

Original

Determinación de la ploidía tisular mediante citometría de flujo de DNA y detección inmunohistoquímica de la proteína p53. Su relación con la displasia en el esófago de Barrett

A. Giménez-Bascuñana¹, A. Minguela-Puras², J. Bermejo-López³, J. Sola-Pérez³, R. Álvarez-López² y A.M. García-Alonso²

¹Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Morales Meseguer; ²Servicios de Inmunología Clínica y ³Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

SUMMARY

Background: There is substantial disagreement between observers in the diagnosis of dysplastic lesions in Barrett's esophagus. The aim of this study was to evaluate the usefulness of DNA flow cytometry and immunohistochemical stain for p53 protein as methods to complement the conventional histological evaluation of dysplasia in this disease. *Methods:* Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from 53 patients was processed for flow cytometric measurements (ploidy determination) and p53 immunostaining. *Results:* Although there was a slight decrease in carcinomas (72.7%), there was a highly significant increase in the percentage of biopsies with positive staining for p53 throughout the sequence: Barrett without dysplasia (0%) → "undetermined" dysplasia (28.5%) → low-grade dysplasia (58.3%) → high-grade dysplasia (100%) (linear trend: $p < 0.0001$). Only in the samples with severe histological alterations [high-grade dysplasia (60%) or adenocarcinoma (81.8%)] we found an aneuploid cell population ($p < 0.0001$). *Conclusions:* The results obtained with both procedures were promising and probably complementary. However, the greater sensitivity of immunohistochemical staining and its technical simplicity suggest that the use of this method could, in short term, play a role in the evaluation and management of these patients. **Rev Esp Patol 1998; 31(2): 111-120.**

Key words: Barrett - Flow cytometry - Ploidy - p53 - Oncogene

RESUMEN

Introducción: Se ha demostrado una sustancial variación interobservador en el diagnóstico de las lesiones displásicas en el esófago de Barrett. El propósito de este estudio fue evaluar la utilidad de la citometría de flujo de DNA y de la tinción inmunohistoquímica para la proteína p53 como métodos complementarios de la evaluación histológica en esta enfermedad. *Métodos:* Se procesó para inmunohistoquímica y análisis citométrico (determinación de la ploidía) tejido incluido en parafina procedente de 53 pacientes. *Resultados:* Aunque con un discreto descenso en los carcinomas (72,7%), se observó un incremento estadísticamente muy significativo en el porcentaje de biopsias con tinción positiva para p53 a lo largo de la secuencia: Barrett sin displasia (0%) → displasia "indeterminada"

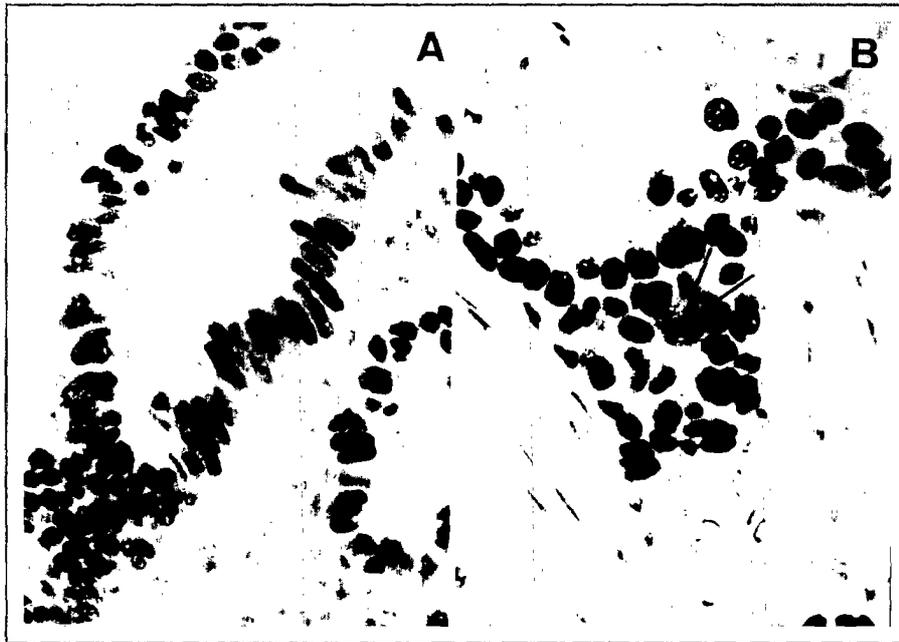


Figura 2. Ejemplos de tinción inmunohistoquímica para la proteína p53 (método estreptavidina-biotina peroxidasa). A: esófago de Barrett con displasia de bajo grado, positivo para p53. Obsérvese cómo la tinción se localiza exclusivamente a nivel nuclear (400x). B: adenocarcinoma poco diferenciado, desarrollado sobre un esófago de Barrett, intensamente positivo para p53. Cuando la acumulación de p53 es masiva, como ocurre en este caso, la proteína puede pasar al citoplasma en el momento de la mitosis, tiñendo la totalidad de la célula (flechas) (400x).

presencia de una población aneuploide detectable mediante citometría de flujo y la existencia de lesiones histológicas graves, ya que únicamente encontramos estas alteraciones en pacientes portadores de displasia de alto grado (3 de 5 muestras, 60%) o adenocarcinoma (9 de 11 adenocarcinomas procesados, 81,8%) ($p < 0.0001$). Se obtuvieron unos índices de DNA de entre 1,30 y 1,81 (media 1,56). En ninguna de las muestras con alteraciones histopatológicas menores (esófago de Barrett sin displasia, con displasia "indeterminada" o con displasia de bajo grado) se demostró la presencia de un pico aneuploide en la citometría de flujo.

