

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE CD44 EN
PROCESOS PRENEOPLÁSICOS Y
NEOPLÁSICOS DE ESÓFAGO, ESTÓMAGO Y
PÁNCREAS**

Memoria para optar al Grado de Doctor, presentada por
Eva Castellà Fernández

Don AURELIO ARIZA FERNÁNDEZ, Profesor Titular del Departamento
de Ciencias Morfológicas de la Universidad Autónoma de Barcelona,
certifica que ha dirigido el trabajo de investigación realizado por doña
EVA CASTELLA FERNÁNDEZ para optar al grado de doctora.

Finalizado el mismo, solicita su valoración para que pueda ser presentado y defendido
ante el tribunal que corresponda.

Badalona, 20 de abril de 2000

Fdo. Aurelio Ariza

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría agradecer al profesor Aurelio Ariza que haya depositado en mi su confianza para llevar a cabo este proyecto de tesis. Asimismo, le estoy agradecida por haber despertado mi interés hacia el complejo, aunque interesante campo de la biología molecular y su aplicación al estudio de la carcinogénesis. Su rigor a la hora de dirigir este trabajo, sus aportaciones metodológicas y sus orientaciones constantes han sido para mi de gran ayuda.

A la Dra. Isabel Ojanguren debo el haber podido llegar a concluir este trabajo. Le doy las gracias por su continua disponibilidad y su incansable apoyo y sobretodo, por haberme animado a seguir adelante en los momentos de mayor dificultad.

Al profesor J.J. Navas Palacios le agradezco el haber propiciado el medio científico y la infraestructura que en definitiva , han permitido la realización de este trabajo.

A todas las personas que han participado en la ejecución de los trabajos que componen este proyecto de tesis, al equipo de biólogos por facilitarme la comprensión del funcionamiento del CD44 y a Ángeles Vasalo por no haber cejado en su propósito de obtener un resultado óptimo con las técnicas de inmunohistoquímica.

Al Fondo de Investigación Sanitaria por la financiación de los reactivos utilizados en los tres trabajos que integran el proyecto de tesis (ayudas FIS 93/1345 y FIS 94/622).

A mi hermana Georgina por haberse prestado a la difícil corrección de un trabajo no literario.

A José Tura por la resolución de los problemas informáticos.

A todas las personas del Servicio de Anatomía Patológica que me han ayudado no sólo en le desarrollo de la tesis , sino también en mi trabajo diario.

INDICE

1. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS
2. INTRODUCCIÓN GENERAL
3. RESULTADOS

CAPITULO 1
EXPRESSION OF CD44H AND CD44V3 IN NORMAL
OESOPHAGOUS, BARRETT MUCOSA, AND OESOPHAGEAL
CARCINOMA

CAPITULO 2
DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD44 VE IN
ADENOCARCINOMA OF THE PANCREAS: AN
IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

CAPITULO 3
DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD44 V6 IN METASTASES
OF THE INTESTINAL AND DIFFUSE TYPES OF GASTRIC
CARCINOMA

4. DISCUSIÓN
5. CONCLUSIONES
6. BIBLIOGRAFÍA

1. PRESENTACIÓN DEL TEMA Y OBJETIVOS DE LA TESIS

El proceso de diseminación de las células malignas depende de su capacidad de producir metástasis, es decir, de traspasar los compartimientos que las confinan en condiciones normales y de crecer en localizaciones distantes del tumor primario. Este proceso se inicia en los tumores epiteliales malignos con el paso de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo, que tiene lugar cuando las células atraviesan la membrana basal y acceden al estroma. La capacidad que adquieren algunas células del tumor primario para separarse de las células vecinas, destruir la membrana basal e invadir la matriz extracelular adyacente constituye la característica básica que las diferencia de las células estacionarias o no metastatizantes. A partir de este momento, las células pueden alcanzar los vasos linfáticos y sanguíneos, donde deberán luchar contra las fuerzas físicas del torrente circulatorio y contra el ataque del sistema inmune. Sólo algunas de estas células tumorales lograrán extravasarse a los órganos diana donde se desarrollaran las micrometástasis, una vez se haya establecido la red vascular necesaria mediante el proceso de la angiogénesis.

En el proceso de diseminación y metástasis resultan determinantes las interacciones de las células malignas entre sí, con las células estromales y endoteliales y con los componentes de la matriz extracelular. Estas interacciones están regidas por multitud

de moléculas denominadas *moléculas de adhesión*, las cuales se agrupan en cinco familias. CD44 constituye una de estas familias.

La familia de proteínas de membrana CD44 está codificada por un único gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11 (locus 11p13). Este gen abarca 21 exones, 10 de los cuales (exones 1-5 y 16-20) se expresan conjuntamente y constituyen la isoforma estándar (CD44s). Los exones restantes pueden ser seleccionados e incluidos en la proteína final mediante un mecanismo de *splicing* alternativo. Las proteínas que resultan de la inclusión de distintas combinaciones de estos exones son múltiples y se denominan *isoformas variantes*. La elección de los exones variables que serán incluidos en la proteína final se produce en la fase de transcripción del RNA mensajero. Una célula individual puede cambiar repetidamente el *splicing* del pre-RNA mensajero de su CD44. Mediante la técnica de la PCR (*polymerase chain reaction*) se han identificado hasta la fecha hasta 30 productos de *splicing* diferentes, con lo cual se ha comprobado que la diversidad de secuencias de CD44 es superior a la de cualquier otra familia de proteínas que utilice el *splicing* alternativo.

A la isoforma más prolífica de CD44 se le aplicó el término de CD44 estándar (CD44s). Como ya se ha mencionado, el RNAm de esta isoforma no contiene ningún exón variable y suele expresarse en linfocitos y en células epiteliales y estromales normales. En cambio, se ha comprobado que en los tejidos tumorales el patrón de

expresión de CD44 es mucho más complejo e incluye isoformas variantes múltiples. A partir de este hecho se ha postulado la hipótesis de que CD44 proporciona a las células tumorales una especie de código postal que les permite adoptar un comportamiento biológico determinado, que en ocasiones incluye los pasos necesarios para la diseminación y la producción de metástasis.

En 1991 Günthert y col., en trabajos experimentales en ratas, demuestran que la inclusión de la secuencia de CD44 que contiene el exón variable v6 en el genoma de una línea celular de carcinoma de páncreas no metastatizante le confiere a esta línea capacidad metastásica. Asimismo, el bloqueo de este exón mediante anticuerpos específicos priva a estas células de su capacidad metastásica al ser inyectadas en ratones atímicos.

A partir de la publicación de estos resultados, se inician multitud de trabajos que investigan la expresión de las distintas isoformas de CD44 en tumores hematológicos y sólidos en humanos. Los resultados obtenidos parecen indicar que las células malignas tienden a expresar un patrón de isoformas variantes más complejo que su contrapartida normal, incluyendo habitualmente el exón v6, inicialmente relacionado con la capacidad metastatizante en trabajos experimentales. Así pues, la expresión de CD44 y sus variantes se ha correlacionado con la evolución clínica y el pronóstico de distintas neoplasias humanas.

En lo que hace referencia al aparato digestivo, la expresión de determinadas isoformas de CD44 se ha relacionado con la progresión tumoral y con una mayor potencialidad metastásica. En 1993 Wielenga y col., mediante métodos de inmunohistoquímica, describen una mayor expresión de la isoforma de CD44 que contiene el exón v6 en los adenocarcinomas metastásicos de colon que en los no metastásicos. Con posterioridad, Mulder y col. (1995) demuestran la implicación de este exón variable en la progresión tumoral desde el adenoma hasta el adenocarcinoma de colon.

Teniendo en cuenta los antecedentes comentados, nos planteamos la posibilidad de investigar la participación de CD44 en la progresión tumoral de varios de los procesos neoplásicos más frecuentes del esófago, estómago y páncreas. El estudio se ha realizado de forma retrospectiva y se ha basado en la detección inmunohistoquímica de diversas isoformas de CD44 en material incluido en parafina del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol.

En concreto, los objetivos que nos propusimos al iniciar este trabajo fueron los siguientes:

1. Determinar la expresión de las distintas isoformas de CD44 en la mucosa esofágica normal, el esófago de Barrett, el carcinoma escamoso esofágico y el adenocarcinoma de esófago.

2. Conocer la expresión de las distintas isoformas de CD44 en el tejido pancreático normal, la pancreatitis crónica y el adenocarcinoma de páncreas.

3. Determinar la expresión de las distintas isoformas de CD44 en la mucosa gástrica normal, metaplásica y neoplásica, así como las diferencias al respecto entre los adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal y difuso y entre las fases de carcinoma superficial y carcinoma invasivo.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. INVASIÓN Y METÁSTASIS

2.1.1. EL PROCESO DE LA INVASIÓN Y LAS METÁSTASIS

Los organismos de los mamíferos se dividen en compartimientos tisulares separados por la matriz extracelular, la cual está constituida por la membrana basal y el estroma intersticial. En condiciones normales, las células se unen a una de las vertientes de la membrana basal y en la vertiente opuesta se encuentra el estroma intersticial, que contiene las células mesenquimales, fibroblastos y miofibroblastos. Durante la remodelación de los tejidos, así como en los procesos proliferativos benignos y en el carcinoma *in situ*, las poblaciones celulares epitelial y mesenquimal se mantienen en sus respectivos compartimientos y no se entremezclan.

La transición de carcinoma *in situ* a carcinoma invasivo se produce en el momento en que las células epiteliales atraviesan la membrana basal e invaden el estroma intersticial adyacente, donde interaccionan con las células estromales y con la matriz extracelular (Siegal 1981, Burtin 1982). Una vez en el estroma, las células tumorales invasivas pueden acceder a los vasos linfáticos y sanguíneos y alcanzar localizaciones distantes, donde dan lugar a las metástasis. Los vasos también están

rodeados de una membrana basal continua, que las células tumorales deben atravesar durante los procesos de intravasación y extravasación. Las membranas basales están constituidas por una densa red de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos (Vracko 1974, Martínez-Hernández 1983). En condiciones normales, estas membranas no presentan ningún poro lo suficientemente grande como para permitir el paso de una célula de forma pasiva. En consecuencia, la invasión de la membrana basal debe llevarse a cabo mediante un proceso activo.

Las células tumorales interaccionan con la membrana basal de forma distinta a como lo hacen las células normales. Las interacciones de las células tumorales con la membrana basal pueden dividirse en tres etapas: unión, disolución de la matriz y migración o locomoción. La primera fase consiste en la unión de los receptores de membrana de las células tumorales a determinados componentes de la membrana basal, como son la laminina, el colágeno y la fibronectina (Kramer 1980, Terranova 1980). La segunda fase se produce pocas horas después de la unión y consiste en la lisis de la membrana basal. Esta lisis se produce en el punto de contacto con la célula tumoral, que segrega enzimas proteolíticas que degradan la matriz. La tercera y última fase es la de locomoción, basada en la emisión de pseudópodos en uno de los extremos de la célula migratoria. Este proceso está regulado por determinados ligandos que se unen a la membrana plasmática y condicionan la movilización coordinada de elementos del citosqueleto (Liotta 1986).

En las distintas fases de invasión del estroma, de diseminación a través de los vasos sanguíneos y de formación de metástasis en localizaciones distantes intervienen numerosas moléculas de la superficie celular que regulan las interacciones de las células entre sí y de las células con la matriz extracelular. La mayoría de estas moléculas forman parte de un grupo denominado, de forma genérica, *moléculas de adhesión*. La interacción de distintos tipos de estas moléculas, así como la densidad y distribución de las mismas en la membrana plasmática, condiciona la afinidad de las células entre ellas y con la matriz extracelular.

2.1.2. LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Como se ha comentado en el punto anterior, los mecanismos moleculares que regulan la interacción directa de las células con la superficie de las células vecinas y con la matriz extracelular están mediados, en gran parte, por las moléculas de adhesión. La hipótesis de que el comportamiento de las células tumorales en el proceso de invasión y metástasis está condicionado principalmente por las moléculas de adhesión ha despertado un gran interés por el estudio de su función y de sus posibles alteraciones en relación con los distintos tipos de neoplasia.

Son muy numerosas las moléculas de adhesión identificadas, contándose entre ellas las que participan en la adhesión entre célula y célula (CAMs) y las que intervienen en la adhesión entre la célula y la matriz extracelular o entre la célula y el substrato (SAMs). La razón de la denominación moléculas de adhesión reside en que, para que una molécula pueda actuar con otra de la superficie celular de la célula adyacente o de la matriz circundante, ambas deben establecer contacto mediante la formación de puentes intermoleculares. Para poder separar estos puentes se requiere una cierta cantidad de energía, lo cual les confiere carácter de adhesión. No obstante, en muchas ocasiones la unión entre las células no es el principal propósito de la molécula de adhesión. La finalidad esencial de la interacción entre dos moléculas es el paso de información de una célula a la otra. Este propósito debe ser distinguido del epifenómeno de la generación de puentes de unión como un proceso interactivo entre las dos moléculas. Así pues, la finalidad de las moléculas de adhesión no es tanto producir un enlace molecular como capacitar a la célula para responder y reaccionar a su entorno.

Los campos en los que se estudiaron inicialmente las moléculas de adhesión son la diapédesis leucocitaria y la embriología, concretamente la migración celular durante el desarrollo embrionario. Los avances de la investigación en estos campos han permitido constatar que las moléculas implicadas en estos dos procesos, aparentemente tan distintos, son esencialmente las mismas o muy similares. Aunque se descubren continuamente nuevas moléculas de adhesión, éstas se clasifican según

sus características funcionales, estructurales y químicas en cinco familias bien establecidas.

2.1.2.1. CARACTERÍSTICAS FUNDAMENTALES DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Antes de describir las cinco familias en que se agrupan las moléculas de adhesión, hay que subrayar que las tres características comunes a todas ellas son más importantes que las diferencias (Freemont 1998):

1. Las moléculas de adhesión son glicoproteínas y actúan como vínculo molecular entre el interior y el exterior de la célula. Todas ellas son proteínas transmembrana que abarcan y atraviesan la membrana celular de un lado a otro. Como tales, constan de tres partes o dominios distintos. El dominio extracelular, que es la porción más voluminosa, está unido al dominio intramembranoso, que a su vez se une al dominio intracitoplasmático funcional.

2. Todas las moléculas se ponen en funcionamiento como respuesta a un estímulo externo (siempre otra molécula de adhesión) que se une al dominio extracelular y altera su estructura. La molécula que se une a la molécula de adhesión es muy

específica y se conoce como *ligando* de la molécula de adhesión. Estos ligandos pueden corresponder a tres categorías distintas:

a: Moléculas del mismo grupo (homotípicos).

b: Moléculas de distintos tipos (heterotípicos).

c: Proteínas o carbohidratos de la matriz extracelular.

3. La molécula de adhesión se une a otra molécula en el interior de la célula, y a través de ella es capaz de influir en la función celular. Algunas de estas moléculas forman parte del citosqueleto y otras son enzimas que pueden inducir un cambio químico en el interior de la célula, normalmente a través de la llamada *vía del segundo mensajero*.

2.1.2.2. LAS FAMILIAS DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Existen cinco familias de moléculas de adhesión:

A. Superfamilia de las inmunoglobulinas

B. Cadherinas

C. Integrinas

D. Selectinas

E. CD44

A. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBUNAS

Esta gran familia de moléculas se denomina así debido a la similitud que presentan sus componentes con las inmunoglobulinas (Springer 1990). El grupo incluye las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, así como moléculas que intervienen en el reconocimiento celular y de antígenos de los linfocitos y de otras células (CD3, CD4 y CD8, entre ellas). Otro subgrupo importante son las moléculas de adhesión intercelular (ICAM), que se encuentran ampliamente expresadas en las células endoteliales y epiteliales, NCAM, VCAM, y CEA (antígeno carcinoembrionario). De forma similar a la cadherina E, la superfamilia de las inmunoglobulinas interviene en procesos de adhesión homotípica (por ejemplo, NCAM se une a NCAM) o heterotípica (por ejemplo, NCAM de las células endoteliales se une a VLA-4 de los linfocitos).

B. CADHERINAS

Las moléculas de adhesión dependientes del calcio (cadherinas) reciben este nombre porque poseen *locus* de unión a moléculas de adhesión y al calcio (Takeichi 1990). De forma típica, se unen a otras cadherinas de la superficie de las células adyacentes. Sus dominios citoplasmáticos se unen a un grupo de moléculas llamadas *cateninas*, que a su vez se unen a filamentos intermedios del citosqueleto.

La cadherina mejor caracterizada es la cadherina E. Se trata de una molécula cuya expresión está regulada por el protooncogén ErbB2. Su expresión es esencial para la organización inicial en el desarrollo embrionario y, por tanto, es una de las primeras moléculas de adhesión que se expresan en los humanos. La cadherina E se concentra en las uniones celulares del tipo *unión adherens* y a través de las cateninas se une a la actina. La desmogleína y la desmocolina son cadherinas que forman parte de los desmosomas y por medio de las cateninas se unen a la citoqueratina.

La mayoría de los trabajos (Behrens 1989, Frixen 1991) que estudian la intervención de las cadherinas en la transformación neoplásica están basados en la cadherina E. Los distintos ensayos realizados *in vitro* permiten afirmar que la cadherina E funciona como inhibidora de la invasión. Asimismo, se ha constatado esta propiedad mediante el estudio de varias líneas de células tumorales derivadas de carcinomas humanos de vejiga, mama, pulmón y páncreas. Las líneas de carcinoma con un fenotipo epitelioide que expresan cadherina E no son invasivas, mientras que las que muestran un aspecto parecido al de los fibroblastos y no expresan cadherina E tienen un carácter invasivo. Se ha comprobado que en este último tipo de células, la invasividad puede ser inhibida mediante la transfección de cDNA de cadherina E y reinducida a partir del tratamiento con anticuerpos anti-cadherina E. Las líneas de cáncer colorrectal muestran también un cambio de fenotipo, de bien a mal diferenciado, cuando se tratan con anticuerpos anti-cadherina E. La transfección de

cDNA de cadherina E a una línea celular de carcinoma de colon pobremente diferenciado revierte su fenotipo maligno.

Se ha investigado la expresión de cadherina E en material histopatológico correspondiente a un amplio espectro de neoplasias, pero los resultados no son coincidentes. Algunos autores no han hallado reducción de la cadherina E en los tumores y sus metástasis, a diferencia de otros, que han detectado una disminución del nivel de cadherina E en las áreas de tumor pobremente diferenciado.

C. INTEGRINAS

Las integrinas son glicoproteínas de transmembrana constituidas por heterodímeros alfa-beta, que se expresan en las células epiteliales y en otros tipos celulares (Hynes 1987). Existen 15 cadenas alfa y 9 cadenas beta, lo que permite un considerable número de permutaciones moleculares. Inicialmente se clasificaban según la subunidad beta, pero en la actualidad se ha optado por una clasificación funcional. La mayoría de las integrinas, especialmente las pertenecientes a la subfamilia beta-1, actúan como SAMs, es decir, como receptores para proteínas de la matriz extracelular (colágeno, laminina y fibronectina). Algunas de ellas tienen especificidades solapadas y actúan como receptores de más de un tipo de proteína de la matriz extracelular. Estos receptores son determinantes en la organización de los

tejidos, ya que permiten la unión de las células a las moléculas de la matriz extracelular y a las membranas basales que se encuentran en diversos tejidos (músculo, tejido nervioso, etc.).

Otras integrinas actúan como moléculas de adhesión intercelular (CAM) y se localizan fundamentalmente en los leucocitos. Asumen la función de mediadoras en la interacción heterotípica entre células al unirse a miembros de la familia de las inmunoglobulinas, tales como las moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1, ICAM-2) y de adhesión vascular (VCAM).

Las integrinas son esenciales en los procesos de adhesión y migración celular. Su función es crítica en la diferenciación celular *in vitro*. Al igual que otros receptores, las integrinas transmiten información desde el exterior hacia el interior de la célula. El crecimiento y la diferenciación de las células del tejido conectivo y del tejido neural están influenciados por distintos sustratos cuyo efecto está mediado principalmente por las integrinas (Springer 1990).

Asimismo, se ha demostrado la existencia de alteraciones en la expresión de las integrinas en neoplasias epiteliales que incluyen el carcinoma de mama, pulmón, colon, próstata, estómago, páncreas, riñón y piel. La expresión difiere según los distintos tipos de tumores, pero en la mayoría de los estudios se describe una

disminución en las concentraciones de integrinas específicas de cada tejido de forma paralela a la pérdida de diferenciación.

D. FAMILIA DE LAS SELECTINAS

La familia de las selectinas está constituida por tres moléculas (selectinas E, P y L). Según los resultados de experimentos *in vitro* (Springer 1990), estas proteínas intervienen en las primeras fases de la cascada de acontecimientos que da lugar a la extravasación de leucocitos. Concretamente, la selectina E permite la adhesión de los neutrófilos, monocitos y linfocitos T de memoria endotelio vascular. Por otra parte, en cuanto a su posible función en las metástasis, se ha demostrado mediante experimentos con líneas celulares que la unión de células tumorales de carcinoma de colon (HT-29) al endotelio vascular activado por citocinas está condicionada por la selectina E.

E. CD44

En los estudios iniciales sobre CD44 se pudo constatar que, entre otras funciones, esta familia de moléculas está involucrada en fenómenos de adhesión celular tales

como la unión de linfocitos circulantes al endotelio vascular y las uniones de las células epiteliales y estromales entre sí o con la matriz extracelular.

Ya que en las lesiones neoplásicas es frecuente observar alteraciones en la cohesión celular, se empezó a investigar la posible alteración de estas moléculas en relación con los procesos tumorales. En este apartado se comentarán las características de CD44 en lo que respecta a su función como molécula de adhesión a nivel molecular.

CD44 tiene diversos ligandos que forman parte de la matriz extracelular y varían dependiendo del tipo de tejido (Sneath 1998). Entre estos ligandos se encuentran el hialuronato, el condroitín-sulfato, el heparán-sulfato, el colágeno, la laminina y la fibronectina. El principal ligando de CD44 es el hialuronato.

HIALURONATO

El hialuronato (HA) es un glicosaminoglicano constituido por un polímero lineal que, a diferencia del resto de los glicosaminoglicanos, no está unido a una proteína principal de forma covalente. Los polímeros de hialuronato pueden tener un peso molecular de varios millones de kD. En solución, el polímero adopta una estructura en espiral (*random coil*) de unos 500 nm de diámetro. Debido a la multitud de residuos hidrofílicos que contiene en su superficie, la molécula atrapa una gran cantidad de solvente y adopta la estructura de una esfera hidratada. Así el HA,

mediante su capacidad de retener agua en el interior de la matriz, le confiere a ésta turgencia y resistencia a las fuerzas de compresión, en contraste con las fibras de colágeno, que son las responsables de la resistencia frente a las fuerzas de tracción.

A causa de su naturaleza laxa e hidratada, la capa de hialuronato mantiene a las células separadas entre sí, lo cual aumenta su capacidad de movimiento a la vez que permite su proliferación. El cese en el movimiento celular y el inicio de las uniones intercelulares se asocia con frecuencia a una disminución de HA y de las moléculas de superficie que se unen al mismo, así como un incremento en la enzima extracelular hialuronidasa capaz de degradar la matriz de HA. Estas funciones son determinantes en el proceso de migración celular y, como consecuencia, también condicionan de manera importante la invasión tumoral y el desarrollo de las metástasis.

Las células tumorales pueden segregar directamente hialuronato (Knudson 1991). Este hialuronato segregado se incorpora a la matriz extracelular e interviene en la regulación de la adhesión entre las células y el substrato. Presumiblemente, el incremento de la síntesis de ácido hialurónico puede estimular la migración y, en este sentido, favorecer la diseminación de las metástasis. El ácido hialurónico, además, se encuentra alrededor de la mayoría de las membranas basales (Underhill 1989) y, por tanto, puede contribuir al movimiento de las células tumorales a través de las mismas.

La degradación de los componentes de la matriz extracelular, en particular del hialuronato, ha sido implicada en la angiogénesis. De este modo, el hialuronato también interviene en el establecimiento del tumor inicial y de las metástasis en localizaciones distantes, induciendo la vascularización de los focos tumorales.

