuible a la respuesta a la QT, ni a un intervalo libre de enfermedad prolongado, así como tampoco al estadio tumoral o al grado histológico.

Similares conclusiones son las obtenidas por Carles J et al en un estudio de 1993 (12) en cuanto a supervivencias y respuesta a QT, y sugiere que la respuesta a la QT no parece ser tan importante en la supervivencia de estos tumores como se pensaba. Este estudio se realiza en 202 carcinomas pulmonares no microcíticos incluidos en un protocolo de quimioterapia basado en el cisplatino. Todos los tumores se obtienen mediante biopsia endoscópica, inmediatamente antes del tratamiento con QT. De los 202 casos, sólo 97 tienen suficiente material para la realización de técnicas IHQ. Considera positivo aquel tumor que expresa dos o más marcadores neuroendocrinos.

Incluye en el análisis las siguientes variables: edad, “performance status” de Karnofsky, subtipo y grado histológico del tumor, estadio (todos ellos menos uno se encuentran en estadios III y IV) y niveles séricos de LDH. Obtiene los siguientes resultados en cuanto a la expresión de marcadores:

- 32,6% de + para Sinaptofisina
- 2,2% para cromogranina A
- 4,2% par leu-7

Estos resultados difieren notablemente de los que aparecen en la literatura, pudiendo ser la causa la procedencia del material para el estudio: la biopsia endoscópica no es el material idóneo, como se comentó anteriormente. Además, establece unos criterios de positividad estrictos, considerando positivos sólo aquellos tumores que expresan dos o más marcadores, con lo que obtiene unos grupos con un número de casos insuficiente, de ahí que probablemente no encuentre diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de éstos y la supervivencia o la respuesta a la terapia.

Finalmente, Schleusener concluye que los tumores no microcíticos con marcadores NE + tienen peor pronóstico en pacientes tratados únicamente con cirugía (igual que los microcíticos) y mejor supervivencia que los no microcíticos NE negativos cuando se añade QT al tratamiento.

Tanto los estudios *in vitro* como los estudios histopatológicos demuestran de forma evidente que existe un solapamiento entre los tumores microcíticos y los no microcíticos en lo que a marcadores neuroendocrinos se refiere. Los adenocarcinomas, por ejemplo, existe más de un 20% de expresión de uno o más de estos marcadores. Los estudios publicados parecen de mostrar que estos tumores responden de forma más significativa a los tratamientos con quimioterapia. Por otro lado, existen estudios que hablan de su mayor capacidad metastatizante. Sin embargo, todos los estudios publicados son retrospectivos, con las limitaciones de interpretación que ello conlleva.. Sólo estudios prospectivos y análisis multivariantes en grandes series pueden determinar si los pacientes con tumores con rasgos NE pueden o no beneficiarse de tratamientos quimioterápicos **(108)**.

En nuestro trabajo ninguno de los carcinomas fue tratado con quimioterapia previamente a la cirugía y no hemos estudiado el comportamiento biológico posterior de los que fueron tratados después, pero nuestro estudio abre así la posibilidad de una continuación en este sentido.

10. SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA SEGÚN EL ESTADÍO TUMORAL

Son muy pocos los artículos publicados en la literatura que relacionen la expresión de marcadores NE en tumores no microcíticos con el estadio en el que se diagnostican y las posibles implicaciones de estos hallazgos.

El autor más importante en este campo es Graziano, con dos artículos publicados a este respecto. El primero de ellos (38) es del año 1994. En este trabajo parten de una hipótesis: los carcinomas no microcíticos con diferenciación NE son un subtipo de tumores con un comportamiento biológico más agresivo (como los carcinomas microcíticos) o menos agresivo (como los carcinoides).

Estudian una serie de 260 tumores no microcíticos, todos ellos en estadios precoces (I y II), tratados con cirugía y quimioterapia, y realizan un panel de IHQ que incluye: enolasa, SF, cromogranina, Leu-7 y CEA.

Obtienen que el 23,5% de los tumores son positivos para 2 o más marcadores NE. Los porcentajes por marcador son los siguientes:

- Enolasa: 70%
- Leu-7: 7,7%
- CrgA: 13,8%

- SF:11,2%
- CEA: 68,5%

La supervivencia media global de los tumores en estadio I fue de 64 meses y de 33,5 meses para los tumores en estadio II.

La supervivencia media de los tumores con 2 o más marcadores NE positivos fue de 44,8 meses y de 53,4 meses para los tumores con un único marcador positivo o negativos.

No encuentran diferencias significativas en la supervivencia cuando comparan la expresión o no de marcadores NE, CEA, queratinas ni tampoco con el grado de diferenciación tumoral.

No justifican el posible valor pronóstico de los marcadores NE en cuanto a respuesta a QT, supervivencia ni período libre de enfermedad. Señalan sin embargo factores pronósticos negativos como la presencia de metástasis ganglionares, estadio tumoral (T1-T2), edad avanzada del paciente y presencia de mucina.

Sin embargo, en nuestro estudio sí observamos reducción estadísticamente significativa de la supervivencia en adenocarcinomas y epidermoides en estadio I y Ib en función de la expresión de sinaptofisina o de la coexpresión de sinaptofisina y Leu-7.

El segundo de estos estudios es el realizado en 1998, también por Graziano SL et al (73). En este estudio, todos los casos son carcinomas no microcíticos en estadio III-A de pacientes tratados con QT preoperatoria seguida de cirugía y posteriormente QT y RT. En todos ellos se realiza un panel de IHQ con SF, cromogranina, Leu-7 y enolasa.

Este protocolo de tratamiento les permite estudiar las piezas antes y después de la QT, partiendo de la hipótesis de que los especímenes post-QT tendrán un porcentaje mayor de células NE negativas, ya que en teoría las células sensibles a la QT son las que expresan marcadores NE.

En total estudian 61 casos, 38 de los cuales tienen material pre y post QT. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

PRE-QT	% DE + PARA NE	POST-QT
47%	ENOLASA	71%
3%	CROMOGRANINA A	14%
5%	LEU-7	16%
8%	SF	13%

Concluyen que los especímenes post-QT tienen un porcentaje mayor de células NE+ cuando se comparan con los pre-QT. Tampoco encuentran relación entre la positividad para alguno de esos marcadores y una mejor respuesta a la QT.

En otros estudios sí parece relacionarse la expresión de marcadores NE con la respuesta a la QT en estos tumores y en estadíos avanzados (**70,103**), pero los resultados son contradictorios. ¿Porqué encuentran mayor porcentaje de células NE + en los especímenes post-QT? Varias hipótesis:

- Porque los marcadores NE no identifican de forma fiable una subpoblación celular sensible a la QT.
- Porque realmente la expresión de marcadores NE no influye en la respuesta a la QT.

- Porque todas las células (las que expresan y las que no) son sensibles a la QT en estos tumores.

En nuestro trabajo se han observado las diferencias de supervivencia previamente comentadas en carcinomas epidermoides y adenocarcinomas en estadio I en función de la expresión de sinpatofisina con o sin coexpresión de Leu-7: cuando los carcinomas son sinaptofisina positivos, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es del 62%, mientras que si son negativos es del 78% (p 0,037). Con la recidiva se han observado también claras diferencias en función de la expresión de estos dos marcadores, si bien no se alcanza la significación estadística probablemente por el reducido número de casos. De la misma forma, cualquier tumor, independientemente del tipo histológico, que exprese marcadores neuroendocrinos (cualquiera de los tres empleados) tiene menor supervivencia media que los que no lo hacen: 66% frente al 78% a los cinco años (p 0,11). Ninguno de los tumores empleados en nuestro estudio recibieron tratamiento quimioterápico neoadyuvante, pero se abre la posibilidad de continuación del trabajo estudiando el comportamiento biológico de estas neoplasias después del tratamiento con quimioterapia de las metástasis o de las recidivas.

11. OTROS FACTORES DE POSIBLE INFLUENCIA EN EL PRONÓSTICO DE LOS TUMORES NO MICROCÍTICOS: LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENO DE GRUPO SANGUÍNEO A

El sistema de grupos sanguíneos ABO consiste en varios genes. Los alelos A y B del locus ABO codifican para glicosiltransferasas específicas, que son las que modifican el oligosacárido que es el producto de la glicosiltransferasa de un segundo gen, el H. El fenotipo O refleja la existencia de un oligosacárido H sin modificar, mientras que el A y el B representan modificaciones terminales diferentes del oligosacárido H. Estas moléculas están presentes como constituyentes de diferentes glicoproteínas y glicolípidos (53).

La unión mediante enlaces covalentes de azúcares a las proteínas es una de las principales funciones biosintéticas del retículo endoplásmico. Este hecho, conocido como glicosilación de proteínas se produce mediante la transferencia “en bloque” a las proteínas de un precursor preformado de oligosacárido (compuesto por N-acetilglucosamina, manosa y glucosa que contiene un total de 14 azúcares). Se transfiere directamente al grupo NH₂ de una asparagina terminal de la proteína, de forma que se denomina oligosacárido “ligado a N” o “ligado a asparagina”. Todo el proceso está catalizado por la enzima oligosacárido-transferasa.

Los oligosacáridos “ligados a N” son los más frecuentemente encontrados en las glicoproteínas. Con menor frecuencia los oligosacáridos se unen a un grupo hidroxilo de una serina o de una treonina. Estos oligosacáridos “ligados a O” se forman en el aparato de Golgi por vías todavía no bien comprendidas. ¿Cuál es la función de la glicosilación?

Existen importantes diferencias entre la síntesis de oligosacáridos y la de otras macromoléculas como DNA, RNA y proteínas.

Mientras que los ácidos nucleicos y las proteínas se copian a partir de una plantilla en series de pasos idénticos utilizando las mismas enzimas, los carbohidratos complejos requieren un enzima diferente en cada paso y que cada producto sea reconocido como único sustrato del siguiente paso. De este proceso tan complejo se deduce que los oligosacáridos de las glicoproteínas y de los glicoesfingolípidos tienen funciones muy importantes que todavía no son totalmente conocidas, si bien entre algunas de ellas se encuentran las siguientes:

- La glicosilación ligada a N, por ejemplo, prevalece en organismos eucarióticos, pero no se produce en los procariontes. Como los oligosacáridos ligados a N están presentes en la mayor parte de las proteínas que viajan por el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, se piensa que tienen funciones de ayuda en el proceso de moldeamiento y transporte protéico.
- Como las cadenas de los azúcares tienen escasa flexibilidad, al disponerse en la superficie de las glicoproteínas, pueden evitar la aproximación de otras macromoléculas, de forma que las hagan más resistentes a la acción de las proteasas, por ejemplo.
- Los oligosacáridos unidos a la superficie de las proteínas pueden ser reconocidos por las lectinas transmembrana (selectinas), que tienen funciones en los sistemas de adhesión y reconocimiento celular.