Por el contrario, en la tinción inmunohistoquímica para p53, aunque no encontramos ningún caso positivo en muestras sin displasia histológica, sí se aprecia positividad en pacientes con alteraciones menos graves: el 28,5% de las muestras con displasia indeterminada y el 58,3% de las muestras con displasia de bajo grado fueron positivas para esta proteína. Se observa asimismo cómo, a pesar de un ligero descenso en los carcinomas, los porcentajes de muestras positivas en esta tinción se fueron incrementando de forma estadísticamente muy significativa a lo largo de la secuencia sin displasia →

displasia indeterminada → displasia de bajo grado → displasia de alto grado (tendencia lineal, $p < 0.0001$) (Tabla 2).

Por otra parte, en 78 casos fue posible realizar de modo aceptable ambas técnicas para una misma biopsia, permitiendo así establecer una correlación entre sus resultados. Entre las muestras tisulares con aneuploidía de las que también se dispone de tinción para p53 ($n=11$), se detectaron 9 casos positivos (81,8%), mientras que el grado de positividad entre las muestras diploides fue del 23,8% (16 de 67 biopsias) ($p < 0.0005$) (Fig. 3).

La Tabla 3 muestra los valores calculados para la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de ambas técnicas. En el cálculo de estos parámetros no se tomaron en consideración, naturalmente, los casos etiquetados como displasia "indeterminada". El resto de muestras se agrupan, por tanto, en dos clases: biopsias con histología normal (sin displasia) y biopsias con histología patológica (displasia y adenocarcinoma).

De este modo, por ejemplo, ante una biopsia con alteraciones histológicas en el rango de displasia/carcinoma, hay un 70,3% de probabilidad de que la tinción para p53 sea positiva (sensibilidad). Si la muestra no presenta alteraciones histológicas, la tinción será negativa en el 100% de los casos (especificidad).

Tabla 1. Criterios de exclusión utilizados.

| |
|--|
| Disparidad diagnóstica en la evaluación histológica |
| Bloques de parafina con tejido de características muy dispares (por ejemplo epitelio plano + material necrótico + epitelio displásico minoritario) |
| Escasa celularidad obtenida (<10.000 núcleos por muestra) |
| Excesivos detritos tisulares (>20%) |
| Coefficientes de variación elevados (>8%) |
| Pequeños <i>shoulders</i> del pico G ₀ /G ₁ |
| Pico G ₀ /G ₁ asimétrico (no gaussiano, casi diploide); ploidía dudosa |

seleccionados de modo aleatorizado entre la casuística general.

Se aceptaron para su estudio los adenocarcinomas de esófago (n=11) siempre que en la pieza de resección fue posible comprobar que se habían originado, con toda probabilidad, sobre un esófago de Barrett, lo cual se determinó por la presencia peritumoral de epitelio cilíndrico "especializado".

Siguiendo los criterios de aceptación/exclusión que se exponen en la Tabla 1, fue posible procesar para citometría de flujo, con resultados válidos, 95 muestras tisulares, a 78 de las cuales se realizó asimismo una tinción inmunohistoquímica para p53, con el diagnóstico histológico que se expone en la Tabla 2. Todo el material aceptado para su estudio procede de biopsias endoscópicas, en un intento de hacer uniforme el método de procesamiento y digestión enzimática tisular.

Examen histológico

Las preparaciones histológicas fueron revisadas e interpretadas por tres anatomopatólogos de forma independiente y sin conocimiento de los resultados obtenidos con las otras técnicas empleadas en el estudio. En los casos en que hubo falta de unanimidad en el diagnóstico y gradación de las alteraciones observadas, se intentó establecer un diagnóstico consensuado con una revisión conjunta de las preparaciones. Si la disparidad diagnóstica persistió, el caso fue excluido de la serie. El diagnóstico de displasia fue definido como una transformación epitelial en sentido neoplásico, siguiendo los criterios establecidos previamente para el diagnóstico de displasia en la colitis ulcerosa (20), y después modificados para su aplicación en el esófago de Barrett (9).

Citometría de flujo

La totalidad de las muestras empleadas en este estudio correspondió a tejido fijado en formaldehído al 10% e incluido en parafina. Utilizamos una técnica de pepsinización modificada de la de Hedley y cols. (21), que consistió básicamente en un proceso de incubación del tejido en una solución al 0,5% de pepsina (*Sigma*[®] Chemical Co.; St. Louis, MO, EE.UU.) a pH 1,5, durante 90 minutos a 37 °C. Tras esta incubación se realizó un procedimiento de tinción simple con yoduro de propidio, utilizando para ello parcialmente el equipo de tinción *CellCycle-kit*[®] (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems*[®]; San

Tabla 2. Resultados globales obtenidos en nuestro estudio.

