

# Alteraciones genéticas en lesiones preneoplásicas y neoplásicas de la vesícula biliar

JONATHAN CASTILLO A.<sup>1</sup>, PATRICIA GARCÍA M.<sup>2</sup>, JUAN CARLOS ROA S.<sup>2</sup>

## Genetic alterations in preneoplastic and neoplastic injuries of the gallbladder

*This article aims to review the most relevant morphological and molecular aspects involved in gallbladder (GB) cancer. In Chile, gallbladder cancer is the main cause of death due to cancer, among women older than 40 years. However, there is almost none information about the morphological changes and the genetic alterations involved in the beginning and development of this neoplasia. Two carcinogenic ways have been described. The sequence adenoma-carcinoma is accepted to be less frequent and important. The most important is the sequence where a metaplasia evolves to displasia that progresses to carcinoma in situ and finally it becomes invasive. This progress requires 10 to 15 years approximately. During this time, a continue progression of injuries have been described. Molecular research studies show genetic anomalies in some genes which are temporary events in preneoplastic injuries of the gallbladder. Some of them even exist before the first morphological changes, while the expression of tumor suppressor genes like p53, adhesion molecules and oncogenes, among others, can be related to late GB carcinogenesis. The K-ras gene seems to play a role in this neoplasia, mainly in those that present an abnormal biliopancreatic union. The microsatelital instability has been found in a small subset of preneoplastic and neoplastic lesions. The existence of methylation in the promotor gene areas has been related to the cellular proliferation, invasion and metastasis and also in cases of chronic cholecystitis, suggesting that this epigenetic phenomenon represents a crucial early event in GB carcinogenesis.*

(Rev Med Chile 2010; 138: 595-604).

**Key words:** Epigenesis, genetics; Gallbladder neoplasms; Molecular biology.

<sup>1</sup>Laboratorio de Patología Molecular y Bioquímica Farmacológica, Instituto de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Patología, Laboratorio de Patología Molecular, Facultad de Medicina, Scientific and Technological Bioresources Nucleus (BIOREN) Universidad de La Frontera. Temuco, Chile.

Trabajo financiado por Fondecyt, Proyecto N° 1090171 y por Proyecto Diufro DI-07-0111.

Recibido el 10 de marzo de 2009, aceptado el 21 de diciembre de 2009.

Correspondencia a:  
Dr. Juan Carlos Roa.  
Departamento de Patología.  
Universidad de la Frontera.  
Manuel Montt 112  
Código postal: 478-1176  
Temuco, Chile  
Tel: 56-45-216273  
56-45-264909.  
E-mail Jcroa@ufro.cl

### Epidemiología

Chile presenta una de las más altas frecuencias de cáncer de vesícula biliar en el mundo, con tasas de mortalidad que superan los 18 x 100.000 habitantes en mujeres mayores de 40 años, con una proporción de 6: 1 respecto a los hombres<sup>1</sup>.

La evolución natural de esta enfermedad muestra un curso invariablemente fatal de no mediar intervención médica. Los cánceres vesiculares incipientes presentan una sobrevida cercana a 90% a cinco años, en cambio aquellos con compromiso seroso alcanzan sólo 11%<sup>2,3</sup>.

### Características anatomoclínicas

El cáncer de la vesícula biliar se puede clasificar según el nivel de infiltración de la pared en *incipientes*, cuando infiltran la mucosa o la túnica muscular, o *avanzados*, cuando infiltran la subserosa o sobrepasan el revestimiento mesotelial de la serosa<sup>4</sup>. Este parámetro, en conjunto con el grado de diferenciación histológica, constituye uno de los factores pronósticos más importantes para el cáncer de la vesícula biliar. La diseminación tumoral, que se produce predominantemente por vía vascular linfática pero también por extensión

local hacia el lecho hepático, constituye un marcador importante del comportamiento biológico de este tumor<sup>5,6</sup>, lo cual explica por qué la resección parcial hepática asociada a disección ganglionar linfática, agregando terapia adyuvante, es el mejor tratamiento hasta ahora conocido para el grupo de los tumores subserosos<sup>7,8</sup>.

Una característica distintiva de esta neoplasia es el alto porcentaje de lesiones inaparentes al examen macroscópico, tanto para el cirujano como para el patólogo. Sin embargo, existen patrones morfológicos altamente sugerentes que permiten predecir la presencia de un tumor, como el hallazgo de un patrón papilar y/o nodular de la mucosa<sup>5</sup>. Desafortunadamente, estas características suelen estar ocultas, ya que en más de 60% de las piezas examinadas se encuentra una reagudización del proceso inflamatorio crónico de base, asociado a la litiasis<sup>5</sup>. Este fenómeno se asocia en forma significativa a tumores avanzados y por lo tanto de peor pronóstico. El estudio sistemático y metódico de la pieza de colecistectomía fijada y estirada mediante el examen de tres cortes que representen a lo menos 80% de la longitud de la vesícula permite pesquisar más de 98% de las lesiones neoplásicas vesiculares.

Más de 98% de las lesiones tumorales vesiculares corresponde a adenocarcinomas y aproximadamente dos tercios de ellos a lesiones moderadas o poco diferenciadas, las cuales se asocian predominantemente a tumores avanzados. Una situación contraria ocurre con los carcinomas incipientes, donde es más frecuente observar tumores bien diferenciados<sup>2,5</sup>. Otra característica morfológica asociada al pronóstico es el espesor de la pared, pues el mayor espesor al momento del diagnóstico se relaciona con un peor pronóstico, probablemente asociado a tumores avanzados, menos diferenciados y con reagudización del cuadro crónico de base. Se han sugerido aquí elementos como el volumen total de cálculos, longitud de la vesícula biliar, deformidad y espesor de la pared, elementos que serían útiles para los criterios de selección a través de imagenología en grupos con mayor riesgo epidemiológico de portar una neoplasia vesicular<sup>2</sup>.

El proceso carcinogénico en la vesícula biliar está lejos de ser totalmente dilucidado, sin embargo, ha quedado claramente establecida una interrelación entre factores predisponentes, ambientales y genéticos en el proceso de iniciación, promoción y progresión del cáncer de la vesícula biliar.