- La glicosilación tiene además funciones reguladoras muy importantes, como la señalización de la superficie celular mediante receptores como el Notch, que interviene en el desarrollo celular, o mediante antígenos de grupo sanguíneo, con funciones transportadoras y estructurales entre otras, como se verá más adelante.

La glicosilación de los antígenos epiteliales de superficie es un fiel indicador de la diferenciación celular, habiéndose observado cambios en el patrón de expresión tanto en células epiteliales premalignas como malignas.

Las estructuras de oligosacárido de los grupos sanguíneos, pues, no son productos primarios de los genes, sino que se sintetizan paso a paso por los mecanismos previamente comentados. Por lo tanto, los perfiles finales de los antígenos expresados por cada célula están influenciados por numerosos factores, como la composición intrínseca de las glicosil-transferasas (que depende del genotipo del individuo), la actividad o la cantidad de esas enzimas, la competitividad enzimática en relación con la concentración de sustrato, la organización de las enzimas en las membranas celulares y el nivel de actividad de las enzimas degradadoras.

La expresión de antígenos de grupo sanguíneo por parte de los tejidos normales y neoplásicos es un hecho bien conocido y que ha sido investigado a menudo por sus implicaciones pronósticas en algunas localizaciones como el urotelio, así como por su importancia a la hora de entender la glicosilación anómala en las células neoplásicas. Además, la expresión de antígenos de grupo sanguíneo

permite identificar neumocitos residuales dentro del tumor, mejorando así el diagnóstico y la clasificación apropiada de algunas neoplasias.

Los estudios anteriores publicados a este respecto en el tracto respiratorio no son muy numerosos. La primera vez que se estudió histológicamente la expresión de antígeno de grupo sanguíneo se realizó en mucosa gástrica y duodenal (99). Desde entonces, se ha estudiado su expresión en numerosos tejidos (100,101). Davidsohn et al (17,18) ya demostraron la pérdida de determinantes antigénicos de grupo sanguíneo ABH en los carcinomas pulmonares. Hirohashi et al (48) hablaron de la expresión de antígenos de grupo sanguíneo en células mucosas normales, de la menor expresividad observada en los carcinomas y de la expresión aberrante de grupos sanguíneos incompatibles así como de la acumulación de precursores. El patrón de distribución y regulación de los histoantígenos de grupo sanguíneo es complejo y varía según el tejido y el tipo de célula. También se han observado diferencias de expresión en tipos celulares iguales, por lo que se piensa que en estos casos la heterogeneidad está relacionada con la diferenciación, maduración y transformación maligna de las células.

En células malignas, los cambios observados en la expresión de estos antígenos pueden dividirse en:

1. Delección de antígenos ABH, acumulación y modificación de precursores. La delección o disminución de la expresión de estos antígenos en tejidos tumorales ha quedado patente en los resultados obtenidos a partir de nuestro estudio. No se ha establecido claramente la relación entre esta pérdida de expresión y el potencial maligno de las células.

2. Expresión de grupo sanguíneo incompatible o aberrante. Consiste en la expresión de histoantígenos de grupo A en pacientes de grupo B o O. En nuestro trabajo este hecho lo hemos detectado en dos casos de pacientes del grupo B con adenocarcinomas que expresaban antígenos de grupo A. El mecanismo por el que se produce la expresión incompatible de antígeno A debe estudiarse a nivel molecular, clonando el gen responsable de la enzima que produce esta expresión aberrante y comparándolo con los genes ABO **(117)**.

Estudios bioquímicos y de genética molecular han revelado que los antígenos de grupo sanguíneo están presentes en numerosas moléculas de superficie celular con una amplia diversidad estructural, incluidos epitopos carbohidratos de glicoproteínas o glicolípidos y antígenos peptídicos o protéicos localizados en la membrana celular vía dominios transmembrana.

Todos los grupos sanguíneos son detectados mediante serología en las células rojas sanguíneas, pero la mayoría de ellos además se expresan en tejidos no eritroides **(13)**.

Debido a su amplia diversidad estructural, los grupos sanguíneos poseen amplia diversidad funcional, subdividiéndose en 5 clases:

- Transportadores y canales
- Receptores de ligandos, virus, bacterias y parásitos
- Moléculas de adhesión
- Enzimas
- Proteínas estructurales.

Recientemente se han realizado numerosos estudios que sugieren que la pérdida de expresión de antígenos de grupo sanguíneo A por parte de tumores pulmonares no microcíticos conlleva peor pronóstico, con disminución de la supervivencia y del período libre de enfermedad. Lee et al (68) fueron los primeros en proponer que la expresión de antígenos del grupo sanguíneo A es un factor pronóstico favorable importante en pacientes con carcinomas pulmonares no microcíticos, ya que pacientes con grupo sanguíneo A o AB que tenían carcinomas que no expresaban el antígeno del grupo A tenían supervivencias significativamente menores que los A positivos. Los artículos posteriormente publicados al respecto han dado lugar a resultados contradictorios. Dresler et al (21) exponen que la pérdida de expresión de este antígeno no conlleva peor supervivencia y Rice et al (97) no encuentran diferencias en cuanto a la supervivencia o período libre de enfermedad en estadios precoces. Sin embargo, Graziano et al (37) observan que en pacientes del grupo sanguíneo A o AB, la pérdida de expresión de antígeno de grupo A es el factor predictivo negativo más importante en lo que a supervivencia se refiere.

Los resultados de nuestra serie fueron expuestos anteriormente, aunque pueden resumirse en los siguiente puntos:

- En nuestro estudio, todas las células normales que tapizan los bronquios, las glándulas y los sacos alveolares, excepto las células serosas, expresan antígenos del sistema ABH. El número de células positivas tiende a ser mayor en el epitelio de superficie y en las glándulas parietales de los bronquios de mayor tamaño, y a disminuir en las vías respiratorias de pequeño calibre. En términos generales, las células mucosectoras y los

neumocitos tipo II muestran un patrón de tinción principalmente citoplásmico, mientras que otros tipos celulares, como las células de Clara y las células basales reaccionan sobre todo con un patrón de membrana. Las células ciliadas muestran una amplia banda de tinción en su porción apical.

- La positividad en los tumores pone de manifiesto una población celular heterogénea, con células teñidas y células sin reactividad dentro del mismo tumor. Los carcinomas epidermoides de mayor grado de diferenciación muestran un patrón de tinción de membrana, sobre todo en las células que se localizan en el centro de los nidos. Los carcinomas epidermoides indiferenciados tienen un patrón de tinción citoplasmático y de mayor intensidad. Los adenocarcinomas bien diferenciados muestran un patrón de tinción principalmente apical, mientras que los de menor grado de diferenciación pierden esta tinción apical, que se hace más difusa en el citoplasma. Esto último se ha considerado como expresión de la pérdida de la polaridad celular **(61)**.
- La pérdida de expresión de grupo A es un fenómeno relativamente frecuente que podemos observar hasta en un 36% de los carcinomas no microcíticos de pacientes A+.
- Los carcinomas epidermoides en general pierden la expresión de este antígeno con menos frecuencia que los adenocarcinomas: un 27% frente a un 34% aproximadamente. Además, la pérdida de expresión en carcinomas epidermoides se produce en porcentajes similares independientemente de que el estadio sea limitado o avanzado.

- En estadios precoces no se encuentran diferencias de pérdida de expresión por tipo histológico, mientras que en estadios avanzados se observa con más frecuencia en adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de célula grande.
- Las mayores diferencias de supervivencia se aprecian en los epidermoides en estadios precoces y en cualquier tipo histológico en estadios avanzados.

En la siguiente tabla se resumen los principales artículos publicados al respecto:

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Lee et al. 1991 (68)	164. 39 estadíos I y II 22 estadíos III y IV	71 pacientes A y AB +. 43 tumores A+ (71 meses de supervivencia). 28 tumores A - (15 meses de supervivencia)	La expresión de Ag de grupo A es un factor pronóstico favorable. La reducción de la supervivencia es más marcada en estadíos precoces. En los avanzados no es significativo. Los tumores que pierden la expresión de grupo A son más indiferenciados. No es estadísticamente significativa la relación con recurrencia ni supervivencia.
Rice et al. 1995 (97)	103 casos 52 adenos 25 epid 24 cel grande 2 adenoescamosos	89 pacientes A+ 57% tumores A+ 33% tumores A-. Supervivencia global:75% a 3 años y 66,6% a 5 años.	No resultados estadísticamente significativos. Concluyen que la pérdida de expresión de Ag de grupo A no influye en el pronóstico.
Dressler et al. 1995 (21)	136 casos 73 adenos 39 epid 8 indif cel grande	47% pacientes A+. Supervivencia 5 años A+: 53%. Tumores A+:52%. Tumores A-:34%	La pérdida de expresión de Ag de grupo A empeora significativamente la supervivencia global y la libre de enfermedad.
Graziano et al. 1997 (37)	260 casos 193 estadío I 67 estadío II	60% tumores A+.98 meses supervivencia est I y 70 meses est II. Tumores A-: 41 meses de supervivencia estadío I y 37 meses est II.	

Algunos autores como Pujol JL et al en 1993 (92) han planteado la hipótesis de que debido a la gran diversificación fenotípica en estos tumores se produciría la aparición de un clon más agresivo que sería el que expresaría estos marcadores NE y

el que favorecería la progresión de estos tumores. Dicho de otra forma: ¿los carcinomas pulmonares acumulan aberraciones fenotípicas a medida que progresan? En nuestro estudio hemos tratado de dar respuesta a esta hipótesis estableciendo la relación entre la expresión de marcadores neuroendocrinos y la pérdida de expresión de histoantígenos de grupo A. Los resultados fueron expuestos anteriormente, pero se resumen en la siguiente tabla:

	Grupo A +	Grupo A -
SF y Leu-7 -	10 (38,46%)	16 (61,53%)
SF y Leu-7 +	9 (64,28%)	5 (35,7%)

Si los tumores acumularan aberraciones fenotípicas, los que expresan marcadores neuroendocrinos perderían la expresión de histoantígenos de grupo A. Esto no ocurre así. No se alcanza la significación estadística ($p > 0,05$), probablemente por el escaso número de tumores en cada grupo.

12. DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA Y PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENO DE GRUPO SANGUÍNEO A EN CARCINOMAS PULMONARES NO MICROCÍTICOS. COMPARACIÓN ENTRE SERIES PUBLICADAS

El hecho de la existencia de gran variabilidad en los resultados de los estudios publicados en la literatura ha sido comentado ampliamente en los puntos previos. Sin embargo, en lo que a diferenciación neuroendocrina se refiere la mayor discrepancia se produce respecto a los anticuerpos más sensibles y específicos y los porcentajes de positividad encontrados según el marcador y el tipo histológico.

