

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"**

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNA S100A4 EN ATIPIA REACTIVA Y
DISPLASIA DE ALTO GRADO/
CARCINOMA *IN SITU* DE LA VESÍCULA BILIAR**

T E S I S D E P O S G R A D O

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN
*ANATOMÍA PATOLÓGICA***

PRESENTA:

DAVID DE JESÚS MORÁN PORTELA

Asesor de tesis

DRA. NORMA O. URIBE URIBE

Profesor del curso

DR. ARTURO ÁNGELES ÁNGELES



MÉXICO D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES POR DARMER LA VIDA Y SU GRAN APOYO

A MIS HERMANOS POR SU CARIÑO Y COMPAÑÍA

A VERÓNICA POR SU INCONDICIONAL AMOR Y FORTALEZA

AL DR. EDGARDO REYES POR SU AMISTAD Y ENSEÑANZAS

**A LA DRA. NORMA URIBE POR SU PACIENCIA Y TIEMPO PARA LA
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO**

**AL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA DEL INCMNSZ
POR BRINDARME EL ESPACIO PARA LA FORMACIÓN COMO
ESPECIALISTA**

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	5
3. Planteamiento del problema.....	5
4. Marco Teórico.....	5
5. Justificación.....	10
6. Hipótesis.....	11
7. Objetivos.....	11
8. Material y métodos.....	12
9. Resultados.....	15
10. Discusión.....	16
11. Conclusiones.....	18
12. Anexos.....	19
13. Bibliografía.....	22

RESUMEN

EXPRESIÓN DE PROTEÍNA S100A4 EN ATIPIA REACTIVA Y DISPLASIA DE ALTO GRADO/CARCINOMA *IN SITU* DE LA VESÍCULA BILIAR

Antecedentes: La proteína S100A4 de la familia de proteínas fijadoras de calcio, se expresa en carcinomas. Se ha informado que lesiones displásicas de alto grado/carcinoma *in situ* (DAG/Cis) de las vías biliares extrahepáticas expresan S100A4, a diferencia de lesiones reactivas. **Objetivo:** Confirmar la utilidad del anticuerpo S100A4 para el diagnóstico de lesiones epiteliales reactivas vs. DAG/Cis en vesícula biliar. **Material y métodos:** Se seleccionaron 26 vesículas biliares con lesiones benignas con atipia reactiva o con DAG/Cis. En todos los casos se les realizó inmunohistoquímica indirecta con el anticuerpo policlonal S100A4 (Dako dilución 1:100). Se determinó sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y exactitud. Se realizó prueba exacta de Fisher para comparar ambos grupos.

Resultados: De 26 vesículas biliares analizadas, 15 correspondieron a atipia reactiva y 11 a DAG/Cis; 7(26.9%) expresaron el anticuerpo, de los cuales 5 correspondieron a atipia reactiva y 2 a DAG/Cis. La utilidad de la expresión de la proteína S100A4 para diferenciar atipia reactiva vs DAG/Cis mostró: sensibilidad=18.2%, especificidad=66.2%, VPP=28.5%, VPN=52.6% y exactitud=46%. La prueba exacta de Fisher resultó no significativa ($p=0.658$). **Conclusiones:** La expresión de S100A4 no tuvo utilidad para diferenciar DAG/Cis de atipia reactiva de la vesícula biliar.

ABSTRACT

EXPRESSION OF S100A4 PROTEIN IN REACTIVE ATYPIA AND HIGH GRADE DYSPLASIA/CARCINOMA *IN SITU* OF THE GALLBLADDER

Background: S100A4 protein is a member of the family of binding calcium proteins and is expressed in many carcinomas. Several studies have shown expression of S100A4 in high grade dysplasia/carcinoma *in situ* (HGD/Cis) but not in reactive epithelial atypia of the extrahepatic bile ducts. **Objective:** Evaluate the utility of S100A4 protein as diagnostic test in HGD/Cis vs. reactive atypia in gallbladder. **Material and methods:** 26 gallbladder specimens with reactive atypia and (HGD/Cis) were selected. Immunostaining with polyclonal antibody S100A4 (Dako, dilution 1:100) was performed in all cases. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for this antibody were assessed. Fisher exact test was done. **Results:** Of 26 cases 15 corresponded to reactive atypia and 11 to HGD/Cis. Seven (26.9%) showed expression of the tested antibody. Five of these seven cases were reactive epithelial atypia and two HGD/Cis. The S100A4 protein expression for the differential diagnosis showed the following results: sensibility=18.2%, specificity=66.2%, positive predictive value=28.5%, negative predictive value=52.6%, $p=0.658$, Fisher exact test. **Conclusions:** Immunostaining with S100A4 protein was not helpful for the adequate separation between HGD/Cis and reactive atypia of the gallbladder in this study.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma de vías biliares extrahepáticas es una neoplasia poco frecuente. El pronóstico de este tumor se basa en la resecabilidad del mismo. La sobrevida a 3 años es del 50% para tumores resecables contra 0% para resecciones paliativas. Los procedimientos diagnósticos actualmente utilizados poseen buena sensibilidad, sin embargo la especificidad es baja. Nuevos marcadores inmunohistoquímicos pueden ser útiles en la detección temprana de lesiones malignas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Evaluar la expresión inmunohistoquímica de proteína S100A4 en lesiones displásicas de alto grado/carcinoma *in situ* y atipia reactiva de la vesícula biliar, para demostrar su utilidad como marcador para apoyar el diagnóstico diferencial entre estas lesiones.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes científicos