| Histología | Nº pacientes (n=53)* | Análisis por citometría de flujo (n=95) | Tinciones p53 (n=78) | Aneuploidías (nº de biopsias y %) | p53+ (nº biopsias y %) |
|---|----------------------|---|----------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Esófago de Barrett sin displasia | 32 | 40 | 30 | 0 | 0 |
| Displasia indeterminada | 18 | 25 | 21 | 0 | 6 (28,5%) |
| Displasia de bajo grado | 12 | 14 | 12 | 0 | 7 (58,3%) |
| Displasia de alto grado | 5 | 5 | 4 | 3 (60%) | 4 (100%) |
| Adenocarcinoma | 11 | 11 | 11 | 9 (81,8%) | 8 (72,7%) |
| Valoración estadística (tendencia lineal) | | | | p<0.0001 | p<0.0001 |

*El número total de pacientes es menor que la suma de la primera columna, ya que varios pacientes en nuestra serie tienen biopsias en diferentes grupos histológicos, así como biopsias con el mismo grado de alteración histológica, aunque tomadas en diferentes momentos de su evolución.

degenerativo neoplásico o con la inminencia de este cambio.

La disparidad entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores, que sí encuentran aneuploidías en pacientes con alteraciones histológicas menores e incluso en pacientes sin displasia, puede explicarse, en algunos casos, por la propia variabilidad en el diagnóstico y gradación de las lesiones displásicas y también, en otros, por el hecho de que la mayoría de estos estudios se han realizado sobre material en fresco. No está aclarado completamente por qué el tejido preparado a partir de material incluido en parafina suele tener una proporción menor de muestras aneuploides (29-31) que cuando se utiliza material en fresco. Se ha sugerido que la digestión enzimática con pepsina puede producir una pérdida selectiva de células tumorales, ya que los núcleos neoplásicos suelen ser de mayor tamaño y con membranas nucleares complejas, lo que podría volverlos relativamente frágiles. Otros observadores (32-35), que también han detectado la presencia de una proporción inusualmente grande de picos hiperdiploides, presumiblemente falsos, al utilizar tejido en fresco, creen que en algunos casos esto podría ser el resultado de una degradación de proteínas cromosómicas con el consiguiente incremento en la captación del yoduro de propidio, un problema al parecer muy frecuente y significativo en la mucosa del tracto gastrointestinal (32).

Por otra parte, naturalmente, en los histogramas de tejido incluido en parafina con gran cantidad de detrito o en los casos en que la población celular de interés es una minoría, se puede oscurecer la presencia de pequeñas poblaciones aneuploides, de ahí nuestro empeño en seleccionar histogramas de calidad y de que los bloques de parafina contengan tejido de características aproximadamente uniformes (Tabla 1). De cualquier manera, aunque se han establecido algunas guías para la unificación de la terminología usada en citometría de flujo (30, 31), una revisión efectuada por Wersto y cols. (36) de más de 200 artículos publicados que relacionan la ploidía con el comportamiento clínico del cáncer, revela que se han usado criterios muy dispares y a menudo inconsistentes en la evaluación de los histogramas de DNA. Por ejemplo, en algunos estudios la presencia de pequeños *shoulders* a la derecha de la población G_0/G_1 , un pico G_0/G_1 asimétrico o, simplemente, todos los casos dudosos son considerados aneuploides. En este trabajo, estos histogramas sospechosos fueron rechazados (Fig. 1).

Aunque la citometría de flujo ha comenzado a constituirse en un test clínico de rutina en muchas instituciones, la deficiencia más importante en el momento actual es sin duda la falta de uniformidad y control de calidad (22). Se hace imprescindible un conjunto de criterios de valoración aceptados mayoritariamente, así como una metodología uniforme que nos permita extrapolar resultados entre diferentes instituciones, y, desde luego, se están haciendo grandes esfuerzos en este sentido (37-41). En cualquier caso, la posibilidad de procesar con éxito pequeñas muestras tisulares fijadas en formaldehído e incluidas en parafina puede permitir el examen citométrico de series numerosas de pacientes de similares características y, por tanto, la obtención de conclusiones firmes acerca de su posible papel en el manejo de esta enfermedad.

Por lo que respecta a la tinción inmunohistoquímica para la proteína p53, nuestros resultados muestran una correlación muy significativa con las alteraciones histopatológicas, incrementándose el porcentaje de biopsias positivas a medida que aumenta la gravedad de las lesiones. El gen *p53*, situado en el brazo corto del cromosoma 17, parece ser la localización más frecuente de las alteraciones genéticas en el cáncer humano (42). Su producto normal, o proteína p53 tipo salvaje, actúa impidiendo la propagación de células dañadas genéticamente en un paso de control (*checkpoint*) del ciclo celular entre las fases G_1 y S (43, 44). Su vida media es muy corta, por lo que suele ser indetectable con los procedimientos habituales de inmunohistoquímica. Las alteraciones del gen llevan a la expresión de formas mutantes de la proteína, no funcionantes y con una vida media más larga, que, de este modo, pueden ser detectados.

Aunque en este estudio no se ha llevado a cabo una estimación precisa, desde el punto de vista cuantitativo, de la positividad en la tinción para p53, es destacable que esta sobreexpresión no tiende a ser más extensa o evidente ni a presentar un patrón morfológico diferente en casos con lesiones graves que, cuando está presente, en aquellos con alteraciones histológicas menores.