Probablemente esto se deba a diferencias en el procesamiento de los tejidos, marcadores empleados para la detección de la diferenciación, valoración y criterios de positividad utilizados y material empleado. En particular, numerosos estudios (107, 37, 103) se han realizado en pacientes con tumores en estadios avanzados, en los que son numerosos los factores que pueden influir en su comportamiento además del criterio de la diferenciación neuroendocrina. Ya se expuso el sistema utilizado en nuestro trabajo, demostrándose la alta fiabilidad de nuestros resultados. En la siguiente tabla se resumen los resultados de positividad por marcador y por tipo histológico de los estudios más relevantes:

AUTOR	Nº CASOS	% CR-A +	% LEU-7 +	% SF +
Kiriakogiani	51	18	--	21,5
Linnoila	62	7,8	22	--
Lyda	98	5	--	3
Baldi	195	21	--	16
Graziano	260	14,2	7,7	11,2
Schleusener	107	4,7	18,7	24,3
Rosell	97	1,2	1,2	32,6
Nosotros	362	12,7	7,2	25,9

Como se puede observar, los porcentajes de positividad de cromogranina oscilan entre el 1,2% y el 21%. Los de Leu-7, entre el 1,2% y el 18,7% y los de sinaptofisina, entre el 3% y el 32,6%.

El primer aspecto a tener en cuenta es el número de casos de la serie. Tras la de nuestro estudio, las series más amplias son la de Graziano, Schleusener y Baldi. Baldi utiliza material de biopsia endoscópica, por lo que tampoco es comparable. En el estudio de Schleusener se emplean tumores en estadios avanzados (III y IV) que han sido previamente sometidos a tratamiento con quimioterapia. Para valorar la positividad de las muestras emplea un sistema de porcentajes e intensidad similar al

utilizado en nuestro trabajo. Obtiene unos resultados comparables y diferentes a los nuestros, con un porcentaje de positividad para Leu-7 mayor y para cromogranina menor. Finalmente, Graziano utiliza material en su mayor parte de resección quirúrgica, excepto en 14 de los casos, que proceden de biopsia endoscópica. No especifica el proceso de lectura de la técnica IHQ, pero obtiene unos resultados similares, con escaso porcentaje de positividad para sinaptofisina.

Por otra parte, las diferencias en cuanto a positividad para los distintos marcadores cuando las comparamos por tipo histológico se resumen en la siguiente tabla:

PREVIAS (ACUMULADOS)		CR-A	SF	LEU-7	
	EPIDERM	218	7,4%	13%	10%
	ADENOS	233	19%	32%	7,22%
	OTROS	119	26%	32%	7,22%
NUESTRA SERIE					
	EPIDERM	156	10,25%	23,7%	1,28%
	ADENOS	140	13,67%	27,34%	11,4%
	OTROS	66	21,84%	34,9%	12,5%

Finalmente, en cuanto a la pérdida de expresión de antígeno de grupo A, la comparación entre las distintas series publicadas se resume en la siguiente tabla:

	ESTADIOS I Y II Nº CASOS	ESTADIOS III Y IV Nº CASOS	TOTAL
LEE, 1991	39	22	164
Rice, 1995	103	0	103
Dresler, 1995	58	0	136
Graziano, 1997	70	20	260
Nosotros	195	72	267

Si establecemos la comparación entre los casos con pérdida de expresión y el estadio, la tabla es la siguiente:

	ESTADIOS I Y II N°CASOS	ESTADIOS III Y IV N° CASOS	TOTAL
Lee, 1991	43 28+/+ 15+/- 35%+/-	15 +/+ 13+/- 46,4% +/-	164
Rice, 1995	103 todos A + 34%+/-	0	103
Dresler, 1995	42 +/+ 8+/- 19%+/-	0	136
Graziano, 1997	41+/+ 30+/- 41% +/-	13+/+ 7+/- 35% +/-	260
Nosotros	58+/+ 41+/- 41% +/-	13+/+ 8+/- 38,1% +/-	267

Observamos una pérdida de expresividad en estadios iniciales igual a la del estudio de Graziano y muy similar en los estadios avanzados.

Como hemos visto, los estudios previos han investigado las alteraciones en la expresión de antígenos de grupo sanguíneo como factor pronóstico en pacientes con varios tipos distintos de carcinomas. La hipótesis de estos autores es que, como las células malignas pierden grado de diferenciación, pueden perder también la capacidad para sintetizar antígenos ABH estructural y funcionalmente normales. Esta hipótesis ha sido ampliamente estudiada en el carcinoma transicional de vejiga, en el que se ha comprobado que la pérdida de capacidad de expresión de antígenos de grupo sanguíneo conlleva peor pronóstico (7). Lee et al (68), han estudiado la pérdida de expresión de histoantígeno de grupo A en 164 casos de carcinomas pulmonares no microcíticos, distribuidos en estadios desde I hasta IIIb. Según sus conclusiones, la pérdida de la expresión confiere peor pronóstico a estos tumores, al igual que la edad, el estado de los ganglios y la tasa de mitosis. Cuando estudian

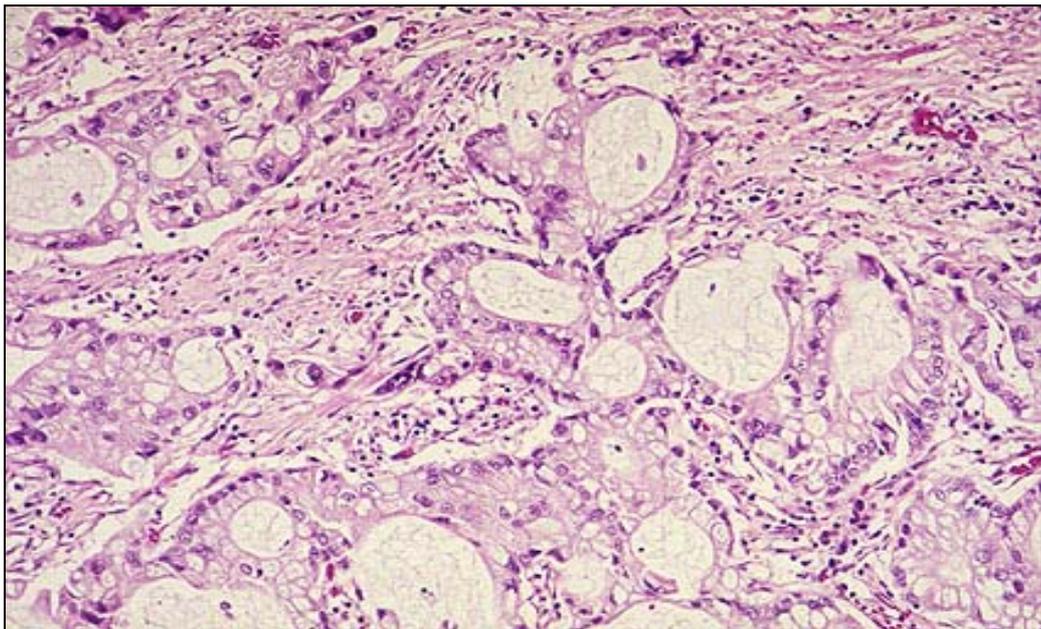
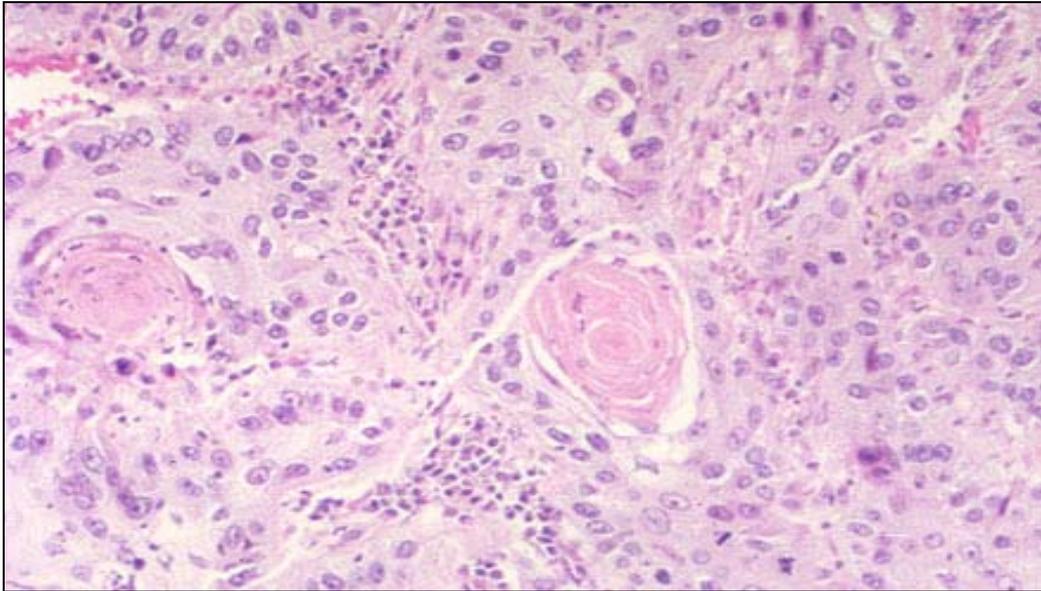
tumores en estadios precoces (Ia y Ib), encuentran diferencias de supervivencia estadísticamente significativas, a pesar de que el número de casos en este grupo es de 27. Es de mayor interés identificar los posibles factores pronósticos de los tumores en estadios precoces, porque en ellos pueden realizarse terapias más agresivas que incrementen la supervivencia. Finalmente, en otro estudio al respecto realizado por Matsumoto et al (78) en 89 carcinomas pulmonares incluyendo carcinomas microcíticos, obtienen resultados similares, con un peor pronóstico en tumores que pierden la expresión de grupo A. En nuestro trabajo, los carcinomas que muestran mayor diferencia en la supervivencia en estadios precoces son los epidermoides, pero como se comentó previamente, la serie que hemos empleado para el estudio de la expresión de antígenos de grupo sanguíneo no está depurada. De la misma manera, los resultados obtenidos, a pesar de mostrar tendencias diferenciales, carecen de significación estadística, probablemente por el reducido número de casos que componen cada subgrupo, sobre todo cuando tratamos de correlacionar los marcadores neuroendocrinos con la pérdida de expresión de grupo A. Por lo tanto, cabe concluir que la pérdida de expresión de grupo A en carcinomas pulmonares no microcíticos es un factor con el que todavía no hemos podido establecer claramente una relación pronóstica, si bien todo parece indicar que puede estar implicado como un cofactor más.