El extremo aminoterminal de la molécula de CD44 es una fracción constante, muy preservada en todas las isoformas de esta familia de moléculas. Es precisamente esta fracción constante la que actúa como *locus* de unión al hialuronato. Este dominio terminal está compuesto por dos grupos de aminoácidos cargados positivamente, los cuales se unen a una secuencia de seis azúcares del hialuronato.

La capacidad de las células para unirse al hialuronato vía CD44 está finamente regulada. Esta capacidad varía en función de la isoforma de CD44 que esté expresando la célula. Parece ser que, aunque las distintas isoformas variantes del CD44 tienen un único dominio de unión al HA, la capacidad de unión se altera con la presencia de los exones variables (Benett 1995). A este respecto, distintos trabajos demuestran que dicha capacidad de unión se incrementa proporcionalmente a los niveles de CC44v6 presentes en la superficie celular. Como ya se ha mencionado con anterioridad, se considera el exón v6 como un elemento decisivo en el proceso metastásico. En un principio se postuló que este exón podría ejercer su función a través de su enlace al hialuronato.

Sin embargo, a partir de una serie de trabajos experimentales en líneas celulares, se ha demostrado que la unión al hialuronato no es suficiente para el desarrollo de las metástasis (Sleeman 1996). Se llegó a esta conclusión ante la evidencia de que el anticuerpo monoclonal contra v6, que inhibe la producción de metástasis en el modelo tumoral del carcinoma de páncreas de rata, no interfiere en la unión al HA. De ello se deduce que las isoformas que expresan este exón actúan a través de la unión a algún otro ligando diferente del HA.

PROTEOGLICANOS

Los proteoglicanos son macromoléculas que se encuentran en la matriz extracelular y en la superficie de diversas células. Los proteoglicanos consisten en uno o más glicosaminoglicanos (polímeros lineales de disacáridos) unidos de forma covalente a una proteína principal (*core*). Los proteoglicanos se denominan según la estructura de la cadena principal de disacáridos que los compone.

En todos los proteoglicanos, las cadenas de glicosaminoglicanos, como el heparán-sulfato y el condroitín-sulfato, se unen covalentemente a residuos de serina de la proteína principal mediante conexiones constituidas por tres azúcares. Además de formar parte de la matriz extracelular, los proteoglicanos se unen a la superficie de distintos tipos celulares, especialmente de las células epiteliales. Las proteínas

principales de los proteoglicanos de la superficie celular tienen un dominio en la superficie interna de la membrana plasmática, otro dominio corto citosólico, y un largo dominio extracelular al que se unen escasas cadenas de glicosaminoglicanos como el heparán-sulfato o el condroitín-sulfato. Las cadenas de heparán-sulfato actúan de puente de unión al colágeno (tipos I, III y V) y a la fibronectina, que se encuentra en la matriz extracelular y que rodea las membranas basales. De esta manera, los proteoglicanos de la superficie celular anclan las células a las fibras de la matriz y a la membrana basal.

Cabe señalar también que, a la vez que actúan como componentes estructurales de la matriz extracelular y que intervienen en el anclaje a la membrana basal, los proteoglicanos, tanto extracelulares como de la superficie celular, desempeñan otras funciones a través de la unión a factores de crecimiento. Se ha propuesto la unión de los factores de crecimiento a los proteoglicanos a través de los glicosaminoglicanos como mecanismo para el reclutamiento o incorporación de factores de crecimiento a la membrana plasmática, presentación a los receptores específicos, regulación de su acción en las "células diana" (*at short range*) y creación de un gradiente en el interior del tejido.

Algunas isoformas de CD44 contienen heparán-sulfato, un GAG que puede unirse a distintos factores de crecimiento y citocinas. CD44s posee seis *locus* de unión con GAG, 5 de los cuales contienen la secuencia ser-gly- y pueden unirse a condroitín-

sulfato. Por el contrario, el exón v3 tiene la secuencia ser-gly-ser-gly, la cual puede modificarse con la unión a heparán-sulfato.

En 1995 Bennet y col. demuestran que únicamente las isoformas que contienen el exón variable v3 se modifican con la unión a heparán-sulfato (HS) y pueden actuar como presentadores de algunos factores de crecimiento. En concreto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el CD44 modificado con el HS puede unirse a b-FGF (*basic fibroblastic growth factor*) y a HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*). De forma simultánea, Hashimoto y col. (1995) comprueban que como consecuencia de la unión del HB-EGF al HS se produce una señal de activación que influye en la proliferación de los queratinocitos, ejerciendo así su función como factor de crecimiento autocrino en los epitelios escamosos. A diferencia de las formas variantes que contienen el exón v3, la forma estándar de CD44 no se modifica con el heparán-sulfato, aunque sí se une al condroitín sulfato.

Los resultados de estos trabajos sugieren que un examen de los tipos celulares que expresan la isoformas de CD44 que contienen el exón v3 y de las proteínas que se unen a heparán-sulfato y son presentadas por CD44 durante el desarrollo, el crecimiento tumoral y el establecimiento de las metástasis, permitiría conocer de que manera el CD44 contribuye en estos procesos biológicos.

2.2. CD44: ESTRUCTURA DEL GEN Y DE LA FAMILIA DE GLICOPROTEÍNAS

La estructura del gen CD44 ha sido descrita de forma detallada (Koopman 1993). Existen 19 exones en el gen CD44 humano, agrupados en cinco dominios estructurales. Los exones 1 a 5 codifican la porción extracelular de la proteína que incluye el segmento de unión al ácido hialurónico. El segundo segmento, codificado por los exones 6 a 14, representa la fracción extracelular variable de la molécula CD44 (v1 a v10), sujeta a un intenso *splicing* alternativo del RNAm. El tercer dominio de la proteína CD44 está codificado por los exones 15 y 16 y comprende la parte constante proximal a la membrana. El cuarto dominio es el segmento hidrófobo de transmembrana, codificado totalmente por el exón 17. El quinto dominio representa la fracción citoplasmática de la proteína CD44, que también está sujeta a *splicing* alternativo. En consecuencia, el CD44 puede contener una cola citoplasmática larga con setenta aminoácidos (forma expresada por los linfocitos de manera predominante) o una cola citoplasmática corta que contiene tres aminoácidos. Asimismo, las alteraciones en la longitud de la cola citoplasmática pueden modular señales intracelulares, ya que la cola citoplasmática tiene *locus* potenciales para la acción de proteínas como las cinasas A y C y para la unión a filamentos del citosqueleto.

2.3. CD44: EL PROCESO DE *SPLICING* ALTERNATIVO

El gen CD44 está localizado en el brazo corto del cromosoma 11. La secuencia genética puede codificar varias proteínas diferentes seleccionando algunos de los exones que la componen, es decir, el gen contiene exones constantes y exones variables. La elección de los exones variables se produce en el momento de la transcripción genética que da lugar al RNAm y a este proceso se le denomina *splicing* alternativo.

El *splicing* alternativo es uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica de las células eucariotas. Se lleva a cabo por largos complejos multicomponentes llamados *spliceosomas* que consisten en un conjunto de pequeñas ribonucleoproteínas nucleares que reconocen secuencias intrónicas (Konig 1996).

La mayor parte de los genes eucariotas que codifican proteínas contienen las secuencias codificadoras (exones) en segmentos discontinuos, interrumpidas por otras secuencias (intrones) que no forman parte del RNA maduro. Los intrones son eliminados del transcrito primario (pre-RNA) por el proceso denominado *splicing*.

Se podría definir el *splicing* alternativo como el mecanismo que determina en unos contextos la inclusión y en otros la exclusión de determinadas secuencias génicas en el RNA maduro.

El *splicing* alternativo permite la síntesis de múltiples productos diferentes a partir de un único gen. Es un mecanismo que genera variabilidad de productos, dando a cada uno de ellos características estructurales y funcionales potencialmente diferentes. Este mecanismo es especialmente importante en procesos complejos como el desarrollo embrionario (Rio 1993) la diferenciación tisular y la transducción de señales extracelulares. Las células individuales tienen la capacidad de cambiar el patrón de *splicing* alternativo de CD44 dependiendo de sus necesidades.

La isoforma que se expresa con más frecuencia es la que se conoce como CD44 estándar (CD44s), que es una proteína de 37 kDa. El RNAm de esta proteína no contiene ninguno de los exones variables. Las isoformas variantes de CD44 pueden contener uno o más exones variables. Se pueden producir distintas combinaciones de los exones variables y una misma célula puede cambiar repetidamente su patrón de *splicing*, dando lugar a distintas isoformas variantes según sus necesidades. Hasta el momento se han detectado, mediante PCR, unos 30 productos diferentes y se ha comprobado que la diversidad de las secuencias excede la de cualquier otra de las familias de proteínas que utilizan el *splicing* alternativo.

Las secuencias exónicas de CD44 de la rata, el ratón y el hombre presentan un alto nivel de conservación (Tölg 1993). Esto es válido tanto para los exones codificadores

de la forma estándar de la proteína como para los exones que le confieren variabilidad mediante el proceso de *splicing*. En cada una de las tres especies, los diez exones variables se corresponden perfectamente en cuanto a secuencias intrónicas y longitud exónica. Aparentemente, la función y el *splicing* de CD44 se conserva en las diferentes especies de mamíferos. La variabilidad conseguida mediante *splicing* es mayor que la de otros genes que también utilizan este procedimiento, algunos de los cuales codifican otras proteínas de adhesión (NCAM, fibronectina, CD45).

La región proximal de la membrana parece desempeñar un importante papel en la determinación de las propiedades de unión de CD44. La introducción de distintos exones en esta región posiblemente modula la adhesividad, bien mediante un cambio conformacional en el *locus* de unión al ácido hialurónico, o bien originando nuevos *loci* de unión para ligandos aún no identificados. La elección específica de distintos exones en una célula determinada posiblemente esté condicionada por señales procedentes del medio que la rodea. El conjunto de distintas variantes de CD44 que se expresan en una célula determinada podría representar un *código postal* que precisaría el destino final de las células migratorias o bien dictarían el potencial metastásico de las células tumorales (Jackson 1992).

Existen distintas hipótesis que intentan explicar los mecanismos de regulación del *splicing* (Konig 1996).

Una posibilidad es que los factores reguladores interfieran con la maquinaria general de *splicing* para cambiar su modo de acción (retención de secuencias exónicas *versus* exclusión de exones). Otro posible mecanismo de acción es que los factores reguladores rotulen o marquen secuencias exónicas individuales específicas para su retención o exclusión. Ya que la inclusión de secuencias exónicas variables del RNAm de CD44 está confinada a ciertos tipos celulares, es posible que exista una regulación específica de cada tipo celular del *splicing* alternativo de CD44. Este control podría estar mediado por la presencia de factores transactivadores positivos o negativos.

Los factores transactivadores negativos impedirían la inclusión de secuencias variantes exónicas y por tanto darían lugar a la expresión de la isoforma estándar de CD44 en la mayoría de los tejidos y podrían estar inactivados en células de ciertas vías de diferenciación o durante la progresión tumoral. De forma alternativa, la elección de una isoforma específica por *splicing* podría conseguirse mediante la inducción de reguladores positivos, los cuales seleccionarían la correspondiente combinación de exones variantes. En las células tumorales, los patrones de *splicing* pueden estar producidos por la *up-regulation* de tales factores positivos o por la mutación de elementos reconocidos por los reguladores del *splicing*.

2.4. CD44: DISTRIBUCIÓN DE CD44 EN LOS TEJIDOS NORMALES

TEJIDOS ADULTOS

Inicialmente, CD44s fue denominado CD44H o forma hematopoyética, debido a que se identificó en esta estirpe celular. Con posterioridad, se ha demostrado la expresión de esta isoforma, que sólo incluye la región constante de la molécula, en una gran variedad de tejidos (pulmón, mama, tubo digestivo, sistema nervioso central, piel...). Las isoformas variantes, que incluyen distintas combinaciones de los exones variables en su estructura, tienen una distribución mucho más restringida y se expresan en distintas células epiteliales con un patrón aparentemente específico para cada tipo de tejido. Este hecho sugiere que el proceso de *splicing* alternativo que da lugar a las isoformas variantes está estrechamente regulado y que posiblemente las isoformas variantes tienen funciones distintas a las de la isoforma estándar.

Concretamente, según un extenso trabajo llevado a cabo por Fox y col. (1994), los epitelios respiratorio, transicional y escamoso queratinizante y no queratinizante presentan inmunorreactividad para v3, v5 y v6. En cambio, los epitelios de las criptas

gastrointestinales y de los ductos pancreáticos sólo manifiestan reactividad focal y débil para estos exones variables. También se ha observado una positividad muy débil para CD44 en el epitelio endocervical y en las glándulas endometriales. Los elementos celulares y la matriz del estroma en general, hígado, corazón, riñón, ovario y tejido muscular liso y esquelético son negativos para las isoformas variantes de CD44.

En cuanto al tejido mamario, las células ductales normales no parecen expresar CD44 pero las mioepiteliales sí que expresan reactividad para CD44v3 y CD44v6. Por lo que se refiere al sistema nervioso central, CD44s se expresa en los astrocitos perivasculares de la sustancia blanca, mientras que en la sustancia gris la expresión es leve. En el ganglio linfático normal los linfocitos del manto de la zona interfolicular y de los sinusoides también presentan expresión de CD44s, mientras que las células de los centros germinales son negativas.

TEJIDOS FETALES

Se ha demostrado que durante las distintas fases del desarrollo embrionario se expresan numerosas variantes de CD44, sobretodo en los epitelios. Yu y col. (1997) han comprobado la expresión de isoformas variantes en los epitelios proliferantes del ratón embrionario, particularmente en las localizaciones donde interaccionan el

mesénquima y los epitelios. Las isoformas expresadas con más frecuencia son CD44v3-v10, CD44v4-v10 y CD44v6-v10.

2.5. CD44: FUNCIONES FISIOLÓGICAS

La variabilidad en la estructura y distribución de CD44 explica la diversidad de funciones de esta familia de moléculas. En condiciones fisiológicas normales se han demostrado las siguientes funciones:

- a) Adhesión a otras células y a componentes de la matriz extracelular, entre los cuales se incluyen el hialuronato, condroitín-sulfato, heparán-sulfato, fibronectina y colágeno.
- b) *Homing* de los linfocitos al tejido linfoide mesentérico, es decir, dirección en la migración de los linfocitos recirculantes a través de las membranas de las vénulas postcapilares (*high endothelial venules*) de los ganglios linfáticos (Jackson 1992).
- c) Activación de los linfocitos *T*. En estudios de linfocitos humanos se ha observado que la elevación de la expresión de CD44 se produce como consecuencia de la activación (Koopman 1993). En este sentido, las células *T* de memoria muestran un incremento en la expresión de CD44 comparadas con los linfocitos no estimulados antigénicamente (*naive*).
- d) Señal de transducción. Se cree que el *splicing* alternativo de los exones que codifican la cola citoplasmática de la molécula produce formas con diferentes funciones de transducción, las cuales alteran el status de la proteína *G* o estimulan la secreción de factores de crecimiento específicos.

- e) Unión a hialuronato e internalización del mismo, como parte del recambio de este compuesto en los tejidos mesenquimales.
- f) Secreción de citocinas (Webb 1990).
- g) Mielopoyesis y linfopoyesis. Se ha sugerido que CD44 puede actuar como mediador en las interacciones entre las células estromales de la médula ósea y las células hematopoyéticas, influyendo en la supervivencia y diferenciación de las formas precursoras de las distintas líneas celulares (Zoller 1995).
- h) Angiogénesis (Trochon 1996).

2.6. CD44: PROGRESIÓN TUMORAL Y METÁSTASIS

CD44 se ha asociado a la progresión y diseminación tumoral en distintos modelos neoplásicos como son, entre otros, los linfomas no hodgkinianos, melanomas y distintos tipos de carcinoma.

Uno de los trabajos más importantes en lo que se refiere al papel de CD44 en el proceso de diseminación y metástasis fue el de Günthert y col. en 1991. Estos autores consiguieron conferir capacidad metastásica a una línea celular de cáncer de páncreas de rata no metastatizante transfectándole el cDNA de una isoforma variante de CD44 que contenía el exón v6. Inicialmente identificaron una isoforma variante que incluía el exón v6 en una línea celular de adenocarcinoma de páncreas metastatizante. Con posterioridad clonaron el cDNA correspondiente a esta proteína y lo transfectaron a otra línea celular de adenocarcinoma de páncreas no metastático. Al inyectar esta línea transfectada a ratones singénicos observaron la colonización de los ganglios linfáticos y el pulmón por parte de las células tumorales.

Más tarde, en 1993, Seiter y col. comprobaron que el bloqueo del exón v6 mediante un anticuerpo específico impedía el establecimiento de las metástasis, tanto de las líneas inicialmente metastásicas como de las líneas transfectadas en los mismos

modelos tumorales. Otra aportación importante de este trabajo es la demostración de que el anticuerpo contra v6 únicamente es eficiente cuando se halla presente con anterioridad al establecimiento de las colonias metastásicas, lo que permite deducir que CD44v6 ejerce su función en una fase inicial de la diseminación linfática. Al parecer, el anticuerpo bloquea las células que expresan CD44v6 durante la migración e impide que dicha molécula establezca una interacción decisiva con un ligando aún desconocido. La unión a este ligando es posiblemente un requisito inicial para la señal de transducción y/o activación de una maquinaria enzimática que permite la supervivencia y expansión selectiva de las células tumorales en las localizaciones metastásicas. Si esta interacción resulta suficientemente bloqueada, las células no pueden sobrevivir y no se produce el desarrollo de las metástasis.

Herrlich y col. (1993) intentan explicar el mecanismo por el cual CD44v6 interviene en el proceso metastásico. Estos autores plantean la hipótesis de que las células epiteliales metastatizantes imitan a los linfocitos en su "viaje" a través del sistema linfático, uniéndose, mediante el mismo exón de CD44 (CD44v6), a ligandos específicos de los ganglios linfáticos. La interacción con este ligando retendría las células en los ganglios linfáticos, donde se produciría su proliferación y desde donde luego serían liberadas nuevamente a la circulación general.

2.7. CD44: EXPRESIÓN EN EL APARATO DIGESTIVO

Heider y col. (1993) estudiaron la expresión de CD44 en el estómago, a nivel de proteínas mediante inmunohistoquímica y a nivel de RNA por medio de técnicas de RT-PCR. Analizaron muestras de mucosa gástrica normal y metaplásica, adenocarcinoma de tipo intestinal y difuso y ganglios metastatizados por estos tumores. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la expresión de v5 en la zona de proliferación foveolar, mientras que las áreas de metaplasia fueron inmunorreactivas tanto para v5 como para v6.

Los datos obtenidos por inmunohistoquímica y por PCR indicaron diferencias en la expresión de variantes de CD44 entre el adenocarcinoma de tipo intestinal y el de tipo difuso. La mayoría de los tumores con células en anillo de sello expresaron variantes de CD44 que contienen el exón v5, mientras que los carcinomas de tipo intestinal expresaron variantes que contienen los exones v5 y v6.

Cuando se investiga la expresión del exón v6 de forma específica, cada par de muestras correspondientes al tumor originario (adenocarcinoma de tipo intestinal) y al ganglio metastásico muestran un patrón de expresión similar, mientras que no existe correlación entre los tumores primarios y las metástasis en la expresión de las

variantes que contienen el exón v5. De ello se deduce que existe una población celular en el tumor primario y en las metástasis ganglionares que es idéntica respecto a la expresión del exón v6, lo que induce a considerar que quizá este exón ejerza una función importante en el proceso de las metástasis. La expresión errática del exón v5 puede explicarse por posibles alteraciones en el proceso de *splicing* alternativo en las células tumorales. El adenocarcinoma de tipo difuso no expresa el exón v6, según se ha confirmado tanto a nivel de las proteínas como a nivel del RNA.

La metaplasia intestinal, que se asocia con frecuencia a adenocarcinomas de tipo intestinal, expresa los exones v5 y v6 de forma similar a este tipo de tumores. Este hecho, junto a la diferencia en la expresión del exón v6, apoya la teoría de que los carcinomas de tipo intestinal y difuso se originan en distintos tipos de células de la mucosa gástrica normal y progresan siguiendo vías distintas.

Con el fin de investigar la posible utilidad de las variantes de CD44 como marcadores de la progresión tumoral en el cáncer humano, se ha estudiado la secuencia de la carcinogénesis en el carcinoma colorrectal (Heider 1992). En este modelo, el desarrollo tumoral progresa siguiendo una serie de etapas consecutivas: mucosa normal, distintos estadios de adenoma, carcinoma localizado, cáncer invasivo y, por último, cáncer metastásico. En este sentido, se ha observado que el epitelio colónico normal expresa concentraciones bajas de CD44s y que esta expresión se localiza en las zonas proliferantes del epitelio, concretamente en la base

de las criptas. Sin embargo, no es hasta los estadios iniciales de la progresión neoplásica cuando se empieza a detectar la expresión de variantes de CD44 que contienen los exones variables. Es interesante hacer notar que la expresión de variantes que contienen el exón variable v6 se correlaciona de forma paralela con la progresión tumoral. Este exón no se detecta en ninguna muestra de colon normal y, en cambio, sí que se expresa en pólipos adenomatosos de más de 1 cm de diámetro y en la mayoría de los carcinomas invasivos. Además, en los carcinomas la expresión del exón v6 se correlaciona con el estadio tumoral (Wielenga 1993).

2.8. CARCINOGENESIS ESOFÁGICA: ESÓFAGO DE BARRETT

2.8.1. PROBLEMAS DIAGNÓSTICOS

El esófago de Barrett es el epónimo aplicado al esófago distal tapizado por epitelio cilíndrico y se adquiere como complicación del reflujo gastroesofágico crónico. Los pacientes que presentan reflujo gastroesofágico suelen tener grandes hernias de hiato e inflamación en el esófago distal. La importancia clínica del esófago de Barrett estriba en su predisposición a la malignidad. El adenocarcinoma desarrollado sobre el esófago de Barrett supone la mayoría de adenocarcinomas de la unión esofagogástrica y del esófago. Entre los pacientes con esófago de Barrett, alrededor de un 10 % desarrollan adenocarcinoma, y el riesgo es aproximadamente 40 veces el de la población normal (Rogers 1986).

2.8.2. PATOGENIA

Los resultados de los estudios clínicos y experimentales evidencian que el esófago de Barrett es consecuencia de la destrucción del epitelio escamoso por la pepsina, el ácido y la bilis que se produce en el reflujo gastroesofágico crónico, seguido de una

reepitelización con epitelio cilíndrico más resistente a estos agentes. La célula a partir de la cual se origina este epitelio ha sido motivo de debate en la literatura. La teoría más aceptada es que células progenitoras totipotenciales migran hacia el área ulcerada desde la mucosa adyacente y se diferencian hacia células escamosas o glandulares, en función de la naturaleza del medio en el que crecen. El resultado es la formación de una mucosa metaplásica cilíndrica que presenta una mayor resistencia a los efectos del reflujo gastroesofágico. Esta mucosa metaplásica puede adquirir con posterioridad diferenciación de tipo intestinal.

2.8.3. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Los distintos tipos de células que pueden identificarse en el epitelio del esófago de Barrett incluyen las células que constituyen el epitelio gástrico y el intestino delgado normal. Concretamente estas células son: las células mucinosas cilíndricas de tipo gástrico, las células caliciformes de tipo intestinal, las células epiteliales con borde en cepillo y sin vacuolas mucinosas similares a las células absortivas del intestino delgado, las células de Paneth con sus gránulos eosinófilos característicos, las células parietales y principales y, por último, las células neuroendocrinas. La arquitectura de la mucosa puede ser parecida a la del epitelio gástrico constituido por criptas, o bien a la del intestino delgado con estructuras villiformes. En la lámina propia suelen

haber cambios inflamatorios y fibrosis, ambos relacionados con el daño inducido por el reflujo. La inflamación aguda suele acompañarse de cambios reactivos del epitelio. La apariencia de la mucosa de Barrett varía ampliamente en distintos pacientes e incluso en un mismo enfermo, dependiendo de donde se haya obtenido la biopsia. Según las características histopatológicas enunciadas anteriormente, la mucosa de Barrett puede clasificarse en las categorías especificadas en la siguiente tabla.

CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL ESÓFAGO DE BARRETT

CATEGORÍA	c. epiteliales glandulares predominantes	c. epiteliales superficiales predominantes	diferenciación intestinal
INTESTINAL	mucinosas columnares	caliciformes y mucinosas	caliciformes absortivas Paneth
CARDIAL	mucinosas columnares	mucinosas columnares	ausente
FÚNDICA	parietales, principales	mucinosas columnares	ausente

DIAGNÓSTICO

Los criterios diagnósticos para el esófago de Barrett incluyen:

- a) Hallazgos histopatológicos

b) Localización de la muestra obtenida para la biopsia

c) Topografía de la mucosa de tipo cilíndrico

Así pues, en lo que hace referencia al diagnóstico del esófago de Barrett, el patólogo depende, en buena parte, de la información proporcionada por el endoscopista referente a la zona de donde se toma la biopsia. En este sentido, la mucosa de tipo intestinal en una biopsia de esófago es diagnóstica de esófago de Barrett. En caso de que se trate de mucosa de tipo antral o fúndico, la localización endoscópica del lugar de donde se obtiene la biopsia es imprescindible para formular el diagnóstico. En algunas ocasiones, sin embargo, se puede asegurar la localización esofágica de la biopsia a partir de la presencia de glándulas submucosas esofágicas por debajo de la mucosa de tipo intestinal en la muestra.

2.8.4. DISPLASIA EN EL ESÓFAGO DE BARRETT

El esófago de Barrett se considera como una entidad premaligna, es decir, un estado clínico que aumenta el riesgo de padecer cáncer. En algunos pacientes con adenocarcinoma desarrollado en un esófago de Barrett se identifican áreas de displasia en la mucosa adyacente a la del carcinoma. También se ha demostrado el desarrollo de adenocarcinoma en pacientes en los cuales, en biopsias previas, solamente se había detectado displasia. Por lo tanto, la secuencia displasia-carcinoma

se cumple en el esófago de Barrett, como sucede habitualmente con la carcinogénesis de los epitelios de superficie.

La displasia en el esófago de Barrett se caracteriza por anomalías arquitecturales y citológicas del epitelio. El diagnóstico diferencial de la displasia debe hacerse con la hiperplasia reactiva secundaria a los cambios inflamatorios. En la hiperplasia reactiva las glándulas son regulares y los núcleos mantienen su localización basal a pesar de que pueden ser hipercromáticos. La displasia debe ser clasificada, según su gravedad, en displasia de bajo grado y de alto grado. Los criterios para separar la displasia de alto y bajo grado incluyen la magnitud de la distorsión arquitectural, la celularidad del epitelio (estratificación nuclear y pérdida de polaridad) y las alteraciones citológicas (aumento de tamaño e irregularidad nuclear, pleomorfismo, hipercromasia y presencia de nucléolos prominentes).

2.9. ADENOCARCINOMA DE ESÓFAGO

2.9.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Se observa displasia en el esófago de Barrett en ausencia de carcinoma en un 5-10 % de los casos y en asociación a carcinoma en un 68 %-100 % de los casos (Berenson 1978). El riesgo de desarrollar carcinoma invasivo en pacientes con displasia sobre esófago de Barrett es muy elevado, sobretodo para aquellos que presentan displasia de alto grado (Lee 1985). El carcinoma que se desarrolla sobre el esófago de Barrett es casi siempre un adenocarcinoma. Se ha estimado que el riesgo es de más de treinta veces el de la población general (Haggitt 1994).

El adenocarcinoma asociado al esófago de Barrett supone un 5-10% de todos los cánceres de esófago. Las características que sugieren que el adenocarcinoma se ha originado sobre el esófago de Barrett son la asociación a mucosa de Barrett (displásica o no) y la localización de más de la mitad de la masa tumoral en el esófago.

Las características epidemiológicas y morfológicas de todos los adenocarcinomas de la unión gastroesofágica son similares y no dependen de si se detecta asociación a mucosa de Barrett o no. Asimismo, cabe señalar que el tumor puede ser multicéntrico y muchas veces está muy avanzado en el momento del diagnóstico, con afectación de la pared y extensión a los ganglios linfáticos. La mayoría de los pacientes son varones y la media de edad al diagnóstico es de 57 años (Spechler 1986).

2.9.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Desde el punto de vista microscópico, los tumores son similares tanto morfológica como inmunohistoquímicamente a su contrapartida gástrica, y con frecuencia se observa en un mismo tumor un amplio rango de diferenciación (Banner 1983). Es de destacar que, en distintos trabajos, se ha demostrado la sobreexpresión de la proteína p53 o de la oncoproteína c-erbB-2, así como la amplificación del gen EGFR, en asociación al adenocarcinoma de esófago (Blount 1991). Sin embargo, la importancia de estos factores en el desarrollo tumoral está todavía por determinar.

2.9.3. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

Las indicaciones quirúrgicas en el esófago de Barrett no están bien establecidas. Los parámetros que se aplican a la hora de tomar esta decisión son la longitud del epitelio de Barrett y la presencia de displasia de alto grado. El pronóstico del adenocarcinoma sobre el esófago de Barrett es pobre, con una supervivencia a los 5 años de aproximadamente un 15 % (Rusch 1994). Este pronóstico es similar al del carcinoma escamoso de esófago. La resección quirúrgica es el tratamiento principal y a veces ésta se combina con radioterapia o quimioterapia preoperatoria.

2.10. CARCINOMA ESCAMOSO DE ESÓFAGO

2.10.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

El carcinoma escamoso de esófago se da con mayor frecuencia en hombres de alrededor de 50 años. Su incidencia varía según los países y es elevada en países orientales (Mannell 1989). El alcohol y el tabaco son dos factores de riesgo conocidos. El tumor se asocia también a estenosis, acalasia, síndrome de Plummer-Vinson, divertículos e historia de irradiación previa (Goffman 1983). En algunas ocasiones el carcinoma escamoso de esófago aparece sincrónicamente con un adenocarcinoma gástrico (Souquet 1989). Por otro lado, se ha sugerido también que el HPV podría desempeñar un papel importante en la carcinogénesis del carcinoma de esófago, debido a que, en algunos estudios, la secuencia de este virus se ha encontrado en más de un 60 % de los casos de carcinoma escamosos de esófago (Chang 1992).

2.10.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

La localización más frecuente del carcinoma escamoso de esófago coincide con las zonas de constricción anatómica normal en el esófago medio y distal. Desde el punto de vista macroscópico el tumor suele ser circunferencial, ulcerado y de márgenes bien definidos. La lesión puede crecer hacia el interior de la luz o a través del espesor de la pared alcanzando los tejidos blandos adyacentes. También afecta en ocasiones al estómago y puede presentar crecimiento submucoso no visible macroscópicamente. La invasión de vasos sanguíneos se produce en el 75 % de los casos (Theunissen 1993).

Desde el punto de vista microscópico los tumores suelen ser bien o moderadamente diferenciados. Cuando se lleva a cabo una búsqueda de forma exhaustiva o bien se examinan al microscopio electrónico, se detecta diferenciación glandular en una quinta parte de los tumores escamosos. Si esta diferenciación es extensa se aplica el término *carcinoma adenoscamoso*.

En diferentes estudios se han constatado alteraciones en la p53 (sobreexpresión y mutaciones del gen) en una alta proporción de carcinomas de esófago. Por otro lado, la expresión del EGFR se ha investigado por inmunohistoquímica, y se ha observado su expresión en una gran proporción de casos (Mukaida 1991).

La abundancia de vasos linfáticos en el esófago facilita la extensión tumoral a los ganglios linfáticos del área periesofágica, por debajo del diafragma y hacia los ganglios cervicales. Estas metástasis se producen en una fase inicial del proceso neoplásico y son las responsables del mal pronóstico de estos tumores. La diseminación a distancia también es frecuente y suele producirse al hígado, pulmón y glándula adrenal.

2.10.3. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

El tratamiento habitual del carcinoma de los dos tercios proximales del esófago suele ser la radioterapia, mientras que los del tercio distal se tratan quirúrgicamente. El pronóstico del carcinoma escamoso de esófago es muy pobre, con una media de supervivencia después del diagnóstico de menos de un año. Los factores que pueden influir en la supervivencia (Klimstra 1994), son el sexo (el pronóstico es peor en los varones), el estadio (los carcinomas *in situ* y los intramucosos son casi siempre curables; entre los casos que presentan afectación ganglionar, los que evolucionan peor son los que tienen más de tres ganglios metastásicos), el grado microscópico (no parece ser un factor pronóstico importante), la presencia de invasión vascular o linfática y necrosis tumoral (peor pronóstico), la afectación de márgenes quirúrgicos (mayor posibilidad de recidiva), la ploidia y los índices de proliferación (los resultados de distintos trabajos en cuanto a la ploidia son contradictorios; el recuento

de AgNOR se correlaciona con la probabilidad de recidivas y con el pronóstico en general) (Morita 1991), la expresión de EGFR (la sobreexpresión del EGFR se correlaciona con la presencia de metástasis ganglionares y con un peor pronóstico) (Mukaida 1991) y la expresión de p53 (los pacientes con sobreexpresión de p53 tienen una supervivencia menor que los que no la presentan) (Shimaya 1991).

2.11. CARCINOGENÉISIS PANCREÁTICA

2.11.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

Se han realizado distintos estudios epidemiológicos con el fin de detectar los distintos factores de riesgo del cáncer de páncreas exocrino. El tabaco y la disminución en el consumo de fruta y verdura parecen ser los factores de riesgo mejor establecidos para este tumor (Gold 1985). Otra causa de carcinoma pancreático es el consumo excesivo de alcohol. La diabetes, aunque se asocia con frecuencia a pancreatitis crónica, no es un factor de riesgo independiente del carcinoma pancreático (Hiatt 1988, Mills 1988, Cuzick 1989).

En 1993 se publicaron los resultados de un estudio cohorte realizado en seis países según el cual el riesgo de cáncer de páncreas está significativamente elevado en sujetos con pancreatitis crónica y parece ser independiente del sexo y el país (Lowenfels 1993).

El aumento en el riesgo de carcinoma de páncreas se ha detectado en distintos tipos de pancreatitis, como son la pancreatitis hereditaria, la tropical o la fibrosis quística

del páncreas. Una explicación de estas observaciones es que la pancreatitis crónica, inducida por factores externos o genéticos, supone un estadio intermedio entre la función pancreática normal y el cáncer de páncreas. En todas las formas de pancreatitis existe disfunción celular, destrucción glandular y probablemente aumento del recambio celular (Preston 1990). El aumento de riesgo de cáncer de páncreas observado en los individuos con distintos tipos de pancreatitis corrobora esta hipótesis.

2.11.2. PANCREATITIS CRÓNICA

La pancreatitis crónica provoca deficiencias en las funciones endocrina y exocrina del páncreas. Desde el punto de vista anatómico se han descrito dos tipos de pancreatitis: la pancreatitis obstructiva crónica y la pancreatitis crónica calcificante. La pancreatitis obstructiva crónica está producida por la obstrucción litiásica o tumoral de los conductos pancreáticos (habitualmente el conducto de Wirsung, en la proximidad de la ampolla de Vater). Por otro lado, la pancreatitis crónica calcificante, mucho más frecuente que la anterior (95% de los casos), se caracteriza macroscópicamente por la nodularidad y dureza de la glándula, que puede estar atrófica o aumentada de tamaño. Histológicamente se observa atrofia de los acinos y esclerosis intra y perilobular. Los ductos están dilatados, con proliferación del epitelio y secreción eosinófila intraluminal que en ocasiones se calcifica. Este tipo de

pancreatitis se asocia a alcoholismo y a hipercalcemia como consecuencia del hiperparatiroidismo.

2.11.3. ADENOCARCINOMA DUCTAL

2.11.3.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

El adenocarcinoma de páncreas supone un 85% del total de las neoplasias pancreáticas. La mayoría de los casos se dan en pacientes de edad avanzada, con una discreta preponderancia en varones (1,6:1) (MacMahon 1982) . A pesar de que esta neoplasia suele cursar con ictericia, el diagnóstico en la mayoría de los casos se hace cuando el tumor ha alcanzado un tamaño mayor de 5 cm, presenta metástasis y se ha extendido a los tejidos peripancreáticos. Dos tercios de los carcinomas se localizan en cabeza y cuerpo del páncreas y el resto en la cola. Como ya hemos mencionado, la extensión extrapancreática de estos tumores es frecuente y en muchos casos dificulta la determinación de si el origen de una determinada neoplasia está en el páncreas o en la ampolla duodenal.

2.11.3.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y EXTENSIÓN

Desde el punto de vista microscópico, los tumores muestran distintos grados de diferenciación. En los casos bien diferenciados el diagnóstico es difícil y hay que basarlo en las características citológicas del tumor (pleomorfismo, pérdida de polaridad, nucléolo y actividad mitótica). La presencia de invasión perineural es un signo frecuente (90%) en el adenocarcinoma, aunque no patognomónico ya que se han visto inclusiones perineurales de epitelio normal y extensión perineural en las pancreatitis crónicas (Costa 1977).

Con estudios citogenéticos se han detectado pérdidas y reordenamientos estructurales en diversos cromosomas (Johansson 1992). En el 50% de los casos se ha comprobado la existencia de mutaciones o acumulación de p53 (Boschman 1994), en el 80% de los casos mutaciones de k-ras (Hruban 1993) y en aproximadamente la mitad de los casos sobreexpresión de HER2/neu.

El adenocarcinoma pancreático metastatiza a los ganglios peripancreáticos en fases precoces de la enfermedad. Los grupos ganglionares que se afectan con mayor frecuencia son la cabeza pancreática alrededor de la arteria hepática común y el ligamento hepatoduodenal alrededor de la arteria mesentérica superior y pancreaticoduodenal anterior. Cubilla y cols. (1978) encontraron que un 33% de los pacientes con adenocarcinoma pancreático en fase precoz presentaban metástasis en los ganglios no extirpados con las técnicas habituales (procedimiento de Whipple).

Las localizaciones más frecuentes de las metástasis a distancia son el hígado, peritoneo, pulmón, adrenal y hueso, entre otros (Lee 1984).

2.11.3.3. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

Los tumores del cuerpo y cola se tratan con pancreatometomía distal. Las neoplasias de la cabeza y de la región periampular se tratan con la técnica de Whipple. Los tumores que presentan diseminación en el momento de la laparotomía son tributarios de derivación paliativa, que tiene una supervivencia similar con menor morbilidad y mortalidad postoperatoria. La supervivencia a los 5 años del adenocarcinoma de páncreas es de alrededor del 2%, con más de un 90 % de mortalidad dentro del primer año después del diagnóstico. Incluso cuando el tumor parece estar confinado al páncreas en el momento de la cirugía, la supervivencia no excede el 15 % a los 5 años (Baylor 1973).

Los factores relacionados con el pronóstico son el estadio tumoral (es el indicador pronóstico más importante), el grado microscópico (los tumores mejor diferenciados se asocian a supervivencias más largas) y el tamaño tumoral (los tumores menores de 4 cm de diámetro tienen un mejor pronóstico; en los tumores no resecables el tamaño tumoral no afecta a la supervivencia) (Pollard 1981, Klöppel 1985, Nix 1991).

2.12. CARCINOMA GÁSTRICO

2.12.1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

El carcinoma gástrico no es una sola entidad, sino que incluye distintos tipos que, según la propuesta de Lauren, se agruparían tal como se describe a continuación.

ADENOCARCINOMA DE TIPO INTESTINAL

La mayoría de los pacientes con adenocarcinoma de tipo intestinal tienen alrededor de los 50 años, aunque también se diagnostican casos en personas más jóvenes e incluso excepcionalmente en niños. El adenocarcinoma de tipo intestinal puede localizarse en el cardias, cuerpo o antro. Los cánceres de este tipo histológico se asocian a diversos factores de riesgo, dependiendo de la región del estómago en la que se originen. Los carcinomas antrales se vinculan a infección por *H. pylori* (Correa 1990), así como a la ingesta de compuestos nitrosos (Correa 1992). Los carcinomas del cuerpo gástrico aparecen en pacientes con gastritis crónica autoinmune y anemia perniciosa. Prácticamente todos los adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal surgen de las células regenerativas de las foveolas gástricas (Taki

1981). Generalmente se asocian a una gastritis crónica atrófica con metaplasia intestinal, y van precedidos por displasia, carcinoma *in situ* y carcinoma superficial (Hattori 1986).

Un 85-90 % de los pacientes presentan hipoclorhidria, que suele preceder en varios años al carcinoma gástrico. El pH intragástrico alto favorece el crecimiento de bacterias que reducen los nitratos alimentarios convirtiéndolos en nitritos. Estos nitritos a su vez convierten las aminas de la dieta en compuestos N-nitrosos, que son carcinógenos (Hall 1986). Se ha constatado que la coexistencia de la gastritis crónica atrófica y cáncer gástrico es frecuente. Sin embargo, el vínculo etiopatogénico entre ambos, así como el riesgo de malignización de la gastritis crónica, es un tema controvertido y no del todo consensuado (Murayama 1990).

2.12.1.1. GASTRITIS CRÓNICA

Las dos principales características de esta enfermedad son la infiltración de la lámina propia por células inflamatorias (células plasmáticas y linfocitos, predominantemente) y la atrofia del epitelio glandular. Esta entidad se divide en gastritis crónica superficial (si el infiltrado inflamatorio está limitado a la región foveolar y no hay atrofia glandular), gastritis crónica atrófica (si la inflamación es más extensa y se acompaña de atrofia glandular) y atrofia gástrica (mucosa

adelgazada, sin evidencia de cambios inflamatorios) como estadio final de una gastritis crónica atrófica.

Si se tiene en cuenta la patogenia, existen dos tipos de gastritis crónica con características histológicas similares. El tipo menos frecuente es la gastritis autoinmune o tipo A. Esta forma afecta al cuerpo gástrico y respeta el antro. Se asocia a anticuerpos contra las células parietales y cursa con hipo o aclorhidria y niveles altos de gastrina. Esta forma puede evolucionar a anemia perniciosa. Como se ha comentado con anterioridad, los pacientes afectados por esta enfermedad tienen un riesgo aumentado de desarrollar carcinomas gástricos en el cuerpo gástrico. El otro tipo de gastritis, mucho más frecuente, es la de tipo B o no inmune, la cual se inicia en el antro y progresa proximalmente.

La gastritis crónica atrófica se asocia con mucha frecuencia al carcinoma gástrico y, en general, su gravedad es proporcional a la extensión del tumor. La patogenia de la gastritis crónica tipo B es compleja y probablemente multifactorial. Según estudios estadísticos, existen distintos factores que se asocian a esta entidad, como son el alcohol, tabaco, reflujo gastroduodenal, alergia a alimentos y algunos fármacos, sobretodo los antiinflamatorios.

En los últimos años se ha comprobado la importancia del *Helicobacter pylori* como agente infeccioso directamente implicado en el desarrollo de la gastritis crónica. Esta

espiroqueta coloniza la mucosa gástrica, provocando distintos grados de lesión. Los cambios que se producen en la mucosa incluyen desintegración y pérdida del moco apical y, con menor frecuencia, erosiones superficiales y ulceración. El mecanismo subyacente puede ser la motilidad del organismo y la actividad de la ureasa.

2.12.1.2. METAPLASIA

En la gastritis crónica se pueden producir dos tipos de cambios metaplásicos que con frecuencia tienen lugar en combinación: la metaplasia pilórica de la mucosa fúndica y la metaplasia intestinal. La metaplasia pilórica consiste en la sustitución de las glándulas de tipo fúndico por glándulas mucosecretoras. Este proceso se inicia en la unión fúndico-pilórica y progresa en dirección proximal hacia el cardias.

La metaplasia intestinal es el resultado del reemplazamiento progresivo de la mucosa gástrica por células de la mucosa del intestino delgado o grueso (células caliciformes, absortivas, células de Paneth o bien células endocrinas). Existen dos tipos de metaplasia intestinal: la completa (tipo I) y la incompleta (tipo II). En la completa, el epitelio es idéntico al del intestino delgado y presenta vellosidades y criptas. En la metaplasia incompleta no se observan células absortivas con borde en cepillo, sino que tienen un aspecto análogo al de las células de las foveolas gástricas. Morson (1955) comparó la incidencia de la metaplasia intestinal en distintos procesos

patológicos y constató que era máxima en los estómagos resecaos por carcinoma, intermedia en los casos de úlcera gástrica, y mínima en los casos de úlcera duodenal.

ADENOCARCINOMA DE TIPO DIFUSO

El adenocarcinoma de tipo difuso no parece estar asociado a factores ambientales. En las áreas geográficas de alto riesgo el adenocarcinoma que predomina es el intestinal y cuando la frecuencia de esta neoplasia disminuye es a expensas de este tipo microscópico de adenocarcinoma. El adenocarcinoma de tipo difuso suele originarse en el cuerpo gástrico, en el contexto de una gastritis superficial, en ausencia de atrofia. Los pacientes afectados tienen menos de 50 años y suelen pertenecer al grupo sanguíneo A (Grabiec 1985, Maheara 1992). Afecta a mujeres con una mayor frecuencia que el adenocarcinoma de tipo intestinal. Las células que dan origen al adenocarcinoma de tipo difuso se localizan en la zona media de la mucosa gástrica, concretamente en las glándulas mucinosas. La región foveolar y la porción más profunda de las glándulas gástricas no intervienen en la patogenia de este tumor.

2.12.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

El aspecto macroscópico del carcinoma gástrico es muy variable y puede presentarse como un tumor fungoide exofítico que crece hacia el interior de la luz, o como un

tumor plano y ulcerado que invade en profundidad la pared gástrica. Cualquier área del estómago puede afectarse y el orden de frecuencia de mayor a menor es el siguiente: pared anterior, pared posterior, curvatura menor y curvatura mayor.

Desde el punto de vista microscópico la práctica totalidad de los carcinomas gástricos son adenocarcinomas y están compuestos por uno a más de cuatro tipos de células (foveolar, mucopéptico, intestinal-cilíndrico y caliciforme). Como se ha mencionado con anterioridad, según Lauren los dos tipos principales de adenocarcinoma gástrico son el intestinal (53 %) y el difuso (33 %). El resto de los tumores tienen una composición heterogénea. El grado de diferenciación del adenocarcinoma de tipo intestinal es variable y disminuye a medida que aumenta el tamaño del tumor. En los más diferenciados, el tipo de célula que predomina es el cilíndrico y el mucosecretor.

El tipo difuso de carcinoma es el que clásicamente se conoce con el nombre de *linitis plástica*, que hace referencia a su aspecto macroscópico. También se le ha designado como *(adeno)carcinoma con células en anillo de sello*. Es el tipo de carcinoma gástrico que predomina en en pacientes jóvenes. Estos tumores afectan el área prepilórica y producen obstrucción debido a la rigidez que causa el tumor al infiltrar la pared. Al corte se aprecia una marcada fibrosis de la submucosa, con o sin ulceración de la mucosa. La muscular aparece hipertrofiada y surcada por finas líneas gris- blanquecinas que se continúan con la serosa, que también suele hallarse

focalmente engrosada. Desde el punto de vista microscópico se produce un crecimiento difuso de las células malignas, acompañado de una marcada fibrosis e inflamación. La totalidad de la pared suele estar afectada, aunque existe el carcinoma con células en anillo de sello intramucoso. La formación de glándulas es mínima y la mayoría de las células crece en forma difusa. La producción de mucina es principalmente intracitoplasmática, lo que confiere a las células el aspecto típico en anillo de sello.

DISEMINACIÓN Y METÁSTASIS

Los tumores de estómago se extienden por contigüidad al esófago, duodeno, epíplon, colon, páncreas y bazo. Invaden con frecuencia los plexos linfáticos de la mucosa y submucosa de la pared del estómago y desde aquí se diseminan hacia los ganglios perigástricos, periaórticos y del tronco celíaco. Los tumores del tercio distal también invaden los ganglios hepatoduodenales. Las localizaciones más frecuentes de las metástasis a distancia son el hígado, peritoneo, pulmón, glándula adrenal y ovario. El adenocarcinoma gástrico de tipo difuso afecta con más frecuencia al peritoneo, pulmones y ovario (Duarte 1981), mientras que el de tipo intestinal se disemina preferentemente a hígado (Esaki 1990).

2.12.3. TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO

El tratamiento del adenocarcinoma gástrico es la gastrectomía, que puede ser subtotal o total dependiendo de la extensión del tumor. La quimioterapia y la radioterapia son poco eficaces en este contexto.

