

Utilidad diagnóstica de la detección de mutaciones en el gen *c-K-ras* en masas pancreáticas

A. Villanueva, G. Reyes, M. Cuatrecasas*, E. Musulén*, J. Balart, E. Lerma*, A. Farré, F. Lluís y G. Capellá

Laboratorio de Investigación Gastrointestinal y *Servicio de Anatomía Patológica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Introducción

A lo largo de los últimos 6 años, se ha puesto en evidencia que la transformación neoplásica es el resultado de la acumulación de varias alteraciones genéticas que comportan la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales. Los oncogenes son las formas activadas de genes —protooncogenes— que desempeñan un papel importante en el control de la proliferación y diferenciación celular normal¹. Su activación comporta de forma dominante la aparición de la neoplasia. Los genes supresores tumorales regulan de forma negativa estos procesos y es la ausencia de su función —su inactivación— la que permite el desarrollo de la neoplasia². Vogelstein et al han demostrado convincentemente que, en el carcinoma colorrectal, se requiere que la célula neoplásica acumule entre 4 y 6 alteraciones genéticas para que el tumor alcance proporciones macroscópicas³.

Son diversas las alteraciones genéticas (vg. translocaciones, amplificaciones, deleciones o mutaciones puntuales) que pueden resultar en la activación de los oncogenes o en la inactivación de los genes supresores tumorales. Las mutaciones puntuales —los cambios en la secuencia de un solo par de bases— son las que se encuentran con mayor frecuencia. También, son las más sutiles y, por tanto, las más difíciles de detectar.

Los 3 miembros de la familia de protooncogenes *ras* (*c-H-ras*, *N-ras*, *c-K-ras*) son los oncogenes más frecuentemente activados en tumores humanos⁴. Son genes altamente conservados a lo largo de la evolución que codifican proteínas ligadas a la membrana (p21). Estas proteínas, que poseen una alta afinidad por GTP y GDP, desempeñan un papel importante en la traducción intracelular de señales⁵. Al unirse a GTP, las proteínas *ras* adoptan su conformación activa, que pierden al unirse a GDP. Cuando la proteína *ras* está activada, otra

proteína, la GAP, potencia su inactivación al estimular la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas *ras*. El potencial maligno de estos oncogenes se activa mediante mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y 61. Estas mutaciones condicionan que la proteína se active de forma constitutiva y no esté sometida a la regulación por la proteína GAP⁶.

El cáncer de páncreas (CP) exocrino es una neoplasia frecuente en nuestro medio. En Catalunya, su incidencia ha ido aumentando en los últimos años hasta situarse en 8 casos por cada 100.000 habitantes y año⁷. En la actualidad, el CP es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo occidental⁸. El diagnóstico de esta neoplasia es difícil; la mayoría de pacientes con CP presentan estadios tumorales avanzados. Más del 90% de los tumores malignos del páncreas son adenocarcinomas de origen ductal. Su grado de diferenciación es variable, presentan una abundante producción de mucina y suelen estar rodeados de un denso tejido fibroso. En el 65% de los casos se localizan en la cabeza, en el 30% en el cuerpo y cola y en el 5% restante exclusivamente en la cola. Más del 80% de los pacientes que ingresan en un hospital con el diagnóstico de CP deben ser intervenidos, pero sólo en un 8% de casos la cirugía se realiza con intención curativa. La supervivencia media después del diagnóstico es de unos 6 meses y no ha variado en los últimos 30 años⁹.

En pacientes con sospecha clínica de CP los métodos de diagnóstico por la imagen (ecografía o tomografía axial computarizada [TAC]) son los que proporcionan una mayor eficacia diagnóstica, y permiten una valoración de la extensión locorregional (afectación ganglionar, invasión retroperitoneal) y a distancia (metástasis hepáticas) del tumor^{10,11}. En el momento del diagnóstico sólo el 15% de los tumores está localizado en la glándula pancreática, en un 25% aparece invasión locorregional y en el 60% res-

tante existe invasión local con presencia de metástasis a distancia. Tanto la ecografía¹² como la TAC¹³ permiten la punción-aspiración percutánea de cualquier masa pancreática y la obtención de un material que posibilita un diagnóstico histológico definitivo en una proporción importante de los pacientes¹⁴. Cuando la punción confirma el diagnóstico se puede indicar la resección quirúrgica o un procedimiento paliativo según la clínica y la diseminación local del tumor. En casos de cáncer avanzado puede evitar una laparotomía innecesaria. En ocasiones, la laparotomía exploradora y la biopsia quirúrgica son necesarias para poder establecer el diagnóstico. En esta situación, la punción intraoperatoria es una alternativa segura y rápida a la biopsia en cuña o la punción con trocar de mayor calibre (*tru-cut*).