La proteína S100A4, pertenece a la familia S100 de proteínas fijadoras de calcio. Se encuentra en el citoplasma y/o núcleo de un amplio número de células. Está involucrada en la regulación de diversos procesos celulares como la motilidad, diferenciación y progresión del ciclo celular (1). La familia consta de más de 20 miembros. Los primeros fueron descubiertos en el cerebro por Moore, y se les dio el nombre de S100 debido a que son solubles al 100% en sulfato de amonio saturado (2). El gen que codifica esta proteína se encuentra ubicado en el cromosoma 1q21. Su producto es un polipéptido de 101 aminoácidos con una masa molecular de 11.5Kd. Esta proteína se ha descrito bajo una variedad de nombres, los cuales incluyen p9Ka, calvasculina o CALP. El gen clonado por diferentes grupos es conocido como mts1 (metastatina), pEL98, 18A2, 42A, y fsp por sus siglas en inglés (fibroblastic-specific protein). (1,2).

Distribución y expresión

Los estudios con respecto a la distribución de esta proteína en tejidos normales humanos, ha sido obstaculizado por problemas técnicos debido a la reactividad cruzada con otros anticuerpos. La mayoría de los conocimientos actuales en relación a su distribución han sido realizados en tejidos de roedores; en estos la expresión intracelular de S100A4 se encontró en células de músculo liso, grasa parda, hígado, células absortivas y epitelio queratinizado. En humanos la expresión de proteína S100A4 ha sido demostrada en monocitos, macrófagos, polimorfonucleares; expresión leve en queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y glándulas sudoríparas. No se ha detectado en condiciones

normales en próstata y ovario, con excepción de pequeños grupos celulares; mama, riñón, colon, vesícula biliar, pulmón y páncreas. (1,2,3).

Mientras que la proteína S100A4 es expresada en un amplio número de tejidos normales, se ha reconocido que niveles elevados de expresión de S100A4 se correlaciona con una alta incidencia de metástasis y mal pronóstico en pacientes con cáncer (4). Esta expresión elevada se ha descrito en diversos tumores que incluyen adenocarcinomas originados en esófago de Barrett (5), carcinomas uroteliales con infiltración muscular y metastásicos a ganglios linfáticos (6), carcinoma ductal de páncreas (7), carcinoma colorrectal (8), carcinoma de próstata (9), carcinoma gástrico poco diferenciado, donde su relación es inversamente proporcional con los niveles de E-cadherina (10). En vías biliares extrahepáticas se ha demostrado expresión de proteína S100A4 en carcinomas invasores así como en displasia de alto grado/carcinoma *in situ* (11,12,13).

Por otro lado estudios hechos en mamíferos, demostraron que la expresión elevada de S100A4 se encuentra relacionada con la proliferación y engrosamiento de células musculares de las arterias coronarias en situaciones de estrés (14,15).

Klingelhöfer y colaboradores, estudiaron el tejido, líquido sinovial y plasma de pacientes con artritis reumatoide, encontraron una elevada expresión de S100A4 en fibroblastos, células del sistema inmune y células vasculares con respecto a otras proteínas de la familia como S100A9 y S100A12, las cuales se expresaron en macrófagos y granulocitos. Estos hallazgos se relacionaron con las altas concentraciones en plasma de S100A4 con respecto a pacientes con osteoartritis (16)

Interacciones celulares

Estudios realizados en roedores transgénicos han arrojado evidencia suficiente que relaciona directamente a S100A4 con la progresión tumoral y metástasis. Su papel oncológico ha sido estudiado ampliamente en modelos de tumores mamarios, los cuales demostraron que la sobreexpresión de S100A4 por sí sola no es tumorigénica, pero sí se correlaciona con la presencia de metástasis. Dentro del citoplasma de las células, esta proteína interactúa con lipirina β 1, metionina peptidasa y la proteína supresora de tumor p53, regulándola al interactuar con el carbono terminal de esta, e inhibiendo la proteína quinasa C que fosforila el supresor tumoral inhibiéndolo (2); cabe mencionar que las interacciones de p53 con S100A4 y otros miembros de la familia ya han sido estudiados por Fernández –Fernández y colaboradores (2,17); particularmente en carcinomas de la vesícula biliar la relación entre S100A4, p53 y otras proteínas han sido evaluadas como marcadores pronósticos en estas neoplasias (13). Destaca la interacción con proteínas involucradas en el rearrreglo del citoesqueleto y motilidad celular como F-actina, y tropomiosina. Zhong-Hua Li mediante estudios in vitro encontró que S100A4 tiene un papel relevante en la generación de metástasis al interactuar con la proteína miosina-IIA, impidiendo que los monómeros de esta se agrupen y deshaciendo los filamentos preexistentes (3). Otros autores han estudiado las variaciones post-transcripción en la proteína S100A4 con el fin de dilucidar los mecanismos mediante los cuales ejerce sus diversas funciones celulares y descubrir blancos terapéuticos para nuevos medicamentos. Debido a que la cantidad de isoformas de S100A4 y su distribución son muchas, las mutaciones responsables de tal condición necesitan ser estudiadas más ampliamente (18).

