

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA  
INCan**

TESIS DE GRADO

PREVIA OPCION AL TITULO  
ONCOLOGÍA MÉDICA

**EXPRESIÓN DE MARCADORES NEUROENDOCRINOS EN CANCER  
CERVICOUTERINO DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS**

**DRA. LUCELY DEL CARMEN CETINA PÉREZ**

ASESOR: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZÁLEZ.

PROMOCIÓN: 1999 - 2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **DEDICATORIA:**

A DIOS: Por darme vida, salud y la fortaleza por realizarme en mi vida personal y para cumplir mis objetivos de trabajo con amor y dedicación.

A MIS PADRES: René Cetina Santibón y Eulalia Pérez Maldonado (descansen en paz), por darme la vida, y las bases necesarias, para realizarme como persona y profesionista, con mis virtudes y defectos.

A MI HIJO: Roberto Morales Cetina, quién llena mis esperanzas de vida y me impulsa para luchar todos los días a pesar de todas las circunstancias.

A MIS MAESTROS: Dr Alfonso Dueñas González con respeto y admiración por su dedicación y trabajo.

A MIS AMIGOS Y AMIGAS: por su comprensión y por escucharme cuando lo he necesitado.

A MI PUEBLO MEXICANO.

A EL INSTITUTE NACIONAL DE CANCEROLOGIA EN MEXICO y todo el personal que lo hacen crecer día a día.

## INDICE

• ANTECEDENTES.....	4
• JUSTIFICACIÓN.....	16
• DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	17
• OBJETIVO GENERAL.....	17
• OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
• HIPÓTESIS.....	18
• MATERIAL Y METODOS.....	19
• CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	19
• CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	19
• RESULTADOS.....	21
• DISCUSIÓN.....	26
• CONCLUSIONES.....	28
• BIBLIOGRAFÍA.....	29

## ANTECEDENTES:

El cáncer cérvico-uterino es una de las principales causas de muerte por cáncer en los países en vías de desarrollo. (Wolfgang *et al.* 1999) En México, esta enfermedad es responsable de aproximadamente 25% de las muertes por cáncer en mujeres (Mohar *et al.*, 2000). Como todas las neoplasias malignas, el carcinoma de cérvix resulta como consecuencia de una serie de alteraciones genéticas en genes que regulan la proliferación celular y apoptosis. El VPH es un importante factor en su etiopatogenia. El DNA del virus se encuentra integrado en las lesiones invasoras en más del 90% de los casos y sus oncoproteínas inactivan los genes celulares supresores p53 y retinoblastoma (McLachlin 2000) El carcinoma cervical sigue un patrón de progresión relativamente ordenado. Se caracteriza primeramente por diseminación locorregional a los órganos pélvicos y ganglios linfáticos regionales y posteriormente a órganos a distancia. La elección del tratamiento depende de factores como el estadio clínico, el tamaño tumoral, presencia de ganglios pélvicos infiltrados por tumor, la histología, condiciones mórbidas y la preferencia de la paciente.

La mayoría de las pacientes (alrededor del 80%) se presentan con enfermedad localmente avanzada en nuestro país (estadios IB2 a IVA). A pesar de las nuevas modalidades terapéuticas la supervivencia a 5 años de las pacientes con cáncer localmente avanzado va desde un 25 a 70%. La mayoría de ellas recurre tanto a nivel pélvico como sistémico por lo que es necesario continuar con estudios con la intención de mejorar el pronóstico de estas pacientes. (Hinojosa *et al.*, 2000)

Se han considerado varios factores pronósticos en el cáncer de cérvix incluyen las características propias de las pacientes, factores pronósticos relacionados con el tumor, la biología del mismo (lo cual nos compete en esta tesis), su extensión y el tratamiento.

Con respecto al tratamiento, en general, los carcinomas microinvasivos (estadio IA1) se tratan con cirugía quedando curados prácticamente la totalidad de los casos. Los tumores en estadios clínicos tempranos (IA2 a IB1) se tratan habitualmente mediante histerectomía radical y linfadenectomía pélvica lo que produce porcentajes de curación por arriba del 90% (Stephen *et al.*, 1996). Las pacientes con estadios clínicos tempranos pero de mayor volumen o extensión tumoral como son los estadios clínicos IB2 y IIA (tumor limitado al cérvix mayor de 4 cm y tumor con extensión al tercio superior de vagina respectivamente) son tratada mediante histerectomía radical y linfadenectomía pélvica o radioterapia radical con resultados equivalentes. Sin embargo, la supervivencia a 5 años de estas pacientes puede ser tan bajo como de un 60% oscilando entre 60 y 90%. El tratamiento de las pacientes con enfermedad avanzada (IIB a IVA) que desafortunadamente son las más frecuentemente observadas en nuestro país, tradicionalmente ha consistido en radioterapia como modalidad única, siendo el pronóstico de estas pacientes menos alentador, lográndose porcentajes de supervivencia a 5 años de 70 a 15% (Lanciano 2000). Para las pacientes que se presentan con enfermedad metastásica a distancia (IVB) o aquellas con recurrencia o persistencia de la enfermedad, la mediana de supervivencia es de aproximadamente de 8 meses.

No ha habido mejoría substancial en el tratamiento del cáncer de cervix desde el advenimiento de la irradiación con Megavoltaje en 1950. Diferentes estrategias se han realizado con la finalidad de mejorar los resultados de la radioterapia, sin embargo ninguna ha sido exitosa. Como resultado de esto se han considerado nuevas estrategias como la quimioterapia-radioterapia concomitante.

La quimioterapia concomitante con radioterapia es una modalidad que se ha estado experimentando en los últimos años en las pacientes con cáncer de cervix localmente avanzado. El principal fundamento de este abordaje terapéutico es el sinergismo existente entre la radioterapia y quimioterapia a través de varios posibles mecanismos: incremento de las lesiones letales al DNA, promoviendo la sincronización de las células hacia fases más sensibles a la radiación y reduciendo la fracción de células hipóxicas resistentes a la radiación. Si además la quimioterapia se administra a dosis mayores que las necesarias para la radiosensibilización actúa contra las metástasis subclínicas. (Leman et al., 2000).

Desde los años ochenta se han publicado varios estudios fase I y II de quimioterapia concomitante con radiación, siendo los agentes más usados cisplatino, fluorouracilo y mitomicina C. Aunque los resultados de estos estudios han sugerido un efecto favorable sobre la supervivencia, no existían datos sólidos demostrando tal superioridad. Sin embargo, recientemente se han publicado 8 estudios aleatorizados de quimioradioterapia concomitante versus radioterapia sola (Keys et al., 1999; Rose et al., 1999; Whitney et al., 1999; Peters et al., 1999; Morris et al., 1999; Wong et al., 1999; Roberts et al., 2000; Pearcey et al., 2002). Dos de esos estudios fueron llevados a cabo en estadios clínicos tempranos, uno como tratamiento adyuvante y el otro como tratamiento definitivo en estadios IB2 (Peters et al., 1999; Morris et al., 1999). Siete de los ocho estudios consistentemente demostraron la superioridad del tratamiento combinado en términos de período libre de enfermedad y supervivencia, además es notable la reducción no sólo de las recurrencias pélvicas sino también de las sistémicas.

Los datos de los 5 estudios en conjunto han llevado al panel de expertos del Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (NCI) a recomendar el uso de quimioterapia concomitante en todas las pacientes (evidentemente cuya condición médica lo permita) con tumores localmente avanzados (del IB2 al IVA). Queda a consideración sin embargo, el esquema de quimioterapia a utilizar. Los resultados de los estudios sugieren que el cisplatino semanal es menos tóxico e igualmente efectivo que los regímenes que utilizan 5-FU junto con el platino por lo que este esquema sería el más recomendable.

Sin embargo a pesar de los estudios previamente comentados con quimioterapia y radioterapia concomitante las pacientes con diagnósticos de cáncer cervico-uterino localmente avanzado continúan con recaída local y sistémica ó persistencia de la enfermedad. Una proporción considerable de las recaídas ó persistencias al tratamiento son sistémicas y por lo tanto la identificación de algunas características del tumor podrían predecir la diseminación de metástasis a distancia y podría ayudar a seleccionar estos pacientes potenciales que podrían beneficiarse de otros tratamientos específicos como quimioterapia sistémica.