El material obtenido mediante punción-aspiración biopsia percutánea en tumores pancreáticos es la primera muestra que se obtiene de este tumor y, a menudo, es el único tejido disponible para realizar el estudio histopatológico. A pesar de la alta sensibilidad del examen citológico del material fresco y en bloque celular, el citopatólogo no siempre puede proporcionar un diagnóstico definitivo. La posibilidad de incrementar la sensibilidad de la evaluación del material obtenido mediante punción puede ayudar a evitar laparotomías exploradoras y a programar mejor la táctica quirúrgica de estos pacientes.

Estudios previos han demostrado que la mayoría (70-90%) de los carcinomas de páncreas exocrino en el hombre contienen una mutación en el codón 12 del gen *c-K-ras*^{15,16}. Esta alta frecuencia sugiere que la activación mutacional del gen *c-K-ras* es un episodio importante en la carcinogénesis pancreática humana. La elevada incidencia de la mutación y su especificidad tumoral¹⁷ hacen de esta alteración genética un posible marcador tumoral tisular. El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP)¹⁸ ha facilitado el análisis molecular de muestras obtenidas de forma rutinaria en la clínica¹⁹. Basándose en esta tecnología se ha podido detectar la presencia de mutaciones en el gen *c-K-ras* en el material obtenido mediante punción—intraoperatoria o percutánea—de carcinomas del páncreas exocrino^{20,21}. Los resultados de estos estudios previos sugerían que la detección de las mutaciones podría complementar, en algunas ocasiones, el diagnóstico citológico clásico. Sin embargo, no se han realizado, hasta el momento, estudios clínicos que cuantifiquen la utilidad diagnóstica del es-

tudio de las mutaciones *ras* en este material celular. En el presente estudio hemos analizado, de forma retrospectiva, la utilidad de las mutaciones *ras* en la valoración del material obtenido mediante punción-aspiración percutánea con aguja fina de masas pancreáticas bajo control radiológico que fueron realizadas de forma consecutiva en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Material y métodos

Se analizó, de forma retrospectiva, el material obtenido de 97 punciones-aspiraciones percutáneas con aguja fina de 77 masas pancreáticas. Todas las punciones se realizaron bajo control ecográfico o de TAC, en nuestro hospital y de forma consecutiva, en el período comprendido entre enero de 1985 y diciembre de 1991. En 13 pacientes se analizó el material obtenido de 2 o más punciones independientes. La edad media de la población estudiada fue de $62,1 \pm 13,3$ años. Su distribución por sexos fue de 40 varones y 37 mujeres. El seguimiento clínico de todos los pacientes ha sido actualizado a febrero de 1993.

Criterios diagnósticos de cáncer de páncreas

Los criterios para establecer el diagnóstico de cáncer de páncreas fueron: a) biopsia quirúrgica con presencia de células neoplásicas; y/o b) fallecimiento dentro del primer año después del diagnóstico con curso clínico compatible con cáncer diseminado. Sesenta y seis de los 77 pacientes (84%) cumplían estos criterios. Los otros 11 pacientes eran portadores de patología benigna: 6 pancreatitis crónicas, 3 masas no filia-das de resolución espontánea, 2 pseudoquistes y un cistadenoma microquístico.

Diagnóstico citológico

La punción-aspiración se obtuvo con agujas de punción epidural de 15-20 cm de diámetro 22G. La aspiración se realizó con jeringas de 10 ml. Con una porción del material aspirado se realizan extensiones directas. Éstas se procesaron siguiendo dos procedimientos: tinción Giemsa tras secado al aire y tinción de Papanicolaou tras fijación con etanol. El resto del material obtenido se colocó en una solución del 50% de agua/etanol. Tras centrifugación, el sedimento obtenido se procesó como bloque celular incluido en parafina. Los cortes se examinaron tras tinción con hematoxilina-eosina. El

diagnóstico morfológico se basó en el examen de las muestras siguiendo criterios citopatológicos clásicos y fueron revisados por el mismo patólogo.

Extracción de DNA de muestras fijadas y conservadas en parafina

El tejido se caracterizó mediante la tinción con hematoxilina-eosina de una sección de 5-10 μm . Se cortaron un número variable (15-20) de secciones de 25 μm que se colocaron en un tubo de Eppendorf. Las muestras fueron desparafinadas con Xylool y desecadas con etanol al 100%. Se incubaron en un tampón de digestión (25-50 μg de proteinasa K diluidos en 50-100 ml de 100 mM Tris a un pH 8,2 y 10 mM de solución EDTA) a 37 °C durante 14-18 horas. Las muestras se mantuvieron en ebullición durante 10 min y se centrifugaron. Finalmente una alícuota de la muestra se utilizó para amplificación (fig. 1).