Para examinar las propiedades bioquímicas de S100A4 se examinó el efecto de su expresión en la conducta infiltrante durante la motilidad estimulada quimiotácticamente. Para esto Zhong-Hua Li y colaboradores crearon un anticuerpo dirigido al sitio de fijación de S100A4 y miosina-IIA, demostraron que S100A4 promueve la motilidad direccional mediante la interacción directa con miosina-IIA. En carcinoma de endometrio, se ha sugerido que la hipometilación juega un papel fundamental en la expresión de S100A4 en tumores en estadios avanzados con respecto a etapas tempranas, apoyando que todas estas interacciones favorecen la generación de metástasis (3,19).

Existe evidencia de que las proteínas S100 tienen funciones extracelulares, sin embargo su mecanismo de secreción permanece desconocido, y se dice que es secretada por fibroblastos. La proteína S100A4 estimula la actividad de metaloproteinasas y actúa como moderador prometastásico en células neoplásicas (2,20)

Mecanismos de progresión tumoral

Motilidad celular: S100A4 modula la interacción con componentes del citoesqueleto tales como miosina II-A y tropomiosina, modulando su fosforilación mediada por la proteína cinasa C dependiente de calcio (1,2).

Adhesión celular: La alteración del citoesqueleto inducida por S100A4, parece estar relacionada con la distribución de la glucoproteína de adhesión transmembrana CD44. Sobre este conocimiento se ha evaluado la interacción entre S100A4 y cadherinas; las cuales forman parte de la familia de glucoproteínas de adhesión transmembrana reguladas por Ca^{2+} suprimiendo la invasión. En estudios realizados en ratones se evaluó la interacción entre estas proteínas, encontrándose que son inversamente reguladas. Estos

hallazgos han sido observados en carcinomas gástricos poco diferenciados y tumores de células no pequeñas de pulmón (2,10.21).

Remodelamiento de la matriz extracelular: Estudios realizados en células de osteosarcoma han sugerido que la interacción de S100A4 y metaloproteinasas aumenta el potencial metastásico de estas células. Sin embargo, se desconoce como S100A4 interactúa en esta aparente regulación de metaloproteinasas (2,3).

Proliferación celular y apoptosis: Se ha estudiado la relación de esta proteína con otras encargadas de la regulación del ciclo celular como p53 y bcl2 regulando la apoptosis, lo cual en etapas tempranas de la neoplasia permite la selección de clonas más agresivas y conducirla a etapas más avanzadas. (2,3).

Angiogénesis: El gen Trombospondina 1, el cual inhibe la angiogénesis vía p53, es indirectamente regulado por S100A4, favoreciendo la neovascularización en modelos animales. Sin embargo, se necesitan más estudios para esclarecer el efecto angiogénico de esta co-estimulación e identificar los receptores de membrana extracelulares de esta proteína (2).

La mayoría de los trabajos realizados resaltan la utilidad de este marcador como factor pronóstico adverso en varios tumores. Por otro lado, Huicong Zhao y colaboradores, estudiaron carcinomas de vías biliares extrahepáticas utilizando S100A4 y mesotelina, encontrando que S100A4 se expresa en displasia de alto grado/carcinoma *in situ*, además de los carcinomas invasores (11).

El carcinoma de las vías biliares extrahepáticas es una neoplasia poco frecuente que representa del 0.15% al 0.16% de todos los tumores invasores El pronóstico de estos tumores está determinado por la resecabilidad, y la

sobrevida a 3 años va del 50% para tumores resecables hasta un 0% para los que no lo son. La biopsia y citología del árbol pancreatobiliar son empleadas para el diagnóstico de las lesiones de este sitio, a pesar la especificidad de estos procedimientos es excelente (97%), la sensibilidad es menor (50%). La detección temprana puede ser mejorada con la ayuda de algunos marcadores inmunohistoquímicos, lo que sería de gran valor (11).

JUSTIFICACIÓN

El carcinoma de vesícula biliar casi siempre es diagnosticado en etapas avanzadas, creemos que la identificación temprana de lesiones precursoras contribuiría a un mejor vigilancia y tratamiento de los pacientes. Por otro lado la displasia de alto grado/carcinoma *in situ* puede confundirse con lesiones benignas como atipia reactiva, lo cual representa un problema para la toma de decisiones terapéuticas. Huicong Zhao y cols. publicaron un trabajo donde utilizaron mesotelina y S100A4 para evaluar la expresión inmunohistoquímica de éstas en atipia reactiva y carcinoma *in situ* de las vías biliares extrahepáticas; sin embargo no existen estudios actuales que describan la utilidad de S100A4 como marcador inmunohistoquímico para distinguir la atipia reactiva de la displasia de alto grado / carcinoma *in situ* en la vesícula biliar.