El pronóstico del cáncer gástrico difiere según los distintos países donde se han realizado estudios a este respecto. Mientras en Japón las series muestran una supervivencia elevada a los cinco años (46% para los avanzados y 89% para los superficiales) (Nakamura 1992), en Estados Unidos la supervivencia media se sitúa entre el 4% y el 13%. Estas diferencias se atribuyen a una disección más extensa de los ganglios linfáticos y a la discrepancia en los criterios aplicados en la diferenciación de displasia severa y carcinoma por los autores japoneses y los occidentales.

El pronóstico del adenocarcinoma gástrico depende de los factores que se comentan a continuación.

- Edad: Peor en pacientes jóvenes, con una mayor proporción de adenocarcinomas de tipo difuso.
- Localización en el estómago: Peor los localizados en el cardias, fundus o unión gastroesofágica.

- Profundidad de la invasión: Cuanto más profunda es la invasión, peor es el pronóstico independientemente del estado de los ganglios linfáticos.
- Márgenes tumorales: Si el tumor tiene un margen expansivo bien definido, el pronóstico es mejor que si infiltra de forma difusa.
- Tamaño tumoral: Los tumores pequeños tienen un mejor pronóstico, aunque la profundidad del tumor sigue siendo un factor determinante.
- Grado de diferenciación y tipo histológico: El adenocarcinoma de tipo intestinal de la clasificación de Lauren tiene un comportamiento biológico menos agresivo que el de tipo difuso. Dentro de cada una de las categorías, el grado de diferenciación no parece tener importancia pronóstica (Moutinho 1981).
- Reacción inflamatoria: Parece ser que una reacción inflamatoria importante en la interfase entre el tejido tumoral y el tejido no neoplásico es un signo de buen pronóstico (Watanabe 1976).
- Invasión perineural: Entre los tumores mayores de T2, el pronóstico es mejor para los que no presentan invasión perineural (Tanaka 1994).
- Afectación de ganglios linfáticos: Con ganglios negativos el índice de supervivencia a los 5 años es del 50 %; si son positivos este índice disminuye al 10 %. El número de ganglios afectados es más importante que el estadio ganglionar (Ichikura 1993).
- Ploidia: Según algunas series, la determinación de la ploidia y de los índices de proliferación (PC10) puede ser útil como indicador pronóstico en este tipo de neoplasias (Inokuchi 1983).

- p53 : Los resultados obtenidos en cuanto a la relación con la supervivencia difieren en las distintas series (Martin 1992).

2.12.4. CARCINOMA SUPERFICIAL (*early carcinoma*)

Este tipo de adenocarcinoma gástrico fue definido por los japoneses como un carcinoma confinado a la mucosa o a la mucosa y a la submucosa (es decir, no invade la capa muscular propia), independientemente de la afectación ganglionar. Hay autores que consideran que el nombre de *early carcinoma* es inadecuado, ya que el concepto no se relaciona con el tiempo de evolución de la lesión sino con la profundidad del tumor. Otros términos que se han utilizado para este tipo de lesiones son *superficial* o *microinvasivo* (Golden 1948). Cuando el adenocarcinoma solo afecta a la mucosa debe ser separado de las lesiones de displasia severa o carcinoma *in situ*, atendiendo a la invasión de la lámina propia una vez se ha sobrepasado la membrana basal glandular.

La mayoría de los casos de *early carcinoma* son de tipo intestinal, aunque también hay casos de tipo difuso (Xuan 1993). Los casos mejor diferenciados están más vascularizados y se asocian con más frecuencia que los pobremente diferenciados a infección por *H. pylori* (Adachi 1993). La mayoría de los casos surgen en el tercio

distal del estómago y en el 10 % de los casos el tumor aparece de forma multicéntrica (Bearzi 1986). Se producen metástasis a los ganglios linfáticos en un 5 % de los casos de crecimiento intramucoso y en un 10 % de los casos que invaden la submucosa. El índice de supervivencia a los 5 años es de un 80-85 % y se mantiene alto incluso en aquellos casos en que hay afectación de los ganglios linfáticos.

3. RESULTADOS

3.1. CAPÍTULO 1

EXPRESSION OF CD44H AND CD44V3 IN NORMAL OESOPHAGUS, BARRETT MUCOSA, AND OESOPHAGEAL CARCINOMA

E Castellà, A Ariza, A Fernández-Vasalo, X Roca, I Ojanguren

Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Autonomous University of
Barcelona, Barcelona, Spain

Publicado en *Journal of Clinical Pathology* 1996;49:489-92.

3.1.1. ABSTRACT

Aims: To examine CD44H and CD44v3 expression in normal gastric and small bowel mucosa, normal and Barrett oesophagus, and oesophageal epithelial malignancies (squamous cell carcinoma and adenocarcinoma).

Methods: Ninety-five specimens comprising 40 normal oesophageal, gastric and small bowel mucosae, 22 Barrett oesophagi (two of them with dysplastic changes), 20 resected adenocarcinomas and 13 squamous cell carcinomas were evaluated. The samples were fixed in formalin and subsequently stained with anti-CD44H and anti-CD44v3 monoclonal antibodies using the avidin-biotin-peroxidase technique.

Results: In contrast to normal oesophagus, which showed positivity for both CD44 epitopes (CD44H and CD44v3) in the basal third of the epithelium, antral and intestinal subtypes of Barrett oesophagus expressed only CD44H, the distribution being focal in non dysplastic Barrett mucosa and diffuse in dysplastic Barrett mucosa. Similarly, normal antral glands and small bowel epithelium revealed focal immunopositivity for CD44H at the base of the crypts. All squamous cell carcinomas were diffusely positive for both isoforms, whereas amongst the adenocarcinomas 75% expressed CD44H and 60% CD44v3.

Conclusions: In the oesophagus CD44H is detected in the proliferating areas of both normal squamous epithelium and Barrett mucosa. CD44H expression seems to increase progressively in dysplasia and infiltrating carcinoma, similar to that described in the stomach. CD44v3, usually not expressed in normal or neoplastic gastric mucosa,

showed as much positivity in normal squamous epithelium as in oesophageal squamous cell carcinoma. CD44v3 immunoreactivity was also identified in 60% of adenocarcinomas. These findings suggest a possible implication of CD44v3 in the development of oesophageal carcinoma of both squamous and glandular types.

Keywords: Oesophageal carcinoma, Barrett mucosa, CD44H, CD44v3

3.1.2. INTRODUCTION

CD44 cell surface glycoprotein is expressed in a great variety of normal and neoplastic tissues as multiple isoforms (1). This protein family is known to be implicated in lymphocyte homing (2), cell-extracellular matrix interaction, tumour invasiveness and metastasis (3).

Differential glycosylation of the extracellular domain of CD44 increases the heterogeneity obtained by means of alternative splicing. In fact, it has been recently proved that CD44 isoforms modified with glycosaminoglycans such as heparan sulfate contain exon v3 (4). These modified CD44 isoforms behave as proteoglycan-like substances, and have high affinity for some growth factors such as heparin binding-epidermal growth factor (HB-EGF), and they could present them to specific membrane receptors (5). HB-EGF acts as an autocrine growth factor for human keratinocytes (6).

Taking into account that the oesophagus is lined by squamous epithelium, it is relevant to investigate CD44H and CD44v3 expression in normal and Barrett oesophagus, as well as in the main oesophageal neoplasms (squamous cell carcinoma and adenocarcinoma).

3.1.3. MATERIALS AND METHODS

Normal and pathological samples were obtained from the archives of the Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol. Samples belonged to 75 patients (56 males and 19 females) with ages between 26 and 84 years (mean, 57 years). Twenty-two of them corresponded to Barrett oesophagus (nine antral subtype, six intestinal subtype, two of them containing dysplastic areas; and seven fundic subtype), twenty to adenocarcinoma (two diffuse type and the rest intestinal type) and thirteen to squamous cell carcinoma. Ten normal esophageal, fundic, antral and small bowel samples were obtained from uninvolved areas of surgical specimens.

Histologic features and prognostic factors were evaluated according to well-established criteria. Results obtained with both antibodies in neoplastic samples were correlated with different prognostic factors, such as grade of differentiation and evidence of lymph node or visceral metastasis at the time of diagnosis. All biopsy specimens were fixed in 10 % neutral formalin and embedded in paraffin at 57-60°C. Five micrometre thick sections were deparaffinised, placed in methanol containing 0.3% H₂O₂ for 30 min at room temperature, washed, heated in a microwave oven (3x3 min, with 2-min intervals) while in buffered citrate (citric acid and sodium citrate, pH 6.0), washed, and incubated for 30 min with rabbit serum. Subsequently, sections were incubated with anti-CD44H (clone 2C5; RD Systems, Abingdon, UK) and anti-CD44v3 (clone 3G5; RD Systems)

mouse monoclonal antibodies at a 1:1000 and 1:600 dilution, respectively, for 22 h at room temperature. The slides were washed and incubated with biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin antibodies at a 1:700 dilution and with avidin-biotin immunoperoxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). After application of the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI, USA) sections were contrasted with haematoxylin, dehydrated and mounted with Permount. A nonimmune mouse serum was used as a control instead of the specific monoclonal antibodies.

Two parameters of CD44 expression were examined:

- 1.- Percentage of positively stained cells: negative, <5%; focal, between 5% and 50%; diffuse, >50%
- 2.- Intensity of staining: 0, no staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; 3, strong staining comparable to lymphocytes.

Two of the authors examined the slides independently. Those with dissimilar results were reviewed to reach a consensus.

Frequency tables were analysed with Fisher's exact test.

3.1.4. RESULTS

Normal Oesophageal, Gastric and Intestinal Mucosa

CD44H was expressed in the basal third of squamous oesophageal epithelium. Control samples of normal gastric and intestinal mucosa showed focal CD44H positivity at the base of the antral and intestinal crypts. Fundic gastric mucosa did not react with any of the two antibodies (fig 1). Endothelial and inflammatory cells (lymphocytes and plasma cells), fibroblasts and smooth muscle cells showed focal immunopositivity for CD44H in the normal samples studied. CD44v3 was positive only in the basal third of squamous epithelium and smooth muscle cells.

Barrett Oesophagus

Isoform CD44H was detected in 100% of the cases of antral and intestinal subtypes of Barrett mucosa. The fundic type of Barrett mucosa was always negative (fig 2). Positivity was always focal, except for two instances, both of intestinal subtype with dysplastic areas that stained diffusely. The staining intensity ranged from weak to strong. None of the Barrett mucosa samples exhibited reactivity for CD44v3 (fig 2).

Adenocarcinoma

CD44H was positive in 15 out of the 20 (75%) cases studied. Immunostaining was focal in 11 cases and widespread in the other four. As for the intensity of membrane staining it was moderate or strong in most cases (86%).

CD44v3 was positive in 60% of cases (fig 2), most of which (66%) showed a diffuse immunostaining (fig 4). Intensity of staining was weak in 58% of cases and moderate in 33%.

Squamous Cell Carcinoma

CD44H was expressed with a moderate or strong intensity and a diffuse pattern in all cases studied (fig 4). CD44v3 was intensely and diffusely positive in every case (100%)(fig 2).

We did not find any statistically significant correlation between the expression of both isoforms and the grade or stage of the neoplasms examined.

Fig.1. Well differentiated adenocarcinoma with strong CD44v3 immunoreactivity in most cell membranes (x250).

Fig. 2. Squamous cell carcinoma with immunoreactivity for CD44H (x250).

Fig. 3 Squamous cell carcinoma with strong CD44v3 immunoreactivity in most cell membranes (x400).

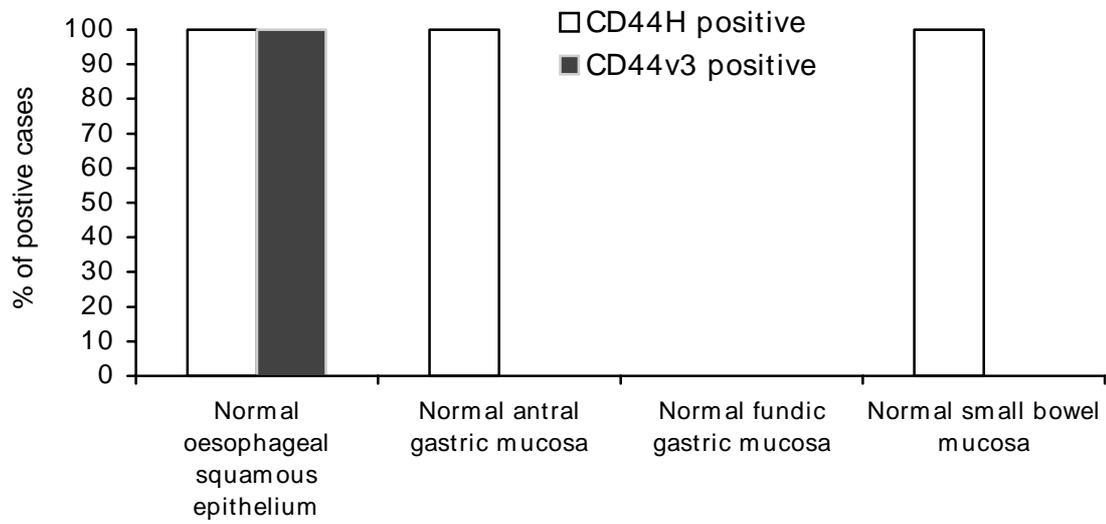


Table 1 CD44H and CD44v3 expression in normal oesophageal, gastric, and small bowel mucosa.

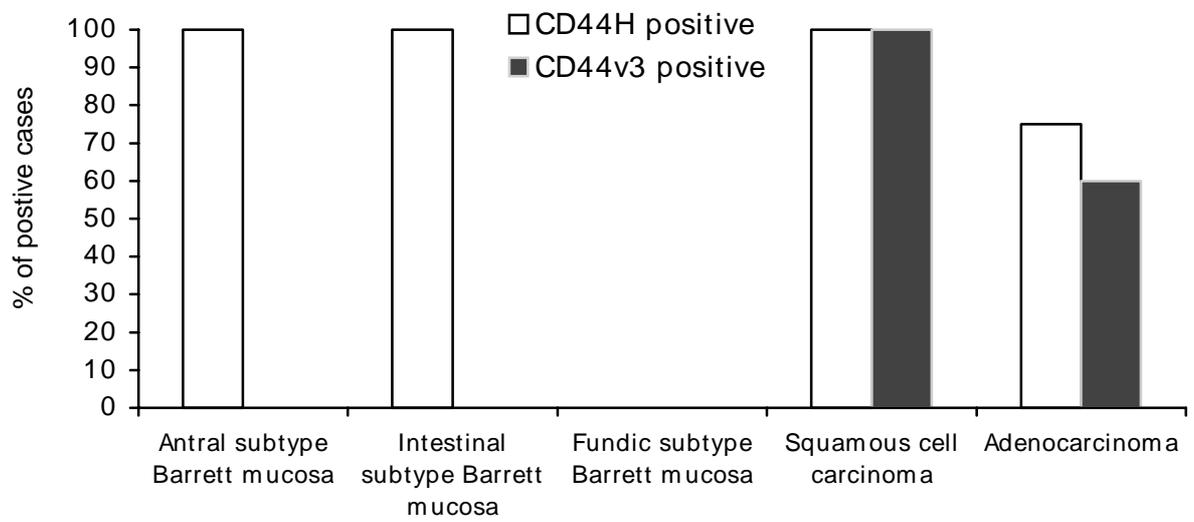


Table 2 CD44H and CD44v3 expression in Barrett oesophagus, oesophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma

3.1.5. DISCUSSION

In agreement with the two types of epithelium found in the lower oesophagus, the most frequent neoplasms in this location are squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Adenocarcinoma of the oesophagus accounts for 10-28% of all oesophageal carcinomas (7,8), arises in most cases from Barrett oesophagus (often with dysplastic foci)(9), and shows the same histological variants as gastric adenocarcinoma (intestinal and diffuse)(10). Histologically, three types of metaplastic columnar epithelium may be seen in Barrett oesophagus: an antral type similar to normal cardiac or antral mucosa, a fundic type resembling fundic mucosa, and an intestinal type (so-called specialised type) similar to normal small-bowel mucosa.

CD44 is the term used to designate a heterogeneous group of membrane glycoproteins implicated in lymphocyte homing (1), metastasis development and cell-extracellular matrix binding (3).

These proteins are codified by a gene made up of 20 exons located in the short arm of chromosome 11. Ten of these twenty exons are always expressed (CD44H), whereas nine of the other ten undergo an alternative splicing process which generates a great variety of isoforms (11). In this regard, it has been demonstrated that splice variants carrying sequences encoded by exon V6 are preferentially expressed in metastatic animal cancer cell lines (12).

Immunohistochemical studies have demonstrated differential expression of CD44 epitopes in normal and tumour tissues of the digestive tract. CD44H expression is limited and located at the base of the crypts in normal colonic epithelium, while tumour progression is strongly related to overexpression of CD44H and CD44 isoforms carrying v6 epitopes. Focal expression of v6 in adenomas has also been identified and correlated with tumour progression (13). Moreover, expression of v6 in colon carcinomas correlates with Dukes stage and seems to be associated with tumour-related death (14,15,16).

In the stomach, CD44H has been shown to be positive also in surface epithelium, foveolar proliferation zones and areas of intestinal metaplasia, being also irregularly expressed in adenocarcinoma (17). Besides, adenocarcinoma of the intestinal type expresses epitopes encoded by exons v5 and v6, whereas the diffuse type predominantly expresses v5-encoded epitopes (18,19, 20).

Concerning normal oesophageal mucosa, expression of CD44H and several variant isoforms (v3, v4-5, v6 and v8-9) has been described (21). In this work we have examined CD44 expression in normal oesophageal, gastric and intestinal mucosa as well as metaplastic and neoplastic oesophagus. In addition to investigating the standard isoform we have considered relevant the study of CD44v3, an isoform that has not been detected in normal or neoplastic colonic and gastric mucosa, seems to be regulated differently than the other variants, and is implicated in keratinocyte growth.

It seems that the diversity of the CD44H glycoprotein family obtained by means of alternative splicing is further magnified by the differential use of numerous N-linked

and O-linked glycosylation sites. Specifically, CD44 isoforms carrying the v3 exon are capable of binding heparan sulfate and acting as proteoglycan-like molecules. These proteoglycan-like CD44 isoforms have been shown to act as reservoirs for growth factors, being implicated in growth factor recruitment at the cell surface and regulation of their action on target cells. Additionally, Bennett et al. (5) have demonstrated the complexing of heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) and heparan sulfate-modified CD44, which suggests a role for CD44 in keratinocyte growth, since HB-EGF is a keratinocyte autocrine growth factor (6).

Our study has shown CD44H positivity in the lower third of the squamous epithelium of normal oesophageal mucosa, as well as an intense CD44H immunoreaction in oesophageal squamous cell carcinoma. Similarly to gastric and intestinal nonneoplastic and neoplastic mucosa, Barrett oesophagus and adenocarcinoma exhibited CD44H immunostaining.

As stated before, CD44v3 has not been detected in normal or neoplastic gastric or intestinal mucosa. In agreement with the results obtained by Fox et al. (21) in several stratified squamous epithelia, we have observed CD44v3 immunostaining at the basal third of the oesophageal squamous epithelium. In contrast, Barrett mucosa did not react with this monoclonal antibody. All squamous cell carcinoma samples revealed a strong diffuse pattern of CD44v3 positivity. Surprisingly, oesophageal adenocarcinoma also showed a weak or moderate, focal CD44v3 immunoreaction in 60% of cases.

As already mentioned, the intense expression of v3 in squamous cell carcinoma cases could be related to the autocrine function of HB-EGF in keratinocytes. However, this

finding does not seem to be restricted to squamous cells, since a great proportion of adenocarcinomas were CD44v3 positive. This distribution suggests the possibility that HB-EGF may be instrumental in cell proliferation control not only in keratinocytes but also in totipotential stem cells of the squamous-columnar junction, and prompts the consideration of a putative role for CD44v3 in the development of oesophageal carcinoma of both the squamous and glandular types.

3.1.6. REFERENCES

- 1 Hofmann M, Wolfgang R, Zöller M, Tölg C, Ponta H, Herrlich P, et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991;**51**:5292-5297.
- 2 Picker LJ, Nakache M, Butcher EC. Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 1989;**109**:927-937.
- 3 Lesley J, Hyman R, Kinkade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv immunol* 1993;**54**:271-335.
- 4 Jackson DG, Bell JI, Dickinson R, Timans J, Shields J. Proteoglycan forms of the lymphocyte homing receptor CD44 are alternatively spliced variants containing the v3 exon. *J Cell Biol* 1995;**128**:673-685.
- 5 Bennett KL, Jackson DG, Simon JC, Tanczos E, Peach R, Modrell B et al. CD44 isoforms containing v3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J Cell Biol* 1995;**128**:687-698.

- 6 Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H, Hashimura E, Kobayashi T, Sudo K, Nakagawa T, et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994;**269**:20060-20066.
- 7 Puestow CB, Gillesby WJ, Guynn VL. Cancer of the esophagus. *Arch Surg* 1955; **70**:662-671.
- 8 Levine MS, Caroline D, Thomson JJ. Adenocarcinoma of the esophagus: Relationship to Barrett mucosa. *Radiology* 1984;**150**:305-309.
- 9 Hamilton SR, Smith RRL. The relationship between columnar epithelial dysplasia and invasive adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 1987; **87**:301-312.
- 10 Wang HH, Antonioli DA, Goldman H. Comparative features of esophageal and gastric adenocarcinoma: Recent changes in type and frequency. *Hum Pathol* 1986;**17**:482-487.
- 11 Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of the DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals

- at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci* 1992;**89**:12160-12164.
- 12 Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haubmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;**65**:13-24.
- 13 Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA, Adolf GR, van der Berg FM, Ponta H et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993;**53**:4754-4756.
- 14 Heider KH, Hofmann M, Hors E; van der Berg F, Ponta H, Herrlich P, et al. A human homologue of the rat metastasis associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinoma and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993;**120**:227-233.
- 15 Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992;**340**:1053-1058.
- 16 Mulder JWR, Kruit PM, Sewenat M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of v6-exon-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994;**344**:1470-72.

- 17 Washington K, Gottfried MR, Telen MJ. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol* 1994;**24**:1043-1049.
- 18 Heider KH, Dammrich J, Skrock-Angel P, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP, Herrlich P, et al. Differential Expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993;**53**:4197-4203.
- 19 Mayer B, Jauch KW, Güntert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke LI. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993;**342**:1019-1022.
- 20 Harn HJ, Ho Li, Chang JY, Wu CW, Jiang SY, Lee HS, et al. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44 in normal and carcinomatous stomach mucosa of Chinese subjects. *Cancer* 1995;**75**:1065-71.
- 21 Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Harris AL, Gearing A, Simmons DL. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994;**54**:4539-4546.

3.2. CAPÍTULO 2

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CD44v6 IN ADENOCARCINOMA OF THE PANCREAS: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

EM Castellà, A Ariza, I Ojanguren, JL Mate, X Roca, A Fernández-Vasalo, JJ Navas-Palacios

Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Publicado en *Virchows Archives* 1996;429:191-95

3.2.1. ABSTRACT

Alternative splicing gives rise to numerous CD44 isoforms, some of which seem to have a role in tumor metastasis. Specifically, a variant form of CD44 with sequences encoded by exon v6 (CD44v6) confers metastatic potential when transfected into a nonmetastasizing cell line of rat pancreatic adenocarcinoma.

This study has immunohistochemically investigated standard CD44 (CD44s) and CD44v6 expression in six samples of normal pancreatic tissue, four of chronic pancreatitis, and twenty-four of metastasizing and nonmetastasizing pancreatic adenocarcinoma. Additionally, eighteen samples of lymph node or visceral metastases were included in the study.

CD44s was expressed in nonneoplastic tissue and in pancreatic adenocarcinoma. In contrast, CD44v6 was not detected in any of the normal tissue or chronic pancreatitis specimens, whereas 54% of pancreatic adenocarcinomas and 55% of metastases expressed this variant exon.

Although it is not clear whether CD44 isoforms containing exon v6 play a role in malignant progression in the human exocrine pancreas, it seems plausible that the expression of multiple isoforms containing this and other variant exon confers a selective advantage to pancreatic adenocarcinoma.