Detección de mutaciones mediante polimorfismos de los fragmentos de restricción introducidos de forma artificial en los productos amplificados (RFLP/RPC artificial)

La presencia de las mutaciones se detectó mediante los polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) que se han introducido de forma artificial utilizando oligonucleótidos iniciadores (*primers*) mutados. Esta modificación de la técnica de la RPC fue descrita inicialmente por Kumar y Barbacid para detectar mutaciones en el codón 12 del gen *c-H-ras*²². La metodología de los RFLP/RPC artificial fue adaptada posteriormente por Jiang et al para detectar mutaciones en los codones 12 y 13 del gen *c-K-ras*²³. Capellá et al²⁴ han descrito una modificación de esta técnica para detectar mutaciones en el codón 12 del gen *c-K-ras* (fig. 2). Se amplificó un fragmento del primer exón del gen *c-K-ras* utilizando los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) 5'GAGAAGCTTATGTGTGACATGTCTA 3' y 5' GAAGGATCCTGCAGTAA-TATGCA 3' durante 15 ciclos (50 °C, 35 seg; 72 °C, 1 min, 25 seg; 92 °C, 1 min, 4 seg) (RPC 1). Un μl del producto amplificado se reamplificó siguiendo la técnica de la RPC anidada con los oligonucleótidos iniciadores mutados 5' CCTGGTGAAAATGACTGAAT 3' y 5' AGGCACTCTTGCTACGTCA 3' durante 30 ciclos (50 °C, 15 seg; 72 °C, 30 seg; 92 °C, 15 seg). El oligonucleótido superior crea un nuevo sitio de restricción para la enzima HphI

[GGTGA], que servirá como control interno de la digestión enzimática. El oligonucleótido iniciador inferior, al cambiar la segunda base del codón 13 (G→A), crea un nuevo sitio de restricción para HphI que se perderá siempre que ocurra una mutación en las dos primeras bases del codón 12. Las mutaciones en la tercera posición del codón no se consideran ya que el oligonucleótido introduce una T en esta localización.

Después de la digestión enzimática del fragmento amplificado, siguiendo las instrucciones del proveedor, las muestras se corren en un gel de poliacrilamida al 10%. La aparición de una banda de 48 pares de bases demuestra el alelo mutado y la banda de 40 pares de bases el alelo normal. Utilizando esta técnica se puede detectar la presencia del alelo mutado, aunque sólo esté presente en 5 de cada 100 células analizadas. Este método no necesita isótopos radiactivos y permite obtener el resultado en un plazo de 48-72 h.

Una muestra se consideró no amplificable—no valorable— tras intentar la amplificación, sin éxito, un mínimo de tres ocasiones. La presencia o ausencia de la mutación se basó en la obtención de resultados consistentes en tres experimentos independientes.

Resultados

Examen citológico de la extensión en fresco y del bloque celular

Sólo en dos de los 77 casos el examen citológico consideró la muestra no valorable (tabla I). Sin embargo, la citología no siempre proporcionó un diagnóstico cierto. En 12 ocasiones el dictamen fue indicativo de presencia de células malignas y el patólogo solicitó una nueva muestra. En 11 de estos 12 casos sospechosos el diagnóstico clínico final fue carcinoma ductal de páncreas (tabla I). En 4 casos (una citología maligna, dos sospechosas y una negativa) el diagnóstico se basó exclusivamente en el examen de la extensión mientras que en 6 casos (4 citologías malignas, dos negativas) sólo el bloque celular fue informativo.

Detección de mutaciones en el gen c-K-ras en punciones aspiraciones biopsia de masas pancreáticas

El análisis de la mutación sólo se ha realizado en DNA extraído del bloque celular. En 12

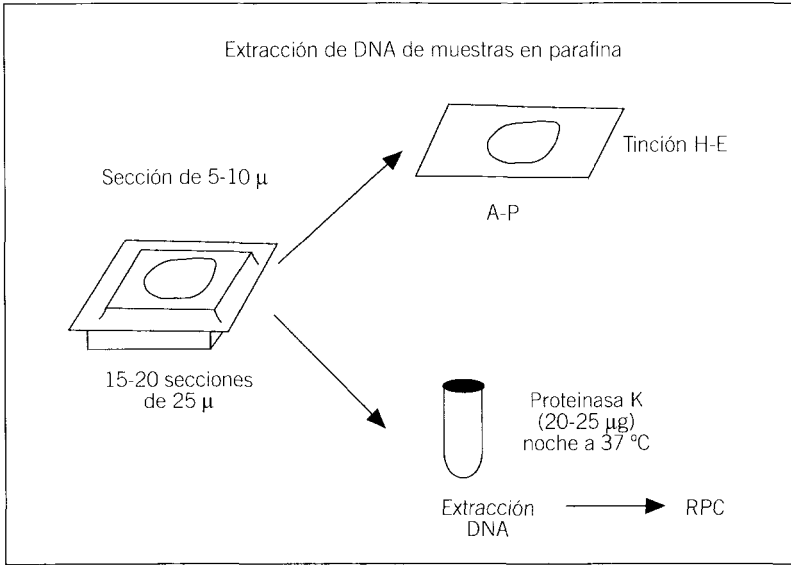


Fig. 1. Representación esquemática de la extracción de DNA de material celular conservado como bloque de parafina (véase "Material y métodos").