### **Aspectos morfológicos de las lesiones preneoplásicas de la vesícula biliar**

---

En la mayoría de los tumores epiteliales, especialmente de tipo glandular o adenocarcinomas, se reconocen dos grandes modelos a través de los cuales se produciría la transformación maligna. Estos modelos son: la secuencia displasia-carcinoma (Figura 1) y la de adenoma-carcinoma (Figura 2)<sup>5,9-13</sup>. La primera se basa en las alteraciones del epitelio propio de la mucosa vesicular en la que aparece frecuentemente una metaplasia como un proceso adaptativo secundario a la irritación crónica o inflamación. Episodios repetidos de colecistitis crónica pueden producir metaplasia pseudopilórica de tipo gástrico o metaplasia intestinal.

Aproximadamente 50% de las colecistitis crónicas se acompañan por alguna forma de metaplasia. La metaplasia pseudopilórica es la más común y puede ser subclasificada como pilórica (con mucinas neutras y ácidas) o foveolar (con mucinas neutras). La metaplasia intestinal se caracteriza por la presencia de células calciformes que contienen mucina ácida, donde células neuroendocrinas y de Paneth pueden también estar presentes<sup>14</sup>. Sobre esta metaplasia aparece la displasia, la cual progresa a carcinoma *in situ* y posteriormente a invasor<sup>11,15-17</sup>.

La segunda vía propone la transformación maligna a partir de un tumor glandular inicialmente benigno, como son los adenomas<sup>9,13</sup>. Observaciones experimentales y clínicas sostienen ambos modelos; sin embargo, en órganos específicos ambas vías tienen distinta importancia y connotación. La evolución y transformación de cada una de estas lesiones a formas de mayor agresividad requeriría de condiciones y períodos distintos. Finalmente, la evidencia acumulada muestra que la secuencia adenoma-carcinoma no es la más importante en este órgano y presenta alteraciones moleculares distintas a las observadas en la vía displasia-carcinoma<sup>18,19</sup>.

### **Alteraciones genético-moleculares en el cáncer de la vesícula biliar**

---

Al igual que en otras neoplasias, la carcinogénesis vesicular es producto de la acumulación de múltiples alteraciones a nivel genético<sup>20-23</sup>. Sin embargo, la información respecto de las alteraciones a nivel genético y molecular del cáncer vesicular

es aún escasa. Los resultados iniciales muestran la participación de oncogenes, genes supresores de tumores, genes reparadores del ADN e inestabilidad microsatelital, sin que hasta ahora sea posible establecer con claridad una secuencia de eventos que permitan explicar este proceso cancerígeno. La mayoría de éstos corresponden a activaciones de oncogenes e inactivación de los genes supresores a través de LOH (pérdida de la heterocigocidad), mutación o metilación de las áreas promotoras de genes (Figuras 1 y 2)

### Oncogenes

Un gen cuyo producto está involucrado tanto en la transformación celular como en la inducción de cáncer se conoce como oncogén.

El oncogén *c-erb-B2*, codifica una proteína con actividad tirosina quinasa que presenta una gran homología con el receptor de crecimiento epidérmico. Estudios inmunohistoquímicos de *c-erb-B2* no han encontrado expresión en displasias o adenomas; sin embargo, la positividad fluctuó entre 10% y 46,5% en carcinomas de vesícula biliar<sup>24,25</sup>. En otro estudio, la expresión de HER2/neu se observó en 28% de cánceres de la vesícula biliar y su inmunoexpresión se correlacionó con el avance de los estados T. De esta forma se cree que este oncogén está asociado con una progresión neoplásica en el carcinoma de la vesícula biliar y su expresión se identificó en pacientes con peor pronóstico<sup>24,27</sup>.

Los pacientes portadores de una unión pancreático-biliar anómala presentan una mayor frecuencia de mutación del gen *KRAS* que los sujetos sin esta condición, sugiriendo que el reflujo pudiese jugar un rol en la carcinogénesis de este grupo de pacientes<sup>28</sup>. Por otra parte, se han reportado cifras extremadamente variables de activación mediante mutación del gen *KRAS* en el cáncer de la vesícula biliar<sup>23,29,30</sup>. Hay autores que no han demostrado mutación de este gen y le asignan escasa participación en la carcinogénesis vesicular<sup>31,32</sup>; otros, en cambio, muestran cifras de mutación entre el 40 y 50% en los cánceres vesiculares<sup>32-35</sup>.

La expresión del inhibidor ciclina dependiente de quinasa p21<sup>Waf1/Cip1</sup> se ha observado en 28% de cánceres de vesícula biliar. Por sí solo, p21 no tiene un impacto conocido en la sobrevida de los pacientes con carcinoma vesicular. Sin embargo, se ha correlacionado la inmunoexpresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> y otros genes tales como p27<sup>Kip1</sup> o *TP53* con la sobrevida de estos pacientes. Pacientes sin