HIPÓTESIS

- 1.- La inmunodetección de S100A4 tendrá expresión diferente entre atipia reactiva y carcinoma *in situ* en epitelio biliar
- 2.- La expresión diferente de S100A4 puede ayudar a distinguir una lesión reactiva de una maligna en vesícula biliar.

OBJETIVOS

Confirmar la utilidad de la expresión de S100A4 mediante inmunohistoquímica para distinguir la atipia reactiva de carcinoma *in situ*. Demostrar que se puede emplear como prueba diagnóstica en la identificación de displasia de alto grado/carcinoma *in situ* cuando las características morfológicas de este se confundan con las de la atipia reactiva.

Valorar el perfil de expresión de proteína S100A4 en cortes de vesícula biliar incluidos en parafina, y determinar sensibilidad, especificidad valor predictivo positivo y valor predictivo negativo en la diferenciación de atipia reactiva y displasia de alto grado / carcinoma in situ.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio:

Retrospectivo, prolectivo, observacional y descriptivo

Población:

Se revisó el archivo de patología quirúrgica entre los años 2000 a 2007. Se buscaron los reportes correspondientes a vesícula biliar, se revisaron las laminillas de los casos con lesiones benignas y con carcinoma primario de la vesícula biliar, no importando el tipo. Se seleccionaron los casos con atipia reactiva y posteriormente se revisaron las laminillas por parte de un experto (JAS).

Criterios de inclusión:

Se incluyeron aquellos casos que cumplieran con los criterios morfológicos de la OMS de atipia reactiva, la cual se caracteriza por una población heterogénea de células, en la que células columnares mucosecretoras, células cuboidales bajas, y células en forma de lápiz (penciloides) están presentes(29); después de la preselección los casos fueron revisados por un patólogo experto (JAS).

También se incluyeron casos con áreas con carcinoma *in situ* o displasia de alto grado, no importando el tipo; la displasia de alto grado/carcinoma *in situ*, que consta de células con acentuada atipia nuclear, frecuentes figuras de mitosis, incremento en la relación núcleo-citoplasma, hiperchromasia, pérdida de la polaridad y sobreposición (29)

Criterios de exclusión:

No se incluyeron casos con algún tipo de lesión neoplásica benigna, a menos de que tuvieran zonas sospechosas de carcinoma *in situ* o displasia. Tampoco se incluyeron lesiones malignas metastásicas

Criterios de eliminación:

Que no existieran laminillas para la revisión, o que no hubieran bloques de parafina o que el material hubiera sido insuficiente para efectuar la reacción de inmunoperoxidasa.

Variables:

Las variables morfológicas evaluadas fueron: atipia reactiva, carcinoma *in situ* y adenocarcinoma invasor, fueron evaluados de manera dicotómica como presentes o ausentes. En cuanto a la reactividad de la PS100A4, esta también fue analizada de manera dicotómica como positiva o negativa.

Inmunohistoquímica:

De los casos seleccionados, se cortaron niveles de los bloques de parafina y se colocaron en laminillas precargadas que fueron desparafinadas. Posteriormente las laminillas se calentaron durante 20 minutos y se les colocó EDTA a una concentración 10mM para recuperación antigénica. Después de enfriarse las laminillas, se lavaron con solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal de conejo S100A4 (dilución 1:100 DAKO); posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario Mach 4 (Biocare) durante 10 minutos, por último se revelaron con el cromógeno diaminobenzidina por 3

minutos, se aclararon y contrastaron con hematoxilina de Meyer. Controles adecuados (amígdala) se corrieron de manera simultánea con los casos a estudiar.

Valoración de inmunoreactividad para S100A4:

Se buscó expresión nuclear y/o citoplasmática, se consideró como positiva cualquier grado de inmunoreactividad.

Análisis estadístico:

Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para los casos con carcinoma in situ que resultaran positivos o negativos para la prueba, al igual que en el caso de atipia reactiva. Se realizó prueba exacta de Fisher para evaluar la asociación entre los cambios epiteliales y la reacción al anticuerpo.

RESULTADOS

Se revisaron 1279 colecistectomías, de estas 127 (9.9%) casos correspondieron a carcinoma de vesícula biliar. Se eliminaron 15 casos por no encontrar bloques y o laminillas en el archivo. Finalmente se seleccionaron 26 casos con los criterios de inclusión, de los cuales 11 corresponden a carcinoma con áreas de carcinoma in situ y 15 presentaron atipia reactiva.