CONCLUSIONES

- El método más sensible y específico para detectar la diferenciación neuroendocrina oculta en carcinomas pulmonares no microcíticos consiste en la combinación de inmunohistoquímica y microscopía electrónica.
- La microscopía electrónica es, de ambas, la técnica de menor sensibilidad. Sin embargo, permite establecer una comparación entre la morfología de tumores neuroendocrinos y no neuroendocrinos, así como la descripción morfológica exacta de los gránulos neurosecretores de estos carcinomas. De ello se derivan fundamentos morfológicos para establecer diagnósticos diferenciales con otras estructuras granulares no neuroendocrinas, y describir las variaciones ultraestructurales que existen con los gránulos neurosecretores de los tumores neuroendocrinos clásicos.
- La diferenciación neuroendocrina oculta se define de forma fiable al utilizar un panel de anticuerpos que incluya sinaptofisina, Leu-7 y cromogranina A, cuando el material que se emplea procede de pieza quirúrgica y el procesamiento se realiza en condiciones estables y controladas, es decir, homogeneizando el método de realización y de evaluación de la técnica (personal técnico, laboratorio, clones, criterios de evaluación, etc).
- Así estudiada, la diferenciación neuroendocrina en tumores pulmonares no microcíticos es una característica frecuente, que aparece aproximadamente en 1/3 de los casos. Existen diferencias de expresión en cuanto a los distintos tipos histológicos: los carcinomas epidermoides son el grupo que los expresa en menor proporción. Los adenocarcinomas y los indiferenciados de célula grande, los que lo hacen con mayor frecuencia. No se observan diferencias de expresión en relación con el grado de maduración tumoral.

- La sinaptofisina es el marcador más sensible y específico para detectar la diferenciación neuroendocrina. La expresión de sinaptofisina está relacionada con la recidiva y la supervivencia de los epidermoides y adenocarcinomas en estadíos precoces.
- En el grupo de tumores estudiado, la expresión de sinaptofisina está relacionada con un comportamiento clínico más agresivo en estadíos Ia y Ib, con reducción estadísticamente significativa de la supervivencia y aumento igualmente significativo de la tasa de recidivas.
- No se ha demostrado la existencia de mayor porcentaje de expresión de marcadores neuroendocrinos en carcinomas epidermoides o adenocarcinomas de mayor tamaño, es decir, no se han observado variaciones fenotípicas en tumores más evolucionados.
- La pérdida de expresión de antígeno de grupo sanguíneo A es un fenómeno que se puede demostrar en un 30% aproximadamente de tumores pulmonares no microcíticos de pacientes A+.
- La pérdida de expresión de grupo sanguíneo A está relacionada de forma estadísticamente significativa con un comportamiento clínico más agresivo, que consiste en reducción de la supervivencia y aumento del número de recidivas.
- En los carcinomas que expresan marcadores neuroendocrinos, no se observa incremento proporcional de la pérdida de expresión de histoantígeno de grupo sanguíneo A, es decir, no se ha podido demostrar que los carcinomas pulmonares no microcíticos acumulen aberraciones fenotípicas durante su progresión.

ICONOGRAFÍA



Figuras 1 y 2. Carcinoma epidermoide (superior) y adenocarcinoma (inferior) empleados en el estudio. A pesar de la ausencia de rasgos morfológicos de diferenciación neuroendocrina, ambos resultaron positivos para marcadores neuroendocrinos mediante IHQ.

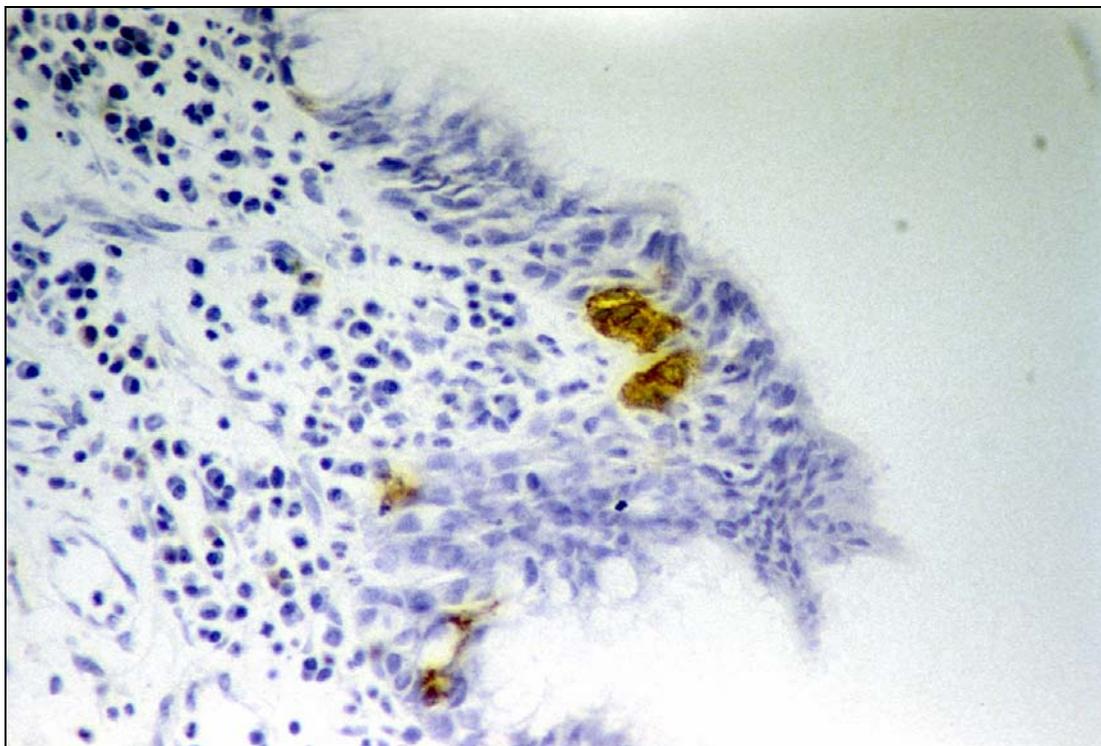


Figura 3. Células neuroepiteliales normales teñidas fuertemente con cromogranina situadas en el espesor del epitelio bronquial. Se utilizan como control interno positivo en la valoración de la técnica.

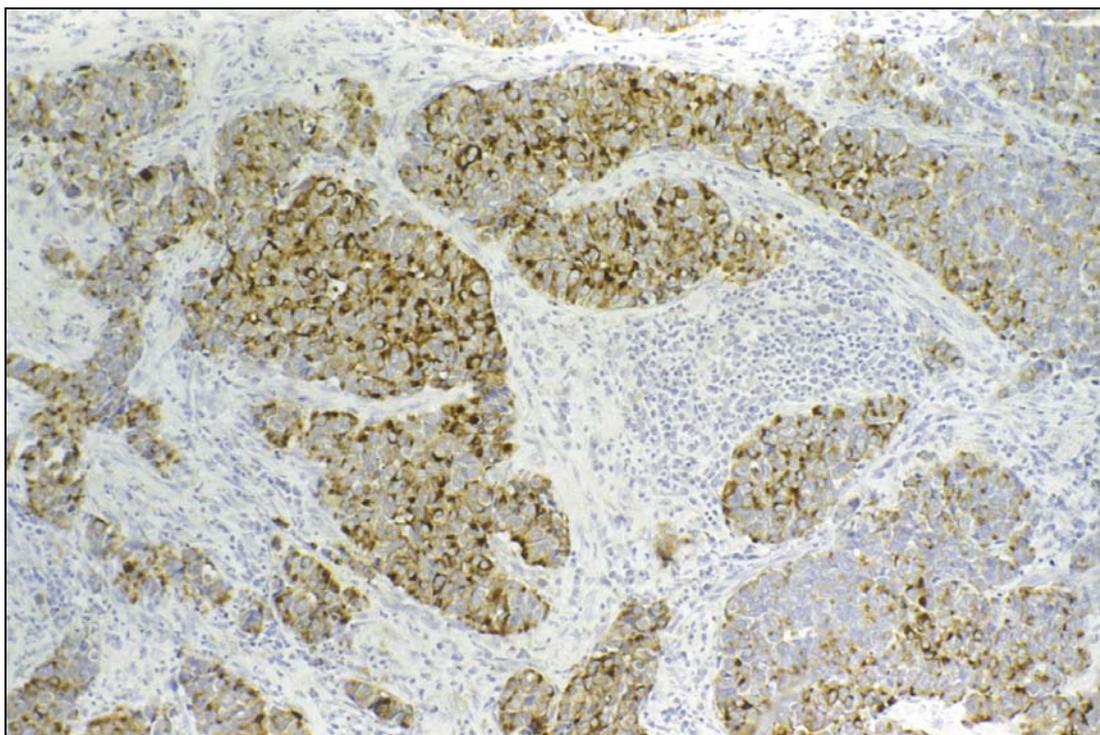


Figura 4. Positividad real para Cr-A en un adenocarcinoma pobremente diferenciado. La reactividad es exclusivamente citoplasmática, con ausencia de tinción nuclear, y la positividad es parcheada dentro del tumor, con áreas positivas y zonas que no se tiñen en absoluto, observándose también diferencias de intensidad en la positividad de las distintas células.

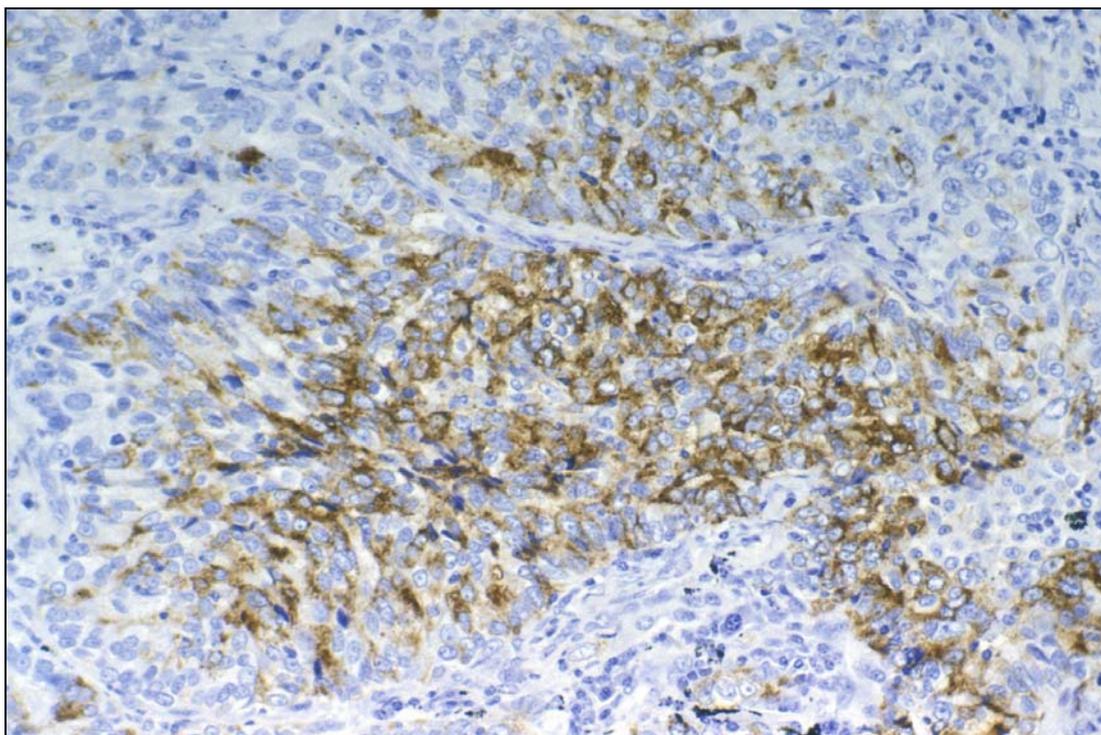


Figura 5. Positividad real para Leu-7. La reactividad es así mismo citoplasmática, finamente granular, con ausencia de reactividad nuclear. La intensidad es menor que la observada anteriormente para cromogranina.