Key words: Pancreatic adenocarcinoma, CD44s, CD44v6, immunohistochemistry, metastasis, invasion.

3.2.2. INTRODUCTION

The prognosis for pancreatic adenocarcinoma is extremely poor because usually there is invasion of surrounding tissues and metastases to lymph nodes, liver or peritoneum at the time of diagnosis [20,10]. The mechanisms underlying these invasive and metastatic capabilities have not yet been clarified.

The widely distributed surface glycoproteins known as CD44 are expressed in many types of tumors and normal tissues [4]. Alternative splicing and differential N- and O-linked glycosylation contribute to the heterogeneity of the family [3]. Alternative splicing of variant exons v1-v10 generates multiple isoforms [14]. The isoform lacking variant exons is referred to as CD44s (for standard), which is the most common isoform in hemopoietic cells [8]. While CD44s is known to be implicated in various processes such as lymphocyte homing, lymphocyte activation [2] and extracellular matrix adhesion [9], the functions of alternatively spliced isoforms are not clear.

The CD44 variant isoforms with the sequence encoded by exon 6, have been reported to confer metastatic potential when transfected into a nonmetastatic cell line of rat pancreatic adenocarcinoma [6]. Moreover, this effect can be blocked by anti-v6 antibodies [15].

In a recent work, non-Hodgkin lymphomas that expressed CD44v6 were associated with poorer survival when compared with those which did not express CD44v6 [13]. In

human colorectal carcinoma [21] and intestinal type gastric adenocarcinoma [7] expression of CD44v6 is related to tumor progression.

In this study we have immunohistochemically examined CD44s and CD44v6 expression in nonneoplastic pancreatic tissues and pancreatic adenocarcinoma, in an attempt to evaluate the role of these adhesion molecules in malignant progression.

3.2.3. MATERIAL AND METHODS

Fifty-four samples of normal pancreatic tissue, chronic pancreatitis and metastasizing and nonmetastasizing adenocarcinoma were obtained from the archives of the Department of Pathology, "Germans Trias i Pujol" University Hospital.

Samples belonged to twenty-eight patients (sixteen males and twelve females) with ages between 34 and 82 years (mean, 71 years). Twenty-four of them corresponded to ductal adenocarcinoma and four to chronic pancreatitis. Six normal pancreatic samples were obtained from the nonneoplastic areas of pancreatic adenocarcinomas surgical specimens.

Of the twenty-four adenocarcinoma samples, six were pancreatic adenocarcinomas with no evidence of metastasis at the time of diagnosis and eighteen were metastasizing pancreatic adenocarcinomas. Additionally, eighteen samples (one per metastasizing case) of lymph node or visceral metastases were included in the study. According to the Cancer of the Pancreas Task Force stage classification the patients were distributed as follows: four, stage I; two, stage II; ten, stage III; and eight, stage IV.

Degree of differentiation was evaluated following well established criteria. The results obtained with immunohistochemistry were correlated with grade of differentiation and tumor stage.

All biopsy specimens were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin at 57-60°C. Five-micrometer-thick sections were deparaffinized, placed in methanol

containing 0.3% H₂O₂ for 30 min at room temperature, washed, heated in a microwave oven (3x3 min, with 2-min intervals) while in buffered citrate [0.1M] (citric acid and sodium citrate, pH 6.0), washed and incubated for 30 min with rabbit serum at 1:10 dilution. Subsequently, sections were incubated with anti-CD44s (clone 2C5; RD Systems, Abingdon, UK) and anti-CD44v6 (clone 2F-1D; RD Systems, Abingdom, UK) mouse monoclonal antibodies at 1:1000 dilution, for 22 h at room temperature. The slides were washed and incubated with biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin antibodies at a 1:700 dilution and with avidin-biotin immunoperoxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). After application of the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride [0.5 mg/ml] (Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI, USA) sections were contrasted with hematoxylin, dehydrated and mounted with Permount. A nonimmune mouse serum was used as control instead of the specific monoclonal antibodies and a non-small lung carcinoma served as positive control for CD44s and CD44v6

Two features were taken into account for the evaluation of CD44 expression:

- 1.- Percentage of positively stained cells: negative, <5%; focal, between 5% and 50%; diffuse, >50%
- 2.- Intensity of staining: 0, no staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; 3, strong staining.

Two of the authors evaluated the slides independently. Those with dissimilar observations were reviewed to reach a consensus.

Frequency tables were analyzed by Chi-square or Fisher's exact test

3.2.4. RESULTS

All normal pancreatic tissue samples examined showed focal immunoreactivity of moderate intensity for CD44s in the ductal epithelium and in acinar cells, whereas endocrine cells seem to be negative (Fig. 1). Similarly, ducts enmeshed in fibrous tissue of chronic pancreatitis cases were focally (50%) or diffusely (50%) positive for CD44s in all cases studied (Fig. 2). The intensity of plasma membrane staining was moderate in 75% of cases and strong in 25% (Table 1). In contrast, CD44v6 was not expressed in any of the normal pancreatic tissue or chronic pancreatitis samples (Table 2).

Of the adenocarcinomas, 70% were positive for CD44s (66% of non metastasizing cases and 72% of metastasizing instances). The distribution of CD44s staining was predominantly focal in non metastasizing neoplasms (75%), while in metastasizing tumors it was focal in 53% of cases and diffuse in 47% of instances (Fig. 3).

Seventy-two percent of metastases (13/18) stained positively for CD44s, the distribution being diffuse in 53% of cases and focal in the rest (Table 1). The intensity of CD44s staining varied from moderate to strong in malignant tumor samples (table 1). CD44v6 immunostaining was positive in thirteen of twenty-four (54%) adenocarcinomas (50% of nonmetastasizing cases (Fig. 4) and 55% of metastasizing instances) and in 72 % of the samples of metastasis (Fig. 5) . CD44v6 positivity was predominantly focal and staining intensity was weak or moderate in most cases of adenocarcinoma and metastasis. These results are summarized in table 2.

The differences in CD44v6 expression between metastasizing and nonmetastisizing pancreatic adenocarcinoma and between primary tumors and their lymph node metastases did not reach statistical significance.

No significant correlation could be demonstrated between CD44v6 expression and presence of metastasis at the time of diagnosis, degree of histological differentiation, or tumor stage. The intensity and distribution of immunoexpresion did not correlate with the histopathological variables analyzed.

Fig 1 CD44s expression in normal epithelial and acinar pancreatic cells (x 400)

Fig 2 CD44s immunoreactivity in chronic pancreatitis (x 400)

Fig 3 CD44s diffuse immunostaining of adenocarcinoma cell membranes (x 400)

Fig 4 Primary pancreatic adenocarcinoma with CD44v6 focal immunoreactivity (x 400)

Fig 5 CD44v6 immunostaining of cell membranes in lymph node metastases of pancreatic adenocarcinoma (x400)

Table 1 CD44s Expression in Nonneoplastic Pancreas and in Pancreatic Adenocarcinoma

	No. of cases	No. of positive cases	Distribution		Intensity		
			F	D	1	2	3
Normal pancreas	6	6(100%)	6(100%)	0	0	6(100%)	0
Chronic pancreatitis	4	4(100%)	2(50%)	2(50%)	0	3(75%)	1(25%)
Nonmetastatizing adc.	6	4(66%)	3(75%)	1(25%)	0	2(50%)	2(50%)
Metastasizing adc	18	13(72%)	7(53%)	6(47%)	0	5(38%)	8(61%)
Total adenocarcinomas	24	17(70%)	10(58%)	7(42%)	0	7(41%)	10(58%)
Metastasis	18	13(72%)	6(46%)	7(53%)	0	7(53%)	6(46%)

adc: adenocarcinoma

Table 2 CD44v6 Expression in Nonneoplastic Pancreas and in Pancreatic Adenocarcinoma

	No..of cases	No. of positive cases	Distribution		Intensity		
			F	D	1	2	3
Normal pancreas	6	0					
Chronic pancreatitis	4	0					
Nonmetastasizing adc	6	3(50%)	3(100%)	0	1	2(66%)	0
Metastasizing adc	18	10(55%)	7(70%)	3(30%)	3(30%)	6(60%)	1(10%)
Total adenocarcinomas	24	13(54%)	10(76%)	3(23%)	4(30%)	8(61%)	1(8%)
Metastasis	18	13(72%)	11(84%)	2(15%)	5(38%)	7(53%)	1(8%)

adc: adenocarcinoma

3.2.5. DISCUSSION

Ductal adenocarcinoma of the pancreas constitutes the fifth leading cause of death from cancer in Western countries [19]. The diagnosis in most cases is made when the tumor has spread beyond the pancreas and has metastasized to lymph nodes. Metastases occur very early in the course of the disease to nodal groups, some of which are not usually removed by the standard Whipple procedure [1], which greatly jeopardizes appropriate treatment.

Takada et al. [17] have recently proved, by flow cytometry, that CD44 levels in pancreatic carcinoma cells are over 100 times higher than in normal pancreatic cells. In the same study, four human pancreatic adenocarcinoma cell lines were investigated with anti-human CD44 and showed similar positive results. In another work, Takada et al. [18] also proved that proliferation of human pancreatic adenocarcinoma cells is not affected by anti-CD44 antibody, whereas the invasive capacity of these cells is suppressed by this antibody.

On the other hand, Rall et al. [12], using reverse transcriptase protein chain reaction (RT-PCR) methods, have reported that expression of CD44s and epithelial isoforms of CD44 (CD44v8-v10) is not different in specimens of primary or metastatic adenocarcinoma and control pancreases. In contrast, CD44v6 is more frequently expressed in adenocarcinoma samples than in control specimens. Moreover, Gansauge et al. [5] have demonstrated, by immunohistochemistry and RT-PCR analysis, that

production of CD44 splice isoforms carrying variant exons v5-v10 is enhanced in pancreatic adenocarcinoma.

Our results are partially in concordance with the data previously reported on the subject. We have not found statistically significant differences in CD44s expression among normal pancreatic tissues, chronic pancreatitis, and metastatic and nonmetastatic carcinoma. The results reported by Rall et al. [12] and Gansauge et al. [5] are in agreement with our data in this regard.

We have obtained positive reactions with anti-CD44v6 monoclonal antibody in pancreatic nonmetastasizing and metastasizing adenocarcinomas, as well as in samples of metastasis. Normal and inflamed tissues did not show reactivity for this variant exon in our hands. Rall et al. [12], using RT-PCR/Southern blot analysis, found two CD44 isoforms that hybridize with radiolabeled CD44v6 in malignant tissues. The differences between metastasizing and nonmetastasizing carcinomas observed in this study, similarly to our results, were not statistically significant. This may be explained by the fact that pancreatic adenocarcinoma, as stated before, metastasizes very early to lymph node groups which are not always removed by the usual Whipple procedure [1]. In view of this, carcinomas considered to be nonmetastasizing presumably are metastatic at the time of diagnosis. More recently, Gansauge et al. [5], based on immunohistochemical, Western blot and RT-PCR techniques, have reported that in pancreatic adenocarcinomas exon v6 is associated with several other variant exons leading to an expression of multiple splice isoforms that contain at least v4-v10, whereas CD44v6 immunohistochemical expression in normal ductal cells is the translation of a splice

isoform consisting only of the variant exon v6. These authors did not specify whether the adenocarcinomas included in their study were metastasizing or not. Our results, similarly to those of Rall et al. [12], seem to indicate that CD44v6 overexpression in human pancreatic adenocarcinoma may be related to a possible role of this variant isoform in the invasive and metastatic mechanisms of this neoplasm. This is supported by several studies which suggest that surface expression of exon 6-containing isoforms diminishes binding to hyaluronate and thus permits the malignant cell to detach from the basement membrane or from adjacent cells [16]. In view of the Gansauge et al's results [5], further investigations are needed to determine whether detaching and invasive capabilities are conferred to neoplastic cells by exon v6 itself or rather by CD44 isoforms with large chains containing several variant exons.

3.2.6. REFERENCES

1 Cubilla AL, Fortner J, Fitzgerald PJ (1978) Lymph node involvement of the head of the pancreas area. *Cancer* 41:880-887

2 Denning SM, Le PT, Singer KH, Haines BF (1990) Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor augment human peripheral blood T cell activation. *J Immunol* 144:7-15

3 Faasen AE, Schragger Ja, Klein DJ; Oegema TR, Couchman JR, McCarty JB (1990) A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44 is involved in type I collagen melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* 116:521-531

4 Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Harris AL Gearing A, Simmons DL (1994) Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 54: 4539-4546

5 Gansauge F, Gansauge S, Zobywalsky A, Scharnweber C, Link KH, Nussler AK, Beger HG (1995) Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas. *Cancer Res* 55: 5499-5503

6 Günthert U, Hofmann M, Wolfgang R, Reber S, Zöller M, Haubmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P (1991) A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65:13-24

7 Heider KH, Dämmrich J, Skroh-Angel P, Müller-Hermelink JK, Vollmers HP, Herrlich P, Ponta H (1993) Differential expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 53:4197-4203

8 Jalkanen S, Bargatze RF, Herron LR, Butcher EC (1986) A lymphoid cell surface glycoprotein involved in endothelial cell recognition and lymphocyte homing in man. *Eur J Immunol* 16:1195- 1202

9 Lesley J, Hyman R, Kinkade PW (1993) CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv in Immunol* 54:271-335

10 Manabe T, Miyashita T, Ohshio G, Nonaka A, Suzuki T, Endo K, Takahashi M, Tobe T (1988) Small carcinoma of the pancreas: clinical and pathologic evaluation of 17 patients. *Cancer* 62: 135-141

11 Pollard HM, Anderson WAD, Brooks FP, Cohn H, Murray M, Connelly RR, Fortner JG, Lemon MH, Palmer PES, Thomas LB, Webster PD, Carter S (1980) Staging of cancer of pancreas. *Cancer* 47: 1631- 1637

12 Rall JNC, Rustgi AK (1995) CD44 isoform expression in primary and metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 55:1831- 1835

13 Ristamäki R, Joensuu H, Söderström KO, Jalkanen S (1995). CD44v6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol* 176:259-267

14 Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci* 89:12160-12164

15 Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zöller M (1993) Prevention of tumor metastasis formation by antivariant CD44. *J Exp Med* 177:433-455

16 Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B (1991) The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate bearing cells. *EMBO J* 10:343-348

17 Takada M, Yamamoto M, Saitoh Y (1994) The significance of CD44 in human pancreatic cancer: I. High expression of CD44 in human pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 9:748-752

18 Takada M, Yamamoto M, Saitoh Y (1994) The significance of CD44 in human pancreatic cancer: II. The role of CD44 in human pancreatic adenocarcinoma invasion. *Pancreas* 9:753-757

19 Taylor WT, Everthert GE (1994) Pancreatic Cancer. Digestive diseases in the United States: Epidemiology and impact, Everthert EG ed, USPAH, NIH Publication no 94-492270

20 Tepper J, Ardi G, Suit H (1976) Carcinoma of the pancreas: review of MGH experience from 1963 to 1973: analysis of surgical failure and implications for radiation therapy. *Cancer* 37:1519- 24

21 Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST (1993) Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 53:4754-56

3.3. CAPÍTULO 3

DIFFERENTIAL EXPRESION OF CD44_{v6} IN METASTASES OF THE INTESTINAL AND DIFFUSE TYPES OF GASTRIC CARCINOMA

E.M. Castellà, A. Ariza, I. Pellicer, A. Fernández-Vasalo, I. Ojanguren

Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Autonomous University of
Barcelona, Barcelona, Spain.

Publicado en *Journal of Clinical Pathology* 1998;51:134-137.

3.3.1. ABSTRACT

Aims: To assess whether standard and variant isoforms of CD44 (CD44s, CD44v5 and CD44v6) show a differential expression profile in early versus advanced gastric adenocarcinoma of the diffuse and intestinal types and their metastases.

Methods: Immunohistochemical expression of CD44s, CD44v5 and CD44v6 was evaluated in fourteen early gastric cancers (nine intestinal and five diffuse) and thirty-seven advanced adenocarcinomas (twenty-one intestinal and sixteen diffuse) as well as in eighteen instances of perigastric lymph node metastases. Ten normal and five metaplastic gastric mucosa samples were also included in the study.

Results: Albeit no significant association was found between level of invasion and CD44 expression profile, CD44v6 positivity was detected more frequently in metastases of intestinal type carcinomas (66%) than in metastases of diffuse type neoplasms (11%) ($p < 0.05$). Weak CD44s, CD44v5 and CD44v6 expression was focally observed in both normal and metaplastic gastric mucosa samples.

Conclusions: These data suggest that CD44v6 expression may be significantly involved in the production of lymph node metastases in intestinal type gastric carcinoma but not so in the diffuse type, whose metastatic potential would be basically unrelated to the CD44 family of adhesion molecules.

Key words: Gastric adenocarcinoma, intestinal, diffuse, CD44, immunohistochemistry, invasion, metastasis

3.3.2. INTRODUCTION

CD44, a family of cell surface adhesion molecules, is expressed in a variety of normal and neoplastic tissues (1). This protein family has been linked to a number of functions including lymphocyte homing and activation (2,3), hemopoiesis, cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, and cell migration (4). To be able to exert such diversity of effects, CD44 resorts to the generation of numerous isoforms through a mechanism of alternative splicing. Some of these CD44 isoforms also seem to play a role in the production of tumour metastasis (5). Specifically, a nonmetastatic cell line of rat pancreatic adenocarcinoma has been seen to acquire metastatic potential when transfected with CD44 variants containing exon v6 (CD44v6), an effect that can be blocked by anti-v6 antibodies (6,7,8).

In regard to gastric adenocarcinoma, it has been described that its intestinal and diffuse types show differential expression of CD44 isoforms. Thus, whereas intestinal type adenocarcinomas express CD44 variant isoforms containing exons v5 and v6, diffuse type tumours are predominantly associated with CD44 isoforms that include exon v5 (CD44v5)(9). In addition, CD44 seems to influence the prognosis of gastric carcinoma, since CD44 overexpression is associated with the development of an invasive phenotype (10) and high tumour recurrence and mortality rates in patients with curatively resected gastric cancer (11).

In view of the aforesaid relationship between the biologic behaviour of gastric carcinoma and its CD44 expression status, inquiry into the possible differences between the CD44 expression profiles of early and advanced gastric cancers of intestinal and diffuse types and their metastases is particularly tempting. Accordingly, we have immunohistochemically evaluated the expression of standard CD44 (CD44s), CD44v5, and CD44v6 in normal gastric mucosa, intestinal metaplasia of the stomach, and gastric carcinoma of the intestinal and diffuse types of various levels of invasion.

3.3.3. MATERIALS AND METHODS

Tissue blocks of normal and pathological stomach from 54 patients (31 men and 23 women) with a mean age of 67.4 years (range, 41-94 years) were obtained from the archives of the Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol. All patients underwent surgery between 1986 and 1995 at the same institution. The 84 samples studied were distributed as follows: five each of normal antral mucosa, normal fundic mucosa, and metaplastic mucosa obtained from gastrectomy specimens; fourteen early gastric carcinomas (five of the diffuse type and nine of the intestinal type); thirty-seven advanced gastric carcinomas which invaded beyond the submucosa (twenty-one of the intestinal type, nine of them with lymph node metastasis, and sixteen of the diffuse type, nine of them with lymph node metastasis) were also included in the study. The degrees of differentiation of intestinal type tumours were as follows: nine well-differentiated, eleven moderately differentiated, and ten poorly differentiated.

Histological features were evaluated according to internationally established criteria. The immunohistochemical results obtained in neoplastic samples were correlated with histological type and prognostic factors such as level of invasion, degree of differentiation, lymph vessel involvement, and evidence of metastasis at the time of diagnosis.

All biopsy specimens were fixed in 10% neutral formalin, embedded in paraffin at 57-60°C and stained with haematoxylin-eosin. For immunohistochemical studies five-

micrometre-thick sections were deparaffinized and incubated with anti-CD44s (dilution 1:1000; clone 2C5; RD Systems, Abingdon, UK), anti-CD44v6 (dilution 1:1000 clone 2F-1D; RD Systems), and anti-CD44v5 (dilution 1:2500 clone VFF-8; Bender MedSystems, Vienna, Austria) mouse monoclonal antibodies for 22 h at room temperature and then treated with the avidin-biotin-peroxidase complex (Dako, Glostrup, Denmark) technique. A nonimmune mouse serum was used as control instead of the specific monoclonal antibodies. A non-small cell lung carcinoma served as positive control for CD44s and CD44v6, and a colon adenocarcinoma as positive control for CD44v5.

Two features were taken into account for the evaluation of CD44 expression: the percentage of positively stained tumour cells (negative, <5%; focal, between 5% and 50%; diffuse, >50%), and the intensity of staining: 0, no staining; 1, weak staining; 2, moderate staining; and 3, strong staining (comparable with lymphocytes). Only cell membrane staining was considered as positive. Two of the authors evaluated the slides independently. Cases with dissimilar observations were reviewed to reach a consensus.

The data were compared with the aid of Fisher's exact test to detect possible associations between CD44 expression and histological tumour type, level of tumour invasiveness or lymph vessel involvement. p values under 0.05 were regarded as statistically significant.

3.3.4. RESULTS

CD44 immunoreactivity in normal and metaplastic gastric mucosa

Ten samples of normal antral or fundic mucosa and five samples of intestinal metaplasia of the stomach were tested for immunoreactivity to anti-CD44s, anti-CD44v5, and anti-CD44v6. CD44s was expressed in most samples examined, specifically in neck and isthmus mucous cells (Fig. 1), as well as in metaplastic areas.

Membrane positivity for v5 and v6 was present preferentially in the same proliferative and metaplastic areas, although the immunostaining was weaker and more focal in distribution. CD44s and isoforms containing exons v5 and v6 were not expressed in the foveolar epithelium or the luminal surface.

CD44 immunoreactivity in gastric carcinomas

Intestinal type adenocarcinomas

Early intestinal adenocarcinoma showed CD44s immunopositivity in 66% of cases. Advanced adenocarcinomas of intestinal type were CD44s-positive in 75% of nonmetastasizing cases and in 77% of metastasizing tumours (Table 1).

CD44v5 was expressed in 33% of early and advanced nonmetastasizing carcinomas, whereas 55% of metastasizing cases were immunoreactive for this antibody (Fig.3) ($p=0.2$) (Table 2).

A positive immunostaining for CD44v6 was obtained in 22% of early intestinal adenocarcinoma samples. As for advanced intestinal cases, nonmetastasizing and metastasizing tumours expressed CD44v6 positivity with an identical frequency (33%) (Table 3).

Diffuse type adenocarcinomas

Sixty per cent of early diffuse adenocarcinomas showed CD44s immunostaining. Nonmetastasizing and metastasizing advanced cases were CD44-positive with a similar frequency (71% and 77%, respectively). The difference between early and advanced diffuse adenocarcinomas did not reach statistical significance ($p=0.5$) (Table 1).

CD44v5 expression rates of early (20%) and advanced cases (14% for nonmetastasizing and 22% for metastasizing instances) of diffuse adenocarcinomas were quite similar (Table 2).

As for CD44v6, nonmetastasizing advanced carcinomas showed immunoreactivity more commonly (42%) than early carcinomas (22%), although the difference did not reach statistical significance ($p=0.4$). Only 22% of metastasizing cases were positive for CD44v6 (Table 3).

Lymph node metastases

Regarding lymph node metastases, CD44s was expressed in a higher percentage of the intestinal carcinomas (88%) (Fig.2) than of the diffuse type cases (44%) ($p=0.06$) (Table 1).

CD44v5 expression was also detected more frequently in metastases of intestinal carcinomas (55%) than in metastases of diffuse type tumours (11 %) ($p=0.06$) (Table 2).

CD44v6 expression rate in intestinal type metastases (66%)(Fig. 4) was higher than in diffuse type metastases (11%), the difference being statistically significant ($p=0.02$) (Table 3).

Differentiation grade was not related to CD44s, CD44v5, or CD44v6 expression (data not shown). The intensity and distribution of immunostaining did not correlate with level of invasion or histological type of carcinoma.

Fig. 1 CD44s expression in normal antral gastric mucosa is detected in neck and isthmus mucous cells, as well as lymphocytes.