La expresión de S100A4 solo se observó en 2 de los 11 casos con carcinoma y presentaron tanto tinción citoplasmática como nuclear de intensidad moderada como se muestra en la figura 1, mientras que 9 de estos resultaron negativos, inclusive en el componente invasor (figura 2). De los casos con atipia reactiva, 5 de los 15 casos presentaron inmunoreactividad para el anticuerpo, revelando tinción citoplasmática y nuclear de leve a moderada (figura 3), los otros 10 casos resultaron negativos (tabla1). Los resultados se colocaron en una tabla de trabajo de 2x2, donde la sensibilidad (S) calculada fue del 18.2% y la especificidad (E) del 66.2% respectivamente. El valor predictivo positivo (VPP) fue de 28.5, mientras que el valor predictivo negativo (VPN) estimado fue de 52.6. La exactitud de la prueba fue del 46% y la Prevalencia (PR) de 42.3, tal y como se muestran en la tabla 2. Se realizó prueba exacta de Fisher, en la cual se asoció el tipo de lesión epitelial con el resultado de inmunohistoquímica para S100A4 con un valor $p= 0.658$, no significativo estadísticamente hablando. La distribución de estos y al valor de p se muestran en la figura 4

DISCUSION

La proteína S100A4 forma parte de la familia de proteínas fijadoras de calcio, hasta la fecha se conocen más de 20 miembros. La función de estas permaneció por mucho tiempo desconocida; sin embargo el interés en el estudio de estas se ha enfocado solo en algunos miembros como lo son S100A2, S100A6 y S100B debido a su relevante papel en la patología oncológica (1). Por tal motivo se ha intentado involucrar a estas como marcadores pronósticos, en especial S100A4; como se sabe esta proteína tiene la capacidad de regular la motilidad celular y modificar la adhesión celular y membrana basal para poder generar metástasis (4). La sobre expresión de esta proteína ha sido ampliamente documentada en tumores del esófago, estómago, pulmón, colon, recto, próstata, vejiga urinaria y páncreas (5-10, 22). Zhong-Hua Li y Anne R. Bresnick estudiaron la interacción de S100A4 con miosina-IIA en la regulación de la motilidad celular mediante al análisis *in vitro* de células HeLa (3); sin embargo Katayama N y colaboradores lo hicieron en cultivos celulares derivados de 4 carcinomas de vías biliares extrahepáticas; en este estudio solo 2 de los 4 carcinomas expresaron S100A4, lo que se relacionó con mayor actividad metastásica por parte de dichas células (25). En el estudio realizado por Nakamura y cols. se evaluó la expresión de S100A4 en carcinomas de la vesícula biliar, donde 25 de 60 casos (42%) la expresaron, y mediante análisis multivariado concluyen que dicha expresión es un factor pronóstico importante después del tamaño de la clasificación del TNM; esto impactó en la sobrevida a 5 años, la cual fue del 31.5% para los casos positivos contra 57.1% para los casos negativos(28). Por otra parte Huicong Zhao y cols. realizaron estudios de inmunohistoquímica para mesotelina y S100A4 en 10

casos de carcinoma invasor de las vías biliares extrahepáticas, 6 casos de displasia de alto grado/carcinoma in situ, 4 casos de displasia de bajo grado y 10 casos de epitelio normal y reactivo. Encontraron que 8 de los 10 casos de carcinoma invasor (80% sensibilidad) expresaron S100A4, 5 de los 6 casos (83% sensibilidad) de displasia de alto grado carcinoma in situ fueron positivos y ninguno de los 4 casos de displasia de bajo grado o de los 10 epitelios normales o reactivos tuvieron positividad para S100A4 (12). Estos hallazgos difieren con los nuestros, donde solo 2 de los 11 casos de displasia de alto grado/carcinoma in situ resultaron positivos, y 5 de los 15 casos con atipia reactiva resultaron positivos. Es importante destacar que no se había reportado previamente positividad para S100A4 en lesiones reactivas.

Con el fin de identificar marcadores pronósticos en carcinoma de vesícula biliar Chang y cols. evaluaron la expresión inmunohistoquímica de 15 proteínas, p53, p27, p16, RB, Smad4, PTEN, FHIT, GSTP1, MGMT, E-cadherina, NM23, CD44, TIMP3, S100A4, y PML (leucemia promielocítica) en 138 casos de carcinoma de vesícula biliar mediante la realización de microarreglo de tejidos (TMA). Encontraron que p53 y PML resultaron ser marcadores pronósticos de importancia considerable con respecto a S100A4 y otros marcadores, ya que los pacientes con expresión anormal de cualquiera de ellos tuvieron un pronóstico desfavorable (13). La detección de S100A4 en el 83% de los casos con neoplasia intraepitelial pancreática de alto grado reportados por Rosty y cols. llama la atención, ya que al igual que en otros tumores, la identificación de factores pronósticos moleculares impactan en el manejo clínico de las lesiones neoplásicas. El papel de S100A4 como marcador diagnóstico permanece meramente especulativo, ya que se ha detectado esta proteína en células no

neoplásicas, tal como lo mostraron Böni R y colaboradores (30); además los conocimientos de esta en células epiteliales con cambios reactivos aún no ha sido estudiada (1). Aun que los trabajos anteriormente comentados tienen menos casos, indican que S100A4 puede tener utilidad como marcador pronóstico, en nuestro estudio revisamos 26 casos. Parece poco probable que S100A4 sea un marcador ideal para discriminar entre células neoplásicas y no neoplásicas; sin embargo su utilidad como blanco terapéutico está por ser demostrada (1,13).