De los datos obtenidos en nuestro estudio puede deducirse que:

- 1) La tinción para p53 permitiría, si es positiva y en casos dudosos, catalogar una determinada muestra como muy probablemente portadora de lesiones en el rango de displasia/carcinoma (aunque no diferenciar

Jose, CA, EE.UU.), que contiene ribonucleasa A. Las mediciones se realizaron con un citómetro de flujo *FACSort*[®] (Becton Dickinson), utilizando el programa informático de análisis *CellFit software*[®] versión 2.0.2 y analizando al menos 10.000 núcleos por muestra (22).

Si se detectó la presencia de excesivos detritos tisulares (>20%) o si el coeficiente de variación del pico G_0/G_1 fue mayor del 8% (23), se reintentó procesar la muestra si quedaba material suficiente; en caso contrario, fue excluida del estudio. Se consideraron como muestras diploides aquellas cuyos histogramas mostraron un solo pico G_0/G_1 definido. Las muestras aneuploides se definieron como aquellas cuyos histogramas presentaban un segundo pico en una localización no esperada para los picos G_0/G_1 o G_2/M (24, 25). Los casos con picos G_0/G_1 asimétricos (casi diploides, no gaussianos) o con pequeños *shoulders* de la población G_0/G_1 (Fig. 1) fueron excluidos (26). No se encontraron tejidos tetraploides (o con fases $G_2/M > 20\%$). El índice de DNA para cada muestra aneuploide fue computado dividiendo el canal medio de la población celular aneuploide por el canal medio de la población celular diploide.

Las 95 medidas citométricas válidas realizadas proporcionaron entre 10.600 y 26.100 núcleos por espécimen (media: 15.800) con un coeficiente de variación medio del 5,3% (rango: 2,7-7,9). La totalidad de las medidas citométricas fueron realizadas por personal del Servicio de Inmunología de este hospital, de modo independiente y sin conocimiento del diagnóstico histopatológico asignado a cada muestra o de los resultados de la tinción inmunohistoquímica.

Detección de la proteína p53

Se utilizó el método de estreptavidina-biotina peroxidasa. Brevemente, tras su desparafinación y rehidratación, las secciones histológicas fueron colocadas en una solución de tampón citrato 10 mM, ajustada a pH 6 y sometidas a 2 pulsos de 5 minutos en horno microondas a 700 W, con un reposo entre ambos de 3 minutos. La actividad peroxidasa endógena fue inhibida tratando el tejido con H_2O_2 al 3%, durante 10 minutos. Todos los lavados tras cada incubación se realizaron con PBS (2 lavados \times 5 minutos). El anticuerpo primario monoclonal anti-p53 utilizado procede del clon DO-7 (*Dako Diagnostics*[®], *Glostup, Denmark*), a una dilución de 1:50; durante 60 mi-

nutos (la solución diluyente empleada contiene un 10% de suero no inmune, de bloqueo; *Biomed*[®] Corp., Roster City, CA, EE.UU.). Tras lavado, se añadió el anticuerpo secundario biotinilado (*Dako Lsab 2 Kit*[®], pre-diluido), y posteriormente se incubaron los cortes con el complejo estreptavidina-peroxidasa (*Dako Lsab 2 Kit*[®]). El cromógeno utilizado fue el aminoetilcarbazol al 3%.

Se utilizaron secciones de un tumor mamario con positividad conocida para p53 como control en cada una de las baterías de tinción, tanto positivo como negativo (en este último caso el fragmento tisular se incubó sin el anticuerpo primario).

La tinción fue valorada, de manera independiente, por un único patólogo, sin conocimiento de los diagnósticos asignados previamente a cada preparación en el examen con hematoxilina-eosina o de los resultados de la citometría de flujo. Los casos fueron etiquetados como positivos para p53 si se demostró cualquier tinción nuclear intensa, evidente, detectada al menos en el 1% de los núcleos del área tisular de interés. Para ello, una vez identificada ésta a bajo aumento, se examinan a gran aumento (400 \times) 10 campos microscópicos al azar, que contengan cada uno de ellos al menos 50 células epiteliales (19) (Fig. 2).

Métodos estadísticos

Para la comparación de proporciones de muestras independientes (por ejemplo, entre la presencia o ausencia de aneuploidía y las alteraciones histopatológicas) y para el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de los distintos parámetros, se realizó un análisis de tablas de contingencia mediante el test χ^2 de Pearson y el subsiguiente análisis de residuos. También se aprovechó este mismo análisis para estudiar la tendencia lineal de las proporciones de resultados patológicos en función de la gravedad histológica. Cuando las frecuencias eran bajas se utilizó el test exacto de Fisher. La comparación de la sensibilidad, especificidad y valor predictivo de ambas técnicas se realizó mediante el test de McNemar.

RESULTADOS

Como se aprecia en la Tabla 2, se observa una estrecha correlación, estadísticamente muy significativa, entre la