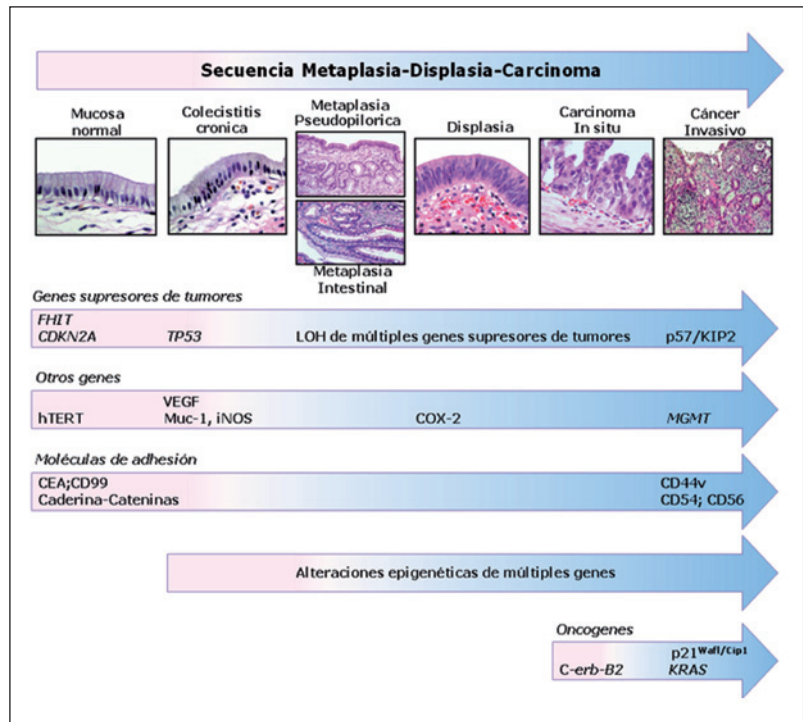
expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> y con mutaciones del gen *TP53*, poseen una sobrevida más prolongada que aquellos pacientes con expresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> y mutación del gen *TP53*. Por otra parte, pacientes sin inmunoexpresión de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> y con inmunoexpresión de p27<sup>Kip1</sup>, poseen una mayor sobrevida que aquellos que poseen inmunoexpresión positiva para p21<sup>Waf1/Cip1</sup> y para p27<sup>Kip1</sup>. Por lo tanto, la ausencia de p21<sup>Waf1/Cip1</sup> podría estar relacionada con una mayor sobrevida<sup>36</sup> (Figura 1; Tabla 1).

### Genes supresores de tumores

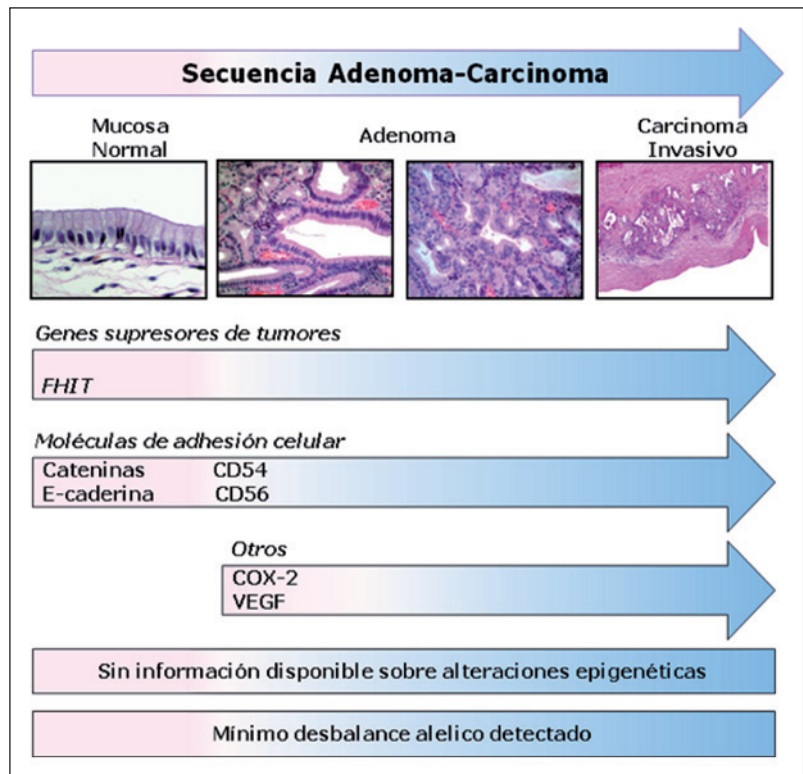
Genes supresores de tumores son aquellos que codifican proteínas que inhiben directa o indirectamente la progresión celular a través del ciclo celular.

Aún cuando la participación del gen *TP53* en la carcinogénesis parece ser más bien tardía, su presencia en lesiones preneoplásicas en un bajo porcentaje y su significativo aumento en las lesiones tumorales avanzadas han permitido establecer una relación en la progresión displasia-carcinoma *in situ*-carcinoma avanzado<sup>32,37,38</sup>. Se han encontrado mutaciones del gen *TP53* y por lo tanto acumulación de p53 entre el 27 y 70% de los carcinomas de la vesícula biliar<sup>39</sup>. Estudios moleculares han revelado que mutaciones entre los axones 5-8 están directamente relacionadas con la desregulación del gen *TP53*, lo que fue observado en pacientes de dos regiones geográficas con gran prevalencia de cáncer de la vesícula biliar (Japón y Chile). Los pacientes chilenos mostraron una transición de G:C a A:T y mutación par de G:C, que frecuentemente se presentan en los sitios CpG. En cambio, en los pacientes japoneses no fue encontrada ninguna transición, pero sí mutaciones pares donde fue prevalente el cambio de A:T<sup>19,39-43</sup>.

La inactivación de p16 es un evento común en cánceres humanos<sup>23</sup>. Se han observado deleciones de este gen en la región (9p21), en la mitad de los cánceres vesiculares<sup>31,32</sup>. En una serie de nuestros casos hemos observado en 41% la inactivación del gen *CDKN2A*(p16), ya sea por LOH (en 11%) o metilación (en 24%)<sup>44</sup>. Además, se ha encontrado una mayor inmunotinción en tejido epitelial normal de cáncer vesicular (50 a 90% de las células), disminuyendo en la displasia-adenoma (sobre 50%) y carcinoma (10-50%). La inactivación del gen *CDKN2A*(p16) se asocia a un peor pronóstico en cánceres de la vesícula biliar, así como su frecuente asociación con la mutación del gen *Kras*<sup>32,39,45,46</sup>.



**Figura 1.** Progresión morfológica y alteraciones genético moleculares de la secuencia Metaplasia-Displasia-Carcinoma en vesícula biliar.



**Figura 2.** Progresión morfológica y alteraciones genético moleculares de la secuencia Adenoma-Carcinoma en vesícula biliar.