CONCLUSIONES

S100A 4 puede expresarse en atipia reactiva, y no expresarse en células neoplásicas, incluso del componente invasor. La distinción entre atipia reactiva y displasia de alto grado/carcinoma *in situ* no fue posible en bases inmunohistoquímicas, ya que áreas de carcinoma *in situ* resultaron negativas.. Los datos de nuestro estudio revelan que S100A4 no tiene utilidad para distinguir atipia reactiva de displasia de alto grado/carcinoma *in situ* de la vesícula biliar, ya que es expresada también en atipia reactiva.

ANEXO 1

	Carcinoma In situ (n=11)	Atipia reactiva (n=15)
S100A4		
Positivos	2	5
Negativos	9	10

Tabla 1. Relación de casos con carcinoma in situ y atipia reactiva.

S100A4	Ca Insitu	Atipia		
(+)	2	5	7	VPP= 28.5
(-)	9	10	19	VPN 52.6
	11	15		
	Sens= 18.2%	Esp= 66.7%		
N= 26				
EX= 46%				
PR= 42.3				

Tabla 2. Sens (sensibilidad), Esp(especificidad), VPP(valor predictivo positivo), VPN(valor predictivo negativo), N(número de casos), EX(exactitud de la prueba) PR(prevalencia)

ANEXO 2

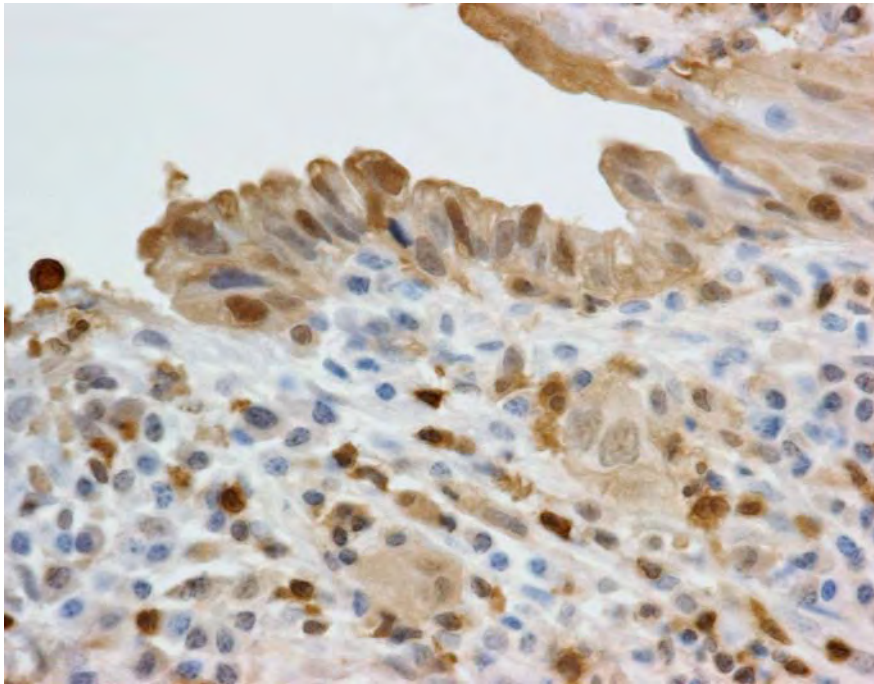


Figura 1. Inmunohistoquímica contra S100A4. Dos de los 11 casos con carcinoma mostraron positividad citoplasmática y nuclear moderada.

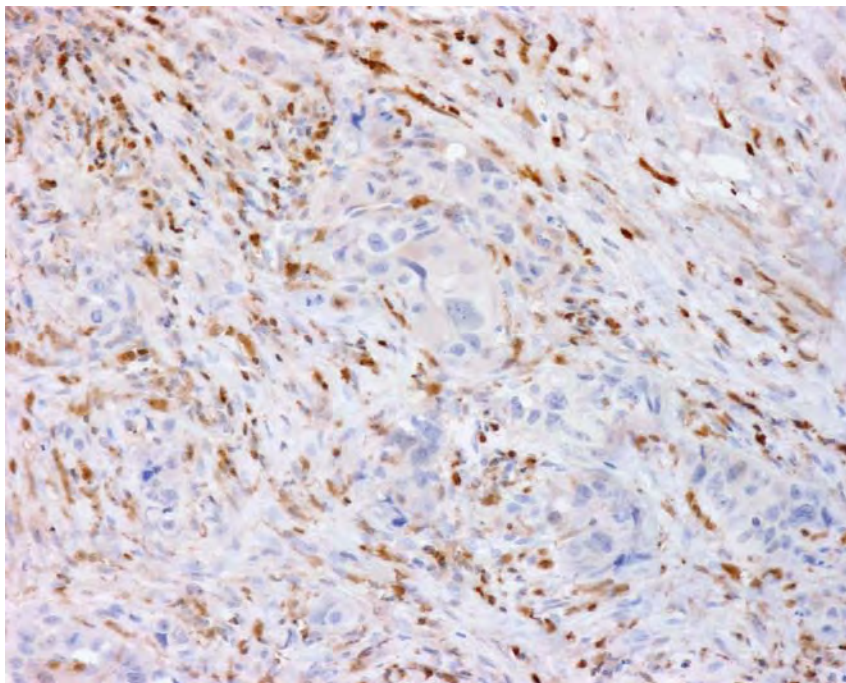


Figura 2. S100A4 resultó negativa en el componente invasor.