29. Esteban JM, Sheibani K, Owens M, Joyce J, Bailey A, Battifora H. *Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis.* Am J Clin Pathol 1991; 95: 460-466.
30. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto LP. *Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal.* Hum Pathol 1989; 20: 528-548.
31. Stephenson RA, Gay H, Fair WL, Malamed MR. *Effect of section thickness on quality of flow cytometric DNA content determinations in paraffin-embedded tissues.* Cytometry 1986; 7: 41-44.
32. Hartmann DP, Montgomery EA, Carr NJ, Gupta PK, Azumi N. *Flow cytometric DNA analysis of ulcerative colitis using paraffin-embedded biopsy specimens: Comparison with morphology and DNA analysis of fresh samples.* Am J Gastroenterol 1995; 90: 590-596.
33. Alanen KA, Joensuu H, Klemi PJ. *Autolysis is a potential source of false aneuploid peaks in flow cytometry DNA histograms.* Cytometry 1989; 10: 417-425.
34. Kubbies M. *Flow cytometric DNA-histogram analysis: Non-stoichiometric fluorochrome binding and pseudoaneuploidy.* J Pathol 1992; 167: 413-419.
35. Joensuu H, Alanen KA, Klemi PJ, Aine R. *Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue.* Cytometry 1993; 14: 472-477.
36. Wersto RP, Liblit RL, Koss LG. *Flow cytometric DNA analysis of human solid tumors: A review of the interpretation of DNA histograms.* Hum Pathol 1991; 22: 1085-1098.
37. Coon JS, Paxton H, Lucy L, Homburger H. *Interlaboratory variation in DNA flow cytometry. Results of the College of American Pathologists' Survey.* Arch Path Lab Med 1994; 118: 681-685.
38. Silvestrini R. *Quality control for evaluation of the S-phase fraction by flow-cytometry: A multicentric study. The SICCAB Group for Quality Control of Cell Kinetic Determinations.* Cytometry 1994; 18: 11-16.
39. Bauer KD. *Quality control issues in DNA content flow cytometry.* Ann NY Acad Sci 1993; 677: 59-77.
40. D'Hautcourt JL, Spyrtos F, Chassevent A. *Quality control study by the French Cytometry Association on flow cytometric DNA content and S-phase fraction (S %). The Association Française de Cytometrie.* Cytometry 1996; 26: 32-39.
41. Baldetorp B, Bendahl PO, Ferno M y cols. *Reproducibility in DNA flow cytometric analysis of breast cancer: Comparison of 12 laboratories results for 67 sample homogenates.* Cytometry 1995; 22: 115-127.
42. Chang F, Syrjanen S, Kurvinen K, Syrjanen K. *The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis.* Am J Gastroenterol 1993; 88: 174-177.
43. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D. *Participation of the p53 protein in the cellular response to DNA damage.* Cancer Res 1991; 51: 6304-6311.
44. Lane DP. *p53, guardian of the genome.* Nature 1992; 358: 15-17.

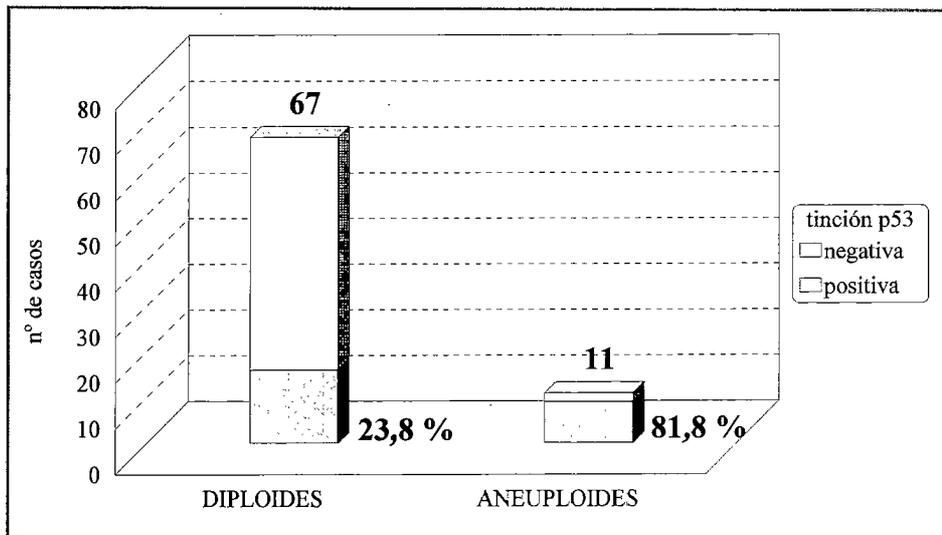


Figura 3. Correlación entre la presencia de aneuploidía y los resultados de la tinción inmunohistoquímica para p53.

Recíprocamente, si una biopsia presenta una tinción positiva, la probabilidad de que el cuadro histológico sea de displasia o carcinoma es del 100% (valor predictivo positivo). Si la inmunotinción es negativa, la probabilidad de que la biopsia sea histológicamente normal es del 78,9% (valor predictivo negativo).

Los valores obtenidos para la sensibilidad y el valor predictivo negativo de la tinción para p53 son, como vemos, superiores a los obtenidos para la detección de un pico aneuploide en la citometría de flujo (aunque sólo en cuanto a la sensibilidad estas diferencias alcanzan significación estadística: $p < 0.05$; test de McNemar). Por lo que respecta a la citometría de flujo, lógicamente, al estar concentrados los casos aneuploides entre las lesiones más graves, se observa un notable incremento de estos valores en la detección de este último tipo de alte-

raciones. Así, la sensibilidad y valor predictivo negativo para la detección de lesiones de displasia de alto grado y/o carcinoma son del 75% y 90,9%, respectivamente. En la detección de adenocarcinoma estos valores ascienden a 81,8% y 95,2%, respectivamente.