**Tabla 1. Resumen con las principales alteraciones genéticas publicadas en lesiones preneoplásicas y neoplásicas de la vesícula biliar**

|   | Epitelio normal | Colecistitis crónica | Metaplasia | Displasia | Carcinoma <i>in situ</i> | Carcinoma invasivo            | Referencias              |
|---|-----------------|----------------------|------------|-----------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| <b>Oncogenes</b>                          |                 |                      |            |           |                          |                               |                          |
| Kras Mutación Codón 12 (PCR)              | 6,7%            | 15%-58%              |            |           |                          | 20% -50%<br>50-80%<br>(APBDJ) | (32-35)                  |
| p21 <sup>Waf1/Cip1</sup> (IHQ)            |                 |                      |            |           |                          | 28%                           | (36)                     |
| c-erb-B2 (IHQ)(FISH)                      |                 |                      |            |           | 10%                      | 46,5%-70%                     | (24-26)                  |
| <b>Genes supresores de tumores</b>        |                 |                      |            |           |                          |                               |                          |
| CDKN2A (p16) Mutación exón 1-2(PCR) (IHQ) | 90-50%          |                      |            | 50%       |                          | 24,5%-70%<br>50-10%           | (32, 39, 44-46)          |
| TP53 mutación exónes 5-8(PCR)             |                 |                      |            |           |                          | 31%-70%                       | (19, 34, 39, 40, 42, 43) |
| p53 (IHQ)                                 |                 | 16,7%                |            | 25%       | 35%-47,4%                | 61,2%-92%                     |                          |
| p57 <sup>Kip2</sup> (IHQ)                 |                 |                      |            |           |                          | 19%                           | (36)                     |
| FHIT (IHQ)                                | 9%              |                      |            | 50%       | 45%-58%                  | 55%-79%                       | (47, 48)                 |
| LOH (PCR)                                 |                 |                      |            | 3p;8p     | 3p,8p,9q,<br>18q,22q     | 3p,8p,9p,9q<br>17p,18q,22q    | (49-51)                  |
| <b>Moléculas de adhesión</b>              |                 |                      |            |           |                          |                               |                          |
| a Catenina (IHQ)                          | 80%             |                      | 88%-77,8%  | 26,70%    |                          | 16%                           | (62)                     |
| b Catenina (IHQ)                          | 90%             |                      | 88,90%     | 40%       |                          | 41,30%                        | (62)                     |
| γ Catenina (IHQ)                          | 95%             |                      | 77,80%     | 66,70%    |                          | 43,50%                        | (62)                     |
| E Caderina (IHQ)                          | 90%             |                      | 100%       | 80%       |                          | 70%-89,1%                     | (60, 62)                 |
| CD44v6 (IHQ)                              |                 |                      |            |           |                          | 39,1%-76%                     | (62, 63)                 |
| CEA (IHQ)                                 | 3%              |                      | 11,10%     | 33,30%    | 70,50%                   |                               | (62)                     |
| CD54 (IHQ)                                |                 |                      |            |           |                          | 39,10%                        | (62)                     |
| CD56 (IHQ)                                |                 |                      |            |           |                          | 10,90%                        | (62)                     |
| CD99 (IHQ)                                | 95%             |                      | 87,50%     |           | 67,40%                   |                               | (62)                     |
| <b>Inestabilidad microsatelital</b>       |                 |                      |            |           |                          |                               |                          |
| MSI                                       |                 |                      | 33%(+)     | 83%(+)    |                          | 10%                           | (56, 58, 75)             |
| <b>Otros genes</b>                        |                 |                      |            |           |                          |                               |                          |
| COX-2 (IHQ)                               |                 |                      |            | 45%       | 87,50%                   |                               | (66-68)                  |
| VEGF (IHQ)                                |                 | 16,70%               |            |           | 42,10%                   | 75%-76,7%                     | (39, 40)                 |
| iNOS (IHQ)                                |                 | 100%                 |            |           | 70,80%                   |                               | (70)                     |
| hTERT (IHQ)                               | 3%              | 4%                   |            | 25%       | 82%                      | 66%-93%                       | (71-73)                  |
| Muc1 (IHQ)                                |                 | 4,40%                |            |           | 78%                      | 89%                           | (74)                     |
| MGMT(IHQ)                                 |                 |                      |            |           |                          | 59%                           | (57)                     |

Imunohistoquímica (IHQ); Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); Hibridación fluorescente *in situ* (FISH); APBDJ: unión biliopancreática anormal; (+) MSI en áreas adyacentes a carcinomas de vesícula biliar con MSI-H. (\*) Diminución de la expresión inmunohistoquímica.

La reducción o la pérdida considerable de la reactividad inmunohistoquímica de *FHIT* (gen frágil de la tríada de la histidina) y la pérdida de sus alelos es casi universal en el cáncer de la vesícula biliar. Estos cambios se detectan temprano en el desarrollo secuencial de esta neoplasia, sugiriendo que *FHIT* es un posible gen supresor de tumores implicado en su patogenia<sup>20,47,48</sup>.

La expresión inmunohistoquímica del inhibidor de ciclina quinasa dependiente p57<sup>Kip2</sup> se ha observado en 19% de cánceres de la vesícula biliar, disminuyendo su expresión en forma significativa en estados T3/T4, cuando hay metástasis a linfonodos y en estados UICC avanzados<sup>36</sup>.

Mediante alelo-tipificación se han demostrado algunas regiones cromosómicas que contienen genes supresores de tumores conocidos y otros aún no plenamente identificados, que pudiesen estar involucrados en la carcinogénesis vesicular y cuyo estudio aún es inicial. Entre estas se encuentran, 3p (20 a 52%); 5q21 (APC-MCC 6 a 66%); 8p22-24 (22 a 44%); 13q14 (Rb 20 a 30%); y 18q22 (DCC 18 a 31%), DPC4 (19%)<sup>20,23,49-51</sup>. (Figura 1 y 2, Tabla 1).

### Alteraciones epigenéticas

Se entiende por "epigenética" aquellos cambios heredables en la expresión de los genes que no son resultado de la alteración de la secuencia de nucleótidos<sup>52</sup>. Los principales componentes del código epigenético que actúan como represores de la transcripción son la metilación del ADN; la modificación de las histonas (fosforilación, acetilación y metilación) y mecanismos alterados de regulación mediante microARNs. Estos últimos conforman una familia de pequeños ARNs no codificantes que regulan negativamente la expresión de genes a nivel post-transcripcional y cuya regulación no se conoce.