Si bien el tratamiento estándar actual es la quimioterapia concomitante con radioterapia como tratamiento definitivo, es necesario seguir ensayando nuevas combinaciones de modalidades terapéuticas, e investigar factores moleculares y características biológicas y funcionales de éste cáncer, con la intención de mejorar el pronóstico de estas pacientes y al mismo tiempo, en lo posible disminuir la morbilidad del tratamiento.

Existe controversia acerca de las diferentes extirpes histológicas como factor pronóstico en el cáncer cervico-uterino. Es bien reconocido que el carcinoma epidermoide representa el 80-90%, de los cáncer de cérvix, y el sistema de la FIGO, más comúnmente empleado divide los carcinomas de células escamosas en carcinomas de células grandes queratinizante invasor, carcinomas de células grandes no queratinizante, y carcinomas escamosos de células pequeñas.<sup>16</sup> La mayoría de los autores coinciden en que las pacientes con cáncer de células escamosas pequeñas tienen peor pronóstico que las pacientes con carcinoma cervico-uterino con cáncer de células grandes queratinizante ó no queratinizante. Existe otra variedad de carcinomas que podría confundirse con el cáncer de células escamosas de células pequeñas y nos referimos al carcinoma de células anaplásicas de células pequeñas, los cuales tienen alta actividad mitótica y se ha reportado que aproximadamente del 30 a 50% de los carcinomas anaplásicos tienen características neuroendócrinas. Estos carcinomas anaplásicos de células pequeñas son más agresivos y pobremente diferenciados que el carcinoma escamosos de células pequeñas; la mayoría de los autores reporta que los rangos de supervivencia son menores del 50% en las pacientes con estadios clínicos I ó tempranos.<sup>16-18</sup>

Otras extirpes histopatológicas importantes corresponde al adenocarcinoma (10-20%), el cual puede ser mixto ó puro (carcinoma adenoescamoso). Una amplia variedad de tipos celulares, patrones de crecimiento, y grados de diferenciación se han observado. Aproximadamente el 80% de los adenocarcinomas contienen células diferenciadas, con características de epitelio glandular epitelial y producción intracitoplásmica de mucina.

Los tumores restantes corresponden a carcinomas de células endometrioides, de células claras, intestinales, ó de tipo celular mixto. Histológicamente estos tumores son indistinguibles de los tumores de endometrio ó de ovario.

Los adenocarcinomas de desviación mínima son raros y muy bien diferenciados y el patrón glandular es muy semejante a las glándulas endocervicales, y por tanto el adenocarcinoma de desviación mínima no ha sido reconocido como un tumor con características malignas, estudios tempranos reportan que las mujeres con estos tumores tienen muy buen pronóstico.<sup>16-18</sup>

Si bien, hemos mencionado que los subtipos histológicos más frecuentes son el carcinoma cervicouterino epidermoide y el adenocarcinoma con sus variantes, no hay evidencia clara de que estos subtipos histológicos difieran en las características clínicas. Sin embargo algunos artículos sugieren que los tumores con diferenciación glandular son más agresivos y que infieren pobre pronóstico<sup>19-20</sup>, otros autores no documentan tales hallazgos<sup>21-23</sup>, de acuerdo con lo último reportado en la FIGO en el resultado del tratamiento en 12, 153 pacientes tratadas desde 1990 a 1992, demostró que no hay

diferencia en supervivencia entre el cáncer cervicouterino de células escamosas y los tumores glandulares.<sup>24</sup>

## CANCER DE CERVIX CON CARACTERISTICAS NEUROENDOCRINAS

Otro subtipo histológico del cáncer cervicouterino incluye el cáncer neuroendocrino ó de células pequeñas y los tumores carcinoídes, reconocidos por la Organización Mundial de la Salud, muchos estudios han demostrado que este subgrupo de tumores son más agresivos y muestran alta frecuencia de metástasis a distancia.<sup>25-26</sup> La incidencia para estos tumores oscila del 1 A 6.5% de todos los carcinomas cervicales, y es un dilema diagnóstico para el anatomopatólogo y un desafío terapéutico para el clínico. El dilema para el primero se debe al gran número de entidades anatomopatológicas descritas como “cánceres de células pequeñas”, entre las que incluyen el carcinoma de células escamosas no queratinizantes de células pequeñas diferenciado, y el carcinoma neuroendocrino (células en avena). Recientemente el Colegio Americano de Patólogos y el Instituto Nacional de Cáncer reconoce cuatro categorías de tumores endocrinos del cérvix: 1) Tumores carcinoídes típicos, 2) Tumores carcinoídes atípicos, 3) Carcinoma neuroendocrino de células grandes y 4) Carcinoma de células pequeñas.<sup>27-29</sup>

### **Tumor carcinoide Típico:**

El tumor carcinoide típico tiene un patrón trabecular, nodular. Forma rosetas comúnmente. Las células neoplásicas son redondas, pequeñas y uniformes y tienen un patrón fino, granular de cromatina y un nucleolo. Las figuras mitóticas son raras. Más del 70% de los carcinoídes atípicos son argirófilos y muestran reactividad positiva para los marcadores neuroendocrinos, que pueden ser reconocidos por el microscopio de luz. Ultraestructuralmente estos tumores contienen gránulos neurosecretorios de electrodensidad variable.

### **Tumor Carcinoide Atípico:**

En contraste con los carcinomas carcinoide típicos, son hipercelulares y muestran atípia citológica, exhiben un incremento de la actividad mitótica (5-10 figuras mitóticas por campo), y contienen foco de necrosis. Ambos tumores sin embargo muestran el mismo patrón de crecimiento. Sus características inmunohistoquímicas, y las del microscopio de luz son similares. La mayoría de los carcinoídes atípicos son argirófilos y muestran reacciones positivas a la cromogranina, sinaptofisina, y enolasa neurona específica. Aproximadamente una tercera parte de los carcinoídes atípicos expresan serotonina y una pequeña proporción expresa hormonas peptídicas.<sup>30</sup>

### **Carcinoma Neuroendocrino de Células grandes:**

El carcinoma neuroendocrino de células grandes es pobremente diferenciado, de alto grado y biológicamente de células pequeñas y atípicas parecidas al tumor carcinoide típico. El patrón de crecimiento de las células neuroendocrinas grandes es organoide, trabecular, forma cordones con prominente palidez y variable necrosis extensa. Las células neoplásicas de los carcinomas neuroendocrinos de células grandes son largas y

tienen abundante citoplasma con núcleo vesicular y nucleolo prominente. Las figuras mitóticas son múltiples, (más de 10 x10 en un campo de alto poder).

El diagnóstico de los carcinomas neuroendocrinos debe de ser confirmado con granos de plata, inmuno-histoquímica o microscopia electrónica porque los carcinomas del cérvix pobremente diferenciado pueden tener una apariencia neuroendocrina con canales convencionales. El carcinoma neuroendocrino de células grandes es argirófilo y muestra reacciones positivas a la cromogranina y sinaptofisina. Este tipo de tumor ha demostrado ser muy agresivo y de mal pronóstico<sup>31-32</sup>

### **Carcinoma de Células Pequeñas**

Se caracteriza por células pequeñas redondas o fusiformes con escaso citoplasma y núcleo hiper cromático con finos gránulos de cromatina y ausencia de nucleolo. Tienen numerosas figuras mitóticas y extensas áreas de necrosis características en esta neoplasia. Las células neoplásicas pueden crecer en forma difusa y formar trabeculas ó cordones. Aproximadamente el 60% de estos tumores no demuestran reactividad a la cromogranina, la sinaptofisina, y una tercera parte de estos no expresa enolasa neurona específica.