DISCUSIÓN

Se ha afirmado que la aneuploidía es probablemente el reflejo de una inestabilidad genómica que, en caso de persistir en el tiempo, puede culminar en un cáncer (27). De hecho, aparte de los adenocarcinomas (9 de los 11 procesados), únicamente otros 3 pacientes presentaron aneuploidías en su mucosa esofágica en ausencia de carcinoma. En todos ellos se trata de pacientes con lesiones de displasia de alto grado en los que una nueva toma biopsica realizada poco tiempo después (entre 1 y 6 meses) mostró la presencia de una degeneración neoplásica no detectada previamente. Nosotros no hemos encontrado ningún caso de aneuploidía entre los pacientes con metaplasia de Barrett simple o con alteraciones histopatológicas menores, resultados concordantes con los obtenidos por algunos autores (15, 16), aunque no con otros (11-14), tanto en éste como en otros tejidos (28). Así pues, tal y como ha sido definido en nuestro trabajo, la existencia de un histograma aneuploide en la citometría de flujo se nos presenta como un marcador estrechamente relacionado con la presencia de un cambio

Tabla 3. Resultados obtenidos en el cálculo de la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de ambas técnicas (los datos se expresan en porcentajes).

| Discriminación sin displasia frente a displasia + carcinoma | Citometría de flujo | |
|---|------------------------|-------------|
| | | Tinción p53 |
| Sensibilidad | 40 | 70,3 |
| Especificidad | 100 | 100 |
| Valor predictivo positivo | 100 | 100 |
| Valor predictivo negativo | 69 | 78,9 |

remoto, emisor de las imágenes (3, 4). Estos sistemas de alta calidad presentan esencialmente dos limitaciones. En primer lugar su elevado coste, especialmente a la hora de disponer de líneas de transmisión con ancho de banda suficiente para soportar la transmisión de vídeo de calidad. La segunda limitación es que se trata, en general, de sistemas cerrados. La comunicación se establece entre dos puntos, o entre una pequeña red de nodos donde se han situado las líneas especiales de comunicación.

Para intentar superar estas dos limitaciones hemos desarrollado un sistema de telepatología con dos características básicas: su sencillez y bajo coste, y su aplicación prácticamente ilimitada, extensible a cualquier patólogo del mundo a través de la red Internet.

Para ello hemos utilizado como origen de las comunicaciones un ordenador de prestaciones domésticas conectado a un microscopio convencional, y con la única adición de una cámara de vídeo para obtener las imágenes y una sencilla tarjeta digitalizadora que las incorpore al ordenador. El *software* empleado es de distribución gratuita (*freeware*) y de bajo coste (*shareware*). Se trata de un sistema que optimiza la transmisión de imágenes a través de líneas telefónicas convencionales de 33,6 Kb/s, permitiendo recibir secuencias de imágenes estáticas con una frecuencia del orden de 1-2 por segundo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las comunicaciones mantenidas se establecían esencialmente entre dos ordenadores. El receptor es potencialmente cualquier ordenador que disponga de conexión a Internet. No necesita ningún tipo de *software* específico, pues las imágenes llegan a su pantalla a través del navegador de Internet.

El ordenador emisor empleado ha sido un PC con procesador Intel Pentium a 166 MHz, con 64 Mb de memoria RAM y tres discos duros con una capacidad global de 7,4 Gb, y un monitor de 17". El sistema operativo empleado ha sido Windows 95 (4.00.950a) y disponíamos de una instalación en el mismo de servidor de Internet (Microsoft *Personal Web Server*, versión 4.02.0602), obtenido de forma gratuita en la siguiente dirección de Internet: <http://www.microsoft.com/ie/download/?/msdownload/ieplatform/pws/pws.htm>. La instalación de este servidor está automatizada y únicamente requiere para Windows 95

la actualización del Winsock a la versión 2, que obtuvimos también de forma gratuita en la siguiente dirección: <ftp://ftp.microsoft.com/bussys/winsoc/winsoc2/>

Las imágenes se obtenían de un microscopio Nikon Labophot 2A, al que se le conectó una cámara de vídeo en color Sony SSC-C370P, con una resolución de 470 líneas de TV y un sensor de 752 x 582 elementos de imagen. La cámara transmite las imágenes al ordenador a través de una tarjeta digitalizadora (ComputerEyes/PCI) insertada en una de la ranuras de expansión del ordenador de tipo PCI. Las imágenes se envían a una página web diseñada en formato HTML, localizada en el propio ordenador, y accesible desde Internet a través del PWS. El *software* que comprime la imagen a formato .jpg y la envía de forma continua a la página web diseñada es WebCam32, versión 4.7.1. Se trata de un programa *shareware* (*software* con un periodo gratuito de evaluación de 30 días antes de su compra) con un precio de 25 dólares y que obtuvimos en la siguiente dirección de Internet: <http://www.kolban.com/webcam32/>

Este programa permite escoger la resolución de las imágenes hasta un máximo de 720 x 576 píxels, equivalente a la resolución PAL que aporta la cámara. El nivel de compresión de las imágenes en formato .jpg es también configurable, y hemos empleado preferentemente compresiones del 70%. Un elemento importante de este programa es la posibilidad de utilización de la denominada tecnología *server push*, que es la que permite que las imágenes se actualicen de forma continua en el navegador de Internet del equipo receptor conforme se van recibiendo.