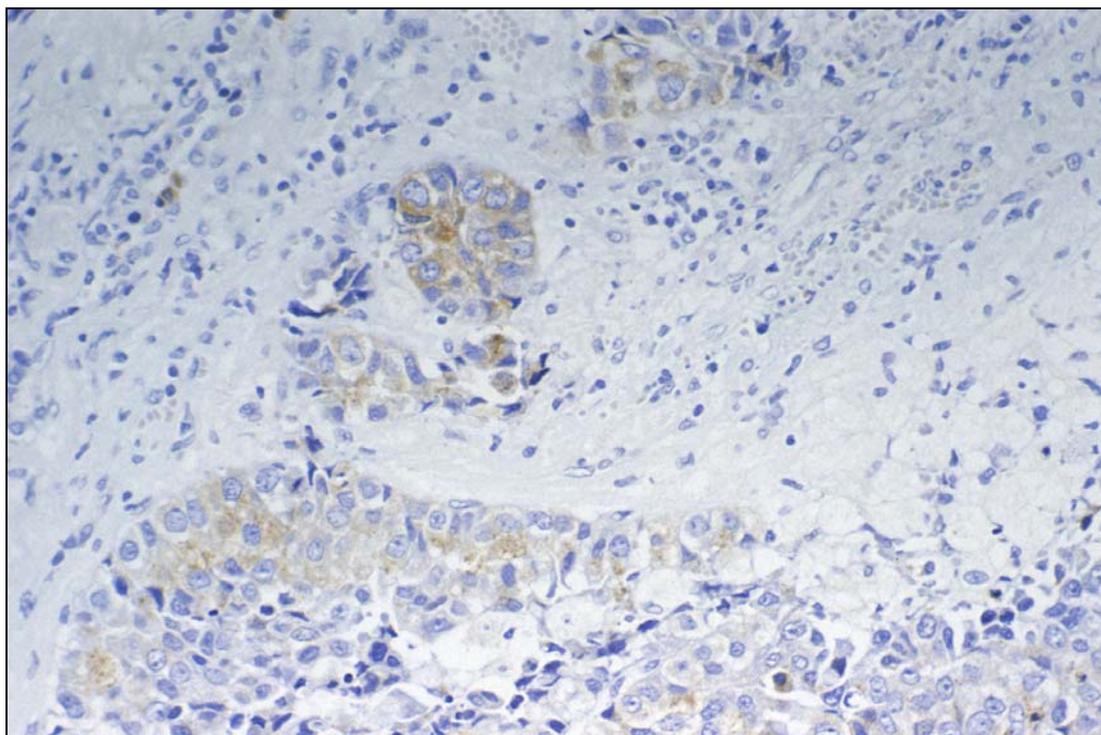


Figura 6. Positividad real para sinaptofisina, que se define por la ausencia de tinción de fondo y la positividad citoplasmática, que es más difusa y menos granular que la observada en los anteriores marcadores.

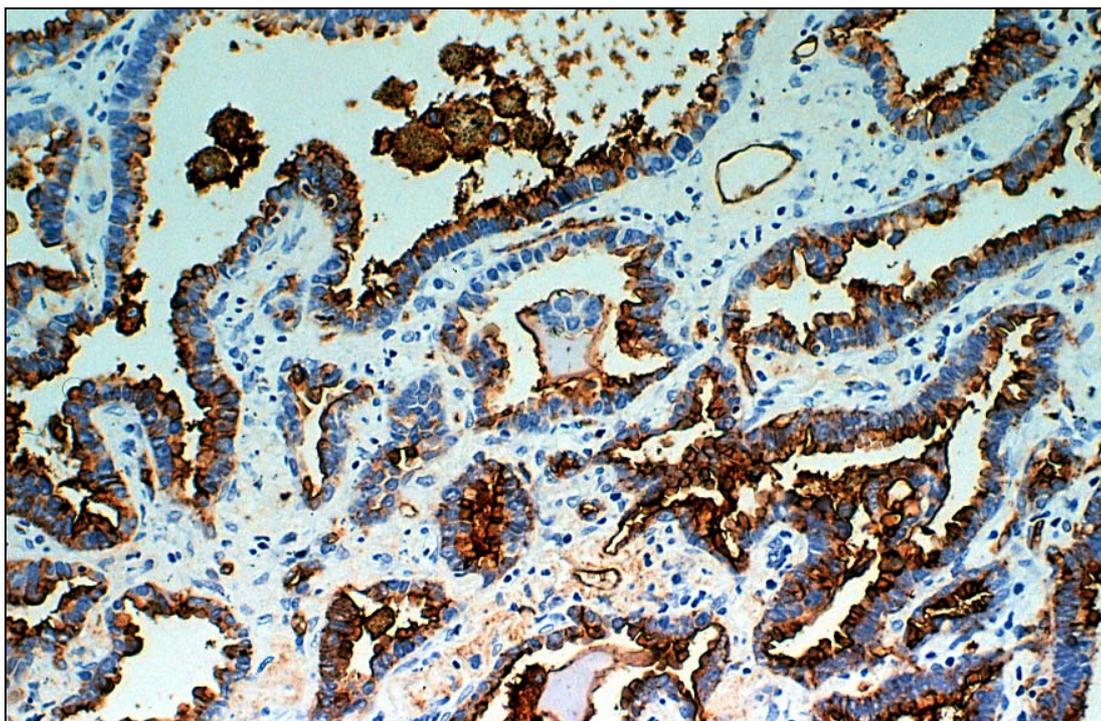


Figura 7. Adenocarcinoma bien diferenciado con positividad marcada especialmente en el tercio apical de las células para antígeno de grupo sanguíneo A. Nótese la fuerte positividad de los tejidos normales del paciente (endotelio y hematíes).

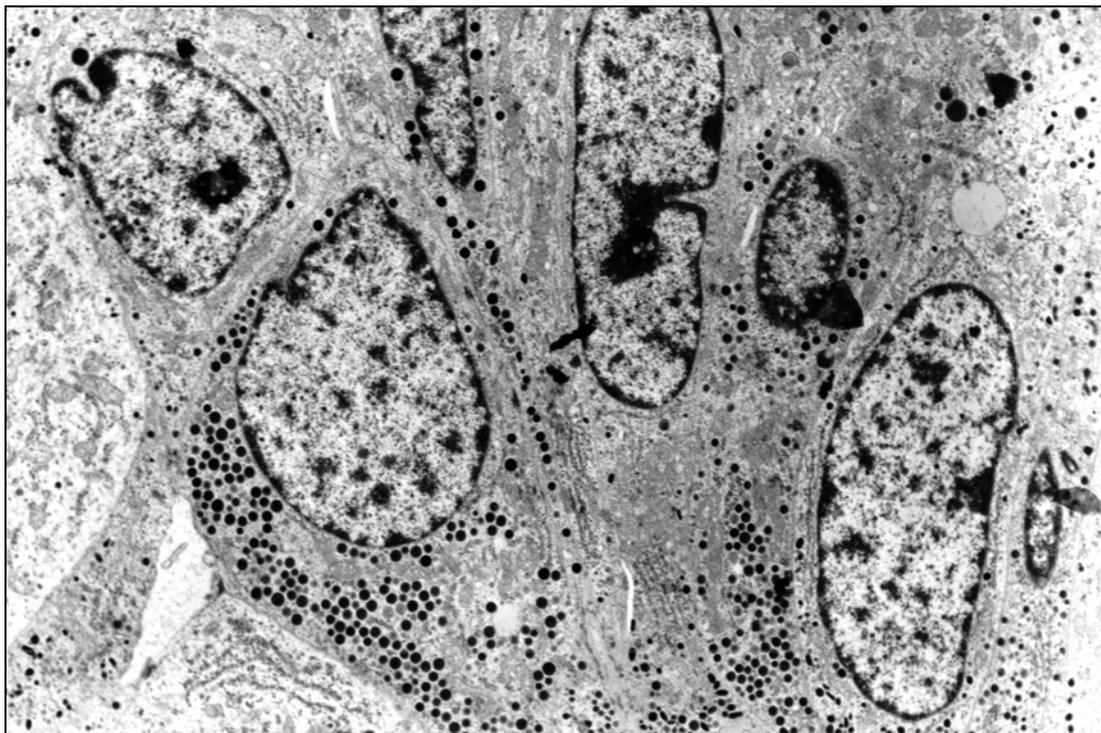


Figura 8. Fotografía de microscopía electrónica de un tumor carcinoide. Gran cantidad de gránulos neuroendocrinos, de morfología homogénea y distribución difusa dentro del citoplasma de la misma célula y entre células del mismo tumor.

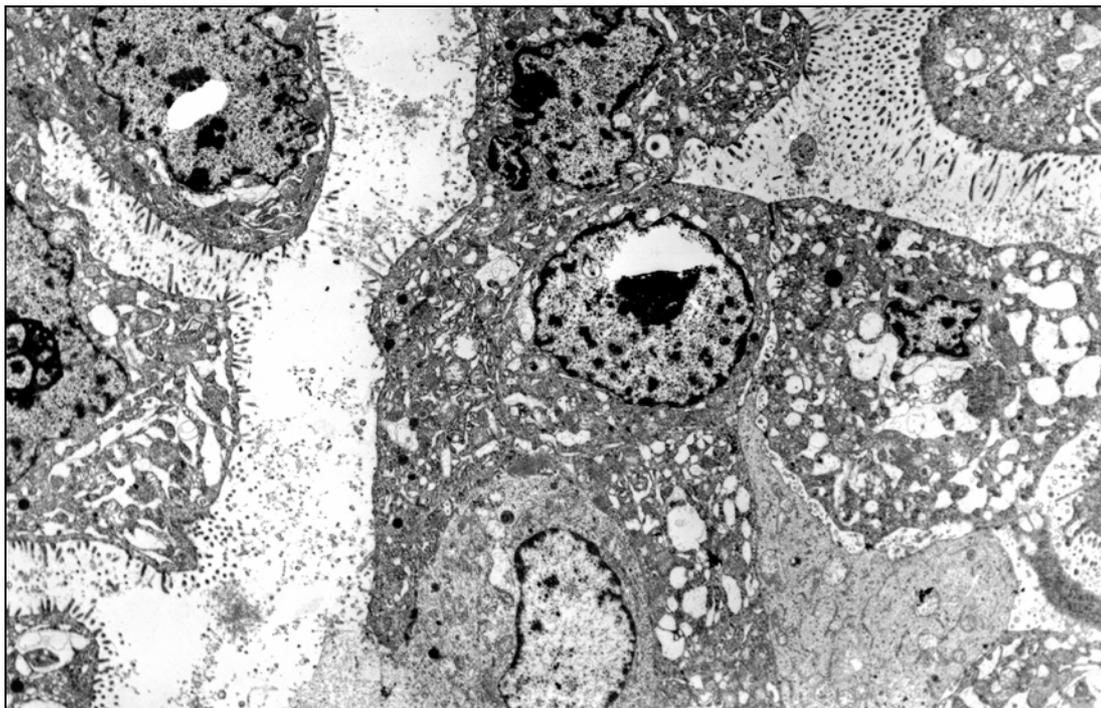


Figura 9. Microscopía electrónica de un adenocarcinoma, con microvellosidades en la superficie de las células. La cantidad de gránulos neuroendocrinos es menor, la distribución más irregular, con gránulos en la superficie apical y la morfología más pleomórfica.