Fig. 2 Intestinal type adenocarcinoma with focal CD44v5 immunostaining in cell membranes.

Fig. 3 Lymph node metastasis of intestinal type gastric adenocarcinoma: diffuse and intense CD44s immunoreactivity in lymphocytes and epithelial cells.

Fig. 4 Lymph node metastasis of intestinal type gastric adenocarcinoma: focal CD44v6 immunostaining restricted to epithelial cells.

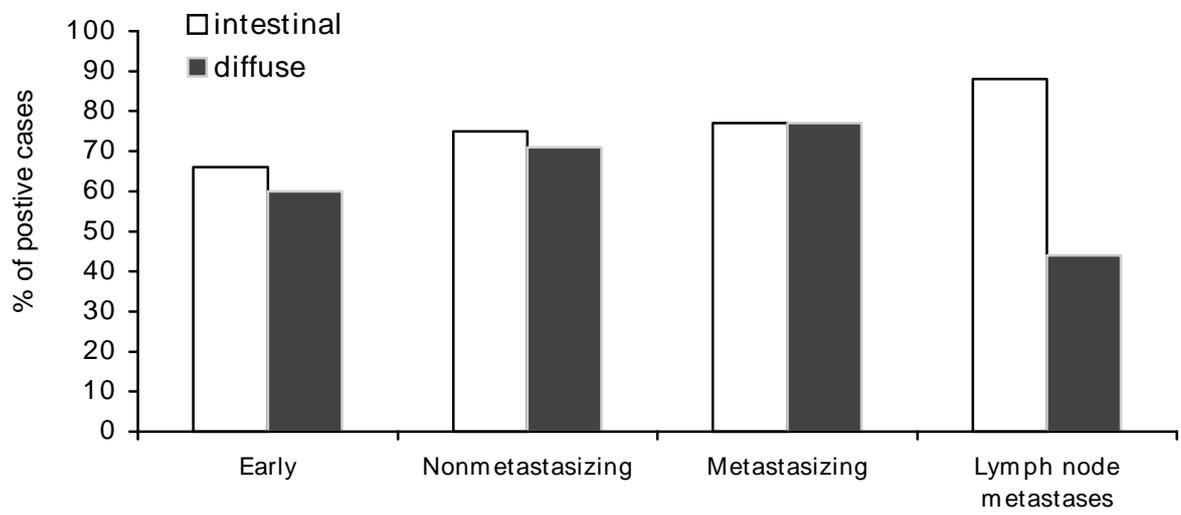


Table 1 CD44s expression in intestinal and diffuse type adenocarcinoma of the stomach

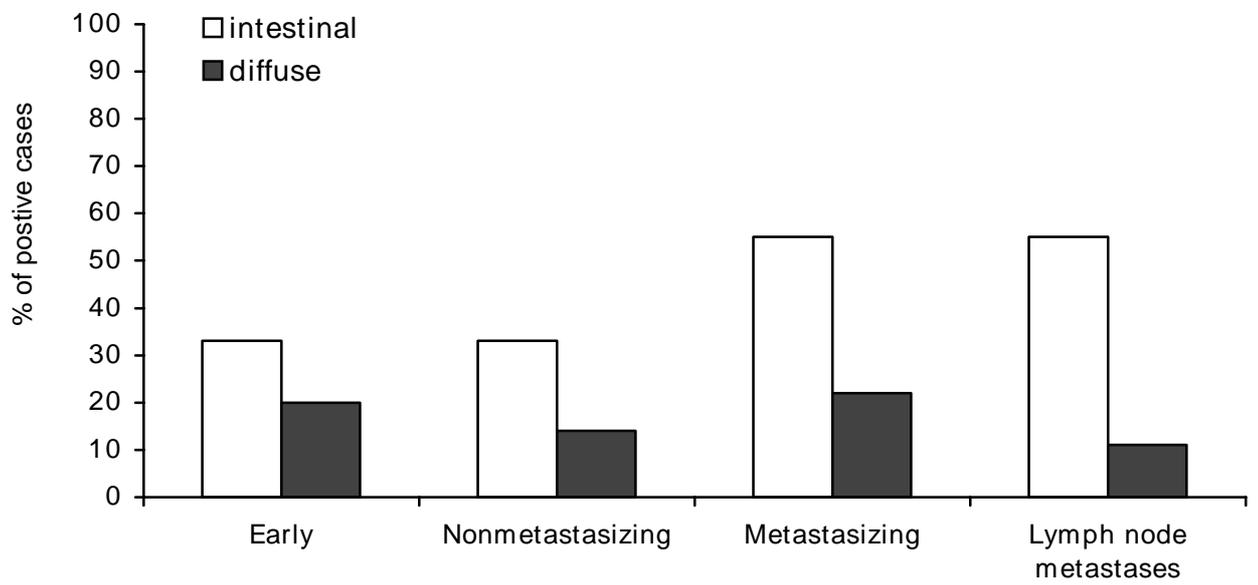


Table 2 CD44v5 expression in intestinal and diffuse type adenocarcinoma of the stomach

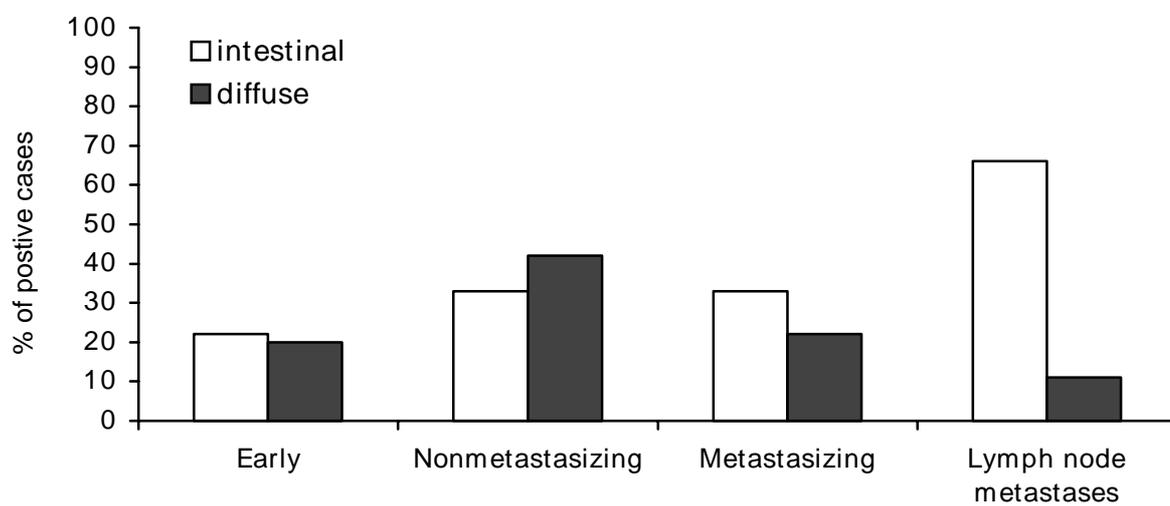


Table 3 CD44v6 expression in intestinal and diffuse type adenocarcinoma of the stomach

3.3.5. DISCUSSION

In this study normal gastric mucosa has shown focal immunostaining for CD44s. The epithelial cells expressing the highest levels of the standard isoform are the mucinous cells at the neck and isthmus of the antral or fundic glands. These areas correspond to the regenerative region of the gastric mucosa and seem to exhibit a pattern of CD44s expression which is quite similar to that shown by colonic basal cells (12).

The two variant isoforms studied by us (CD44v5 and CD44v6) have shown focal immunostaining in mucous cells of the antral and fundic mucosa and in metaplastic areas. In previous studies Heider et al. (9) have found v5 expression in the foveolar proliferation zone and mucous surface epithelium, whereas intestinal metaplasia reacted with specific monoclonal antibodies for exons v5 and v6.

In the carcinoma samples investigated, CD44s immunopositivity seemed to increase with depth of invasion, the percentage of positive cases being greater in advanced than in early carcinomas, although statistically significant differences could not be detected. Consequently, with respect to standard isoform expression, our results are consistent with Mayer et al's (11), who have found that CD44s and CD44v9 expression is associated with the presence of distant metastases at the time of diagnosis and with increased local recurrence and mortality rates in patients with curatively resected tumours.

The expression of variant isoforms containing spliced exon v6 has been previously associated with an unfavourable outcome in non-Hodgkin lymphoma (13). Regarding epithelial tumors, Kaufman et al. (14) have demonstrated that CD44v6 is a good prognostic marker in breast carcinoma. On the other hand, expression of CD44 variant isoforms containing v6 exon has been seen to increase in parallel with colorectal tumor progression and Dukes stage (12). Other authors (15), however, have claimed that CD44v6 expression has a prognostic value which is independent of Dukes' stage.

Concerning gastric cancer, previous studies have reported that intestinal type adenocarcinoma expresses variant isoforms containing exons v5 and v6, whereas diffuse type adenocarcinoma expresses predominantly exon v5 and, in a very low percentage of cases, exon v6. Besides, the lymph node metastases of these diffuse type tumours have been shown to be devoid of v6-related proteins by Southern blot analysis. In contrast, a correlation between primary tumours of intestinal type and their lymph node metastases has been observed in regard to v6 containing isoforms, while no obvious correlation was detected for exon v5 (9). More recently, Dammrich et al. (16) have claimed that the relationship between v6 and metastatic lymphogenic spreading is different in the two cancer types. Specifically, whereas diffuse type metastasizing cells lack v6 expression, intestinal type cancers do show v6 staining in infiltrative lymph node metastases.

Our results are in agreement with these previous observations. In our hands, isoforms containing exon v6 have been more frequently detected in metastasizing intestinal type carcinomas than in metastasizing diffuse type carcinomas. Moreover, CD44v6

expression has been seen to be significantly more frequent in lymph node metastases of intestinal type carcinomas than in those of diffuse type cases. These findings suggest an important role of exon v6 in the metastatic process, particularly in the lymph node spreading of intestinal adenocarcinoma cells. On the contrary, invasion of lymph nodes by diffuse type tumour cells seems to be independent of exon v6.

As for the level of invasion, we have not found statistically significant differences in standard and variant CD44 isoforms

expression between early and advanced cases of both histological types of gastric adenocarcinoma. These results may indicate that CD44 participation in the metastatic cascade takes place at the initial stages of tumour progression, since expression of CD44 variant isoforms is already detected in early carcinomas of both the intestinal and diffuse types. Further studies are necessary to elucidate the mechanisms propelling neoplastic cell invasion and migration to lymph nodes, as well as the degree of participation of CD44 in this process.

3.3.6. REFERENCES

1 Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Harris AL, Gearing A, Simmons DL: Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994;54:4539-46

2 Picker LJ, Nackache M, Butcher EC: Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types. *J Cell Biol* 1989;109:927-37

3 Denning SM, Le PT, Singer KH, Haynes BF: Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor augment human peripheral blood T cell activation. *J Immunol* 1990;144:7-15

4 Lesley J, Hyman R, Kinkade PW: CD44 and its interaction with the extracellular matrix. *Adv Immunol* 1993;54:271-335

5 Herrlich P, Zoller M, Pals ST, Ponta H: CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993;14:395-9

6 Günthert U, Hofmann M, Wolfgang R, Reber S, Zöller M, Haubmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P: A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24

7 Hofmann M, Rudy W, Zöller M, Tö Ig C, Ponta H, Herrlich P, Günthert U: CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res* 1991;51:5292-7

8 Seiter S, Arch R, Reber S, Komitowski D, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P, Matzku S, Zöller M: Prevention of tumor metastasis formation by antivariant CD44. *J Exp Med* 1993; 177:433-55

9 Heider KH, Dämmrich J, Skroh-Angel P, Müller-Hermelink JK, Vollmers HP, Herrlich P, Ponta H: Differential expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993; 53:4197-203

10 Washington K, MR Gottfried, Telen MJ: Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994;25(10):1043-9

11 Mayer B, Jauch KW, Günthert U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson PJ: De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993;342:1019-22

12 Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST: Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993;53:4754-6

13 Ristamäki R, Joensuu H, Söderström K, Jalkanen S: CD44v6 expression in non-Hodgkin lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol* 1995;176:259-67

14 Kaufmann M, Heider KJ, Sinn HP, Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P: CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. 1995;345:615-9

15 Mulder JW, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema W et al. Colorectal cancer prognosis and expression of v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; 334:1470-2

16 Dammrich J, Vollmers HP, Heider KH, Müller-Hermelink HK: Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *J Mol Med* 1995;73(8):395-401.

4. DISCUSIÓN

4.1. ESÓFAGO

En nuestro primer trabajo nos hemos propuesto examinar la expresión de CD44s y de CD44v3 en muestras de mucosa esofágica normal, esófago de Barrett y carcinomas de esófago (escamoso y adenocarcinoma), así como controles de mucosa gástrica y de intestino delgado normal.

La incidencia del adenocarcinoma de esófago y de cardias ha aumentado en los últimos años considerablemente (Blot 1991). Las características epidemiológicas del adenocarcinoma de esófago son similares a las del adenocarcinoma de cardias y claramente diferentes respecto a las del carcinoma escamoso de esófago y a las del adenocarcinoma de las áreas distales del estómago.

Una de las razones aducida como posible causa del incremento en la incidencia del adenocarcinoma de esófago es el aumento que ha experimentado últimamente la práctica de análisis endoscópicos. El cambio en las prácticas diagnósticas, que ha repercutido en una mayor exactitud en la localización de estos tumores, quizá pueda relacionarse con el incremento en cuanto al número de cánceres asignados al

esófago. No obstante, de ser ésta la única razón, el aumento de los adenocarcinomas de esófago hubiera sido paralelo a un descenso en la incidencia de los adenocarcinomas de cardias, que, como se ha comentado anteriormente, también ha acusado un notable incremento en los últimos años.

Se cuenta con pocos estudios que evalúen los factores de riesgo del adenocarcinoma de esófago. Un trabajo realizado en China, en una región donde la incidencia de carcinoma escamoso y adenocarcinoma es de las mayores del mundo (Li 1989), refleja que la proporción entre hombres y mujeres es mayor en el adenocarcinoma que en el carcinoma escamoso de esófago, de forma similar a lo que ocurre en Estados Unidos. Sin embargo, ni en éste ni en otros estudios realizados, se ha confirmado el alcohol (Levi 1990) o el tabaco como factores de riesgo de esta neoplasia. En cambio, en dichos estudios se ha demostrado, su ya conocida relación con el esófago de Barrett (Blot 1991, Pera 1993).

El esófago de Barrett se desarrolla como una complicación del reflujo gastroesofágico crónico y predispone al desarrollo de adenocarcinoma. El adenocarcinoma de esófago únicamente aparece en pacientes con esófago de Barrett. El riesgo estimado de malignización es aproximadamente 40 veces mayor en estos pacientes que en la población general (Rogers 1986). La displasia precede al desarrollo del adenocarcinoma sobre esófago de Barrett y, por tanto, permite detectar qué pacientes presentan un alto riesgo de sufrir esta complicación.

La displasia sobre el esófago de Barrett se caracteriza por una combinación de alteraciones arquitecturales y citológicas. A su vez, se clasifica en alto y bajo grado de una manera análoga a la displasia que complica la colitis ulcerosa. Como hemos comentado anteriormente, se considera como una entidad preneoplásica que permite detectar los casos con un alto riesgo de presentar adenocarcinoma, mediante el examen endoscópico con biopsias periódicas. Sin embargo, cabe señalar, que al utilizar la displasia como marcador de riesgo de desarrollar carcinoma, topamos con algunos inconvenientes, principalmente, la dificultad de diferenciarla de los cambios reactivos, en algunos casos, y del carcinoma *in situ*, en otros.

Hasta el momento, además de las alteraciones morfológicas, únicamente el análisis del DNA mediante citometría de flujo parece ser útil como indicador objetivo del riesgo de cáncer, ya que se ha comprobado que las poblaciones celulares aneuploides se incrementan paralelamente a la progresión desde metaplasia a displasia y carcinoma. En este sentido, el estudio de la expresión de las distintas isoformas de CD44 podría contribuir a hallar un marcador objetivo de progresión en la secuencia neoplásica del adenocarcinoma sobre el esófago de Barrett, y también en el desarrollo del carcinoma escamoso sobre el epitelio primitivo del esófago.

CD44s

En cuanto a la expresión de CD44s, los resultados obtenidos en nuestro trabajo han puesto de manifiesto positividad en las zonas proliferativas (tercio basal) del epitelio esofágico normal y de los subtipos antral e intestinal del esófago de Barrett. En el esófago de Barrett con mucosa de tipo fúndico no hemos constatado expresión de CD44s. En cuanto a la distribución de la expresión de CD44s, se presenta de forma focal en las muestras de mucosa de Barrett sin displasia, en las cuales la positividad se limita a la base de las criptas, con una distribución similar a la descrita por otros autores en el epitelio colónico normal (Heider 1993), o en las zonas de metaplasia intestinal de la mucosa gástrica (Heider 1993). En los casos de esófago de Barrett con displasia, la distribución es más difusa y alcanza la zona más superficial de las glándulas

Todos los carcinomas escamosos, y un 75 % de los adenocarcinomas, presentan inmunorreactividad para CD44s. No se ha observado correlación entre la expresión de CD44s y el grado de diferenciación o el estadio neoplásico. En este sentido, se aprecia bastante coincidencia entre los datos que hemos obtenido y los de un estudio publicado por Lagorce y col. (1998), en el que analizaron muestras de esófago de Barrett, con y sin displasia, y de adenocarcinomas de esófago. Estos autores obtuvieron un patrón de expresión de CD44s similar al descrito en nuestro estudio y, a la vez coincidieron con nuestros hallazgos en lo que se refiere al aumento de expresión de CD44s en los casos de displasia sobre esófago de Barrett, ya que en los 35 casos de displasia analizados obtuvieron positividad difusa para CD44s. Además,

según los mismos autores, la extensión de la positividad de la isoforma estándar de CD44 en el epitelio displásico se correlaciona directamente con la gravedad de la displasia. El porcentaje de positividad de los adenocarcinomas para CD44s (70 %) es comparable al de nuestra serie.

En lo que afecta a expresión de CD44s en el epitelio escamoso normal y displásico y en los carcinomas escamosos de esófago, Roye et al. (1996) demostraron expresión en el tercio basal del epitelio esofágico normal y un incremento en la expresión de esta isoforma paralelo al aumento en la gravedad de la displasia. A partir de estos resultados se podría establecer una posible implicación de CD44s en el desarrollo de la displasia sobre el epitelio escamoso esofágico. En cuanto a las muestras neoplásicas, Roye y col. (1996) constataron positividad para CD44s en los carcinomas escamosos de esófago. Sin embargo, en contraste con nuestros resultados, detectaron una disminución de CD44s paralela a la pérdida de diferenciación tumoral. Por ello, estos autores sugieren que la pérdida de expresión de CD44s en los tumores más pobremente diferenciados podría estar relacionada con el aumento en la potencialidad invasiva de estos tumores, al disminuir la unión de las células al hialuronato u otros componentes de la matriz extracelular y de las membranas basales.

Analizando los hallazgos de los distintos trabajos en cuanto a la relación de CD44s con la progresión tumoral en el esófago, tanto en lo referente a las neoplasias

escamosas como a las glandulares, los resultados reflejan que CD44s se expresa en las zonas proliferativas del epitelio escamoso normal y del metaplásico del esófago de Barrett. La expresión de esta isoforma se incrementa de forma paralela al desarrollo de la displasia en ambos tipos de epitelio y alcanza la zona más superficial de los mismos cuando la displasia es de alto grado. En cuanto a la fase de carcinoma, los resultados de nuestro trabajo son parcialmente concordantes con los de otros autores (Roye 1996, Lagorce 1998), en lo que hace referencia a la expresión de CD44s en los carcinomas escamosos y en los adenocarcinomas.

CD44v3

Además de la isoforma estándar, hemos considerado apropiado el estudio de la expresión del exón variable v3, teniendo en cuenta que la glicosilación con heparán-sulfato capacita a las isoformas que contienen este exón para su unión a factores de crecimiento tales como el HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor*) (Bennett 1995). Así, los complejos de CD44v3 con HB-EGF actúan como sustancias similares a los proteoglicanos, ya que presentan los factores de crecimiento a las "células diana". Como consecuencia, se activa el sistema de transducción de señales y se estimula la proliferación celular. En este sentido, además, se ha demostrado que el HB-EGF actúa como un factor de crecimiento autocrino sobre los queratinocitos (Hashimoto 1994) y que las anomalías del EGFR son más frecuentes en el carcinoma escamoso de esófago que en cualquier otro tipo de carcinoma (Mukaida 1991).

En nuestro estudio hemos constatado la expresión del exón v3 en el tercio basal del epitelio escamoso esofágico, en tanto que la mucosa gástrica y del intestino delgado normal y la mucosa de Barrett han resultado negativas. Las muestras tumorales presentan inmunorreacción positiva para CD44v3 en un 100 % de los casos de los carcinomas escamosos. Se han publicado distintos trabajos que hacen referencia a la expresión de CD44v3 en el esófago. La expresión de v3 en el epitelio escamoso normal ya fue demostrada por Fox en 1994 (Fox 1994). Con posterioridad, Roye y col. (1996) han analizado la expresión de esta isoforma y han demostrado que la expresión de v3 es similar a la de la isoforma estándar en las muestras normales, displásicas y neoplásicas del epitelio escamoso esofágico. En nuestro trabajo, no se ha investigado la expresión de CD44 en la displasia del epitelio escamoso por no disponer de un número suficiente de casos. Respecto a la expresión de V3 en el carcinoma escamoso, no hemos obtenido una disminución de la positividad de este exón paralela a la pérdida de diferenciación tumoral tal como la que han observado dichos autores. En este sentido, cabe la posibilidad de que esta falta de concordancia sea debida al menor número de casos incluidos en nuestra serie (13 respecto a los 50 de la serie de Roye).

La intensa expresión de CD44v3 en el carcinoma escamoso parece confirmar la función de este exón en el reclutamiento y presentación del HB-EGF al EGFR de la membrana de los queratinocitos, sobre los cuales actúa como factor de crecimiento

autocrino. De hecho, el carcinoma escamoso de esófago representa el sistema prototipo para demostrar la amplificación y sobreexpresión del gen del EGFR. Las anomalías de este receptor son más frecuentes en este tipo de carcinoma que en cualquier otro (Ullrich 1984). En esta línea de estudio, se ha demostrado que el carcinoma escamoso de esófago expresa diez veces más EGFR que los cánceres gástricos. Asimismo se ha publicado que la sobreexpresión del EGFR se correlaciona con el grado de displasia y con la frecuencia de metástasis ganglionares en el carcinoma de esófago (Yano 1991). En la mucosa esofágica normal se detecta EGFR en las porciones basales de la membrana celular, mientras que las áreas con displasia o carcinoma *in situ* se caracterizan por una mayor inmunoreactividad que la mucosa normal adyacente.

El hallazgo menos esperado en nuestro estudio ha sido la expresión de este exón en el 60 % de los adenocarcinomas de esófago, dado que CD44v3 no se expresa ni en la mucosa gástrica normal ni en las neoplasias glandulares que se originan en ella. Las alteraciones genéticas del adenocarcinoma de esófago han sido menos estudiadas que las del carcinoma escamoso. No obstante, se ha detectado amplificación del EGFR en los tumores de la unión gastroesofágica (Houldsworth 1990, Filipe 1993). Además, en este tipo de tumor también existe correlación entre la expresión del EGFR y el grado de displasia y la frecuencia de metástasis ganglionares (Iihara 1993).

Del comportamiento del CD44v3 en las neoplasias de esófago se puede deducir que la unión a HB-EGF mediada por CD44v3 puede estar involucrada no sólo en el control de la proliferación de los queratinocitos sino también en el de las *stem cells*, en las que se origina el adenocarcinoma sobre el esófago de Barrett. Estas células totipotenciales de la unión gastroesofágica tienen capacidad de diferenciación hacia queratinocitos o células glandulares, dependiendo de las características del medio en que se desarrollan y, concretamente, de la existencia o no de reflujo gastroesofágico.