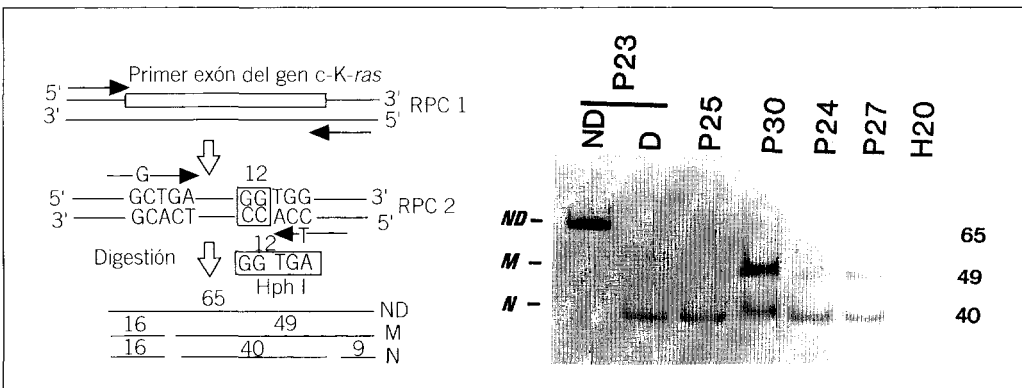


Fig. 2. Detección de las mutaciones en el codón 12 del gen c-K-ras mediante polimorfismos de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RPC) (véase "Material y métodos"). Después de una primera amplificación (RPC 1) que engloba todo el primer exón del gen c-K-ras, un μ l del producto amplificado se reamplificó (RPC 2) siguiendo la técnica de la RPC anidada con oligonucleótidos iniciadores (primers) mutados. El oligonucleótido superior crea un nuevo sitio de restricción para la enzima HphI [GGTGA], que servirá como control interno de la digestión enzimática. El oligonucleótido inferior crea un nuevo sitio de restricción para HphI que se perderá siempre que ocurra una mutación en las dos primeras bases del codón 12. Después de la digestión enzimática del fragmento amplificado, las muestras se corren en un gel de poliacrilamida al 10% y se procede a tinción de bromuro de etidio; P23: DNA obtenido de material celular proveniente de una masa pancreática benigna; ND: producto amplificado no digerido, y D: el producto después de la digestión enzimática; P25: punción de carcinoma de páncreas con células neoplásicas negativas para la mutación; P30: punción de masa pancreática de un paciente con curso clínico compatible con cáncer de páncreas. El citopatólogo sólo evidenció células de apariencia benigna. Sin embargo, las células contenían la mutación; P24 y 27: punciones de masas pancreáticas que contenían células neoplásicas que eran positivas para la mutación.

TABLA I
 RENDIMIENTO DEL DIAGNÓSTICO
 CITOLÓGICO Y MOLECULAR

	<i>Citología (%)</i>	<i>c-K-ras (%)</i>
Material no valorable	2 (2,5)	12 (15,3)
Material sospechoso*	12 (16,6)	0
Dictamen suficiente	63 (81,9)	65 (84,7)

* En 11 de los 12 casos sospechosos el diagnóstico clínico fue carcinoma de páncreas. En el otro caso el diagnóstico final es de cistadenoma microquístico.

casos (15%) no fue posible obtener amplificación del DNA extraído de los bloques (tabla I); en 2 casos no había células en el bloque y el diagnóstico se basó en la revisión de la extensión celular; en otros 2 casos el contenido celular era escaso, y en otros 2 casos había contaminación significativa de sangre, que puede inhibir la reacción enzimática de amplificación; en los 6 casos restantes, el bloque contenía abundante material celular. En siete de estos 12 casos la citología fue considerada maligna, en 3 casos benigna y en 2 casos no valorable.

La mutación en el gen *c-K-ras* se detectó en 36 de los 65 (58%) bloques celulares provenientes de pacientes con CP y en ninguno de los 12 pacientes con patología benigna analizados (tabla II). De los 42 bloques celulares con células malignas, sólo 35 contenían DNA amplificable. Veinticinco de los 34 (75,3%) bloques evaluables contenían el alelo mutado. De los 9 bloques con células sospechosas, todos se amplificaron y sólo seis (66,6%) eran positivos por la mutación. La mutación se detectó en el

50% de los bloques con células benignas y no valorables citológicamente en los que fue posible amplificar DNA.

Es posible estimar la incidencia de mutaciones en el gen *c-K-ras* en los carcinomas de páncreas analizados si se valoran los casos con citología positiva y los casos con mutación presente en las células (tabla III). De las 45 punciones con bloque que contenía células malignas, 36 (80,0%) eran positivas para la mutación.