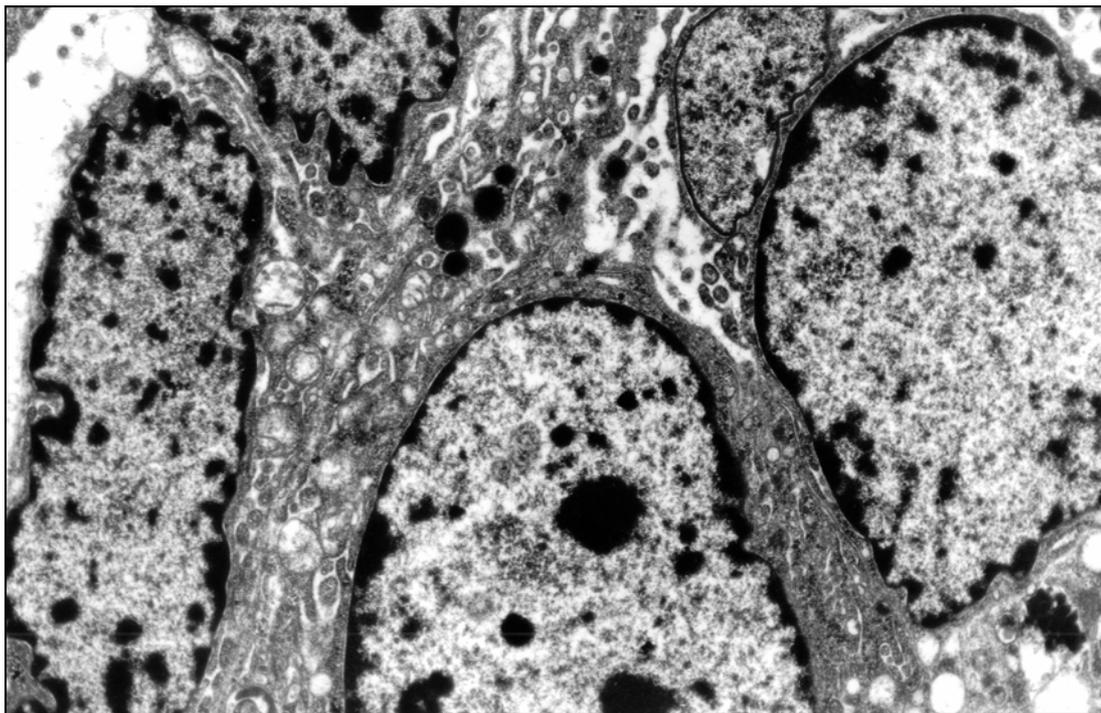


Figura 10. Detalle de la morfología de los gránulos neuroendocrinos de un adenocarcinoma.

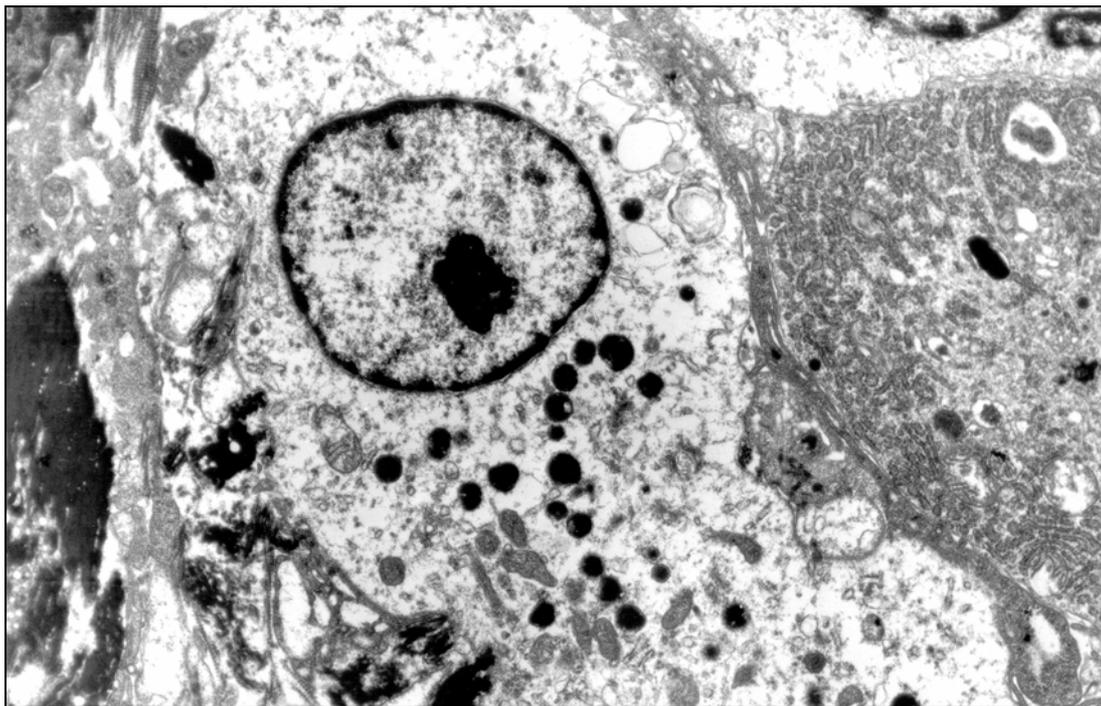


Figura 11. Carcinoma epidermoide con gránulos neuroendocrinos en el citoplasma de las células.

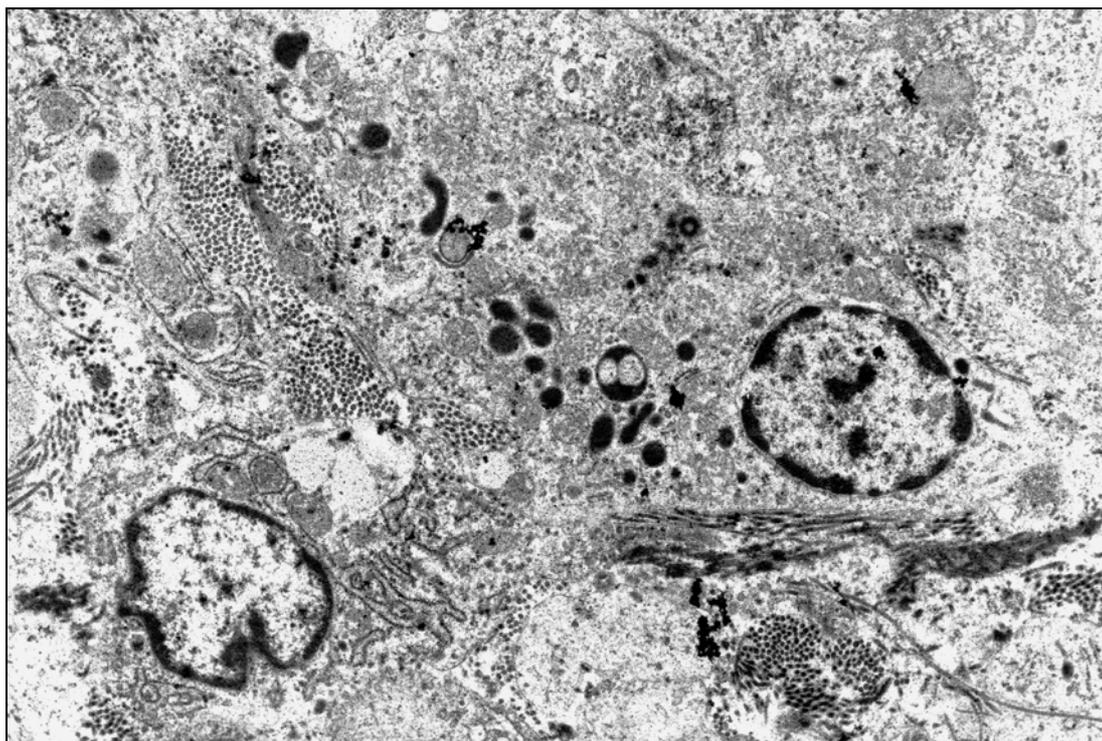


Figura 12. Variabilidad en la morfología de los gránulos neuroendocrinos en un carcinoma epidermoide.