El ordenador emisor estaba conectado a Internet a través de una RDSI con dos canales de 64 Kb/s de capacidad. Uno de ellos se empleaba para la transmisión de imágenes mientras que con el otro se mantenía simultáneamente una conexión telefónica con voz con el receptor. Todos los ordenadores receptores en que se ensayó el sistema disponían de conexiones de telefonía convencional a Internet con capacidad máxima de transferencia de datos de 33,6 Kb/s.

FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

El sistema se utilizó funcionando de la siguiente forma. Inicialmente se establece una conexión telefónica con voz entre emisor y receptor. Ambos conectan con Internet y

estas últimas entre sí: bajo grado, alto grado y carcinoma).

- 2) Con el examen citométrico, por el contrario, el descubrimiento de una línea celular aneuploide nos indicaría que estamos ante un proceso neoplásico ya avanzado en su historia natural.
- 3) Aunque, como vemos, ambos métodos pueden ser complementarios, si tenemos en cuenta la simplicidad técnica, el bajo coste y la rapidez de ejecución de la tinción para p53, un procedimiento al alcance de la mayoría de laboratorios de anatomía patológica. Si todo ello se une a su superior sensibilidad en la detección de lesiones displásicas, parece evidente que el uso de esta inmunotinción podría desempeñar un papel destacado, a corto plazo, en la evaluación de los pacientes con esófago de Barrett.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido patrocinado por la Fundación Isabel Gómez Aroca (Real Academia de Medicina y Cirugía de Murcia).

BIBLIOGRAFÍA

1. Phillips RW, Wong RKH. *Barrett's esophagus: Natural history, incidence, etiology and complications*. Gastroenterol Clin North Am 1991; 20: 791-816.
2. Winters C, Spurling TJ, Chobanian SJ y cols. *Barrett's oesophagus. A prevalent occult complication of gastro-oesophageal reflux*. Gastroenterology 1987; 92: 118-124.
3. Haggitt RC, Tryzelaar J, Ellis FH, Colcher H. *Adenocarcinoma complicating columnar epithelium-lined (Barrett's) esophagus*. Am J Clin Pathol 1978; 70: 1-5.
4. Sarr MG, Hamilton SR, Marrone GC, Cameron JL. *Barrett's esophagus: Its prevalence and association with adenocarcinoma in patients with symptoms of gastroesophageal reflux*. Am J Surg 1985; 149: 187-193.
5. Naef AP, Savary M, Ozello L. *Columnar-lined lower esophagus: An acquired lesion with malignant predisposition*. J Thorac Cardiovasc Surg 1975; 71: 826-835.
6. Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. *The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus*. N Engl J Med 1985; 313: 857-901.
7. Williamson WA, Ellis FH Jr, Gibb SP, Shanian DM, Aretz HT, Heatley GJ. *Barrett's esophagus. Prevalence and incidence of adenocarcinoma*. Arch Intern Med 1991; 151: 2212-2216.
8. Hameeteman W, Tytgat GNJ, Houthoff HJ, van den Tweel JG. *Barrett's esophagus: Development of dysplasia and adenocarcinoma*. Gastroenterology 1989; 96: 1249-1256.
9. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE y cols. *Observer variation in the diagnosis of dysplasia in Barrett's esophagus*. Hum Pathol 1988; 19: 166-178.
10. Sagan C, Flejou JF, Diebold MD, Potet F, Le Bodic MF. *Reproducibility of histological criteria of dysplasia in Barrett's esophagus*. Gastroenterol Clin Biol 1994; 18: 31-34.
11. Reid BJ, Haggitt RC, Rubin CE, Rabinovitch PS. *Barrett's esophagus. Correlation between flow cytometry and histology in detection of patients at risk of adenocarcinoma*. Gastroenterology 1987; 93: 1-11.
12. Fennerty MB, Sampliner RE, Way D, Riddell R, Steinbroon K, Garewal HS. *Discordance between cytometric abnormalities and dysplasia in Barrett's esophagus*. Gastroenterology 1989; 97: 815-820.
13. Herman RD, McKinley MJ, Bronzo RL y cols. *Flow cytometry and Barrett's esophagus*. Dig Dis Sci 1992; 37: 635-637.
14. Sciallero S, Giaretti W, Bonelli L. *DNA content analysis of Barrett's esophagus by flow cytometry*. Endoscopy 1993; 25: 648-651.
15. Menke-Pluymers MBE, Mulder AH, Hop WCJ (The Rotterdam Oesophageal Tumor Study Group). *Dysplasia and aneuploidy as markers of malignant degeneration in Barrett's oesophagus*. Gut 1994; 35: 1348-1351.
16. Robaszkiewicz M, Hardy E, Volant A y cols. *Analyse du contenu cellulaire en ADN par cytométrie en flux dans les endobrachyoesophages. Étude de 66 cas*. Gastroenterol Clin Biol 1991; 15: 703-710.
17. Imazeki F, Omata M, Nose H. *p53 gene mutation in gastric and esophageal cancers*. Gastroenterology 1992; 103: 892-896.
18. Hardwick RH, Shepherd NA, Moorghen M, Newcomb PV, Alderson D. *Adenocarcinoma arising in Barrett's esophagus: Evidence for the participation of p53 dysfunction in the dysplasia/carcinoma sequence*. Gut 1994; 35: 764-768.
19. Jones DR, Davidson AG, Summers CL, Murray GF, Quinlan DC. *Potential application of p53 as an intermediate biomarker in Barrett's esophagus*. Ann Thorac Surg 1994; 57: 598-603.
20. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF. *Dysplasia in inflammatory bowel disease: Standardized classification with provisional clinical applications*. Hum Pathol 1983; 14: 931-968.
21. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW. *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin embedded pathological material using flow cytometry*. J Histochem Cytochem 1983; 31: 1333-1335.
22. Brown RD, Linden MD, Mackowiak P, Kubus JJ, Zarbo RJ, Rabinovitch PS. *The effect of number of histogram events on reproducibility and variation of flow cytometric proliferation measurement*. Am J Clin Pathol 1995; 105: 696-704.
23. Shankey TV, Rabinovitch PS, Bagwell B. *Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry*. Cytometry 1993; 14: 472-477.
24. Hiddemann W, Schuman J, Andreef M. *Special report. Convention on nomenclature for DNA cytometry*. Cytometry 1984; 5: 445-446.
25. Hiddemann W, Schumann J, Andreef N. *Convention on nomenclature for DNA flow cytometry*. Cancer Genet Cytogenet 1984; 13: 181-183.
26. Weaver DL, Bagwell CB, Hitchcox SA y cols. *Improved flow cytometric determination of proliferative activity (S-phase fraction) from paraffin-embedded tissue*. Am J Clin Pathol 1990; 576-584.
27. Reid BJ, Sánchez CA, Blount PL, Levine DS. *Barrett's esophagus: Cell cycle abnormalities in advancing stages of neoplastic progression*. Gastroenterology 1993; 105: 119-129.
28. Kahn MA, Dockter ME, Hermann-Petrin JM. *Flow cytometer analysis of oral premalignant lesions: A pilot study and review*. J Oral Pathol Med 1992; 21: 1-6.