Sensibilidad y especificidad de las técnicas

Para la valoración de las características operativas de estas técnicas —sensibilidad y especificidad— se han considerado los casos sospechosos como falsos negativos y no se han incluido los casos valorables²⁵. El examen citológico de la extensión y del bloque celular, sobre un total de 75 casos, presenta una sensibilidad del 67,1%, sin falsos positivos (tabla IV). La detección de las mutaciones posee una sensibilidad similar (65,4%), y tampoco aporta falsos positivos. La sensibilidad de los dos métodos combinados aumenta hasta el 80,3% y permite ofrecer un dictamen en todos los casos. La eficiencia diagnóstica, que valora de forma combinada sensibilidad y especificidad, es también superior (83%) al combinar las dos técnicas.

La detección de las mutaciones hubiera sido de utilidad en 10 casos (12,9%) (tabla V). Estos 10 casos se dividen en tres grupos. Las 2 muestras en las que la extensión y el bloque no fueron valorables citológicamente contenían el oncogén *c-K-ras* mutado. De los 21 falsos negativos de la citología, la utilidad varía según el dictamen citológico. De los 12 casos etiqueta-

 TABLA II
 INCIDENCIA DE LA MUTACIÓN SEGÚN EL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DEL BLOQUE CELULAR*

<i>Diagnóstico clínico</i>	<i>Número</i>	<i>Amplificable (%)</i>	<i>ras</i>	<i>Porcentaje</i>
Cáncer de páncreas	65	56 (86,1)	36	64,2
Citología maligna	42	35	25	71,4
Citología sospechosa	9	0	6	66,6
Citología benigna	8	6	3	50,0
No valorable	6	4	2	50,0
Patología benigna	12	9 (75,0)	0	
Citología atípica	1	0		
Citología benigna	11	9		
Total	77	65	36	

* El análisis de la mutación se ha realizado en DNA extraído del bloque celular. Los porcentajes se expresan sobre el total de bloques amplificables.

TABLA III
INCIDENCIA DE LA MUTACIÓN EN LOS CARCINOMAS DE PÁNCREAS

	Número	ras (%)
Bloque con células malignas demostradas	45*	36 (80,0)
Citología maligna		25
Citología sospechosa		6
Citología benigna		3
Citología no valorable		2

*En 34 casos la citología fue maligna y en 11 casos la mutación confirmó la presencia de células neoplásicas en el bloque celular.

TABLA IV
SENSIBILIDAD-ESPECIFICIDAD DEL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO Y MOLECULAR*

	Citología (n = 75)*	c-K-ras (n = 65)**	Citología + c-K-ras (n = 77)***
Verdadero P	43	36	53
Falso N	21	19	13
Sensibilidad	67,1%	65,4%	80,3%
Falso P	0	0	0
Verdadero N	11	10	11
Especificidad	100%	100%	100%
Eficiencia	72,0%	70,7%	83,1%

*En el análisis de sensibilidad (VP/VP + FN) y especificidad (FP/FP + VN) de cada método se han incluido los casos sospechosos como falsos negativos y no se han incluido los no valorables. La eficiencia diagnóstica se calcula siguiendo la fórmula (VP + VN/TOTAL); *2 casos no valorables; **12 casos no valorables; *** todos los casos fueron valorables.

TABLA V
APORTACIÓN DE LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN C-K-RAS
AL DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

	Citología	Citología + c-K-ras	Contribución de las mutaciones
VP	43	53	10
Material no valorable	2	0	2
FN	21	13	8
Sospechoso	(12)	(6)	(6)
Resto	(9)	(7)	(2)

dos como sospechosos, seis eran positivos para la mutación y se confirmó la existencia de células malignas. Finalmente, de los 9 casos etiquetados como benignos, en dos el análisis de las mutaciones detectó células neoplásicas.

Discusión

La alta incidencia de las mutaciones en el gen c-K-ras en carcinomas del páncreas exocrino y su especificidad tumoral hacen de esta alteración genética un posible marcador tumoral ti-

sular. En el presente trabajo hemos demostrado, en un grupo homogéneo de pacientes atendidos de forma consecutiva en nuestro centro, que el análisis molecular del material obtenido mediante punción-aspiración biopsia de masas pancreáticas puede aumentar la sensibilidad del examen citológico. Para ello hemos utilizado una modificación de la técnica original de la RPC, que permite detectar mutaciones puntuales con una elevada sensibilidad.

La punción-aspiración con aguja fina de masas pancreáticas permite un diagnóstico segu-

ro, rápido, exacto y económico en una proporción importante de los casos. Si se consideran los casos sospechosos como falsos negativos, la sensibilidad citológica de la punción aspiración biopsia intraoperatoria oscila entre el 72-100%, mientras que la percutánea desciende al 50-81%. Con el objeto de incrementar la sensibilidad citológica de esta técnica diversos autores evalúan de forma combinada una extensión en fresco y, posteriormente, un bloque celular de parafina. En nuestra experiencia la sensibilidad del examen citopatológico combinado de la extensión en fresco y del bloque celular es del 67% y en sólo 2 casos las dos muestras no fueron valorables.