Estos carcinomas neuroendocrinos pueden identificarse mediante criterios característicos de microscopia óptica y electrónica, no pueden distinguirse de los carcinomas de células en avena del pulmón. Además, parecen comportar el peor pronóstico de los diversos carcinomas de “células pequeñas”. Por tanto es importante distinguir este subtipo concreto del cáncer del resto y considerar nuevos enfoques de tratamiento

En contraste con el cáncer cervicouterino de células escamosas los tumores endocrinos del cérvix, usualmente, no están confinados localmente al diagnóstico. Los nódulos linfáticos comúnmente se encuentran involucrados en 50-60% de los pacientes y la invasión vascular es habitual, con frecuencia recaen a nivel sistémico y tiene predilección por el hueso, cerebro, pulmón e hígado y el 80% se presenta al año del diagnóstico. El verdadero carcinoma cervical neuroendocrino de células pequeñas tiene muy mal pronóstico. Abeler reportó 26 casos, la supervivencia a los 5 años fue del 14% a pesar de la terapia agresiva que incluía cirugía, radioterapia y quimioterapia.<sup>29</sup>

En la estadificación I-II de la FIGO para el cáncer cervicouterino de células pequeñas reportan rango de supervivencia a 5 años de 0-60%, y para el estadio clínico III de la FIGO reportan 17% de supervivencia a 5 años.

Por estas razones se ha incrementado la quimioterapia sistémica como modalidad neoadyuvante ó adyuvante en éstos pacientes con carcinoma cervicouterino de esta histología. Aunque el diagnóstico de cáncer cervicouterino de células pequeñas se realiza con la examinación de hematoxilina y eosina, se ha observado que el 100% de éstos tumores expresan cuando menos un marcador neuroendócrino como enolasa neurona específico (NSE), cromogranina A (CgA), y sinaptofisina ( SYN).<sup>33-34</sup>

Varios estudios han descrito una serie de cambios moleculares involucrados en la patogénesis del carcinoma cervical de células escamosas. Es bien conocido que la infección por el virus del papiloma humano (HPV), juega un papel importante en la

patogénesis del carcinoma cervical así como otros cambios moleculares que actualmente se han reportado, como la relativa alta frecuencia de la pérdida de heterogeneidad (LOH) en las regiones del cromosoma 4p, 6q y las deleciones localizadas en el 3p. En contraste con la baja frecuencia del TP 53 y anomalías del gen RB son usualmente presentes, consistentemente con la inactivación mediada por el HPV y sus productos.<sup>35-36</sup>

Algunos autores han observado que en general los tumores con patrón neuroendocrino sugieren datos de mal pronóstico, y por consiguiente el significado pronóstico de los marcadores neuroendocrinos ha sido evaluado en pacientes con cáncer escamoso del cérvix con patrón neuroendocrino y en otros tumores más comunes; como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, colón, mama, ovario y cáncer de próstata, todos estos con diferenciación neuroendocrina.

### CANCER DE CERVIX CON PATRON NEUROENDOCRINO

Se ha reportado casos de cáncer de cérvix de células escamosas con patrón neuroendocrino<sup>37-38</sup> y existe especial controversia en el pronóstico de la enfermedad cuando éstas características se presentan, especialmente, en otro tipo de cánceres como pulmón, próstata, y mama.

El cáncer de cérvix con patrón neuroendocrino es una entidad muy rara y por lo tanto no hay evidencia clara acerca del pronóstico de esta enfermedad, dado que, se trata de una combinación poco frecuente. Barret, reportó gránulos neuroendocrinos positivos para el patrón neuroendocrino previamente, en tumores del tipo adenocarcinoma, adenoescamoso, pobremente diferenciado o indiferenciado, y cáncer de células pequeñas. Reportó 7 de 20 casos y el pronóstico de supervivencia es muy pobre en pacientes que contienen consistentemente gránulos neuroendocrinos, independientemente del estadio clínico y el grado de diferenciación de la neoplasias.<sup>39</sup>

Por otro lado, Savargaonkar estudió la expresión neuroendocrina con cromogranina en 67 pacientes con cáncer cervical del tipo adenocarcinoma, adenoescamoso, y carcinoma de células escamosas, encontró 20.9% de expresión neuroendocrina y controversial para el pronóstico de la enfermedad.<sup>40</sup>

En esta revisión pretendemos analizar el cáncer de cérvix de células escamosas con característica neuroendocrina, dado que se han descrito en otras patologías con especial controversia en el pronóstico de la enfermedad.

### CANCER DE PULMÓN CON DIFERENCIACION NEUROENDOCRINA

En el cáncer de pulmón de células pequeñas, es bien reconocido que presentan 75% de múltiples marcadores neuroendocrinos.

Desde 1970, los tumores neuroendocrinos del pulmón se han dividido en tres categorías, carcinoide típico (CT), carcinoide atípico y carcinoma de células pequeñas del pulmón. Más recientemente Travis et al<sup>41</sup> reconocieron el cuarto tumor neuroendocrino como carcinoma de células grandes neuroendocrino (LCCNEC) y recientemente la Organización Mundial de la Salud reconoció a este tumor como una

variante de carcinoma de células grandes. Es importante señalar que Iyoda et al y Jiang et al, concluyen que los carcinomas de células grandes con diferenciación neuroendocrina tienen peor pronóstico.<sup>42-43</sup>

#### EN EL CANCER DE PULMON DE CELULAS NO PEQUEÑAS

Linoila, et al<sup>44</sup> demostró que en el cáncer de pulmón de células no pequeñas presentan una gran variedad de marcadores neuroendocrinos; la cromogranina A (CgA) se encontró en 8% de los cánceres de pulmón de células no pequeñas, la enolasa neurona específica (NSE) se presentó en 52% y 7% de Leu-7. Por otro lado Balde et al demostró que los marcadores neuroendocrinos se presentan en el cáncer de pulmón de células no pequeñas en el 50%.<sup>33</sup>

En conclusión el cáncer de pulmón de células no pequeñas presenta diferenciación neuroendocrina del 30 a 50% y también se ha demostrado que éstos pacientes presentan pobre supervivencia.<sup>45</sup>

#### CÁNCER DE COLÓN CON DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA

En el cáncer de colón y recto también se ha demostrado diferenciación neuroendocrina. Siverseen et al<sup>46</sup> reportó marcadores de diferenciación neuroendocrina (cromogranina A y enolasa neurona específica) en el cáncer de colón y recto de un 15 y 36%, respectivamente y concluye que los pacientes con estos marcadores positivos tienen pobre pronóstico y supervivencia.

Amada et al<sup>47</sup> reportó hallazgos similares en pacientes con cáncer de colón y recto concluyendo que la CG (cromogranina A), por inmunohistoquímica es útil para identificar pacientes con diferenciación neuroendocrina y que es un factor pronóstico independiente de pobre supervivencia.

#### CANCER DE CAVIDAD NASAL Y SENOS PARANASALES DE CÉLULAS PEQUEÑAS CON DIFERENCIACIÓN NEUROENDOCRINA

Los carcinomas de células pequeñas con diferenciación neuroendocrina en la cavidad nasal y los senos paranasales son extremadamente raros. Perez et al<sup>48</sup> reportó que no hay diferencia de incidencia en el género y que independientemente de estadio clínico el pronóstico es malo. Todos los casos de esta serie fueron diagnosticados por inmunohistoquímica con CgA y ENE. Los tumores están compuestos de trabéculas, con extensas áreas de necrosis y hemorragia, se caracterizan por células pequeñas ó intermedias con escaso citoplasma y un núcleo oval ó redondo hiper cromático con alto grado mitótico.

En cáncer de mama y Cáncer de próstata también se ha reportado características neuroendocrinas, repercutiendo en el pronóstico de la enfermedad.

## DIFERENCIACION NEUROENDOCRINA

En muchos órganos y tejidos del cuerpo, hay una población de células, inicialmente referidas como células claras epiteliales, actualmente denominadas neuroendócrinas.