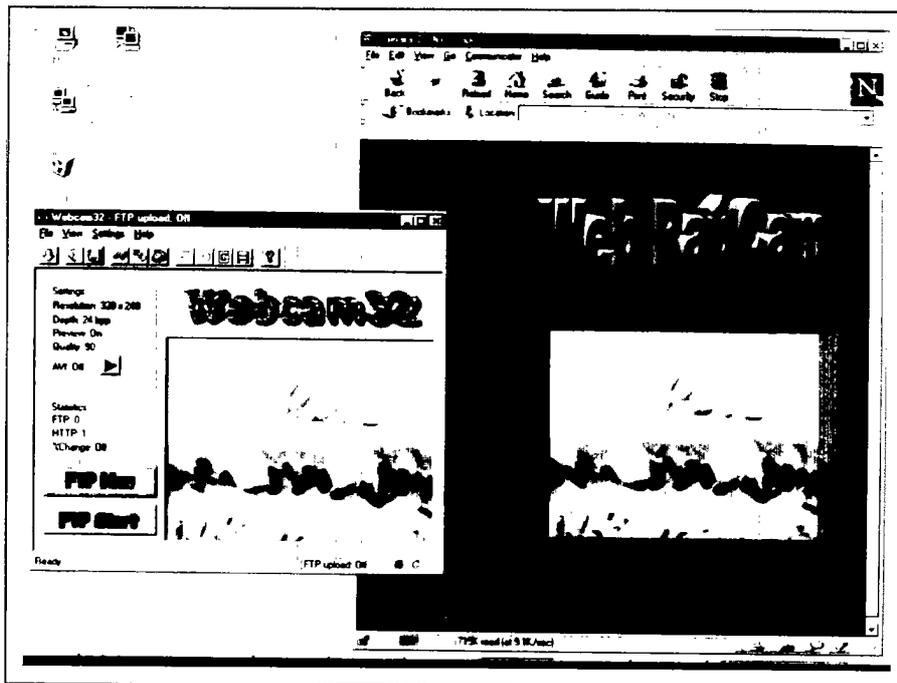


Figura 2. Pantalla del ordenador emisor. Izqda.: ventana del programa WebCam32 que captura, comprime y envía las imágenes. Dcha.: ventana de la página web que está recibiendo simultáneamente el receptor.

//www.geocities.com) y realmente la pérdida de velocidad del sistema es muy escasa. La única variación necesaria para este segundo procedimiento es modificar el código de la página web (Tabla 1) sustituyendo la dirección del servidor emisor por la dirección IP de la conexión a Internet del ordenador emisor, e indicar al receptor la dirección de la página web que tiene que teclear para acceder al servidor remoto (Geocities en nuestro ejemplo) donde llegan las imágenes.

DISCUSIÓN

Desde el principio de esta década han surgido diversos sistemas de telepatología. En muchos casos venían justificados por necesidades de índole geográfica (5) o de carencia de patólogos en lugares remotos, como entre los pioneros noruegos en el desarrollo de estos sistemas en Europa (6). Existen diversos estudios que intentan demostrar la validez de los diagnósticos anatomopatoló-

Tabla 1. Código HTML de la página web.

```
<HTML>
<HEAD>
<TITLE>cámara 1</TITLE>
</HEAD>
<BODY bgcolor="#000000" font text="#ffff00" link="#999999" vlink="#999999" alink="#999999">
<center>
<BR><A HREF="mailto:lalfaro@ctv.es"><IMG SRC="http://ordenador_emisor:puerto" border=25></A>
</center>
<P><BR>
<HR size=5>
<font size=-1>Luis Alfaro Ferreres</font>
</BODY>
</HTML>
```