El menor rendimiento de la punción percutánea respecto a la punción intraoperatoria se atribuye a que aquélla no permite identificar con tanta precisión el área de punción. Las limitaciones de la punción percutánea se concentran en el tamaño de la lesión y en la técnica de radiodiagnóstico utilizada. Mientras que en lesiones inferiores a 2 cm el rendimiento de la ecografía es mejor, en lesiones mayores la TAC podría permitir precisar mejor las zonas neoplásicas. En ambos casos, el patólogo puede, ocasionalmente, cometer errores ya que las células de un carcinoma bien diferenciado o de un tumor neuroendocrino pueden ser interpretadas como benignas. Aunque se acepta que el examen citológico del material obtenido tras punción-aspiración biopsia no tiene falsos positivos, se pueden producir casos sospechosos, habitualmente asociados a procesos inflamatorios. En nuestra serie se informaron 12 casos como sospechosos y en un caso el diagnóstico final fue de neoplasia-cistadenoma microquístico-benigno.

La RPC ha aumentado la sensibilidad de diversas técnicas de biología molecular y ha posibilitado el análisis de alteraciones genéticas de muestras antes inaccesibles, debido al escaso material disponible y/o a su procesamiento. Hemos aplicado una modificación de la técnica original de la RPC para la detección de mutaciones en el gen c-K-ras en el material conservado como bloque celular procedente de punción-aspiración. Esta técnica es sensible ya que permite detectar la mutación aunque sólo esté presente en 1-5 de cada 100 células analizadas (resultados no mostrados). Además, no necesita de material radiactivo y permite obtener el resultado en 48-72 h. En nuestro trabajo, la principal limitación de la técnica ha sido la imposibilidad de amplificar el material en 12 casos (15,3%) de los cuales sólo seis tienen una po-

sible explicación. Es importante resaltar que la proporción de muestras no amplificables disminuyó en las muestras obtenidas en los últimos 2 años. No obstante, si consideramos la proporción de diagnósticos suficientes aportados, las dos metodologías son comparables.

El análisis molecular ofrece, sin embargo, una sensibilidad (66%) alta si tenemos en cuenta que la incidencia estimada de la mutación en los carcinomas en nuestro medio es del 80%. Además, esta metodología no aporta falsos positivos y confirma que la presencia de la mutación en el gen c-K-ras en masas pancreáticas es específica de células malignas. La detección de mutaciones en el gen c-K-ras, que sólo proporciona información ante un resultado positivo, complementa el diagnóstico citológico clásico en 10 casos. En 2 grupos de muestras el análisis molecular ofrece un mayor rendimiento: los casos sospechosos (6 de 12) y los no valorables (2 de 2). A destacar que el análisis molecular ha permitido disminuir el número de falsos positivos de 9 a 7. Es difícil discriminar cuántos casos no valorables y falsos negativos son atribuibles a la precisión de la punción. En nuestra serie en 4 ocasiones el análisis molecular ha confirmado la presencia de células neoplásicas que el patólogo no había podido sospechar o valorar. Esta discrepancia se puede atribuir al mayor número de células valoradas mediante la detección de mutaciones. Así, mientras el patólogo analiza un número limitado de secciones del bloque, el análisis molecular incluye un material mucho más abundante (50-100 veces más) lo que aumenta las probabilidades de detectar células neoplásicas. Por contra, el patólogo ha podido examinar la extensión en fresco del tumor, material del cual no ha sido posible extraer DNA al tratarse de un estudio retrospectivo.

Nuestros resultados confirman, en una serie más amplia de pacientes, los estudios previos^{20,21} que sugerían que la mutación podría ser de utilidad clínica en la evaluación del material obtenido mediante punción-aspiración biopsia percutánea bajo control radiológico. La metodología utilizada permite ofrecer un diagnóstico molecular, sin necesidad de material radiactivo y sin falsos positivos, en un plazo corto de tiempo. Sin embargo, esta técnica no permite la evaluación inmediata del material obtenido y no tiene, por tanto, utilidad para la valoración de las punciones intraoperatorias. En nuestra experiencia, este análisis hubiera sido de utilidad en una proporción significativa (15%) de estos pacientes. Es necesario realizar estu-