Hace más de 500 años se establecieron muchas similitudes entre las células endócrinas y las células neuronales, por ejemplo la apropiada estimulación de ambos tipos celulares, la liberación de sustancias químicas que actúan con receptores específicos de órganos vecinos ó a distancia y además ambas poseen actividad eléctrica que se incrementa al liberarse los productos secretados, los cuales, pueden actuar como hormonas clásicas, neurotransmisores, factores parácrinos ó autócrinos, y por éstas similitudes, fueron denominadas previamente células APUD (precursores de amina y descarboxilación), sin embargo por ahora la mayoría de los investigadores las denominan células neuroendócrinas. Inicialmente se pensó, que todas estas células provenían de la cresta neural. Las células neuroendócrinas tienen las siguientes derivaciones embriológicas:

- a) Derivados de la cresta neural: Médula adrenal, todos los paraganglios, células C parafoliculares del tiroides, melanocitos y células de Merkel de la piel;
- b) Derivados del tubo neural: Epífisis, hipófisis, células neuroendócrinas hipotalámicas;
- c) Derivados de origen endodérmico: Células del sistemas gastroentero-pancreático, el sistema broncopulmonar, células paratiroides, células de la placenta y otras células relacionadas

Las células neuroendócrinas se distribuyen ampliamente en todo el organismo normalmente: Adenohipófisis, glándula paratiroides, ganglios intra y extraadrenal, islotes pancreáticos, tracto broncopulmonar, laringe, tiroides, timo, piel, mama, tracto gastrointestinal, vejiga, en el urotelio, próstata y en el epitelio endocervical y exocervical.

## FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS

Estudios iniciales sugieren, que las células neuroendócrinas producen una hormona únicamente, sin embargo estudios actuales sugieren que estas células son un sistema multimensajero.

Las hormonas peptídicas son sintetizadas, en el retículo granular endoplásmico y en los gránulos secretorios del aparato de Golgi y otras hormonas peptídicas, tales como las catecolaminas que son sintetizadas en el citosol, y luego almacenados en los gránulos secretorios.

La secreción de cualquier célula neuroendócrina varía de acuerdo a las diferentes señales de su estado funcional normal y patológico. Diferentes estudios de inmunohistoquímica y de biología molecular han realizado interesantes señalamientos de las interrelaciones funcionales de varios sistemas neuroendócrinos. Por ejemplo, hormonas peptídicas aisladas desde el tracto gastrointestinal, han sido subsecuentemente

encontradas en el sistema nervioso central, donde funcionan como neurotransmisores ó neuromoduladores.

Otros péptidos inicialmente aislados desde el cerebro han sido localizados en células endocrinas del intestino, páncreas, pulmón, en donde tienen otras funciones parácrinas. Las células neuroendócrinas de diferentes tejidos pueden producir péptidos idénticos, la somatostatina, por ejemplo, está presente en ciertas neuronas hipotalámicas, células endocrinas broncopulmonares, células endócrinas tímica, y un subtipo de células C del tiroides.

Las células neuroendócrinas pueden producir múltiples péptidos distintos originados de una molécula precursora común. Por ejemplo la adrenocorticotropina (ACTH), es sintetizada desde una gran molécula precursora pro-opiomelanocortina (POMC)<sup>21</sup>. En la adenohipófisis, la POMC es procesada también a ACTH, pero también produce la B-lipotropina, y a la 16KD fragmento terminal N. Y en el mismo lóbulo intermedio de la hipófisis, la ACTH y la B-lipotropina son procesadas todavía a alfa-MSH, y B-endorfinas relacionadas a péptidos respectivamente.

La diversidad hormonal en una célula neuroendócrina puede ser el resultado de diferentes RNAm que se producen de un mismo gen.

## MARCADORES DE LAS CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS

Las células neuroendócrinas se han identificado en base al contenido de sus productos peptídicos, como se discutió previamente, ó por la presencia de productos no peptídicos. Estos productos pueden ser identificados por inmunohistoquímica, anticuerpos monoclonales, y técnicas más sofisticadas.

La cromogranina y la secretograninas (Cg/Sg), representa una amplia familia de proteínas solubles que predominan en los gránulos secretorios, (ver el cuadro num.1). La función de esta familia de proteínas es desconocida, han sugerido que representa un papel importante en el procesamiento y la regulación de los péptidos.<sup>49</sup>

La Cg/Sg son ampliamente distribuidas a través del sistema neuroendócrino tienen patrones distintivos en los diferentes tejidos. Aunque muchas células neuroendócrinas contienen CgA, CgB, y SgII, otros contienen solamente una ó dos de estas proteínas. Por ejemplo las células C del tiroides contienen CgA, SgII, pero no CgB.<sup>50</sup>

Las membranas de pequeñas vesículas sinápticas, contienen una compleja familia de proteínas que incluyen las sinaptofisinas, vesículas sinápticas asociadas con las membranas de las proteínas (VAMP/sinaptobrevina), syntaxina y sinaptosome-asociada a una proteína 25 (SNAP25), la cual juega un papel importante en las vesículas sinápticas, en activación, fusión, y regulación de la exocitosis.

La sinaptofisina y las proteínas relacionadas son ampliamente distribuidas en los nervios terminales del sistema nervioso central y periférico, y están también presentes en las células que son especializadas, para la regulación ó la secreción de las hormonas. La sinaptofisina tiene un patrón punteado en las regiones sinápticas de las neuronas y tiene una distribución difusa en el citoplasma de las células neuroendócrinas. Aunque algunas de estas enzimas están presentes en la mayoría de las células neuroendócrinas, otras tienen una distribución más restringida.

La enolasa neurona específica, ha sido considerada un marcador genérico, para las neuronas y las células neuroendócrinas. Los productos de la enolasa neurona específica son producto de tres genes independientes, los cuales han sido designados alfa, beta y gamma<sup>50</sup>.

La beta enolasa esta presente en el tejido muscular, las enolasas híbridas (beta y gamma), se han identificado en megacariocitos, y una variedad de otras células. Las enolasas no neuronales (alfa-alfa), están presentes en tejido fetal, células gliales y muchos tejidos no endócrinos. Aunque la sensibilidad de la enolasa neurona específica para detectar las células neuroendócrinas es alta, la especificidad es baja. Seshi et al han demostrado un alto grado de especificidad con anticuerpos monoclonales para la enolasa neurona específica<sup>50</sup>. Algunos de estos anticuerpos monoclonales reaccionan predominantemente con las fibras nerviosas y otras reaccionan exclusivamente con perikarion ó con el perikarion de fibras nerviosas asociadas.

A continuación se menciona en la tabla1, algunos marcadores para tumores neuroendocrinos.

TABLA 1

---

MARCADORES DE LAS CÉLULAS NEUROENDÓCRINAS

---

- 1.- Contenido de amina fluorogénico.
  - 2.- Aminoprecursor (5 hidroxitriptófano y DOPA
  - 3.- Acido aminoaromático y descarboxilasa
  - 4.- Colinesterasa
  - 5.- Alfa glucorofosfato deshidrogenasa
  - 6.- Síntesis de hormonas peptídicas
  - 7.- Canales voltaje dependientes de Ca y Na
  - 8.- Excitabilidad eléctrica
  - 9.- Enolasa Neurona Específica
  - 10.-Cromogranina y Secretogranina
  - 11.-Cromomembrina B
  - 12.-Sinaptofisina y otras vesículas sinápticas
  - 13.-Antígenos linforreticulares
  - 14.- Toxina del tétanos
  - 15.- Células Neuronales y Moléculas Adhesivas.
-

Por todo lo mencionado previamente decidimos realizar una serie de casos en pacientes con cáncer de cérvix escamoso y buscar intencionadamente diferenciación neuroendocrina, y relacionarla con la evolución de la enfermedad.

## JUSTIFICACION

El cáncer cervico-úterino tiene un impacto muy importante en México ya que es la neoplasia más frecuente y tiene repercusiones en los costos económicos en los Servicios de Salud, en la Sociedad y en la calidad de vida de la mujer Mexicana. Considerando esto, es muy importante estudiar la incidencia, el tratamiento y algunos factores pronósticos que finalmente pueden influir en la respuesta al mismo.