La hipermetilación de regiones promotoras es un mecanismo epigenético frecuente del proceso carcinogénico<sup>52</sup>. La inactivación de genes supresores de tumores parece ser un evento temprano, progresivo y acumulable en la carcinogénesis de la vesícula biliar, incrementando desde colecistitis crónica sin metaplasia a colecistitis crónica con metaplasia, lo que podría proveer una nueva evidencia para considerar a esta adaptación morfológica como una lesión premaligna de la mucosa de la vesícula biliar. Su presencia ha sido utilizada

como marcador tumoral, pronóstico y en selección de terapias. En nuestro laboratorio hemos encontrado en una serie de 109 cánceres avanzados una asociación significativa con supervivencia en la metilación de los genes p73 ( $p < 0,006$ ), *MGMT* ( $p < 0,006$ ) *DCL1* ( $p < 0,044$ ) y una tendencia no significativa para los genes *CDH13* ( $p < 0,06$ ), *FHIT* ( $p < 0,1$ ). Los tumores subserosos con índice de metilación igual o superior a 0,4 se asociaron a peor supervivencia ( $p < 0,001$ ). El análisis multivariado encontró al gen *MGMT* como un factor pronóstico independiente de la supervivencia ( $p < 0,01$ )<sup>53</sup>. Otros estudios han demostrado una alta frecuencia de metilación en *SEMA3B* (92%) y *FHIT* (66%) una incidencia intermedia en *BLU* (26%) y *DUTTI* (22%) y muy baja frecuencia en *RASSF1A* (8%) y *hMLH1* (4%) en el cromosoma 3p, candidato a genes supresores de tumores<sup>54</sup>. Estudios publicados por nuestro laboratorio ilustran que los genes *DAPK1*, *DLC1*, *TIMP3* y *RARB2* muestran un progresivo incremento en su estado de metilación desde colecistitis crónica sin metaplasia a carcinoma avanzado que invade la capa serosa<sup>53</sup>. Por otra parte, el aumento de *p15*, *APC*, *DLC1* y *CDH13* se relaciona con un peor pronóstico de supervivencia. Esto muestra el importante rol que cumpliría este proceso epigenético en la carcinogénesis vesicular y la utilidad de los estudios de epigenética como factores pronósticos y de potencial selección para alternativas terapéuticas en el cáncer de la vesícula biliar<sup>53,55</sup> (Figura 1).

### Inestabilidad microsatelital (MSI)

En términos generales se acepta que si bien la MSI está presente desde las primeras etapas del proceso cancerígeno de la vesícula biliar, está limitada a un subgrupo restringido de pacientes<sup>56,57</sup>. En nuestros trabajos se ha observado una inestabilidad microsatelital de alto grado en 10% de los carcinomas vesiculares. Estas alteraciones también fueron demostradas en 33% de las áreas con metaplasia intestinal y en 83% de displasias adyacentes a los carcinomas con MSI, en cambio, en las lesiones inflamatorias no se observó esta alteración<sup>58</sup> (Figura 1; Tabla 1).

### Moléculas de adhesión

La carcinogénesis y la aparición de metástasis son procesos que implican interacciones complejas

entre las células y su ambiente. La adhesión celular es un componente dominante en la cascada de las metástasis, implicando muchas interacciones entre las células tumorales y las células del huésped en los procesos de angiogénesis, proteólisis, motilidad e invasión<sup>59</sup>. Estos procesos son mediados por las moléculas de la adhesión que pertenecen a cuatro familias importantes: integrinas, caderinas, inmunoglobulinas y selectinas.

Se ha demostrado que en carcinomas vesiculares subserosos se produce una expresión alterada y por lo tanto una desaparición significativa de hasta el 30% de las moléculas de adhesión alfa, beta, gama cateninas y E-caderina<sup>60</sup>. La expresión citoplasmática y nuclear de la  $\beta$ -catenina en carcinomas se correlaciona con un mejor comportamiento del tumor<sup>61</sup>. Un estudio de CD54 (ICAM-1) encontró inmunoreactividad positiva en 14,3% de los adenomas y en 39,1% de los carcinomas. Esto demuestra la expresión aberrante de CD54 en etapas avanzadas de la enfermedad<sup>62</sup>.

La expresión alterada de CD44 y de sus variantes (CD44v)<sup>63</sup> CD56, CD99 y CEA, están implicadas en varias etapas de la progresión del tumor y las metástasis<sup>59,62,64</sup> (Figura 1 y 2; Tabla 1).

### Otros genes

El paso dominante en la conversión del ácido araquidónico libre a prostaglandinas es catalizado por la enzima ciclooxigenasa (COX). Una de sus isoformas COX-2 está implicada en la regulación positiva del crecimiento y génesis tumoral. Estudios utilizando inmunohistoquímica han mostrado que en epitelio normal y displasia de vesícula biliar se presentó una inmunoreactividad para COX-2 en 14,3% y 70,3% respectivamente. En adenocarcinomas, la expresión fluctuó entre 59,2% y 71,9<sup>65-68</sup>, sugiriendo que COX-2 participa tempranamente en la carcinogénesis vesicular.

Varios trabajos han demostrado que, a medida que avanza la progresión del tumor, aumenta la expresión de VEGFR. Para el crecimiento y la metástasis de los tumores sólidos en humanos, se requiere críticamente una vascularización adecuada, convirtiéndolo en un potencial blanco para terapia específica dirigida<sup>39,40</sup>.

La O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA-metiltransferasa (MGMT) es una enzima reparadora del ADN que juega un rol importante en la protección de la célula frente a agentes alquilantes. Se detectó

una tinción negativa para MGMT en el 59% de carcinomas de vesícula biliar estudiados y el 60% de especímenes de carcinoma extra hepático de ducto biliar<sup>57</sup>.