dios prospectivos para poder definir con precisión el papel que esta metodología del DNA recombinante debe tener en la evaluación diagnóstica de los pacientes con masas pancreáticas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-310.
- Marshall CJ. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64: 313-326.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
- Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4.682-4.689.
- Barbacid M. ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
- McCormick F. ras GTPase activating protein: signal transmitter and signal terminator. *Cell* 1989; 56: 5-8.
- Anàlisi de la mortalitat a Catalunya 1989. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Sanitat i Seguretat Social, 1991.
- Silverberg E, Lubera JA. Cancer statistics, 1989. *Ca-A Cancer Clin* 1989; 39: 3-20.
- Trede M. The surgical treatment of pancreatic carcinoma. *Surgery* 1985; 97: 28-35.
- DiMugno EP, Malagelada J-R, Taylor WF, Go VLW. A prospective comparison of current diagnostic tests for pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1977; 297: 737-742.
- Niederer C, Grendell JH. Diagnosis of pancreatic carcinoma. Imaging techniques and tumor markers. *Pancreas* 1992; 7: 66-86.
- Martínez A, Velasco M, Cáceres J. Fine-needle biopsy of the pancreas using real-time ultrasonography. *Gastrointest Radiol* 1984; 9: 231-234.
- Harter LP, Moss AA, Goldberg HI, Gross BH. CT-guided fine-needle aspirations for diagnosis of benign and malignant disease. *AJR* 1983; 140: 363-367.
- Bret PM, Nicolet V, Labadie M. Percutaneous fine-needle aspiration biopsy of the pancreas. *Diagn Cytopathol* 1986; 2: 221-227.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-553.
- Shibata D, Capellá G, Perucho M. Mutational activation of the c-K-ras gene in human pancreatic carcinoma. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 1991; 4: 151-169.
- Perucho M, Forrester K, Almoguera C, Kahr S, Lama C, Shibata D et al. Expression and mutational activation of the c-Ki-ras gene in human carcinomas. *Cancer Cells* 1989; 7: 137-141.
- Mullis K, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987; 155: 335-350.
- McCormick F. The polymerase chain reaction and cancer diagnosis. *Cancer Cells* 1989; 1: 56-61.
- Shibata D, Almoguera C, Forrester K, Dunitz J, Martin SE, Cosgrove MM, Perucho M, Arnheim N. Detection of c-K-ras mutations in fine needle aspirates from human pancreatic cancer. *Cancer* 1990; Res 50: 1.279-1.283.
- Tada M, Ornata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991; 100: 233-238.
- Kumar R, Barbacid M. Oncogene detection at the single cell level. *Oncogene* 1988; 3: 647-651.
- Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu S-H, Weinstein IB. Rapid detection of ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal, and gastric cancer. *Oncogene* 1989; 4: 923-928.
- Capellá G, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environmental Health Perspectives* 1991; 93: 125-131.
- Kline TS. *Handbook of Fine Needle Aspiration Biopsy Cytology*. Nueva York: Churchill Livingstone, 1988; 332-338.

DISCUSIÓN

J.C. LACAL: Quería saber si han determinado cuál es el número mínimo de células que debe contener la muestra para que sea factible la detección, y la segunda pregunta es si han complementado los estudios de K-ras en este tipo de tumores con, por ejemplo, P53 o retinoblastoma en alguno de los genes supresores.

G. CAPELLA: No hemos mirado cuál es el número mínimo de células, entre otras cosas por-

que el material obtenido mediante la punción es muy escaso. La ventaja que podemos tener respecto al patólogo es que éste mira un número limitado de extensiones, y nosotros obtenemos un *pool* más importante, al cortar una proporción importante del bloque para poder obtener una amplificación. Lo que sí hemos visto, es que cada vez sabemos un poco más. De los 12 casos no amplificados, nueve corresponden a las primeras tandas de expe-

rimentos. Es muy probable que en aquel momento no aplicáramos las técnicas de forma óptima. En cualquier caso, creo que siempre nos vamos a encontrar con problemas en un número de muestras que no vamos a amplificar. Respecto a detectar otras alteraciones, el candidato obvio sería hacer un estudio de inmunohistoquímica con P53, aunque en patología pancreática yo no sería muy partidario de hacerlo. Se han publicado algunos estudios realizados con el material obtenido por la citología tras canular el conducto pancreático, en los que se ha observado que la pancreatitis crónica, que es el problema diagnóstico diferencial número uno, también produce una sobreexpresión de la P53 quizá con un patrón de tinción intracelular algo distinto, por lo que esta sobreexpresión no permite discriminar entre estas patologías.

F. GARRIDO: Un comentario a la pregunta anterior: en relación al número de células que se pueden tomar en una biopsia, yo personalmente creo que aunque sea una cantidad muy pequeña en las biopsias clásicas, en el contexto de la RPC estamos hablando de un número muy importante de células. Está demostrado que una célula que esté mutada para *ras* en un millón de células no mutadas puede ser detectada por RPC.

C. CAPELLA: Estoy de acuerdo en que son muchas células para la RPC, pero no todas las células son neoplásicas. Nuestros resultados indican, sin embargo, que nuestros radiólogos aciertan bastante al realizar la biopsia por punción en estos pacientes. Por otra parte, quisiera señalar que en nuestras manos, la sensibilidad en los mejores experimentos oscila entre el 1 y el 5%. En la bibliografía se describen sensibilidades del orden de uno cada 10.000, o uno de cada 100.000. No somos capaces de reproducirlo, y me consta que otros laboratorios bastante mejores que el nuestro han sido totalmente incapaces de reproducir esta sensibilidad. Otra cosa es que una célula aislada sin contaminación de células normales puede ser amplificada, pero cuando se produzca contaminación de las células normales la sensibilidad utilizando nuestro método es del 1% en los mejores experimentos.