El cáncer de cérvix posee características que lo hacen especialmente atractivo para su estudio, y en nuestro país es sumamente importante entender y contribuir con los avances de su etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento. En los últimos tiempos existe un avance importante en cuanto al conocimiento de los factores etiológicos, de la biología tumoral del mismo, se han identificado factores del tumor y del huésped relacionados con la respuesta al tratamiento, y también existen modificaciones en el tratamiento que ha disminuido la mortalidad de las pacientes en un 30%.

Sin embargo a pesar de esté avance en el tratamiento y otros factores, las pacientes con cáncer cervico-úterino, aún en estadios tempranos, continúan con persistencia ó recaída de la enfermedad local y/ó sistémicas, por lo tanto es necesario con continuar estudios relacionados con factores pronósticos que pueden predecir en un momento dado la falla al tratamiento.

Existen algunos estudios que apoyan que los tumores neuroendocrinos de células pequeñas en el pulmón presentan muy mal pronóstico, sin embargo, existen reportes con que señalan lo contrario, y del mismo modo existen reportes en la literatura que reportan que el cáncer de próstata, mama y tiroides con esta diferenciación, confieren peor pronóstico.

Existen muy pocos reportes en la Literatura Mundial y es controvertido la existencia de células con marcadores neuroendocrinos en el cáncer cervico-uterino de células no pequeñas, y por lo tanto no hay evidencia de que éstas células guarden algún factor pronóstico en el mismo. En este trabajo se pretende investigar, la existencia de éstas células con diferenciación neuroendocrinas en el cáncer cervico-uterino de células no pequeñas y relacionarlos con las características clínicas y su asociación como factor pronóstico.

## DEFINICION DEL PROBLEMA

El cáncer cervico-úterino es la neoplasia más frecuente y tiene repercusiones en los costos económicos en los Servicios de Salud, en la Sociedad y en la calidad de vida de la mujer Mexicana. Considerando esto, es muy importante estudiar la incidencia, el tratamiento y algunos factores pronósticos que finalmente pueden influir en la respuesta al mismo.

Actualmente, existe un avance importante en cuanto al conocimiento de los factores etiológicos, de la biología tumoral, así como, se han identificado factores del tumor y del huésped relacionados con la respuesta al tratamiento. Por otro lado existen modificaciones en el tratamiento que han disminuido la mortalidad de las pacientes en un 30%.

Sin embargo a pesar de este avance en el tratamiento y otros factores, las pacientes con cáncer cervico-úterino, aún en estadios tempranos, continúan con persistencia ó recaída de la enfermedad local y/o sistémicas por esto consideramos necesario, que deben continuar los estudios relacionados con factores pronósticos que pueden predecir en un momento dado la falla al tratamiento.

Los marcadores neuroendocrinos señalan datos de mal pronósticos en otros tumores, como pulmón, próstata, colón, entre otros, y en cáncer de cérvix existe muy poca información al respecto. Por esto, nos hemos planteado las siguientes preguntas:

¿Cuál es la frecuencia de los marcadores neuroendocrinos en el cáncer cervicouterino de células no pequeñas? ¿Cuál es la frecuencia de estos marcadores neuroendocrinos en líneas celulares de cáncer de cérvix?

¿Podría influir la presencia de estos marcadores neuroendocrinos en el pronóstico de las pacientes?

## **OBJETIVO GENERAL**

- 1.- Investigar la frecuencia de diferenciación neuroendocrina en pacientes con cáncer de  
cérvix de células no pequeñas, (epidermoide, adenocarcinoma, adenoescamoso).
- 2.- Asociar los hallazgos de diferenciación neuroendocrinas en pacientes con  
cáncer de cérvix de células no pequeñas previamente tratadas con la evolución  
clínica de las pacientes.
- 3.- Investigar la expresión de marcadores neuroendocrinos en líneas celulares de  
cáncer de cérvix.

## **HIPOTESIS DE TRABAJO**

Existe un subgrupo de pacientes con cáncer de cérvix de células no pequeñas que presentan diferenciación neuroendocrina, y es posible que la frecuencia de estos marcadores se encuentre relacionada con mala evolución clínica en estas pacientes.

## **HIPOTESIS NULA**

No existe la diferenciación neuroendocrina en las pacientes con cáncer de cérvix de células no pequeñas y no hay correlación alguna con el pronóstico de las pacientes.

## MATERIAL Y METODOS

Revisamos 54 tumores del archivo de patología con sus respectivos cortes histopatológicos de pacientes con cáncer de cérvix de células no pequeñas (epidermoide, adenocarcinoma y adenoescamoso), previamente tratadas en el Instituto Nacional de Cancerología en el periodo comprendido entre marzo de 1999 a enero del 2000, se excluyeron a las pacientes con cáncer de cérvix indiferenciado o neuroendocrino de células pequeñas.

Todas las pacientes fueron tratadas previamente, y de éstas 37 correspondían a cáncer de cérvix en estadios clínicos Ib2 a IIB, y a un protocolo de Quimioterapia Neoadyuvante que consistió en aplicar quimioterapia a base de cisplatino ( a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup>/S.C. día 1) y gemcitabina (1000 mgrs/m<sup>2</sup>/S.C.día 1 y 8), cada tres semanas. Al finalizar tres ciclos las pacientes fueron valoradas por dos ginecooncólogos o cirujanos oncólogos y en las pacientes que había respuesta se realizó un tratamiento quirúrgico que consistió en Histerectomía Radical tipo III, más linfadenectomía pélvica bilateral, en las pacientes que se encontró metástasis a retroperitoneo se abortó el tratamiento. En las pacientes en las cuales no fue posible el tratamiento Quirúrgico recibieron quimiorradioterapia concomitante con cisplatino 40 mg/m<sup>2</sup>/S.C. y radioterapia externa 50Gys de lunes a viernes, seguido de 1 ó 2 tiempos de Braquiterapia. Los resultados de estudios se encuentran ya publicados.<sup>52- 53</sup>

Se incluyó a 17 pacientes con cáncer de cérvix en estadios clínicos IB a IIa de un estudio clínico randomizado comparando RT pélvica estándar (10 pacientes) con la técnica de caja y 1 ó 2 aplicaciones de Braquiterapia vs 7 pacientes quienes recibieron un tratamiento neoadyuvante con quimioterapia PBV a base de cisplatino a dosis de 50 mg/m<sup>2</sup>/ S.C día 1, vincristina a dosis de 1.5mg/m<sup>2</sup>/S.C. y bleomicina a dosis de 25 mg/m<sup>2</sup> días 1-3 seguidas de histerectomía radical. El resultado de este estudio ya fue publicado.<sup>52</sup>

A los tejidos de las pacientes incluidas se les realizó Inmunohistoquímica buscando los marcadores de diferenciación neuroendocrinas más comunes, los cuales consisten en sinaptofisina, cromogranina, y enolasa neurona específica, con la técnica que se describe más adelante.

Todos los expedientes de las pacientes se analizaron con un promedio de 26 meses de seguimiento asociando los hallazgos de diferenciación neuroendocrina.

Por otro lado se realizó RT- PCR de los marcadores neuroendocrinos transcritos en el RNA mensajero de las líneas celulares de cáncer de cérvix, Vibo, Caski, SiHa, VIPa, INBL, CALO, Hela, y C33A.

Los marcadores neuroendocrinos buscados consistieron en Chromogranin A (CRO-A), Enolasa neurona específica (ENS) y Synaptofisina (SYPH).