El óxido nítrico (NO) es generado por la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y es un factor importante en la inducción del tumor, especialmente en tejidos crónicamente inflamados donde puede causar lesión de la célula, ruptura del ADN, mutación de genes, seguido de desarrollo de cáncer<sup>69</sup>. Los estudios sobre la expresión de iNOS en vesícula biliar, aunque escasos, han demostrado una expresión de iNOS en el 87,5% de colecistitis crónica, 100% en colecistitis con adenomioma y 70,8% en adenocarcinoma<sup>70</sup>.

Un estudio encontró que las señales nucleares de hTERT (subunidad catalítica de la telomerasa) aumentaban progresivamente con el grado de anormalidad del epitelio de vesicular, en 3% fue expresado en epitelio normal, 4% en epitelio regenerativo, 25% de inmunoreactividad en displasia de bajo grado, 82% en displasia de alto grado de displasia y 93% en adenocarcinomas<sup>71</sup>. Otros autores han encontrado expresión de hTERT en 73% y 66% de adenocarcinomas de la vesícula biliar<sup>72,73</sup>.

Las mucinas son glicoproteínas de elevado peso molecular secretadas por células mucosas normales, las cuales juegan un importante rol en la protección y lubricación del epitelio normal en órganos gastrointestinales. MUC1 se expresa en la superficie de las células epiteliales glandulares y ductales. Su expresión se ve aumentada a medida que las células pierden su polaridad apical normal. La mayoría de las células humanas con adenocarcinoma expresan MUC1 y su expresión inmunohistoquímica se puede relacionar con la progresión del tumor y con el pronóstico en pacientes con varios tipos de cáncer. La expresión de MUC1 en la vesícula biliar es significativamente más alta en tejidos con cáncer que en tejidos no cancerosos normales o con colecistitis. De esta forma se ha demostrado que la expresión de MUC1 está relacionada con la progresión del tumor en el cáncer de la vesícula biliar y también con el potencial de invasión a los vasos linfáticos<sup>74</sup> (Figura 1 y 2; Tabla 1).

### Conclusión

Numerosos estudios morfológicos nacionales han caracterizado a esta neoplasia, demostrando

asociaciones pronósticas significativas que han permitido por un lado seleccionar grupos de mayor riesgo y por otro, identificar grupos que deben recibir terapias diferenciadas. La caracterización genético molecular de esta enfermedad ha comenzado a clasificar subgrupos de pacientes que no pueden ser distinguidos en forma rutinaria mediante el análisis de los patrones morfológicos y que se podrán beneficiar en un futuro cercano con el uso de terapias específicas dirigidas (“*Targeted Therapy*”).

## Referencias

1. Medina E, Kaempffer AM. [Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations]. *Rev Med Chile* 2001; 129: 1195-202.
2. Roa I, de Aretxabala X, Araya JC, Villaseca M, Roa J, Gilda IT, et al. [Morphological prognostic elements in gallbladder cancer]. *Rev Med Chile* 2002; 130: 387-95.
3. Roa I, de Aretxabala X, Araya JC, Villaseca M, Roa J, Guzman P. [Incipient gallbladder carcinoma. Clinical and pathological study and prognosis in 196 cases]. *Rev Med Chile* 2001; 129: 1113-20.
4. Roa I, Araya JC, Wistuba I, de Aretxabala X. [Gallbladder cancer: anatomic and anatomic-pathologic considerations]. *Rev Med Chile* 1990; 118: 572-9.
5. Roa I, Araya JC, Villaseca M, Roa J, de Aretxabala X, Ibacache G. Gallbladder cancer in a high risk area: morphological features and spread patterns. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1540-6.
6. Roa I, de Aretxabala X, Araya JC, Villaseca M, Roa J, Burgos L, et al. [Findings in surgical reinterventions for cancer of the gallbladder in patients with and without preoperative chemotherapy and radiotherapy]. *Rev Med Chile* 2001; 129: 1013-20.
7. de Aretxabala XA, Roa IS, Burgos LA, Araya JC, Villaseca MA, Silva JA. Curative resection in potentially resectable tumours of the gallbladder. *Eur J Surg* 1997; 163: 419-26.
8. de Aretxabala X, Losada H, Mora J, Roa I, Burgos L, Yanez E, et al. [Neoadjuvant chemoradiotherapy in gallbladder cancer]. *Rev Med Chile* 2004; 132: 51-7.
9. Kozuka S, Tsubone N, Yasui A, Hachisuka K. Relation of adenoma to carcinoma in the gallbladder. *Cancer* 1982; 50: 2226-34.
10. Roa I, Araya JC, Villaseca M, De Aretxabala X, Riedemann P, Endoh K, et al. Preneoplastic lesions and gallbladder cancer: an estimate of the period required for progression. *Gastroenterology* 1996; 111: 232-6.
11. Laitio M. Histogenesis of epithelial neoplasms of human gallbladder I. Dysplasia. *Pathol Res Pract* 1983; 178: 51-6.
12. Laitio M. Histogenesis of epithelial neoplasms of human gallbladder II. Classification of carcinoma on the basis of morphological features. *Pathol Res Pract* 1983; 178: 57-66.
13. Harbison J, Reynolds JV, Sheahan K, Gibney RG, Hyland JM. Evidence for the polyp-cancer sequence in gallbladder cancer. *Ir Med J* 1997; 90: 98.
14. Hansel DM, Argani AP. Pathology of the gallbladder: a concise review *Current Diagnostic pathology* 2004; 10: 304-17.
15. Roa I, Araya JC, Wistuba I, Villaseca M, de Aretxabala X, Busel D, et al. [Epithelial lesions associated with gallbladder carcinoma. A methodical study of 32 cases]. *Rev Med Chile* 1993; 121: 21-9.
16. Smok G, Cervilla K, Bosch H, Csendes A. [Precancerous lesions of invasive carcinoma of the gallbladder]. *Rev Med Chile* 1986; 114: 954-8.
17. Albores-Saavedra J, Alcantra-Vázquez A, Cruz-Ortiz H, Herrera-Goepfert R. The precursor lesions of invasive gallbladder carcinoma. Hyperplasia, atypical hyperplasia and carcinoma *in situ*. *Cancer* 1980; 45: 919-27.
18. Wistuba, II, Miquel JF, Gazdar AF, Albores-Saavedra J. Gallbladder adenomas have molecular abnormalities different from those present in gallbladder carcinomas. *Hum Pathol* 1999; 30: 21-5.
19. Yokoyama N, Hitomi J, Watanabe H, Ajioka Y, Pruyas M, Serra I, et al. Mutations of p53 in gallbladder carcinomas in high-incidence areas of Japan and Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7: 297-301.
20. Wistuba, II, Tang M, Maitra A, Álvarez H, Troncoso P, Pimentel F, et al. Genome-wide allelotyping analysis reveals multiple sites of allelic loss in gallbladder carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 3795-800.
21. Sasatomi E, Tokunaga O, Miyazaki K. Precancerous conditions of gallbladder carcinoma: overview of histopathologic characteristics and molecular genetic findings. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 556-67.
22. Lazcano-Ponce EC, Miquel JF, Muñoz N, Herrero R, Ferrero C, Wistuba, II, et al. Epidemiology and molecular pathology of gallbladder cancer. *CA Cancer J Clin* 2001; 51: 349-64.
23. Rashid A. Cellular and molecular biology of biliary tract cancers. *Surg Oncol Clin N Am* 2002; 11: 995-1009.
24. Kim YW, Huh SH, Park YK, Yoon TY, Lee SM, Hong SH. Expression of the c-erb-B2 and p53 protein in gallbladder carcinomas. *Oncol Rep* 2001; 8: 1127-32.
25. Kamel D, Paakko P, Nuorva K, Vahakangas K, Soini Y. p53 and c-erbB-2 protein expression in adenocarcinomas and epithelial dysplasias of the gall bladder. *J Pathol* 1993; 170: 67-72.
26. Suzuki T, Takano Y, Kakita A, Okudaira M. An im-