Resultaría, pues, interesante demostrar qué papel desempeña este exón en las fases preneoplásicas, es decir, en las lesiones displásicas sobre el esófago de Barrett. Para ello sería preciso analizar un mayor número de casos de esta entidad, puesto que en los dos casos de displasia estudiados en nuestro trabajo, no se ha detectado la expresión de este exón

CD44V6

De los diferentes artículos publicados sobre CD44 en el esófago normal y neoplásico, cabría destacar los datos que consignamos a continuación referentes a la expresión del exón v6. En cuanto a la expresión de v6 en las neoplasias de estirpe escamosa, Salmi y col. (1993) constataron, mediante experimentos en muestras de piel, que CD44v6 no interviene en el crecimiento invasivo o en la formación de metástasis en los carcinomas escamosos, y que su expresión parece estar silenciada

en la transformación maligna de estos tumores. Roye y col. (1996), por su parte, han demostrado en los carcinomas escamosos de esófago que la expresión de v6 es paralela a la de las isoformas CD44s y CD44v3. Basándose en estos datos sostienen que la disminución de la expresión de CD44 en general puede estar asociada a un peor pronóstico en estos tumores.

En lo que respecta a los adenocarcinomas, Lagorce y col. (1998), además de CD44s, han analizado la expresión de CD44v6 y han comprobado la asociación entre la expresión de esta isoforma y la profundidad de la invasión tumoral de los adenocarcinomas en la pared del esófago. Sin embargo, el análisis multivariable ha demostrado que la expresión de esta isoforma no tiene un valor pronóstico independiente. En otro artículo publicado en 1998, en el que también se ha investigado la expresión de v6 en el adenocarcinoma sobre esófago de Barrett, Böttger y col. no han confirmado la correlación entre la expresión de v6 y ningún parámetro morfológico de agresividad o la existencia de metástasis ganglionares. En nuestro estudio no hemos hecho mención de la expresión de v6 en las muestras analizadas, ya que no hemos hallado correlación alguna con la progresión neoplásica en el esófago. Así pues, nuestros resultados respecto a esta isoforma concuerdan en parte con el resto de los trabajos publicados.

4.2. PÁNCREAS

En las últimas décadas se han producido avances en cuanto a la identificación de marcadores asociados al desarrollo de distintas neoplasias. Ello ha contribuido, en parte, al diagnóstico precoz de algunos tumores sólidos. En este sentido, el antígeno carcinoembrionario (CEA) fue el primer antígeno utilizado clínicamente para la detección del cáncer colorrectal, seguido de la alfa-feto proteína (AFP) para el hepatocarcinoma, del CA125 para el carcinoma de ovario, y, por último, del antígeno prostático específico (PSA) para el carcinoma de próstata.

En lo que afecta al diagnóstico y tratamiento del carcinoma pancreático, los progresos, tanto en el tratamiento como en el diagnóstico, han sido escasos. En el adenocarcinoma de páncreas, las diferencias entre la incidencia y la mortalidad son mínimas. A pesar de los avances en las técnicas de imagen, los carcinomas de páncreas raramente se diagnostican en fases iniciales. Asimismo aún no son bien conocidas la epidemiología y la etiopatogenia de estos tumores. Así pues, ante esta situación, se plantea la necesidad de desarrollar métodos que permitan identificar poblaciones de alto riesgo, así como de definir estrategias mediante las cuales sea posible diagnosticar el carcinoma en fases iniciales.

En este sentido, las mutaciones puntuales del k-ras parecen desempeñar un papel importante en la génesis del adenocarcinoma de páncreas, ya que un 80% de los

casos presenta este tipo de mutaciones en el codón 12 del oncogén (Hruban 1993). En cuanto al gen supresor de tumores p53, se ha demostrado su sobreexpresión en neoplasias invasivas y metastásicas, así como en estadios neoplásicos iniciales, como son el carcinoma *in situ* e incluso las lesiones hiperplásicas del epitelio ductal pancreático (Boschman 1994).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en nuestro segundo trabajo nos hemos centrado en investigar la posible implicación de CD44s y CD44v6 en la carcinogénesis pancreática mediante el análisis inmunohistoquímico del tejido pancreático normal, pancreatitis crónica y adenocarcinomas de páncreas metastásicos y no metastásicos. Asimismo hemos incluido muestras ganglionares y viscerales de metástasis de adenocarcinoma de páncreas.

CD44s

En el estudio llevado a cabo hemos confirmado expresión de CD44s en el epitelio ductal y en las células acinares de las glándulas pancreáticas. A diferencia de estas últimas, las células endocrinas de los islotes pancreáticos han resultado negativas para este anticuerpo. Nuestros resultados concuerdan con los de trabajos aparecidos en la literatura anteriores al nuestro. Así, Chaudhry y col. (1994) estudiaron 22 carcinomas endocrinos de páncreas, además de tejido pancreático normal. Los métodos utilizados en este estudio fueron inmunohistoquímica y análisis del RNAm

mediante PCR seguida de electroforesis e hibridación. Los resultados obtenidos por Chaudhry y col. (1994) en las muestras de páncreas normal son similares a los nuestros, ya que en ambos trabajos se detecta una intensa reacción para CD44s en las células acinares y ductales, mientras que las células de los islotes pancreáticos resultan claramente negativas.

Asimismo, los hallazgos obtenidos en las muestras neoplásicas parecen confirmar el hecho de que CD44, contrariamente a lo que ocurre en los tumores originados en las células epiteliales de los ductos pancreáticos, no interviene en el desarrollo de los tumores originados en las células de los islotes, dado que, entre los tumores endocrinos estudiados, únicamente los gastrinomas manifestaron positividad para CD44s. Los citados autores, a la hora de interpretar estos hallazgos, sugieren que los gastrinomas posiblemente se originen en células totipotenciales del epitelio ductal que expresan altos niveles de CD44, mientras que el resto de los tumores endocrinos pancreáticos se desarrollaría a partir de la transformación de las células de los islotes pancreáticos, que son negativas para CD44.

Por otro lado, Gansauge y col. (1995) también observaron positividad inmunohistoquímica para CD44s en las células ductales y con menor intensidad en las acinares. Rall y col. (1995), por su parte, utilizaron RT-PCR y *Southern blot* para el análisis de las distintas isoformas de CD44, y en las muestras de tejido normal

observaron amplificación del producto de 83 pares de bases correspondiente a la isoforma estándar.

En lo que hace referencia a la expresión de CD44s, en las muestras de pancreatitis crónica estudiadas, también hemos detectado positividad en los ductos atrapados en la fibrosis.

Asimismo, las muestras neoplásicas de nuestro estudio, el 70% de los adenocarcinomas han mostrado inmunotinción positiva para CD44s, sin que se hayan detectado diferencias referidas a la frecuencia de positividad entre los tumores metastásicos y los no metastásicos. Estos resultados concuerdan en parte con los aparecidos en la literatura al respecto. Rall y col. (1995), en su estudio basado en técnicas de RT-PCR, no encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia de expresión de v6 en las muestras de páncreas normal y en las tumorales.

Sin embargo, Takada y col. (1994), en uno de los primeros artículos sobre CD44 en adenocarcinoma de páncreas en humanos, demostraron, mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica, que los niveles de expresión de CD44s en cuatro líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas eran 100 veces superiores a los de las células pancreáticas normales. Estos autores propondrían la posibilidad de utilizar la determinación cuantitativa de CD44s para el diagnóstico del adenocarcinoma de páncreas.

En un trabajo posterior, los mismos autores (Takada 1994) examinaron la relación entre CD44 y la proliferación y la invasión celular utilizando una membrana basal de Matrigel, que está constituida por colágeno tipo IV, laminina, proteoglicanos y factores de crecimiento, entre otros componentes. La proliferación de las células de adenocarcinoma pancreático no se vio alterada por la función de un anticuerpo contra CD44. En cambio, la invasión celular sí que se logró suprimir mediante la aplicación de este anticuerpo. Estos resultados sugieren que CD44 desempeña un importante papel en la invasión y transgresión de la membrana basal.

CD44v6

En nuestra investigación, respecto a la expresión de CD44v6, no hemos observado positividad ni en el tejido pancreático normal ni en la pancreatitis crónica. En cambio, los adenocarcinomas metastásicos y no metastásicos, así como las muestras correspondientes a las metástasis ganglionares y viscerales han demostrado reactividad para v6, en más de la mitad de los casos. Estos hallazgos están parcialmente en concordancia con los distintos estudios aparecidos en la literatura.

En cuanto al papel de las isoformas variantes del CD44 en la transformación neoplásica de las células ductales del páncreas, es interesante comentar los hallazgos de Gansauge y col. (1995), que en un estudio de 40 muestras correspondientes a pancreatitis crónicas demostraron que el 12 % de las mismas presentaba un patrón de

splicing de CD44 alterado. Asimismo, en dos pacientes que habían desarrollado un adenocarcinoma sobre la pancreatitis crónica, el patrón de *splicing* era muy similar en las muestras de pancreatitis y en las neoplásicas. Estos resultados sugieren que las isoformas variantes de CD44 posiblemente se expresan en una fase inicial del desarrollo neoplásico, que podría corresponder a las alteraciones displásicas de la pancreatitis crónica.

En nuestro caso, como ya hemos comentado anteriormente, no se ha detectado inmunotinción para isoformas variantes (CD44v6) en las cuatro muestras de pancreatitis crónica analizadas. Es posible que ello se deba a la menor sensibilidad del método utilizado, por un lado, y al escaso número de casos examinado, por otro.

Otro estudio que se debería tener en cuenta es el de Satoh y col. (1997). En su trabajo analizaron la expresión inmunohistoquímica de CD44s, CD44v5 y CD44v6 en adenocarcinomas invasivos e intraductales de páncreas, y demostraron que la isoforma estándar se expresaba en la totalidad de los tumores. Las isoformas v5, y sobre todo v6, se expresaban en un alto porcentaje de los tumores invasivos, mientras que en los intraductales su reactividad era menor. Estos resultados apoyan la hipótesis de que v6 puede estar implicado en el desarrollo de la invasividad de las células tumorales pancreáticas.

Gansauge y col. (1995), en un estudio anterior al de Satoh y col. (1997), en el que compararon tejido normal y muestras correspondientes a adenocarcinoma, demostraron inmunoreactividad para v6, tanto en el páncreas neoplásico como en el no neoplásico. En el mismo estudio estos autores analizaron, mediante técnicas de RT-PCR y *Western blot*, las posibles diferencias en cuanto a la composición de las isoformas que contenían el exón v6. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que mientras que en el tejido normal las isoformas expresadas contenían únicamente el exón v6, en los carcinomas, las isoformas expresadas contenían además otros exones variables (v4-v10) en combinación con v6, dando lugar a un patrón de *splicing* mucho más complejo.

A partir de estos datos es posible deducir que el cambio en las funciones de CD44 no se debe únicamente a la presencia de v6 en las isoformas expresadas, sino que la incorporación de distintos exones variables en combinación a nivel del *splicing* alternativo del RNA mensajero puede resultar determinante. La expresión de estas isoformas parece conferir a las células carcinomatosas una ventaja selectiva que podría estar relacionada con una menor afinidad al hialuronato provocada por los cambios conformacionales producidos en la molécula por la incorporación de distintos exones variables (Stamenkovic 1991). La disminución de la unión al hialuronato permitiría a las células desprenderse de la membrana basal y de las células vecinas. Con todo, es necesario investigar más en este sentido, para poder determinar si el exón v6 por sí mismo, o bien en combinación con otros exones

variables, es el responsable final de la adquisición de propiedades invasivas por parte de las células del adenocarcinoma de páncreas.

En concordancia con estudios previos (Rall 1995, Gansauge 1995), nuestros resultados no han puesto de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en cuanto a expresión de CD44v6 entre los adenocarcinomas que presentaban metástasis en el momento diagnóstico y los que no las presentaban.

La explicación de este hecho posiblemente resida en que los adenocarcinomas de páncreas metastatizan en un estadio muy inicial de la progresión tumoral y que las metástasis ganglionares, no siempre se detectan (Cubilla 1987). Ello se debe a que, mediante la técnica de Whipple utilizada habitualmente, no se resecan todos los ganglios linfáticos que pueden albergar estas metástasis. De esta manera, es posible que algunos adenocarcinomas considerados no metastásicos en el momento del diagnóstico, en realidad presenten metástasis no detectadas.

4.3. ESTÓMAGO

El comportamiento biológico de los tumores gástricos depende principalmente de dos factores. El primero de ellos es el tipo histológico y el segundo, el nivel de invasión en el momento del diagnóstico.

Como ya hemos comentado en la introducción, según la clasificación de Lauren, el cáncer gástrico se divide en dos tipos histológicos (intestinal y el difuso). En Estados Unidos y en los países occidentales Europeos se ha producido un descenso en la incidencia de los tumores de tipo intestinal que coincide con el descenso general de los tumores gástricos, mientras que su incidencia sigue siendo alta en los países menos desarrollados (Neugut 1996). Estos cambios quizá sean debidos a factores ambientales. El adenocarcinoma de tipo intestinal se asocia a un alto contenido en la dieta de comidas en salmuera. Así pues, parece ser que tales hábitos alimentarios favorecen la aparición de gastritis y atrofia gástrica, provocando un medio adecuado para la formación de compuestos nitrosos carcinogénicos en la que participan las bacterias. La generalización del uso de la refrigeración de los alimentos y el consumo de productos frescos y de frutas y verduras ha contribuido posiblemente al descenso observado en los países occidentales en cuanto a la incidencia de cáncer gástrico.

Pero además de este descenso en la incidencia, se ha producido otro cambio importante en el cáncer gástrico. Este cambio radica en un aumento absoluto en la incidencia del adenocarcinoma de tipo difuso, que actualmente representa un 30 % del total en algunas series.

Estos tumores afectan a personas jóvenes, principalmente mujeres (Grabiec 1985). Además, suelen ser pobremente diferenciados, carecen de relación con procesos preneoplásicos definidos y con frecuencia presentan alteraciones macroscópicas mínimas, por lo que son muy difíciles de detectar clínicamente en estadios iniciales. El adenocarcinoma de tipo difuso se suele originar en el cuerpo gástrico en ausencia de atrofia y de metaplasia intestinal y tiene un patrón de diseminación distinto del adenocarcinoma de tipo intestinal, ya que afecta predominantemente a la cavidad peritoneal y no suele formar masas hepáticas discretas. El hecho de que este tipo de tumores no esté asociado a estados preneoplásicos histológicamente identificables, como la gastritis crónica o la metaplasia intestinal, tal como ocurre en el adenocarcinoma de tipo intestinal, podría ser debido a una alta exposición a algún tipo de carcinógeno o a algún defecto congénito en un gen supresor de tumores que haga susceptible la mucosa gástrica a dosis mucho menores de carcinógeno.

Además del tipo histológico, otro factor pronóstico importante en las neoplasias gástricas es el nivel de profundidad en el momento del diagnóstico. En este sentido, resulta esencial el establecimiento del concepto de *early gastric carcinoma* o carcinoma superficial, que fue definido por los japoneses hace aproximadamente

trenta años como un cáncer confinado a la mucosa y a la submucosa, independientemente de la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos perigástricos. Su proporción respecto al total de carcinomas gástricos varía según los distintos países. En Japón supone de un 35 a un 50 % del total, en los Estados Unidos de un 8 a un 25% y en Europa de un 10% a un 20 % (Antonioli 1990, Ming 1992, Graanen 1991)

En el estadio tumoral del carcinoma superficial, la profundidad de la invasión es el factor de mayor importancia pronóstica. Los tumores intramucosos raramente (menos del 5 % en algunas series) presentan metástasis en los ganglios linfáticos, lo que se explica por la pobreza en vasos linfáticos de la mucosa. Este grupo tiene una supervivencia a los 5 años cercana al 100 % (Donald 1995). Sin embargo, la invasión de la submucosa se asocia con un 10-20 % de metástasis ganglionares, disminuyendo la supervivencia a los 5 años en un 90-95 % (Graanen 1991, Kodama 1983).

Teniendo en cuenta, por una parte, los dos principales tipos histológicos de carcinoma gástrico y la distinta relación de ambos con la metaplasia intestinal, y por otra, la importancia pronóstica del nivel de invasión tumoral, en nuestro tercer trabajo nos hemos propuesto analizar, mediante métodos inmunohistoquímicos, las posibles diferencias en la expresión de CD44s, CD44v5 y CD44v6 en muestras de mucosa gástrica normal y metaplásica, y en adenocarcinomas de tipo intestinal y difuso en estadio inicial (carcinoma superficial) y avanzado (invasivo). También

hemos considerado interesante estudiar la expresión de estas isoformas en las muestras correspondientes a las metástasis ganglionares y viscerales de estos tumores.

La elección de los exones variables v5 y v6, además de la isoforma estándar, se basó en resultados de trabajos previos aparecidos en la literatura. En este sentido, Heider y col. (1993) demostraron un patrón de expresión de isoformas distinto para los dos tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico. Así, mientras que el adenocarcinoma de tipo intestinal expresaba isoformas que contienen los exones v5 y v6, los adenocarcinomas de tipo difuso únicamente expresaron el exón variable v5.

Discutiremos nuestros resultados a partir de la comparación con los de trabajos publicados en la literatura considerando separadamente la isoforma estándar y las dos isoformas variables.

CD44s

En la mucosa gástrica normal hemos obtenido positividad para CD44s en las zonas regenerativas de las glándulas antrales y fúndicas, concretamente en las células mucinosas ístmicas, con un patrón similar al observado por otros autores en la base de las criptas en el colon (Wielenga 1993). También hemos detectado positividad focal en las áreas de metaplasia intestinal.

Heider y col. (1993) no utilizaron un anticuerpo monoclonal para detectar la expresión de la isoforma estándar, sino que obtuvieron un suero policlonal contra CD44v3-v10 que utilizaron para detectar la expresión de CD44 en general en las muestras objeto de estudio. Con este anticuerpo policlonal observaron positividad para CD44 en las áreas de proliferación foveolar de las glándulas antrales y fúndicas, así como en las áreas de metaplasia intestinal. De manera que, en lo referente a la expresión de CD44 en la mucosa gástrica normal y metaplásica, nuestros resultados son similares a los trabajos publicados previamente.

En cuanto a las muestras neoplásicas en nuestro trabajo, CD44s ha resultado positivo en un mayor porcentaje de casos de carcinoma en fase avanzada que de carcinomas en fase inicial, aunque las diferencias entre ambos grupos no han sido estadísticamente significativas. En este aspecto, Mayer y col. (1993), mediante técnicas de inmunohistoquímica aplicadas a 120 neoplasias de estómago, demostraron que en los tumores gástricos, la expresión elevada de CD44s se asocia a la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico, así como a un aumento en la tasa de recidivas y de mortalidad en los pacientes con tumores resecables quirúrgicamente. Heider (1993), por su parte, detectó con el anticuerpo policlonal expresión de CD44 en general en todos los adenocarcinomas estudiados, con una tinción heterogénea en cuanto a intensidad y proporción de células positivas.

En este punto cabría comentar las dificultades que se plantean al comparar los resultados de los estudios llevados a cabo mediante diferentes técnicas. Para la detección de la isoforma estándar, los métodos inmunohistoquímicos se basan en la detección de la fracción constante de la molécula, con lo cual no es posible discernir si la inmunorreacción está detectando isoformas que sólo expresan esta fracción (CD44s) o bien isoformas variables que, como ya hemos comentado, contienen la fracción constante de la molécula además de los correspondientes exones variables.

CD44v5 y CD44v6

En nuestro estudio, la inmunorreactividad para v5 y v6 se observa en las mismas áreas de mucosa normal y metaplásica que la isoforma estándar, pero de forma más focal. En este punto nuestros resultados difieren de los de Heider y col. (1993). Estos autores obtuvieron una reacción positiva para la secuencia exónica de v5 en el epitelio superficial de la mucosa, en la zona proliferativa foveolar y en las áreas de metaplasia intestinal. El exón v6, en cambio, sólo fue detectado en las zonas de metaplasia, mientras que la mucosa gástrica normal no reaccionó con el anticuerpo contra este exón.

Heider y col. (1993), a partir de los resultados expuestos, sugirieron que los dos tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico mantenían el patrón de expresión de las células en que se originaban. Así, los adenocarcinomas de tipo difuso expresarían

los exones variables v5 y v6 de forma similar a las células proliferativas de la mucosa normal, concretamente de las células mucinosas del cuello o zona intermedia de las glándulas, donde posiblemente se originan estos tumores (Nakamura 1993). En cambio, los adenocarcinomas de tipo intestinal sólo expresarían el exón v6 de forma análoga a lo que ocurre con la metaplasia intestinal, considerada como un estadio preneoplásico de este tipo de adenocarcinoma. En nuestro trabajo no se han confirmado estos resultados, ya que v6 se expresaba, aunque de sólo de forma focal, en la mucosa gástrica normal, con un patrón similar a v5 y a CD44s.

Asimismo hemos observado expresión de CD44v5 en adenocarcinomas tanto de tipo difuso como de tipo intestinal, con frecuencias similares, sin que hayamos obtenido correlación entre la expresión de este exón y la profundidad de la invasión tumoral o la presencia de metástasis. En lo que hace referencia a CD44v6, en nuestro trabajo, el porcentaje de casos de carcinomas invasivos positivos para este exón es mayor que el de carcinomas superficiales en ambos tipos histológicos, pero las diferencias observadas no son estadísticamente significativas. Las diferencias entre los tumores metastatizantes y no metastatizantes en la expresión de este exón son mínimas, tanto para el adenocarcinoma de tipo difuso como para el intestinal. Por el contrario, sí que hemos hallado diferencias estadísticamente significativas en el análisis de las muestras correspondientes a las metástasis ganglionares. Así, mientras que los ganglios metastatizados por adenocarcinoma de tipo intestinal presentan

inmunopositividad para v6 en el 66 % de los casos, en los de tipo difuso sólo se observa en el 11% de las muestras.

Estos datos concuerdan con los estudios previos realizados por Heider y col. (1993), que demostraron, mediante análisis de RNA, que cada par de muestras de una misma neoplasia en los adenocarcinomas de tipo intestinal (tumor primario y metástasis ganglionar) presentaba un patrón de expresión del exón v6 muy similar. Esta concordancia, en cambio, no se detectó en los tumores de tipo difuso.

Más recientemente Dammrich y col. (1995) postularon que la intervención de v6 en el proceso de diseminación metastásico es diferente en ambos tipos de tumores, ya que en las metástasis de los adenocarcinomas de tipo difuso no hallaron expresión de este exón. En este trabajo los autores también demostraron que el nivel de expresión de v6 aumenta progresivamente con la profundidad de la invasión y con la afectación ganglionar en los adenocarcinomas de tipo intestinal, a diferencia de lo que ocurre en el adenocarcinoma de tipo difuso.

Otras publicaciones referentes a CD44v6 en el adenocarcinoma gástrico también basan sus análisis en el estudio de RNAm mediante PCR y *Southern blotting* de los productos obtenidos de la amplificación. En uno de ellos, Yamamichi y col. (1998) analizaron el nivel de expresión de CD44s y CD44v6 en tejido tumoral y mucosa normal adyacente. Posteriormente determinaron la proporción entre los niveles de

expresión en el tejido sano y el tejido tumoral, y, finalmente correlacionaron estos ratios con parámetros clinicopatológicos y con el pronóstico. Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que el nivel de RNAm de CD44v6 respecto a CD44s, es significativamente mayor en pacientes con metástasis ganglionares y hepáticas y que el índice de supervivencia es mayor en pacientes con niveles bajos de CD44v6. Los autores de este trabajo sugirieron que el nivel de expresión de RNAm de CD44v6 podría utilizarse como indicador pronóstico y como predictor de metástasis en los adenocarcinomas gástricos.

Otros estudios obtuvieron resultados discordantes en cuanto a la expresión de v6. Concretamente, Hong y col. (1995) no encontraron correlación entre la expresión inmunohistoquímica de v6 y ninguno de los factores pronósticos clínicos o histopatológicos en los adenocarcinomas de tipo intestinal. En cambio, en los de tipo difuso demostraron que la expresión de v6 estaba asociada a la profundidad de la invasión, a la afectación ganglionar y a la incidencia de metástasis a distancia. Sin embargo, no hallaron correlación entre la expresión de este exón y la supervivencia en ninguno de los dos tipos histológicos de carcinoma.