### RT-PCR para synaptofisina

El RNA total de las células fue aislado usando TRIZOL, de acuerdo las instrucciones del manual (Gibco BRL). Un microgramo de RNA fue tratado con DNAasa I por 15 minutos a temperatura ambiente y después 10 minutos a 65°C para inactivar la enzima. Esta mezcla fue sometida a transcripción reversa de acuerdo a las instrucciones del kit (GeneAmp RNA PCR Kit, Perkin Elmer). Posteriormente 1 µl del templado de DNA fue amplificado por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en un volumen final de 25 µl, el cual contenía 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dNTPs, 50 mM KCL, 20 mM Tris-HCl, 2 unidades de Taqpol (Gibco BRL), y 2 µM de cada uno de los siguientes primers (1): sentido: 5' TCT GGC CAC CTA CAT CTT CC-3' y antisentido 5' CCT GTC TCC TTA AAC ACG AAC C-3'.<sup>51</sup>

## IMNUNOHISTOQUIMICA

Los tejidos fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 4 mm, posteriormente las laminillas fueron desparafinadas a 60 °C por 20 min posteriormente fueron colocadas 15 min en xilol a 60 °C, 2 minutos en xilol a temperatura ambiente, 2 minutos en xilol-etanol (1:1), se procedió a la hidratación del tejido en alcoholes graduales 2 min en cada uno, hasta agua bidestilada pura y finalmente colocadas en PBS (0.01M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0.01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15M NaCl, pH 7.2; después de la hidratación las laminillas no deben dejarse secar) en una cámara húmeda se pusieron a bloquear con peroxidasa endógena (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS) por 5 minutos a temperatura ambiente.

Se procedió a la recuperación de antígeno con amortiguador de citratos (0.01 mol/L sodium citrate pH 6) en baño maria en ebullición durante 40 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente.

Las laminillas fueron lavadas con PBS e incubadas con 150 µl de solución de bloqueo (PBS al 10% de SFB) a 37 °C por 30 min. Enseguida se elimina la solución de bloqueo por decantación en seguida se colocan 150 µl de anticuerpo primario diluido 1:75 en la solución de bloqueo se deja incubando toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. (polyclonal rabbit anti-SYPH antibody, sc-916, Sta Cruz Biotechnology, CA; monoclonal mouse-anti CRO-A antibody, M0869, Dako A/S, Denmark; monoclonal mouse-anti NSE antibody, M0873, Dako A/S, Denmark).

Posteriormente los anticuerpos monoclonales fueron detectados con el kit Dako EnVision<sup>TM</sup>+System, HRP(DAB) (K4011, Dako A/S, Denmark), y los anticuerpos policlonales fueron detectados con el kit Dako EnVision<sup>TM</sup>+System, HRP(DAB) (K4007, Dako A/S, Denmark). Los tejidos fueron contrateñidos en solución acuosa de hematoxylina, seguido de la secuencial deshidratación usando alcoholes graduales y xileno, finalmente fueron montados con resina.

Las líneas celulares ViPa, ViBo, CaLo, InBl, CasKi, C33, Hela, y SiHa (todas de carcinoma de cérvix) fueron crecidas en cajas de cultivo especiales para posterior inmunohistoquímica (Falcon<sup>®</sup> cat. 35-4102, Becton Dickinson, NJ.) y subsecuentemente fijadas en formol por 24 hrs a temperatura ambiente. Para la inmunohistoquímica fueron sometidas al mismo tratamiento que los tejidos a partir de la hidratación en xilol frío.

## RESULTADOS

Analizamos la expresión de los marcadores neuroendocrinos en las 54 pacientes con cáncer de cérvix. Las características de estas pacientes se muestran en la Tabla 1. Todas estas pacientes fueron previamente tratadas como mencionamos previamente y el estadio clínico consistió desde Ib2 a IIIB.

Tabla 1. Características de las pacientes

Numero de Pacientes	54
Edad	32 (28 -57)
FIGO	
IB2	17
Ila	5
Ilb	21
IIIB	11
Histología	
Escamoso	
Bien diferenciado	2
Moderadamente diferenciado	17
Pobrementemente diferenciado	31
Adenocarcinoma	
Bien diferenciado	0
Moderadamente diferenciado	0
Pobrementemente diferenciado	2
Adenoescamoso	
Bien diferenciado	0
Moderadamente diferenciado	0
Pobrementemente diferenciado	2
Tratamiento	
Radiación	10
QT Neoadyuvante c/PVB	7
QT Neoadyuvante c/CG	37
Positivos por Inmunohistoquímica	
CgA	0
NSE	0
SYN	5 (9%)

QT, quimioterapia; PVB, platino, vincristina, bleomicina; CG, cisplatino, gemcitabina, CgA, cromogranina A; NSE, enolasa neurona específica; SYN, synatofisina.

La media de edad fue de 32.6 años (rango 28-57 años) y la mayoría (93%) fueron carcinoma epidermoide o escamoso. Como mencionamos previamente 17 pacientes

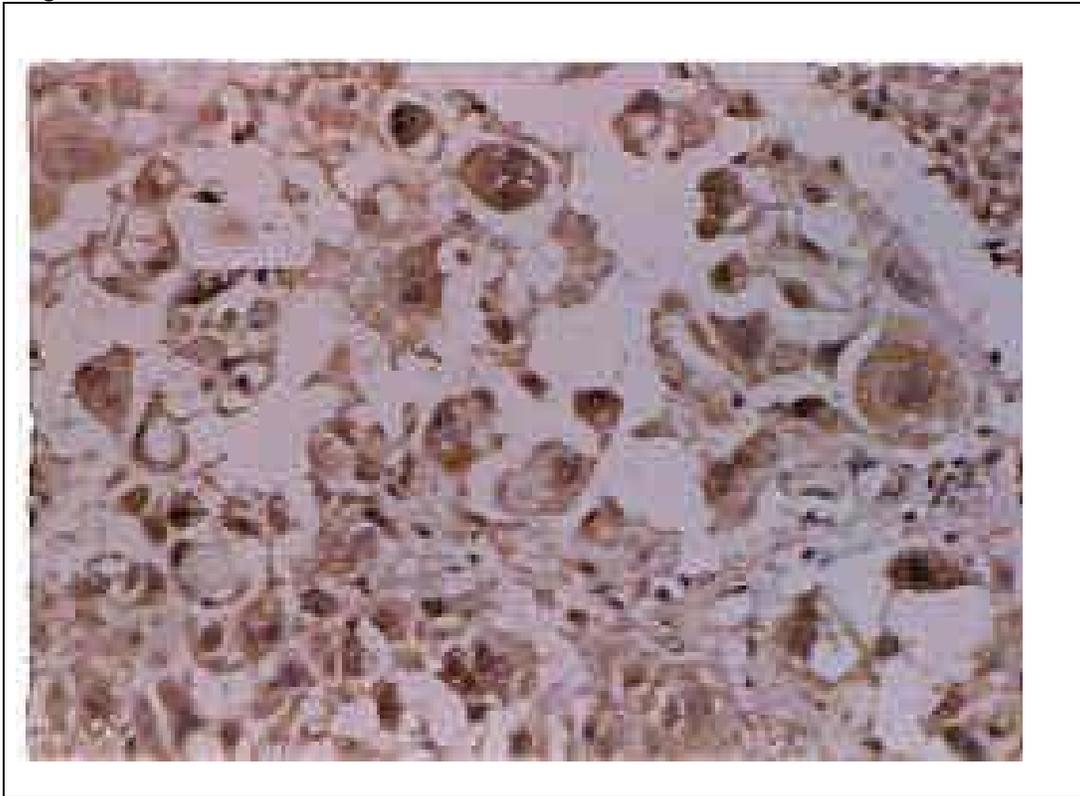
fueron tratadas en un estudio que consistió en Radioterapia estándar vs Quimioterapia con el esquema PVB. Los resultados de este estudio ya fueron publicados<sup>52</sup>.

Las 37 pacientes restantes fueron tratadas en el estudio previamente mencionado de Quimioterapia Neoadyuvante que consistió en 3 ciclos de Cisplatino a las dosis previamente comentadas y gemcitabina seguido de Histerectomía Radical o Quimiorradioterapia concomitante. Los resultados de este estudio también han sido publicados.<sup>53</sup>

El análisis de Inmunohistoquímica no reveló casos positivos para CgA o NSE. Los reactivos fueron positivos en 5 de 54 pacientes (9%) como gránulos multifocales citoplasmáticos que fueron de moderada intensidad comparado con un control positivo (páncreas). El porcentaje de positivos para estas células fue en un rango desde el 5% A 20%.

Ninguno de los casos negativos demostraron estos rasgos. Ver la figura 1.