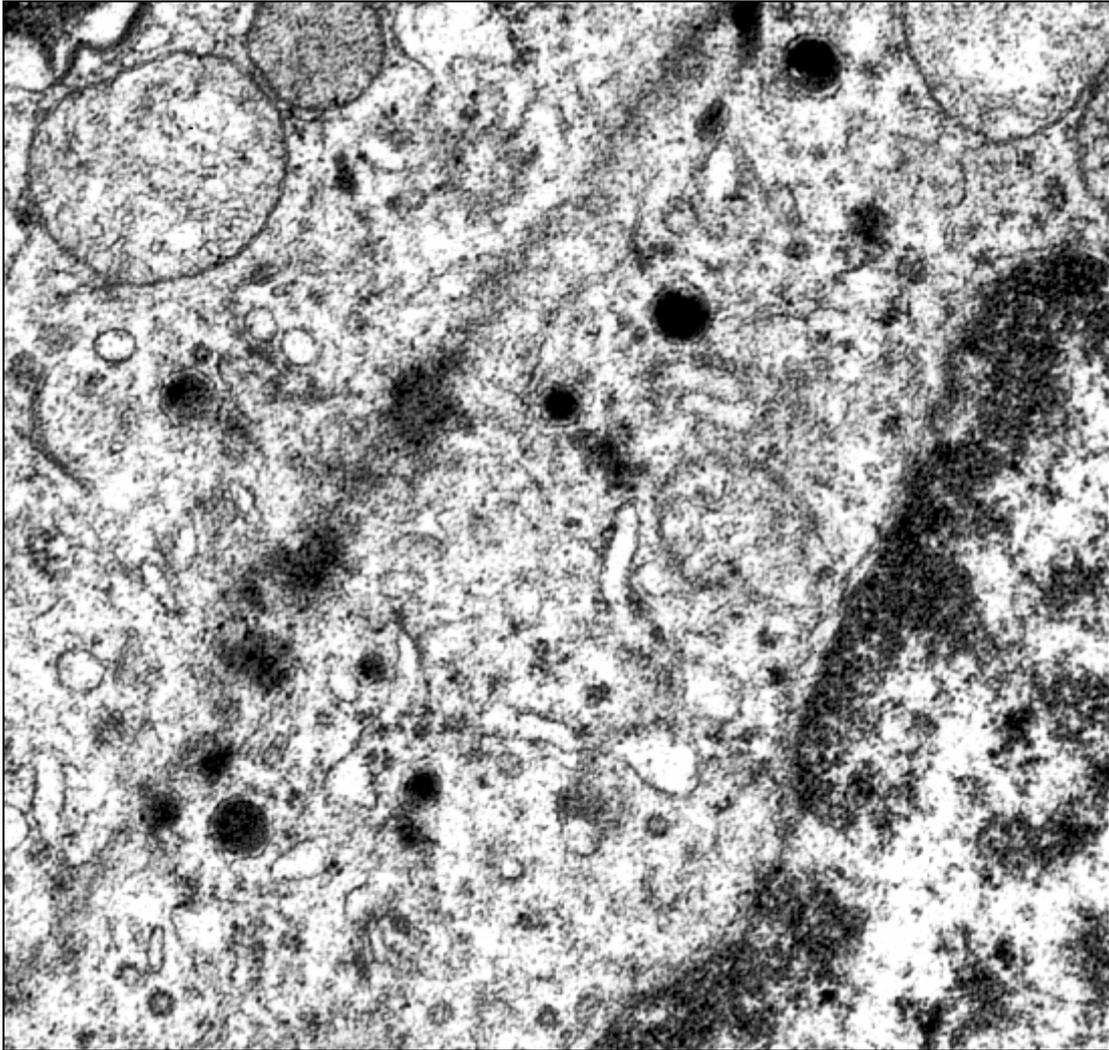


Figura 13. Gránulos neuroendocrinos en la periferia de las células de un carcinoma epidermoide. La morfología es clásica, con el centro electron-denso y halo claro periférico. El tumor expresaba cromogranina y sinaptofisina con técnicas de inmunohistoquímica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arrigoni MG, Woolner LB, Bernatz PE. Atypical carcinoid tumors of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1972;64:413-21.
2. Baldi A. et al. Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung carcinomas. *In vivo*, 2000. Jan-Feb;14(1):109-14.
3. Banks PM. Diagnostic applications of an immunoperoxidase method in haematopathology. *J Histochem Cytochem*;27: 1191-1194. 1979.
4. Bartek J, Lukas J et al. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol*;187:95-99.1999.
5. Bensch KG, Corrin B, Pariente R. Oat-cell carcinoma of the lung. Its origin and relationship to bronchial carcinoid. *Cancer* 1968;22:1163-72.
6. Berendsen HH, de Leij L et al. Clinical characterization of non-small-cell lung cancer tumors showing neuroendocrine differentiation features. *J Clin Oncol*;7:1614-1620.1989.
7. Bergman S, Javadpour N. The cell surface antigen A, B o O(H) as an indicator of malignant potential in stage a bladder carcinoma: preliminary report. *J Urol* 1978;119:49-51.
8. Black M, Carey FA. Expression of the pro-opiomelanocortin gene in lung neuroendocrine tumours: in situ hybridisation and immunohistochemical studies. *J Pathol* 169:329-334.1993.
9. Brozman M. Immunohistochemical analysis of formaldehyde and trypsin ior pepsin-treated material. *Acta Histochem* 63: 251-260.1978.
10. Buckland RM. Strong signals from streptavidin-biotin. *Nature*; 557-558. 1986.

11. *Bunn PA, Linnoila RI. Small cell lung cancer, endocrine cells of the fetal bronchus, and other neuroendocrine cells express the Leu-7 antigenic determinant, present on natural killer cells. Blood;65:764-968.1985.*
12. *Carles J et al. NE differentiation as a prognostic factor in NSCLC. Lung cancer 1993;10:209-19.*
13. *Cartron JP. Structural and functional diversity of blood group antigens. Transfus Clin Biol 2001 Jun;8(3):163-199.*
14. *Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. Appl Psychol Measurment.20:37-46,1960.*
15. *Cutz E., Chan W. Ultrastructural and fluoresce histochemistry of endocrine (APUD-type) cells in tracheal mucosa of human and various animal species. Cell Tiss Res, 158:425-430. 1975.*
16. *Davidson I and Ni L.Y.. Loss of isoantigens A, B and H in carcinoma of the lung. Amer J. Pathol.;57:307-334.1969.*
17. *Davidson I et al. Isoantigens A, B and H in bening and malignant lesions of the cervix. Arch Pathol.;87:306-314.1969.*
18. *Davidson J, Ni IY. Loss of isoantigens A, B and H in carcinoma of the lung. Am J Pathol;57:307-334.1969.*
19. *Deftos LJ, Linnoila RI et al. Demonstrationof chromogranin A in human neuroendocrine cells lines by immunohistology and immunoassay. Cancer;62:92-97.1988.*
20. *Dobbins WO, Diagnostic pathologyof the intestine and colon. In Diagnostic electron microscopy. 1978; Vol 1:253-339.*

21. *Dresler CM et al. Immunostains for blood group antigens lack prognostic significance in T1 lung carcinoma. Ann Thorac Surg 1995 May;59(5):1069-73.*
22. *Dunnill MS, Gatter KC: cellular heterogeneity in lung cancer. Histopathology 10:461-475, 1986.*
23. *Erlandson RA: Diagnostic transmission electron microscopy of tumors. New York, NY. Raven Press pp124-131.1994.*
24. *Fallini B, Taylor CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their applications. Arch Pathol Lab Med; 107:105-117. 1983.*
25. *Fontaine J. Et al. Analysis of endoderm formation in the avian blastoderm by the use of quail-chick chimaeras: the problem of the neuroectodermal origin of the cells of the APUD series. J. Embryol. Exp. Morphol., 41:209-214. 1977.*
26. *Gazdar AF, Heiman LJ. Expression of neuroendocrine cell markers L-dopa decarboxylase, chromogranin A and dense core granules in human tumors of endocrine and non endocrine origin. Cancer Res 1988;48:4078-4082.*
27. *Gazdar AF, Linnoila RI. The pathology of lung cancer. Changing concepts and newer diagnostic techniques. Semin Oncol 1988;15:215-225.*
28. *Ghadially FN et al. Is it neuroendocrinoma (APUD-oma)? What type of neuroendocrinoma is it? Diagnostic Electron microscopy of tumors. 2nd edition. London, Butterworths 123-51, 1985.*
29. *Ghadially FN. The role of electron microscopy in the determination of tumor histogenesis. Diagn. Histopathol.,4:245-262.1985.*
30. *Ghadially GN: diagnostic electron microscopy of tumours. London, England, Butterworths,1980.*

31. Gordon GB, Miller LR. Studies on the bronchial counterpart of the Kultchitzky (argentaffin) cell and innervation of bronchial glands. *J Ultrastr Res* 1965;12:668-86.
32. Gosney JR et al. Endocrine Pathology of the lung. In: Anthony PP Mathews RNM eds. *Recent advances in histopathology*.16.Edinburgh. Chapter 3. Livingstone,147-166.1994.
33. Gould VE, Linnoila RI. Neuroendocrine components of the bronchopulmonary tract: hyperplasias, dysplasias and neoplasms. *Lab. Invest.*, 49:519-537.1983.
34. Gould VE, Linnoila RI. Pulmonary neuroepithelial bodies, neuroendocrine cells and pulmonary tumors. *Human Pathol* 1982;13:1064-6.
35. Gould VE, Wiedenmann B et al. Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. *Am J Pathol* 126:243-257.1987.
36. Graziano SL et al. Analysis of NE markers, HER2 and CEA before and after chemotherapy in patients with stage IIIA non-small cell lung cancer: a Cancer and Leukaemia Group B study. *Lung Cancer* 1998 Sep;21(3):203-11.
37. Graziano SL et al. Blood group antigen A and flow cytometric analysis in resected early-stage NSCLC. *Clin Cancer Res* 1997 Jan;3(1):87-93.
38. Graziano SL et al. The prognostic significance of neuroendocrine markers and carcinoembryonic antigen in patients with resected stage I and II non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994 Jun 1;54(11):2908-13.
39. Graziano SL et al. The use of neuroendocrine immunoperoxidase markers to predict chemotherapy response in patients with NSCLC. *J Clin Oncol* 1989 Oct;7(10):1398-406.

40. Greenlee RT, Hill-Harmon MB et al. *Cancer Statistics, 2001. CA Cancer J Clin, 51:15-36.2001.*
41. Hammar SP. *Adenocarcinoma and large cell undifferentiated carcinoma of the lung. Ultrastr Pathol., 11:251-274.1987.*
42. Hammar SP, Bolen JW. *Ultrastructural and histochemical features of common lung tumors: an overview. Ultrastr Pathol., 9:283-318.1985.*
43. Hammond EH, Sause WT. *Large cell neuroendocrine tumors of the lung. Clinical significance and histopathologic definition. Cancer 1985;56:1624-9.*
44. Hammond EH, Yowell RL. *Neuroendocrine carcinomas: role of immunocytochemistry and electron microscopy. Human Pathology. Vol 29. N° 12(December1998).*
45. Heggeness MH, Ash JF. *Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. J Cell Biol 73: 738-783. 1977.*
46. Henderson BE et al. *Toward the primary prevention of cancer. Science 254:1131. 1991.*
47. Henderson DW, Papadimitriou JM: *ultrastructural appearances of tumours. A diagnostic atlas (ed 2). Edinburgh, Scotland. Churchill Livingstone, 1986.*
48. Hirohashi S, Ino Y et al. *Distribution of blood group antigens A, B, H and I (Ma) in mucus producing adenocarcinoma of the lung. J. Natl Can Inst.72:1299-1305.1984.*
49. Hirsch FR, Ottensen G et al: *Tumor Heterogeneity in lung cancer based on light microscopic features. A retrospective study of a consecutive series of 200 patients, treated surgically. Virch Arch (A) 402:147-156,1983.*

50. Hsu SM, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an Avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*; 75: 734-738.1981.
51. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*; 29: 577-580.1981.
52. Huang S, Minassian H, More JD. Application of immunofluorescent staining improved by trypsin digestion. *Lab Invest* 1976; 35: 383-391.
53. Ito N, Hirota T. Histochemical and cytochemical localization of blood group antigens. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 1992; Vol 25 N°2.
54. Jensen et al. A comparison of synaptophysine, chromogranin and L-dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990 Sep 15;50(18):6068-74.
55. Johannessen JV, Gould VE et al. The fine structure of human thyroid cancer. 1978; *Human Path.*9:385.
56. Johnson BE, Russell E et al. MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Chem Biochem; Suppl* 24:210-27.1996.
57. Kaiser K, Schmid W et al. Expression of neuroendocrine markers (neuron specific enolase, synaptophysin and bombesin) in carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract*, 183:412-417.1988.