- munohistochemical and molecular biological study of c-erbB-2 amplification and prognostic relevance in gallbladder cancer. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 283-92.
27. Chow NH, Huang SM, Chan SH, Mo LR, Hwang MH, Su WC. Significance of c-erbB-2 expression in normal and neoplastic epithelium of biliary tract. *Anticancer Res* 1995; 15: 1055-9.
  28. Nakayama K, Konno M, Kanzaki A, Morikawa T, Miyashita H, Fujioka T, et al. Allelotype analysis of gallbladder carcinoma associated with anomalous junction of pancreaticobiliary duct. *Cancer Lett* 2001; 166: 135-41.
  29. Masuhara S, Kasuya K, Aoki T, Yoshimatsu A, Tsuchida A, Koyanagi Y. Relation between K-ras codon 12 mutation and p53 protein overexpression in gallbladder cancer and biliary ductal epithelia in patients with pancreaticobiliary maljunction. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 198-205.
  30. Ito R, Tamura K, Ashida H, Nishiwaki M, Nishioka A, Yamamoto Y, et al. Usefulness of K-ras gene mutation at codon 12 in bile for diagnosing biliary strictures. *Int J Oncol* 1998; 12: 1019-23.
  31. Wistuba, II, Albores-Saavedra J. Genetic abnormalities involved in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1999; 6: 237-44.
  32. Kim YT, Kim J, Jang YH, Lee WJ, Ryu JK, Park YK, et al. Genetic alterations in gallbladder adenoma, dysplasia and carcinoma. *Cancer Lett* 2001; 169: 59-68.
  33. Hanada K, Tsuchida A, Iwao T, Eguchi N, Sasaki T, Morinaka K, et al. Gene mutations of K-ras in gallbladder mucosae and gallbladder carcinoma with an anomalous junction of the pancreaticobiliary duct. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1638-42.
  34. Matsubara T, Sakurai Y, Sasayama Y, Hori H, Ochiai M, Funabiki T, et al. K-ras point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer* 1996; 77: 1752-7.
  35. Iwase T, Nakazawa S, Yamao K, Yoshino J, Inui K, Yamachika H, et al. Ras gene point mutations in gallbladder lesions associated with anomalous connection of pancreatobiliary ducts. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 1457-62.
  36. Puhalla H, Wrba F, Kandioler D, Lehnert M, Huynh A, Gruenberger T, et al. Expression of p21(Waf1/Cip1), p57(Kip2) and HER2/neu in patients with gallbladder cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 1679-84.
  37. Takada M, Horita Y, Okuda S, Okumoto S, Samizo M, Wada T, et al. Genetic analysis of xanthogranulomatous cholecystitis: of gallbladder cancer? *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 935-7.
  38. Roa I, Melo A, Roa J, Araya J, Villaseca M, de Aretxabala X. [P53 gene mutation in gallbladder cancer]. *Rev Med Chile* 2000; 128: 251-8.
  39. Quan ZW, Wu K, Wang J, Shi W, Zhang Z, Merrell RC. Association of p53, p16, and vascular endothelial growth factor protein expressions with the prognosis and metastasis of gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2001; 193: 380-3.
  40. Tian Y, Ding RY, Zhi YH, Guo RX, Wu SD. Analysis of p53 and vascular endothelial growth factor expression in human gallbladder carcinoma for the determination of tumor vascularity. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 415-9.
  41. Wistuba, II, Gazdar AF, Roa I, Albores-Saavedra J. p53 protein overexpression in gallbladder carcinoma and its precursor lesions: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1996; 27: 360-5.
  42. Fujii K, Yokozaki H, Yasui W, Kuniyasu H, Hirata M, Kajiyama G, et al. High frequency of p53 gene mutation in adenocarcinomas of the gallbladder. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 461-6.
  43. Itoi T, Watanabe H, Yoshida M, Ajioka Y, Nishikura K, Saito T. Correlation of p53 protein expression with gene mutation in gall-bladder carcinomas. *Pathol Int* 1997; 47: 525-30.
  44. Roa JC, Vo Q, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Ibacache GS, et al. [Inactivation of CDKN2A gene (p16) in gallbladder carcinoma]. *Rev Med Chile* 2004; 132: 1369-76.
  45. Shi YZ, Hui AM, Li X, Takayama T, Makuuchi M. Overexpression of retinoblastoma protein predicts decreased survival and correlates with loss of p16INK4 protein in gallbladder carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4096-100.
  46. Ueki T, Hsing AW, Gao YT, Wang BS, Shen MC, Cheng J, et al. Alterations of p16 and prognosis in biliary tract cancers from a population-based study in China. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1717-25.
  47. Wistuba, II, Ashfaq R, Maitra A, Álvarez H, Riquelme E, Gazdar AF. Fragile histidine triad gene abnormalities in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 2073-9.
  48. Koda M, Yashima K, Kawaguchi K, Andachi H, Hosoda A, Shiota G, et al. Expression of Fhit, Mlh1, and P53 protein in human gallbladder carcinoma. *Cancer Lett* 2003; 199: 131-8.
  49. Wistuba, II, Sugio K, Hung J, Kishimoto Y, Virmani AK, Roa I, et al. Allele-specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res* 1995; 55: 2511-5.
  50. Wistuba, II, Maitra A, Carrasco R, Tang M, Troncoso P,