Fig 1



Tumor con gránulos citoplasmáticos positivos para SYN.

Del reporte de los expedientes de las pacientes estudiadas tuvimos 50 pacientes con cáncer de cérvix de células escamosas o epidermoide de las cuales 2 fue bien diferenciado, 17 moderadamente diferenciado y 31 poco diferenciado como se observa en la tabla 2. Dos pacientes presentaron adenocarcinoma y otras dos adenoescamoso. De estas pacientes (54) únicamente 5 (9%), pacientes presentaron marcadores neuroendocrino, y de estas 1/2 corresponde a cáncer de cérvix epidermoide bien

diferenciado, 2/31 a cáncer epidermoide de cérvix no diferenciado y a 1/2 a adenocarcinoma poco diferenciado ( veáse la tabla 2).

Tabla 2

Expresión de sinaptofisina positiva por Inmunohistoquímica, en pacientes con cáncer de cérvix de células no pequeñas, de acuerdo a la histología.

<b>Histología</b>	<b>Número</b>	<b>SYN positivo</b>	<b>SYN negativo</b>
Escamoso	50	4	46
Bien diferenciado	2	1	1
Moderadamente diferenciado	17	1	16
Poco diferenciado	31	2	29
Adenocarcinoma	2	1	1
Bien diferenciado	0	0	0
Moderadamente diferenciado	0	0	0
Poco diferenciado	0	1	1
Adenoescamoso			
Bien diferenciado	0	0	2
Moderadamente diferenciado	0	0	0
Pobremente diferenciado	2	0	2

SYN sinaptofisina

El seguimiento de los casos fue posible, con una mediana de seguimiento de 26 meses y (rango de 7- 40 meses). Veintiuno (39%) presentaron recaída y 16(29%) murieron. Las 5 pacientes con SYN positivos recayeron antes de los 6 meses después de completar el tratamiento. Tres de ellas tuvieron recurrencia pélvica y sistémica, una tuvo recurrencia pélvica y una solamente falla sistémica. Cuatro de éstas pacientes con SYN positivos al momento del análisis se encuentran muertas con enfermedad.

Analizando los casos de las pacientes con cáncer de cérvix con marcadores neuroendocrinos positivos como se encuentran en el cuadro 3, tenemos:

**Paciente 1:**

Femenino de 32 años de edad con adenocarcinoma poco diferenciado invasor en estadio clínico IIB, recibió tres ciclos de quimioterapia neoadyuvante a base cisplatino y gemcitabina como se describió previamente y fue llevada a cirugía radical (Histerectomía Radical tipo III más linfadenectomía pélvica bilateral), el reporte histopatológico después del evento quirúrgico fue tumor residual de 3 x 3 cms con ganglios negativos y borde quirúrgico negativo, presentó progresión a los 5 meses de seguimiento a nivel local, ganglios inguinales, peritoneo, pulmón, recibió quimioterapia paliativa a base cisplatino a 100mg/m<sup>2</sup>/S.C. y 5 FU a dosis de 800 mg /m<sup>2</sup> /S.C., fallece un mes después.

**Paciente 2:**

De 53 años de edad, con cáncer epidermoide de cérvix de células grandes no queratinizante poco diferenciado invasor en estadio clínico IIB, (ver el cuadro 3),

recibió quimioterapia neoadyuvante a base de cisplatino y gemcitabina, y se realizó cirugía radical después de tres ciclos con reporte histopatológico de tumor residual de 3 x 3 cms, con ganglios negativos y bordes quirúrgico negativo, sin tratamiento adyuvante, presenta progresión tres meses después de concluir su tratamiento a nivel local y en ganglios inguinales, motivo por lo cual recibió quimioterapia y radioterapia concomitante a pelvis e ingles con respuesta clínica completa, sin embargo a los 4 meses de concluir el tratamiento presenta nuevamente progresión local e inicia quimioterapia paliativa sin embargo fallece un mes después.

Paciente 3:

Femenino de 55 años con diagnóstico de cáncer epidermoide de células grandes no queratinizante poco diferenciado en estadio clínico Ib2, recibió tratamiento neoadyuvante a base de cisplatino, vincristina y bleomicina a las dosis previamente mencionadas, con persistencia de la enfermedad motivo por lo cual no fue operada y recibió quimioradioterapia concomitante con cisplatino semanal a dosis de 40 mg/m<sup>2</sup>/S.C., y radioterapia extgerna 50Gys seguido de Braquiterapia dosis convencional, tres meses después de concluir su tratamiento, presenta progresión de la enfermedad en el primario, a ganglios inguinales, pulmón y sistema nervioso central, motivo por lo cual recibió un ciclo de quimioterapia paliativa a base de carboplatino a 6 ABC y taxol a 175/m<sup>2</sup>/S.C. sin respuesta, fallece un mes después.

Paciente 4:

Femenino de 37 años de edad con diagnóstico de cáncer epidermoide de células grandes no queratinizante bien diferenciado de cérvix en estadio clínico IB2, recibió quimioterapia neoadyuvante a base de PVB a dosis previamente mencionada, se realizó cirugía radical con reporte histopatológico de tumor residual de 15x 12 mm con bordes y ganglios negativos, presenta progresión de la enfermedad 4 meses después de concluir su tratamiento, motivo por lo cual recibió QTRT concomitante a dosis de cisplatino 40 mg/m<sup>2</sup>/s.c. y radioterapia externa a pelvis 50 Gys más braquiterapia a dosis convencional a 26 meses de seguimiento se encuentra viva sin enfermedad.

Paciente 5:

Femenino de 50 años de edad con diagnóstico de cáncer cervicouterino epidermoide de células grandes moderadamente diferenciado, en estadio clínico IB2, recibió quimioterapia neoadyuvante a base de cisplatino, vincristina y bleomicina (PVB), con respuesta parcial, se realizó cirugía radical con reporte histopatológico de tumor residual de 3 x 2 cms con 20/23 ganglios positivos y bordes negativos, recibió tratamiento adyuvante a base de quimioradioterapia concomitante con cisplatino semanal a dosis de 50 mg/m<sup>2</sup>/S.C. y radioterapia externa 50 G y más braquiterapia convencional. Tres meses después de concluir su tratamiento presenta progresión de la enfermedad a ganglios paraórticos y

supraclavicular, motivo por lo cual recibió quimioterapia paliativa sin repuesta y fallece tres meses después.

Tabla 3

Paciente	Edad	E.C.	Tx	Resp	Recaída	SLVE(m)	SV(m)	EA
1	32	IIB	Qt N-S	RC	Pelv/ Sist	5	10	Muerta
2	53	IIB	Qt N-S	RC	Pelv/ Sist	4	6	Muerta
3	55	IB2	Qt N-CT/RT	RC	Pelv/ Sist	3	9	Muerta
4	37	IB2	Qt N-S	RC	Pelv	5	34	Viva
5	34	IB2	Qt N-S	RC	Sist	3	8	Muerta

EC, Estadio Clínico; Tx, tratamiento; Resp, Respuesta; SLVE, Supervivencia libre de enfermedad; m, meses; SV, sobrevida global; EA, Estado actual; CT/RT, quimiorradioterapia concomitante; Qt N, Quimioterapia neoadyuvante; S, cirugía; RC, respuesta completa; Pelv, pelvica; Sist, sistémica.

#### Expresión de los marcadores Neuroendocrinos en las líneas celulares

También obtuvimos información de líneas celulares de los marcadores neuroendocrinos, en varias líneas celulares de carcinoma cervical, la inmunohistoquímica fue realizada en 8 líneas celulares. Solamente la línea celular C33A (cáncer cervical indiferenciado) fueron positivos para SYN. Mientras que en las líneas celulares para carcinoma escamoso CasKi fue positivo para CgA para investigar si el uso de un método más sensible aumentaría la detección de los marcadores neuroendocrinos, se realizamos la reacción de polimerasa de transcriptasa reversa ( RT-PCR) SYN en las líneas celulares. Como se muestra en la Figura 2, solamente la línea celular C33A fue positiva, confirmando los resultados de Inmunohistoquímica e indicando que el resto de las líneas celulares carecieron de synaptofisina así como de los niveles de RNA.