58. Kibbelaar R.B., Moolenaar K.E. et al. "Neural cell adhesion molecule expression, neuroendocrine differentiation and prognosis in lung carcinoma" *Eur J Cancer* 1991;27(4): 431-435.
59. Kiriakogiani et al. The value of neuroendocrine markers in non-small cell lung cancer: a comparative immunohistopathologic study. *Lung Cancer* 1994 Dec;11(5-6):353-64.
60. Kivelä T, Tarkkanen A et al. Synaptophysin in the human retina and retinoblastoma. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*,30:212-219.1989.
61. Kluskens LF, Kluskens JL et al. Lectin binding in endometrial adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1984;82:259-266.
62. Kwa HB, Michalides RJ et al. "The prognostic value of NCAM, p53 and cyclin D1 in resected non-small cell lung cancer". *Lung cancer* 1996 Jun;14(2-3):207-17.
63. Lack EE, Mercer LA. Modified grimelius argyrophil technique for neurosecretory granules. *AM J Surg Pathol*;1:275-277.1977
64. Lantuejuol S, Moro D et al. "Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors" *Am J Surg Pathol* 2000 Feb;24(2):319-20.
65. Lauweryns JM, Van Ranst L. Leu-7 immunoreactivity in human, monkey and pig bronchopulmonary neuroepithelial bodies and neuroendocrine cells. *J Histochem Cytochem*;35:687-691.1987.
66. Lawreyns JM, Van Ranst L et al. Chromogranin in bronchopulmonary neuroendocrine cells. Immunocytochemical detection in human, monkey and respiratory mucosa. *J Histochem Cytochem*;35:113-118.1987.

67. Lee I, Gould VE. Synaptophysin expressed in the bronchopulmonary tract: neuroendocrine cells, neuroepithelial bodies and neuroendocrine neoplasms. *Differentiation* 3:115-125.1987.
68. Lee JS et al. Expression of blood-group antigen A: a favorable prognostic factor in NSCLC. *N Engl J Med* 1991 Apr 18;324(16):1084-90.
69. Leube RE, Kaiser P et al. Synaptophysin: molecular organization and m-RNA expression as determined from cloned c-DNA. *EMBO J.* 6:3261-3268.1987.
70. Linnoila RI et al. Impact of neuroendocrine differentiation in NSCLC. The LCSG experience. *Chest* 1994 Dec;106(6Suppl):367s-371s).
71. Linnoila RI et al. Neuroendocrine differentiation in endocrine and non endocrine lung carcinomas. *Am J Clin Pathol* 1988 Dec;90(6):641-52.
72. Loy TS et al. Immunostaining in the diagnosis of pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol* 1995 Feb;19(2):173-82.
73. Lyda MH, Laurence MW. Immunoreactivity for epithelial and neuroendocrine antibodies are usefull in the differential diagnosis of lung carcinomas. *Hum Pathol* 2000;31:980-987.
74. Lloyd RV, Wilson BS. Specific endocrine tissue marker defined by a monoclonal antibody. *Science*;222:628-630.1983.
75. Marchevsky AM, Kleinerman J. Immunocytochemical studies of APUD cells in airways. Effects of nitrosodiethylamine and nitrogen dioxide. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 106:400-403. 1982.
76. Marchevsky et al. Quantitative studies of argyrophilic APUD cells in airways. The effects of sensitization and anaphylactic shock. *Am Rev Respir Dis*, 129:477-480. 1984

77. Masamune H. et al. *Mohsch-positivemucopolysaccharides of gastric cancers as compared with the corresponding components of gastric mucosae. Tohokus exp. Med.*; 68: 81-91.1958.
78. Matsumoto H, Muramatsu H et al. *Correlation of expression of ABH blood group carbohydrate antigens with metastatic potential in human lung carcinomas. Cancer* 1993;72:75-81.
79. McDowell EM, Barrett LA. *Observations on small granule cells in adult human bronchial epithelium and in carcinoid and oat cell tumors. Lab Invest* 1976;34:202-6.
80. Miettinen M. *Synaptophysin and neurofilament proteins as markers for neuroendocrine tumors. Arch Pathol. Lab. Med.*,111:813-818.1987.
81. Miller KD, Singh N, Wotherspoon AC. *Current trends in immunocytochemistry. En: Kirkham N, Hall P. Progress in pathology vol 1. Ed Churchill Livingstone, 1995. Edinburgh.*
82. Mooi WJ, Dewar A. *Non-small cell lung carcinomas with neuroendocrine features. A light microscopic, immunohistochemical and ultrastructural study of 11 cases. Histopathology* 1988;13:329-37.
83. Mooi WJ, Dingemans KP. *Ultrastructural heterogeneity of lung carcinomas: representativity of samples for electron microscopy in tumor clasification. Hum Pathol Dec* 1990;21:1227-1234.
84. Mooi WJ, van Zandwijk N et al. *The "grey area" between small cell and non-small cell lung carcinomas. Light and electron microscopy versus clinical data in 14 cases. J Pathol* 149:49-54.1986.

85. *Mulshine J et al. Preliminary report of prospective trial of NE marker analysis and in vitro drug sensitivity testing in patients with NSCLC. (Abstr 713). Proc Am Soc Clin Oncol 1987;6:181.*
86. *Navone F, Jahn R. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. J Cell Biol 103:2511-2527.1986.*
87. *Pearse AGE et al. The APUD cell concept and its implications in pathology. 1974; Path Ann.9:27.*
88. *Pearse AGE, Takor T. Embriology of the diffuse neuroendocrine system and its relationship to the common peptides. Fed Proc.38:2288-2294.1979.*
89. *Pearse AGE. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. J. Histochem. Cytochem., 17:303-310. 1969.*
90. *Pelosi G, Pasini F, Sonzogni A et al. Prognostic implications of neuroendocrine differentiation and hormone production in patients with stage I nonsmall cell lung carcinoma. Cancer. 97:2487-97.2003.*
91. *Poola I et al. Expression of NSE, Chromogranin A, synaptophysin and Leu-7 in lung cancer cell lines. J Exp Clin Cancer Res 1998 Jun;17(2):165-73.*
92. *Pujol JL et al. Neural cell adhesion molecule and prognosis of surgically resected lung cancer. Am Rev Respir Dis. 1993 Oct;148(4Pt1):1071-5.*
93. *Pujol JL, Simony J, Demoly P et al. "Neural cell adhesion molecule and prognosis of surgically resected lung cancer". Am Rev Respir Dis 1993 Oct;148(4 Pt 1):1071-75.*

-
94. Raymond BN, Claire MP. Comparison of the usefulness of histochemistry and ultrastructural cytochemistry in the identification of neuroendocrine neoplasms. *Amer J Clin Pathol*;85(3):289-296.1985.
 95. Rehm H, Wiedenmann B. Molecular characterization of synaptophysin, a mayor calcium binding protein of the synaptic vesicle membrana. *EMBO J*, 5:535-541.1986.
 96. Reif MS, Socinski MA et al. Evidence-based medicine in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Chest Med*;1:107-20.2000.
 97. Rice TW et al. Expression of blood group antigen A by stage I non-small cell lung carcinomas. *Ann Thorac Surg* 1995 Mar;59(3):568-72.
 98. Roggli VL, Vollmer RT, et al: lung cancer heterogeneity: A blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol* 16:569-579, 1985.
 99. Ruckdeschel J, Linnoila RI et al. The impact of neuroendocrine and epithelial differentiation on recurrence and survival in patients with lung cancer. *Proc. 6th World Conference on lung cancer. Lung cancer*;7(suppl):56.1991.
 100. Said JW, Vimadala S et al. Immunoreactive neuron-specific enolase, bombesin and chromogranin as markers for neuroendocrine lung tumors. *Hum Pathol*;16:236-240.1985.
 101. Saldaña MJ. Study of resected and postmortem lung specimens. *En Pathology of pulmonary disease. J. B. Lippincott Company, Philadelphia,1994.*
 102. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol*;16:1207-17.1998.

103. Schleusener JT et al. NE differentiation is an independent prognostic factor in chemotherapy-treated nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer Apr* 1;77(7):1284-91.
104. Sekido Y, Fong KM et al. Progress in understanding the molecular patogénesis of human lung cancer. *Biochimica et biophysica acta*;1378:F21-F59.1998.
105. Shen L. et al. *Zhonghua Bing Li Xua Za Zhi* 1993 Aug;22(4):201-3.
106. Shimosato Y. Lung cancer: its histogenesis, differentiation and prognostic factors. *Trans Soc Pathol* 1983;72:29-57.
107. Skov BG, Sorensen JB et al. Prognostic impact of histologic demonstration of chromogranin A and neuron specific enolase in pulmonary adenocarcinoma. *Ann Oncol*;2:344-360.1991.
108. Souhami RL. Neuroendocrine phenotype, chemosensitivity and prognosis in adenocarcinoma of the lung (editorial). *Ann Oncol*;2:323-324. 1991.
109. Sundaresan V et al. Neuroendocrine differentiation and clinical behaviour in non-small cell lung tumours. *Br J Cancer* 1991 Aug;64(2):333-8.
110. Sundaresan V reeve JG et al. Neuroendocrine differentiation and clinical behaviour in non-small cell lung tumors.. *Proc. 6th World Conference on Lung Cancer. Lung cancer*;7(suppl):50.1991.
111. Taylor CR, Kledzik G. Immunohistologic techniques in surgical pathology. A spectrum of "new" special stains. *Hum Pathol*; 12: 590-596. 1981.
112. Travis WD, Colby TV et al. WHO histological typing of lung and pleural tumors, 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 1999 (in press).
113. Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG. Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural,

- immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. Am J Surg Pathol* 1991;15:529-53.
114. Warren WH, Faber LP. Neuroendocrine neoplasms of the lung: a clinicopathologic update. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989;98:321-32.
115. Wertz H et al. Results after surgery in undifferentiated large cell carcinoma of the lung: the role of NE expression. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997 Nov;12(5):698-702.
116. Wiedenmann B, Franke W et al. Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,83:3500-3504.1986.
117. Yamamoto F, Clausen H et al. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature (Lond.)*1990;345:229-233.