ANEXO 3

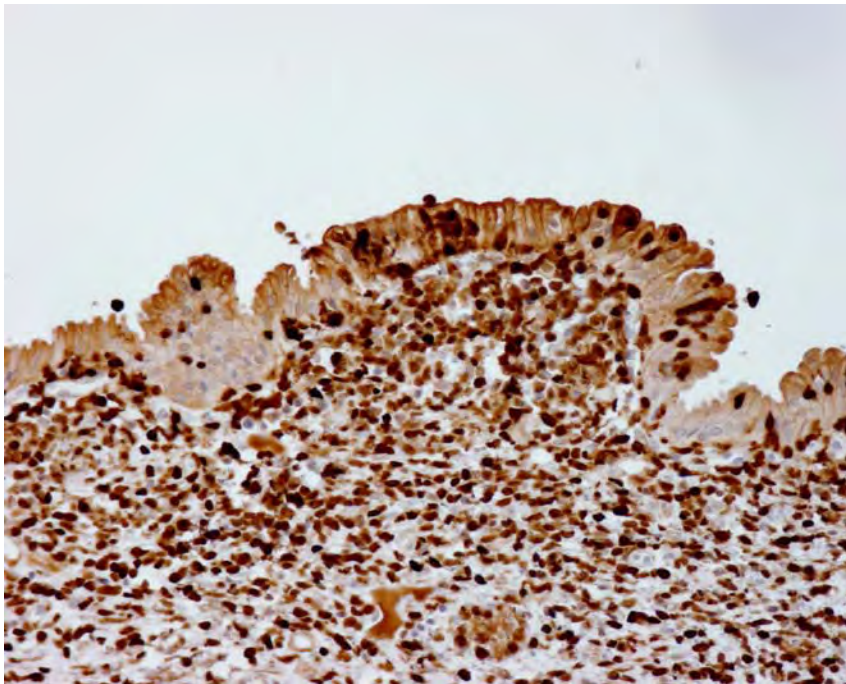


Figura 3. Epitelio con atipia reactiva e infiltrado inflamatorio con positividad para S100A4

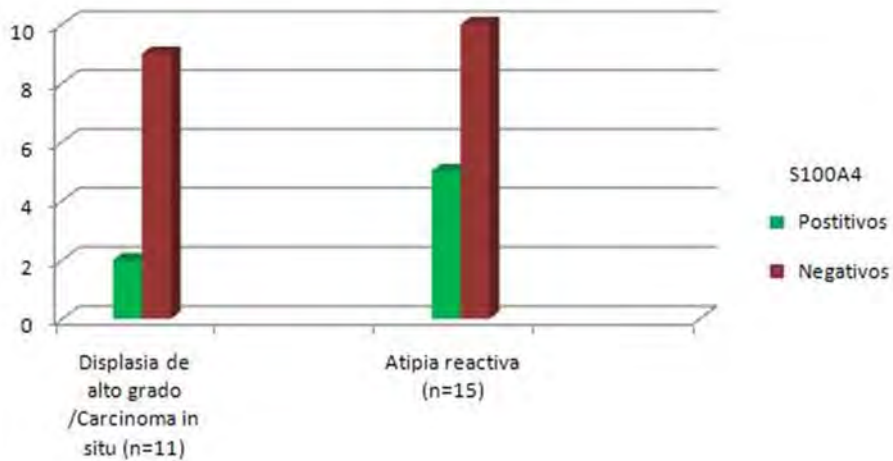


Figura 4. Distribución de lesiones epiteliales con atipia reactiva y carcinoma in situ de la vesícula biliar en asociación con el marcador de inmunohistoquímica S100A4 ($p=0.658^*$) *Prueba exacta de Fisher

BIBLIOGRAFÍA

1. Mazzuccelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologist? *Am J Pathol.* 2002; 160: 45-50
2. Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4 a Mediator of Metastases. *J Biol Chem.* 2006; 281: 677-80
3. Li ZH, Bresnick AR. The S100A4 Metastases factor regulates cellular motility Via interaction with myosin-IIA. *Cancer Res.* 2006; 66: 5173-80.
4. Malashkevich VN, Varney KM, Garrett SC, Wilder PT, et al. Structure of Ca²⁺-bound S100A4 and its interaction with peptides derived from nonmuscle myosin-IIA. *Biochemistry.* 2008; 47: 5111-26.
5. Lee OJ, Hong SM, Razvi MH, Peng D, Powel SM, Smoklin M, Moskaluk CA, El-Rafai W. expression of calcium –binding proteins S100A2 and S100A4 in Barrett´s adenocarcinomas. *Neoplasia.* 2006; 8: 843-50.
6. Levett D, Flecknell PA, Rudland PS, Barraclough R, Neal DE, Mellnon JK, Davies BR. Transfection of S100A4 produces mestastatic variants of an orthotopic model of bladder cancer. *Am J Pathol.* 2002; 160: 693-700.
7. Ai KX, Lu LY, Huang XY, Chen W, Zhang HZ. Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 1931-5.
8. Takenaga K, Nakanishi H, Wada K, Suzuki M, Matsuzaki O, Matsuura A, Endo H. Increased expression of S100A4, a metastases-associated gene, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 2309-16.
9. Saleem M, Kweon MH, Johnson JJ, Adhami VM, Elcheva I, Khan N, Bin Hafeez B, et al. S100A4 accelerates tumorigenesis and invasion of human

prostate cancer through the transcriptional regulation of matrix metalloproteinase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 14825-30

10. Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, et al. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 4234-42.