- Minna JD, et al. High resolution chromosome 3p, 8p, 9q and 22q allelotyping analysis in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 87: 432-40.
51. Yanagisawa N, Mikami T, Yamashita K, Okayasu I. Microsatellite instability in chronic cholecystitis is indicative of an early stage in gallbladder carcinogenesis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 413-7.
  52. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2 Suppl 1: S4-11.
  53. Garcia P, Manterola C, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Sanhueza A, et al. Promoter methylation profile in preneoplastic and neoplastic gallbladder lesions. *Mol Carcinog* 2008.
  54. Riquelme E, Tang M, Baez S, Díaz A, Pruyas M, Wistuba, II, et al. Frequent epigenetic inactivation of chromosome 3p candidate tumor suppressor genes in gallbladder carcinoma. *Cancer Lett* 2007; 250: 100-6.
  55. Roa JC, Anabalón L, Roa I, Melo A, Araya JC, Tapia O, et al. Promoter methylation profile in gallbladder cancer. *J Gastroenterol* 2006; 41: 269-75.
  56. Saetta AA. K-ras, p53 mutations, and microsatellite instability (MSI) in cancer. *J Surg Oncol* 2006; 93: 644-9.
  57. Kohya N, Miyazaki K, Matsukura S, Yakushiji H, Kitajima Y, Kitahara K, et al. Deficient expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with mismatch-repair proteins hMLH1 and hMSH2 is related to poor in human biliary tract carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 371-9.
  58. Roa JC, Roa I, Correa P, Vo Q, Araya JC, Villaseca M, et al. Microsatellite instability in preneoplastic and neoplastic gallbladder. *J Gastroenterol* 2005; 40: 79-86.
  59. Tang DG, Honn KV. Adhesion molecules and tumor metastasis: an update. *Invasion Metastasis* 1994; 14: 109-22.
  60. Roa I, Ibacache G, Melo A, Morales E, Villaseca M, Araya J, et al. [Subserous gallbladder carcinoma: expression of cadherine-catenine complex]. *Rev Med Chile* 2002; 130: 1349-57.
  61. Chang HJ, Jee CD, Kim WH. [Mutation and altered expression of beta-catenin during gallbladder carcinogenesis]. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 758-66.
  62. Choi YL, Xuan YH, Shin YK, Chae SW, Kook MC, Sung RH, et al. An immunohistochemical study of the expression of adhesion gallbladder lesions. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 591-601.
  63. Roa I, Villaseca M, Araya J, Roa J, de Aretxabala X, Ibacache G, et al. [CD44 (HCAM) expression in subserous gallbladder carcinoma]. *Rev Med Chile* 2001; 129: 727-34.
  64. Kanthan R, Radhi JM, Kanthan SC. Gallbladder carcinomas: an immunoprognostic evaluation of P53, Bcl-2, CEA and alpha-fetoprotein. *Can J Gastroenterol* 2000; 14: 181-4.
  65. Han JA, Kim JI, Ongusaha PP, Hwang DH, Ballou LR, Mahale A, et al. P53-mediated induction of Cox-2 counteracts p53- or genotoxic stress-induced apoptosis. *Embo J* 2002; 21: 5635-44.
  66. Asano T, Shoda J, Ueda T, Kawamoto T, Todoroki T, Shimonishi M, et al. Expressions of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E-receptors in of the gallbladder: crucial role of arachidonate metabolism in growth and progression. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 1157-67.
  67. Legan M, Luzar B, Marolt VF, Cor A. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with p53 premalignant and malignant gallbladder lesions. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3425-9.
  68. Zhi YH, Liu RS, Song MM, Tian Y, Long J, Tu W, et al. Cyclooxygenase-2 promotes angiogenesis by increasing vascular growth factor and predicts prognosis in gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3724-8.
  69. Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res* 1994; 305: 253-64.
  70. Zhang M, Pan JW, Ren TR, Zhu YF, Han YJ, Kuhnel W. Correlated expression of inducible nitric oxide synthase and benign and malignant diseased gallbladder. *Ann Anat* 2003; 185: 549-54.
  71. Luzar B, Poljak M, Cor A, Klopčič U, Ferlan-Marolt V. Expression of human telomerase catalytic protein in gallbladder carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2005; 58: 820-5.
  72. Niiyama H, Mizumoto K, Kusumoto M, Ogawa T, Suehara N, Shimura H, et al. Activation of telomerase and its diagnostic application in specimens from biliary tract neoplasms. *Cancer* 1999; 85: 2138-43.
  73. Itoi T, Shinohara Y, Takeda K, Takei K, Ohno H, Ohya-shiki K, et al. Detection of telomerase activity in biopsy specimens for diagnosis of biliary tract cancers. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 380-6.
  74. Ghosh M, Kamma H, Kawamoto T, Koike N, Miwa M, Kapoor VK, et al. MUC 1 core protein as a marker of gallbladder malignancy. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 891-6.
  75. Saetta AA, Gigelou F, Papanastasiou PI, Koilakou SV, Kalekou-Greca H, Miliaras D, et al. High-level microsatellite instability is not involved in carcinogenesis. *Exp Mol Pathol* 2006; 80: 67-71. Epub 2005 Jun 16.