J. LEÓN: Nosotros también hacemos algo parecido pero en las leucemias mieloides y siempre nos han preocupado los falsos positivos, es decir, ¿cómo confirmar los positivos, cómo distinguir la presencia, por ejemplo, de una mutación de una digestión parcial?

G. CAPELLA: Nosotros hemos modificado una técnica original introduciendo un control. De los dos nuevos *locus* para la enzima de restricción, uno cambia cuando está mutado, y el otro es el control interno de la digestión. La existencia de este segundo control es lo que permite conocer cómo ha funcionado cada digestión enzimática.

J.C. LACAL: Quisiera comentar que existen métodos alternativos por RPC que son incluso más sensibles, y no implican la utilización de enzimas de restricción, me refiero a las pinzas de GC para gradientes desnaturalizantes, que permiten detectar mutaciones puntuales un fragmento de hasta 200 pares de bases, sin necesidad de una mínima restricción, con lo que se reduce la posibilidad de riesgo. Sin embargo, aunque ya están disponibles a nivel de investigación básica, creo que no se ha avanzado lo suficiente como para aplicarlos en la resolución de problemas clínicos como los que usted ha expuesto.

G. CAPELLA: Lo que ocurre es que estos métodos utilizan radiactividad con lo que la aplicabilidad no es tan fácil. Creo que es muy importante no tener que utilizar radiactividad.

J.C. LACAL: Sin embargo también existen métodos no radiactivos, luminométricos que fácilmente, en cuestión de minutos, pueden detectar la aplicación de sondas marcadas, por ejemplo, con fosfatasa alcalina. Aunque todavía no se han aplicado en la clínica. Esta es la gran labor de grupos de investigaciones como ustedes, establecer el nexo de unión entre lo estrictamente básico y la clínica, ya a nivel básico se están realizando grandes progresos.

V. VICENTE GARCÍA: Una cuestión referente a la metodología: ¿han observado cambios de sensibilidad en muestras ya incluidas en parafina en comparación con las muestras en fresco?

G. CAPELLA: Desde hace más de un año estamos recogiendo las muestras en fresco. No las hemos analizado aún y, por tanto, no puedo contestar a su pregunta todavía. Lo lógico es que podamos llegar a obtener un mejor rendimiento.

M. PORTA: Quisiera felicitarle por su excelente presentación y por el trabajo. Habría muchas cosas que se podrían comentar, pero hay una en particular que quisiera traer a colación: se refiere al espectro de pacientes que se estudian. Existe un progreso enorme en su trabajo con respecto a los artículos sobre *K-ras* y cáncer de páncreas en humanos publicados

a partir de 1988, en el sentido de que el espectro de pacientes tiene que ser lo más parecido posible al espectro de pacientes en quienes se planteará el diagnóstico diferencial de una enfermedad, por tanto, la aplicación de la prueba diagnóstica. Y en la medida en que la frecuencia de la enfermedad, en este caso el cáncer de páncreas, es superior en el estudio a lo que es en la realidad, está muy bien establecido que se sobreestima el valor predictivo positivo y, en general, la utilidad diagnóstica de la prueba. Vuestra muestra incluye 77 masas pancreáticas, una mayoría de las cuales eran adenocarcinomas de páncreas. Por lo tanto, es lógico plantearse si a pesar de los alentadores resultados obtenidos por su grupo y por otros, no estamos todavía sobreestimando la utilidad clínica de la detección de las mutaciones en *K-ras*; y en este sentido es curioso observar que, como usted mismo ha señalado, la prevalencia de mutaciones ha ido descendiendo al ampliar el espectro de pacientes estudiado. Supongo que este es un aspecto que ustedes se han planteado y me gustaría conocer su opinión al respecto.

G. CAPELLA: Lo obvio es que para responder a la pregunta de la eficacia diagnóstica, de la utilidad clínica real, tiene que ser en un contexto prospectivo y controlado en el que se defina previamente una población, que es en la que existe sospecha de cáncer de páncreas. Para el caso de la punción, este contexto se define por un paciente con una masa pancreática. ¿Cuántos de estos pacientes con masas pancreáticas en la ecografía también tenían metástasis hepáticas? Lo estamos valorando, porque en estos pacientes probablemente no sirve de nada la detección de la mutación, ya que la sospecha es tan firme que no requiere confirmación. Estoy totalmente de acuerdo en el riesgo de sobreestimar el método, y pienso que debemos ser muy críticos, incluso en lo que concierne a la eficacia de la propia citología, ya que los patólogos o citólogos muchas veces son extraordinariamente optimistas respecto a su apreciación de la citología, y es porque están sobreestimando sus verdaderos positivos, o su valor predictivo positivo. La respuesta sólo se puede obtener mediante un estudio prospectivo y comparativo con otros métodos diagnósticos.