11. Hong SM, Kim MJ, Jang KT, Yoon GS, Cho H, Frierson HF, Yu E. Adenosquamous carcinoma of extrahepatic bile duct: clinicopathologic study of 12 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008; 1: 147-56

12. Zhao H, Davydova L, Mandich D, Cartun RW, Ligato S. S100A4 protein and mesothelin expression in dysplasia and carcinoma of the extrahepatic bile duct. *Am J Clin Pathol*. 2007; 127: 374-9.

13. Chang HJ, Yoo BC, Kim SW, Lee BL, Kim WH. Significance of PML and p53 protein as molecular prognostic markers of gallbladder carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2007; 13: 326-25.

14. Brisset AC, Hao H, Camenzind E, Bacchetta M, Geinoz A, Sanchez JC, Chaponnier C, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Intimal smooth muscle cells of porcine and human coronary artery express S100A4, a marker of the rhomboid phenotype in vitro. *Circ Res*. 2007; 100: 1055-62.

15. Schneider M, Kostin S, Strom CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, Grigorian M, Andersen CB, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2007; 75: 1-2.

16.- Klingelhöfer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshoj I, Pavelka K, Neidhart M, Gay S, et al. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-

1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56: 779-89.

17. Fernandez-Fernandez MR, Rutherford TJ, Fersht AR. Members of the S100 family bind p53 in two distinct ways. *Protein Sci.* 2008; 17: 1663-70.

18. Haugen MH, Flatmark K, Mikalsen SO, Malandsmo GM. The metastasis-associated protein S100A4 exists in several charged variants suggesting the presence of posttranslational modifications. *BMC Cancer.* 2008; 8: 172

19. Xie R, Loose DS, Shipley GL, Xie S, Bassett RL Jr, Broaddus RR. Hypomethylation-induced expression of S100A4 in endometrial carcinoma. *Mod Pathol.* 2007; 20: 1045-54.

20. Xie R, Schlumbrecht MP, Shipley GL, Xie S, Bassett RL Jr, Broaddus RR. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling. *Lab Invest.* 2009; 89: 937-47.

21. Schmidt-Hansen B, Klingelhöfer J, Grum-Schwensen B, Christensen A, Andresen S, Kruse C, et al. Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem.* 2004; 279: 24498-504.

22. Chen XL, Zhang WG, Chen XY, Sun ZM, Liu SH. Correlations of S100A4 protein expression to invasion and metastasis of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng.* 2006; 25: 1134-7.

23. Bandiera A, Melloni G, Freschi M, Giovanardi M, Carretta A, Borri A, Ciriaco P, Zannini P. Prognostic factors and analysis of S100a4 protein in resected pulmonary metastases from renal cell carcinoma. *World J Surg.* 2009; 33: 1414-20.

24. Matsumoto K, Irie A, Satoh T, Ishii J, Iwabuchi K, Iwamura M, Egawa S, Baba S. Expression of S100A2 and S100A4 predicts for disease progression and patient survival in bladder cancer. *Urology*. 2007; 70: 602-7.
25. Katayama N, Murao S, Ajiki T, Kitazawa S, Onoyama H, Kuroda Y, Maeda S. The role of S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein in human bile duct adenocarcinoma cell lines: correlation of S100A4 expression and invasive growth in Matrigel Matrix. *Int J Mol Med*. 2000; 6:539-42.
26. Uozumi M, Murao S, Katayama N, Kitazawa S, Amatsu M, Maeda S. Induction of S100A4 gene expression inhibits in vitro invasiveness of human squamous cell carcinoma, KOSC-3 cells. *Cancer Lett*. 2000; 28: 135-41.
27. Sherbet GV. Metastasis promoter S100A4 is a potentially valuable molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett*. 2009; 280: 15-30.
28. Nakamura T, Ajiki T, Murao S, Kamigaki T, Maeda S, Ku Y, Kuroda Y. Prognostic significance of S100A4 expression in gallbladder cancer. *Int J Oncol*. 2002; 20: 937-41.
29. Albores-Saavedra J, Henson DE, Klimstra DS. *Tumors of the Gallbladder, Extrahepatic Bile Ducts, and Ampulla of Vater*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2000. *Atlas of Tumor Pathology*; Third series, Fascicle 27.
30. Böni R, Brug G, Doguoglu A, Ilg EC, Schäfer BW, Müller B, Heizmann CW. Immunohistochemical localization of the Ca²⁺ binding S100 proteins in normal human skin and melanocytic lesions. *Br J Dermatol*. 1997; 137: 39-43