Más tarde, Muller y col. (1997) estudiaron, mediante inmunohistoquímica, la expresión de v5 y v6 en 418 carcinomas gástricos. En manos de estos autores, el exón v5 se expresaba con menos frecuencia en los adenocarcinomas de tipo difuso que en los de tipo intestinal. Además, según su análisis estadístico, la expresión de

CD44v5 se correlacionó con un estadio tumoral más avanzado y con la permeación de vasos linfáticos, pero no con la afectación ganglionar. Por el contrario, estos autores no detectaron correlación entre la expresión de v6 y ninguno de estos parámetros histomorfológicos.

Por lo que respecta al nivel de invasión, en nuestro estudio no hemos observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD44s, CD44v5 y CD44v6 entre los adenocarcinomas superficiales e invasivos en ninguno de los dos subtipos histológicos. Estos resultados sugieren que el papel de CD44 en la cascada metastásica tiene lugar como un evento muy inicial en la progresión tumoral, ya que la expresión de las isoformas variantes se detecta ya en las fases de carcinoma inicial, tanto en el adenocarcinoma de tipo intestinal como en el difuso.

Otros grupos, Saito y col. (1998) analizaron el nivel de CD44v6 en suero mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) y observaron que los pacientes con adenocarcinoma de tipo difuso que presentaban niveles elevados tenían tumores que invadían en profundidad la pared gástrica y una mayor frecuencia de metástasis ganglionares. Los autores sugirieron, a partir de los resultados obtenidos, que un nivel elevado de CD44 en el suero podría ser útil como indicador pronóstico en pacientes con adenocarcinoma de tipo difuso.

Del análisis conjunto de los resultados aparecidos en la literatura sobre la expresión de v5 y v6 en los adenocarcinomas gástricos se puede deducir que la utilización de distintos métodos de análisis (PCR *versus* inmunohistoquímica), así como la aplicación de diferentes anticuerpos y métodos de cuantificación de la inmunopositividad, son elementos que pueden influir en las discrepancias entre los grupos investigadores.

Parece evidente que estas dos isoformas de CD44, CD44v5 y CD44v6, están implicadas en el desarrollo de las neoplasias del estómago. Sin embargo, a tenor de la discordancia en los distintos análisis estadísticos, ninguna de ellas puede utilizarse de momento como un marcador pronóstico ni como un indicador de la agresividad o de la capacidad metastásica en ninguno de los dos subtipos histológicos de carcinoma gástrico.

5. CONCLUSIONES

5.1. ESÓFAGO

1. CD44s se expresa en las zonas proliferativas (tercio basal) del epitelio esofágico normal y en la base de las criptas de los subtipos de metaplasia antral e intestinal del esófago de Barrett. En los casos de esófago de Barrett con displasia, la distribución de CD44s se hace más difusa y alcanza la zona más superficial de las glándulas.

2. El 100% de los carcinomas escamosos y el 75% de los adenocarcinomas presentan inmunorreactividad positiva para CD44s. No existe correlación entre la expresión de esta isoforma y el grado de diferenciación o el estadio tumoral.

3. CD44v3 se expresa en el tercio basal del epitelio escamoso. La mucosa del esófago de Barrett, así como la del estómago e intestino delgado, son negativas para este exón.

4. La totalidad de los carcinomas escamosos de esófago y el 60% de los adenocarcinomas esofágicos presentan inmunopositividad para CD44v3. No hay asociación entre la expresión de CD44v3 y el grado de diferenciación o el estadio tumoral.

5. La expresión de C44v3 en los carcinomas escamosos y adenocarcinomas de esófago parece confirmar la implicación de este exón en el proceso neoplásico, mediante el reclutamiento y presentación de factores de crecimiento a las células diana y la consiguiente activación de la proliferación celular.

5.2. PÁNCREAS

1. CD44s se expresa en el epitelio ductal y en las células acinares de las glándulas pancreáticas. Las células endocrinas de los islotes son negativas para CD44s.
2. En la pancreatitis crónica CD44s es positivo en los ductos atrapados por la fibrosis.
3. El 70% de los adenocarcinomas ponen de manifiesto inmunorreactividad para CD44s. No se evidencian diferencias en la frecuencia de positividad entre los tumores metastásicos y no metastásicos.
4. CD44v6 no se detecta en el tejido pancreático normal ni en la pancreatitis crónica.
5. Las muestras neoplásicas, tanto las procedentes de los tumores primarios como las procedentes de las metástasis, presentan una inmunorreactividad positiva para CD44v6 en más de la mitad de los casos. No obstante, no hay diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de expresión de CD44v6 en los tumores metastásicos y los no metastásicos.

5.3. ESTÓMAGO

1. CD44s, CD44v5 y CD44v6 se expresan en las zonas regenerativas de la mucosa gástrica normal y de forma focal en las áreas de metaplasia intestinal.
2. No hay correlación entre la expresión de CD44s, CD44v5 o CD44v6 y parámetros de agresividad tumoral como son el nivel de invasividad, la presencia de metástasis o el grado de diferenciación tumoral.
3. El porcentaje de casos inmunopositivos para CD44s y CD44v6 es mayor en el grupo de carcinomas invasivos que en el de superficiales para ambos tipos histológicos. Sin embargo las diferencias no son estadísticamente significativas.
4. Las muestras de ganglios metastatizados por adenocarcinoma de tipo intestinal presentan inmunorreactividad para v6 con mayor frecuencia que los metastatizados por adenocarcinoma de tipo difuso, siendo las diferencias entre ambos estadísticamente significativas. Estos hallazgos sugieren una vía patogénica distinta para la formación de metástasis en los dos tipos histológicos de adenocarcinoma gástrico.

5. Parece evidente que CD44v5 y CD44v6 están implicados en el desarrollo del adenocarcinoma de estómago y que inciden en el proceso neoplásico en una fase inicial, ya que se detectan en el carcinoma superficial, tanto de tipo intestinal como difuso.

6. A tenor de la discordancia en los resultados de distintos investigadores, la utilización del nivel de expresión de CD44 como marcador diagnóstico o pronóstico o como indicador de la agresividad tumoral requeriría una estandarización de las técnicas de detección.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi Y, Mori M, Enjoji M y cols. Microvascular architecture of early gastric carcinoma. Microvascular-histopathologic correlates. *Cancer* 1993; 72:32-36.
- Antonioli DA. Gastric carcinoma and its precursors, in Goldman H, Appleman HD, Kaufman N (eds): *Gastrointestinal Pathology (USCAP Monographs in Pathology, n° 31)* Baltimore, MD, Williams & Williams, 1990:144-80.
- Banner BF, Memoli VA, Warren WH, Gould VE. Carcinoma with multidirectional differentiation arising in Barrett's esophagus. *Ultrastruct Pathol* 1983; 4:205-17.
- Baylor SM, Berg JW. Cross-classification and survival characteristics of 5000 cases of cancer of the pancreas. *J Surg Oncol.* 1973; 5:335-38.
- Bearzi I, Ranaldi R. Multifocal early gastric cancer. Morphology and histogenesis. *Pathol Res Pract* 1986; 181:144-47.
- Behrens J, Mareel MM, VanRoy FM y cols. Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 1989; 108:2435-47
- Bennett KL, Jackson DG, Simon JC y cols. CD44 isoforms containing v3 are responsible for the presentation of heparin binding growth factor. *J Cell Biol* 1995; 128:673-85.
- Berenson MM, Riddell RH, Skinner DB y cols. Malignant transformation of esophageal columnar epithelium. *Cancer* 1978; 41:554-61.

-
- Blot WJ, Devesa SS, Kneller RW y cols. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. JAMA 1991; 265:1287-89.
 - Blount PL, Ramel S, Raskind WH y cols. 17^o allelic deletions and p53 protein overexpression in Barrett's adenocarcinoma. Cancer Res 1991; 51:5482-86.
 - Boschman CR, Stryker S, Reddy JK y cols. Expression of p53 protein in precursors lesions and adenocarcinoma of the pancreas. Am J Pathol 1994; 145:1291-95.
 - Böttger TC, Youssef V, Dutkowski P y cols. Expression of CD44 variant proteins in adenocarcinoma of Barrett's esophagus and its relation to prognosis. Cancer 1998; 83:1074-80.
 - Burtin P, Chavanel G, Foidat JM y cols. Antigens of basement membrane in the peritumoral stroma in human colon adenocarcinomas: an immunofluorescence study. Int J Cancer 1982; 30:13-18.
 - Correa P, Fox J, Fontham E y cols. Helicobacter pylori and gastric carcinoma. Cancer 1990; 66:2569-74.
 - Correa P. Human gastric carcinogenesis. A multistep and multifactorial process. First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. Cancer Res 1992; 52:6735-40.
 - Costa J: Benign epithelial inclusions in pancreatic nerves. Am J Clin Pathol 1977; 67:306-07.

- Cubilla AL, Fortner J, Fitzgerald PJ. Lymph node involvement in carcinoma of the head of pancreas area. *Cancer* 1978; 41:880-87.
- Cuzick J, Babiker AG. Pancreatic cancer, alcohol, diabetes mellitus and gallbladder disease. *Int J Cancer* 1989; 43:415-21.
- Chang F, Syrjanen K. Infectious agents in the etiology of esophageal cancer. *Gastroenterology* 1992; 103:1336-1348.
- Chaudhry A, Gobl A, Eriksson B y cols. Different splice variants of CD44 are expressed in gastrinomas but not in other subtypes of endocrine pancreatic tumors. *Cancer Res* 1994; 54:981-86.
- Dammrich J, Vollmers HP, Heider KH y cols. Importance of different CD44v6 expression in human gastric intestinal and diffuse type cancers for metastatic lymphogenic spreading. *J Mol Med* 1995; 73:395-401.
- Donald A, Antonioli MD. Precursors of gastric carcinoma. A critical review with a brief description of early (curable) gastric cancer. *Hum Pathol* 1994; 25:994-1005.
- Duarte I, Llanos O. Patterns of metastases in intestinal and diffuse types of carcinoma of the stomach. *Hum Pathol* 1987; 12:237-42.
- Esaki Y, Hirayama R, Hirokawa K. A comparison of patterns of metastasis in gastric cancer by histological type and age. *Cancer* 1990; 65:2086-90.
- Filipe MI, Jankowski J. Growth factors and oncogenes in Barrett's esophagus and gastric metaplasia. *Endoscopy* 1993; 25:637-41.

-
- Fox SB, Fawcett J, Jackson DG y cols. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res* 1994; 54:4539-56
 - Freemont AJ. Adhesion molecules. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51:175-84.
 - Frixen UH, Behrens J, Sachs M, y cols. E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 1991;113:173-85
 - Gansauge F, Gansauge S, Schlosser W y cols. The splice-pattern of CD44 is altered in chronic pancreatitis exhibiting dysplastic changes. *Eur J Med Res.* 1998; 3:519-26.
 - Gansauge F, Gansauge S, Zobywalski A y cols. Differential expression of CD44 splice variants in human pancreatic adenocarcinoma and in normal pancreas. *Cancer Res* 1995; 55:5499-503.
 - Goffman TE, McKeen EA, Curtis RE y cols. Esophageal carcinoma following irradiation for breast cancer. *Cancer* 1983; 52:1808-09.
 - Gold Eb, Gordis L, Diener MD y cols. Diet and other risk factors for cancer of the pancreas. *Cancer* 1985; 55:460-67.
 - Golden R, Stout AP. Superficial spreading carcinoma of the stomach. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1948; 59:157-67.
 - Graanen ME, Dekker W, Ferwerda J y cols. Early gastric cancer. A clinicopathologic study. *J Clin Gastroenterol* 1991; 13:274-83.

-
- Grabiec J, Owen DA. Carcinoma of the stomach in young persons. *Cancer* 1985; 56:388-96.
 - Günthert U, Hofmann M, Wolfgan R y cols. A new variant of glycoprotein confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65:13-24.
 - Haggitt RC. Barrett esophagus, dysplasia, and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25:982-993.
 - Hall CN, Darkin D, Brimbleclombe R y cols. Evaluation of the nitrosamine hypothesis of gastric carcinogenesis in precancerous conditions. *Gut* 1986; 27:491-98.
 - Hashimoto K, Higashiyama S, Asada H y cols. Heparin binding epidermal growth factor-like is an autocrine growth factor for human keratinocytes. *J Biol Chem* 1994; 269:20060-6
 - Hattori T. Development of adenocarcinoma in the stomach. *Cancer* 1986; 57:1528-34.
 - Heider K, Hoffmann M, Hors E y cols. A human homologue of a rat metastasis associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993;120:623-27.
 - Heider KH, Dämmrich J, Skroh P y cols. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal and diffuse type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res* 1993; 53:4197-203.
 - Herrlich P, Zöller M, Pals ST y cols. CD44 splice variants: metastases meet lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 54:271-335.

- Haiti RA, Klatsky AL, Armstrong MA. Pancreatic cancer, blot glucose and beverage consumption. *Int J Cancer* 1988; 41:794-97.
- Hong RL, Lee WJ, Sung CT y cols. Expression of CD44 and its clinical implication in diffuse type and intestinal-type gastric adenocarcinomas. *Oncology* 1995; 52:334-39.
- Houldsworth J, Cordon-Cardo C, Ladanyi M y cols. Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1990; 50:6417-22.
- Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ y cols. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143:545-54
- Hynes RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-50.
- Ichikura T, Tomimatsu S, Okusa Y. Comparison of the prognostic significance between the number of metastatic lymph nodes and nodal stage based in their location in patients with gastric cancers. *J Clin Oncol* 1993; 11:1894-1900.
- Iihara K, Shiozaki H, Tahara H y cols. Prognostic significance of transforming growth factor alpha in human esophageal carcinoma: Implication for the autocrine proliferation. *Cancer* 1993; 71:2902-09.
- Inokuchi K, Kodama Y, Sasaki O. Differentiation of growth patterns of early gastric carcinoma determined by cytophotometric DNA analysis. *Cancer* 1983; 1138-41.

- Jackson DG, Buckley J, Bell JL. Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at single site in the extracellular domain. *J Biol Chem* 1992; 267:4732-39.
- Johanson B, Bardi G, Heim S y cols. Nonrandom chromosomal rearrangements in pancreatic carcinomas. *Cancer* 1992; 69:1674-81.
- Klimstra DS. Pathological prognostic factors in esophageal carcinoma. *Semin Oncol* 1994; 21:425-30
- Kllöppel G, Lingenthal G, von Bülow M y cols. Histological and fine structural features of pancreatic duodenal adenocarcinoma in relation to growth and prognosis. Studies in xenografted tumours and clinico-pathological correlation in a series of 75 cases. *Histopathology* 1985; 9:841-856.
- Knudson W, Knudson CB. Assembly of a chondrocyte-like pericellular matrix on non chondrogenic cells. Role of the cell surface hyaluronan receptor in the assembly of a pericellular matrix. *J Cell Sci* 1991; 6:227-35.
- Kodama Y, Ynokuchi K, Soejima K y cols. Growth patterns and prognosis in early gastric carcinoma: superficially spreading and penetrating growth types. *Cancer* 1983; 51:320-26.
- König H, Moll J, Ponta H y cols. Trans-acting factors regulate the expression of CD44 splice variants. *EMBO J* 1996; 1:4030-4039.
- Koopman G, Griffioen AW, Ponta H y cols. CD44 splice variants; expression on lymphocytes and in neoplasia. 54th Forum in Immunology. *Cell*.1993;56:750-54.

- Koopman G, Heider K, Horst E y cols. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin lymphomas express the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med* 1993; 177:897-904.
- Kramer RH, González R, Nicolson GL. Metastatic tumor cells adhere preferentially to the extracellular matrix underlying vascular endothelial cells. *Int J Cancer* 1980; 26:639-42.
- Lagorce–Pages C, Paraf F, Dubois S y cols. Expression of CD44 in premalignant and malignant Barrett’s oesophagus. *Histopathology* 1998;32:7-14.
- Lee RG. Dysplasia in Barrett’s esophagus. A clinicopathologic study of six patients. *Am J Surg Pathol* 1985; 9:845-52.
- Lee Y, Tatter D. Carcinoma of the pancreas and periampullary structures. Pattern of metastasis at autopsy. *Arch Pathol lab Med* 1984;108:584-87.
- Levi F, Ollio JB, LaVecchia C y cols. The consumption of tobacco, alcohol and the risk of adenocarcinoma in Barrett’s esophagus. *Int J Cancer* 1990; 45:852-54.
- Li JY, Ersow AG, Chen ZI. A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. *Int J Cancer* 1989; 5:755-61.
- Liotta LA. Tumor invasion and metastases. Role of the extracellular matrix. Roads Memorial award lecture. *Cancer Res* 1986; 46:1-7.
- Loiter LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab*

Invest 1983; 49:636-49.

- Lowensfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G y cols. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1993; 328:1433-37.
- MacMahon B. Risk factors for cancer of the pancreas. *Cancer* 1982;50:2676-80.
- Maehara Y, Sakaguchi Y, Moriguchi S y cols. Signet ring carcinoma of the stomach. *Cancer* 1992; 69:1645-50.
- Mannell A, Murray W. Oesophageal cancer in South Africa. A review of 1926 cases. *Cancer* 1989;64:2604-08.
- Martin HM, Filipe MI, Morris RW. P53 Expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1992; 50:859-62.
- Martínez-Hernández A, Amenta PS. The basement membranes in pathology. *Lab Invest* 1983; 48:656-80.
- Mayer B, Jauch KW, Günthert U y cols. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 1993; 53:4754-56.
- Mills PK, Beeson WL, Abbey DE y cols. Dietary habits and past medical history as related to fatal pancreas cancer risk among Adventists. *Cancer* 1988; 61:2578-85.
- Ming SC, Goldman H (eds): *Pathology of the Gastrointestinal Tract*. Filadelfia, Saunders, 1992.

- Morita M, Kuwano H, Matsuda H y cols. Prognostic significance of argyrophilic nucleolar organizer regions in esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51:5339-41.
- Morson BC. Intestinal metaplasia of the gastric mucosa . *Br J Cancer* 1955; 9:365-76.
- Moutinho M, Ribeiro M, Sarmiento JA. Prognostic significance of Lauren and Ming Classifications and the pathological parameters in gastric carcinoma. *Cancer* 1981; 47:780-784.
- Mukaida H, Toi M, Yamashita Y y cols. Clinical significance of expression of epidermal growth factor receptor in esophageal cancer. *Cancer* 1991; 68:142-48.
- Mulder J, Kruyt PM, Sewnath M y cols. Colorectal cancer prognosis and expression of v6-containing CD44 proteins. *Lancet* 1994; 334:1470-1472.
- Müller W, Schneiders A, Heider KH y cols. Expression and prognostic value of the CD44 splicing variants v5 and v6 in gastric cancer. *J Pathol* 1997; 183:222-27.
- Murayama Y, Kikuchi M, Enjoji M y cols. Changes in gastric mucosa that antedate gastric carcinoma. *Cancer* 1990; 66:2017-26.
- Nakamura K, Ueyama T, Yao T. Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10000 patients who underwent primary gastrectomy. *Cancer* 1992; 70:1030-37
- Nakamura K. Histogenesis of gastric carcinoma and its clinicopathological significance, in Nishi M et al. (eds): *Gastric Cancer*. Tokio, Springer-Verlag, 1993:112-32.

-
- Neugut A, Hayek M, Howe G. Epidemiology of gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23:281-91.
 - Nix GA, Dubbleman C, Wilson JH y cols. Prognostic implications of tumor diameter in carcinoma of the head of the pancreas. *Cancer* 1991;67:529-35
 - Pera M, Cameron AJ, Victor F y cols. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction. *Gastroenterology* 1993; 104:510-13.
 - Pollard HM, Anderson WAD, Brooks FP y cols. Staging of cancer of the pancreas. *Cancer* 1981; 47:1631-37.
 - Preston MS, Pike MC, Ross RK y cols. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990; 50:7415-21.
 - Rio DC. Splicing of pre-mRNA: mechanism, regulation and role in development. *Cur Opin Genet Dev* 1993; 3:574-584.
 - Rogers EI, Goldkind SF, Iseri OA. Adenocarcinoma of the lower esophagus. A disease primarily of white men with Barrett's esophagus. *Int J Cancer* 1990; 45:852-54.
 - Roye GD, Russell BM, Brown D y cols. CD44 expression in dysplastic epithelium and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 1996; 69:254-58.
 - Rusch VW, Levine DS, Haggit R y cols. The management of high-grade dysplasia and early gastric cancer in Barrett esophagus. A multidisciplinary problem. *Cancer*

1994; 74:1225-29.

- Saito H, Tsujitani S, Katano K y cols. Serum concentration of CD44 variant v6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1998 ;83:1094-101.
- Salmi M, Grön-Virta K, Sointu P y cols. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: down regulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol* 1993; 122:431-42.
- Satoh K, Shimosegawa T, Koizumi M y cols. Expression of CD44 in duct cell carcinomas and in intraductal neoplasm of the pancreas. *Anticancer Res* 1997; 17:215-19.
- Seiter S, Arch R, Reber S y cols. Prevention of tumor metastasis formation by antivariant CD44. *J Exp Med* 1993; 177:433-455.
- Shimaya K, Shiozaaki H, Inoue M y cols. Significance of p53 expression as a prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch (A)* 1993; 422:271-76.
- Siegal GP, Barsky SH, Terranova VP y cols. Stages of neoplastic transformation of human breast tissues as monitored by dissolution of basement membranes components. *Invasion Metastasis* 1981; 1:54-65.
- Sleeman JP, Arning S, Moll JF. Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 1996, 56:3134-41.
- Sneath RJS, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in

neoplasia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1998; 51:191-200.

- Souquet JC, Berger F, Bonvoisin S y cols. Esophageal squamous cell carcinoma associated with gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1989; 63:786-90.
- Spechler SJ, Goyal RK. Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 1986; 315:362-71.
- Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990; 346:425-34.
- Stamenkovic I, Arrufo A, Amiot M. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J* 1991; 10:343-48.
- Takada M, Yamamoto Y, Saitoh Y. The significance of CD44 in human pancreatic cancer I: High expression of CD44 in human pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 1994; 9:748-52.
- Takada M, Yamamoto Y, Saitoh Y. The significance of CD44 in human pancreatic cancer II: The role of CD44 in human pancreatic adenocarcinoma invasion. *Pancreas* 1994; 9:753-57.
- Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990; 59:237-52.
- Taki K, Kuwabara N. Studies of the histogenesis of the gastric carcinoma using minute cancers. *Pathol Res Pract* 1981; 172:176-90.
- Tanaka A, Watanabe T, Okuno K y cols. Perineural invasion is a predictor of

recurrence of gastric cancer. *Cancer* 1994; 73:550-55.

- Terranova VP, Rohrbach DH, Martin GR. Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 1980; 22:719-26.
- Theunissen Ph, Borchard F, Poortvliet DC. Histopathological evaluation of esophageal carcinoma. The significance of venous invasion. *Br J Surg* 1991; 78:930-32.
- Tolg C, Hofmann M, Herrlich P y cols. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acid Res* 1993; 21:1225-29.
- Trochon V, Mabilat C, Bertrand P y cols. Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro. *Int J Cancer* 1996; 66:664-68.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflic JS y cols. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 1984; 309:418-25.
- Underhill CB. The interaction of hyaluronan with the cell surface: the hyaluronan receptor and the core protein. *Ciba Found Simp* 1981; 143:87-99.
- Vracko R. Basal lamina scaffold - anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structures. *Am J Pathol* 1974; 77:313-346
- Watanabe H, Enjoji M, Imai T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 1976; 38:232-43.

- Webb D, Shimizu Y, Seventer van G y cols. LFA-3, CD44, and CD45: physiological triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 1990; 249:1295-97.
- Wielenga VJM, Heider KH, Offferhaus GJA y cols. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res* 1993; 53:4754-56.
- Xuan ZX, Ueyama T, Yao T y cols. Time trends of early gastric carcinoma. A clinicopathologic analysis of 2846 cases. *Cancer* 1993; 72:2889-94.
- Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura Y y cols. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998; 79:256-62.
- Yano H, Shiozaki H, Kobayashi K y cols. Immunohistochemical detection of the epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1991; 67:91-98.
- Yu Q, Toole B. Common pattern of CD44 isoforms is expressed in morphogenetically active epithelia. *Dev Dyn* 1997; 208:1-10.
- Zöller M. CD44: physiological expression of distinct isoforms as evidence for organ-specific metastasis formation. *J Mol Med* 1995; 73:425-38