Tabla 4

En las líneas celulares encontramos que únicamente en dos líneas celulares fueron positivas para diferenciación neuroendocrinas y comprende la línea celular de CasKi positivo para cromogranina y C33A para sinaptofisina. El resto de las líneas celulares fue negativo para los marcadores neuroendocrinos y por lo tanto para diferenciación neuroendocrina

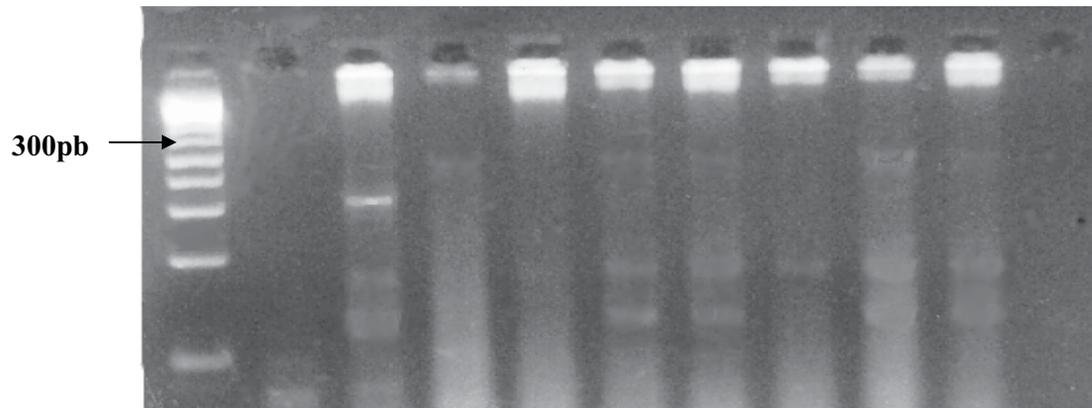
#### INMUNOHISTOQUIMICA EN LINEAS CELULARES

<b>LINEA</b>	<b>NSE</b>	<b>CgA</b>	<b>SYN</b>
C33A	-	-	+
ViBo	-	-	-
CasKi	-	+	-
SiHa	-	-	-
ViPa	-	-	-
HeLa	-	-	-
INBL	-	-	-
CaLo	-	-	-

NSE enolasa neurona específica  
CgA cromogranina A  
SYN sinaptofisina

## RT-PCR DE SINAPTOFISINA EN LINEAS CELULARES

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1. Marcador de 1kb
2. Control negativo
3. Células C33A
4. Células ViBo
5. Células Caski

6. Células SiHa
7. Células ViPa
8. Células HeLa
9. Células INBL
10. Células CaLo

## DISCUSION

Dado que en los carcinomas neuroendocrinos del cérvix, son parecidos a los carcinomas neuroendocrinos de otros sitios, tales como pulmón, próstata, colón y otros, en los cuales se ha observado metástasis tempranas, datos de mal pronóstico y alta mortalidad, nosotros decidimos investigar si en este subtipo de cáncer cervico-uterino que es el más frecuente, que expresa marcadores neuroendocrinos comúnmente observado en cáncer de células pequeñas, y explorar si esta expresión puede identificar tumores de mal pronóstico. Nuestros resultados encontraron que el 9% de los cánceres de células no pequeñas expresan SYN y que estos tumores fueron más agresivos que otros tumores similares que tuvieron SYN negativo.

La hipótesis que el cáncer de células pequeñas neuroendocrino puede originarse en células neuroendocrinas en el cérvix normal (54) o de una célula madre indiferenciada que adquiere un fenotipo neuroendocrino (55).

Este hecho puede explicar la frecuencia coexistente de cáncer in situ o carcinomas invasivos y/o características glandulares, en algunos carcinomas de células neuroendocrinas de células pequeñas (56-57), aunque estos tipos de diferenciación no alteran el pronóstico. Por otro lado, la significancia de las células neuroendocrinas en carcinoma de células escamosas o de células glandulares es desconocido.

En este trabajo nosotros evaluamos los tejidos de cáncer de células no pequeñas (epidermoide ó adenoescamoso) la presencia de tres marcadores neuroendócrinos en cáncer de cérvix: Cg A, SIN, y NSE, y los primeros dos fueron los más frecuentes en estos tejidos. Gersell et al (33), reportaron que la NSE y Cg A en 11 de 13 casos y SYN en 10 casos. Van Nagell et al (58), detectaron NSE y Cg A en 5 y 3 de 15 casos pero no evaluaron en los tejidos SYN. En otro estudio de 26 carcinomas de células pequeñas, los marcadores neuroendocrinos fueron detectados en 19 casos (79%): NSE fue reportada en todos los casos 19, aunque SYN estuvo presente en 7 y CgA en 5 casos (29). Ueda et al (59), también reporta NSE positivo en 90% y CgA positivo en 70% de los casos de su estudio de carcinomas de células pequeñas de pulmón. En contraste a estos estudios, nosotros encontramos la expresión de SYN. Nosotros no tenemos una explicación satisfactoria para nuestros hallazgos. Sin embargo, estas diferencias podrían ser los resultados de diferentes anticuerpos utilizados (monoclonal o policlonal), así como el epitope reconocido por cada uno de estos anticuerpos. También es posible que la inmunohistoquímica realizada tenga una detección limitada y tal vez sea necesario utilizar pruebas más sensibles, tales como RT PCR. Por otro lado Abbona y Colbs. (57), detectaron en sus estudios Cg A en el RNA mensajero en 50% de los carcinomas de células no pequeñas de los cuales solamente el 5% fueron positivos por inmunohistoquímica. Para nuestro conocimiento este es el primer estudios que evalúa tres marcadores neuroendocrinos en una población no seleccionada de pacientes con cáncer cervical que abarcan los tres tipos más comunes de cáncer cervical ( epidermoide, adenocarcinoma, adenoescamoso), además de su grado histológico. Son pocos los estudios similares a este, los que se han reportado previamente en la literatura, generalmente reportan tumores más pequeños y pobremente diferenciados. Barret et al (39), analizó 19 casos por inmunohistoquímica de cánceres escamosos pobremente diferenciados, adenoescamosos, y adenocarcionmas, y encontró solamente un casos positivo para NSE, aunque tres tumores adicionales fueron positivos con tinción de gránulos neurosecretorios o

examinación ultraestructural. En otro estudio pequeño de 7 casos (3 adenocarcinomas pobremente diferenciados y 4 adenocarcinoma escamoso), solamente 2 reaccionaron a NSE (60). En un estudio más grande de 67 casos (32 adenocarcinoma, 18 adenoescamoso, 17 carcinoma epidermoide), fueron positivos para CgA por inmunohistoquímica 14 (20.9%) y hubo una tendencia para una asociación entre positivos y diferenciación intestinal (40).

Debido a que existe información muy limitada sobre la frecuencia de éstos marcadores neuroendocrinos en cáncer de cérvix de células no pequeñas (adenocarcinoma, epidermoide y adenoescamosos), y de valor pronóstico indefinido, es necesario investigar más al respecto. En los dos estudios previamente citados (39,40), existe una tendencia de desenlace de pobre pronóstico en tumores con marcadores CgA positivos por inmunohistoquímica. Cinco de 7 casos en el estudio de Barret et al, murieron en los primeros 24 meses de seguimiento (39), mientras que Savargaonkar et al (40), encontró que 6 de 14 pacientes con tumores CgA positivos murieron por enfermedad. Interesantemente en nuestro reporte las cinco casos positivos recayeron en los primeros 6 meses después del tratamiento y solamente una paciente se encuentra viva sin enfermedad. Estos resultados sugieren que las características neuroendocrinas, evaluados tanto por inmunohistoquímica para la expresión de SYN, confiere pobre pronóstico ya que en la mayoría de las pacientes se presentó metástasis a distancia tempranamente independientemente de la respuesta inicial a la quimioterapia. Deberíamos señalar que la expresión neuroendocrina por si misma no es diagnóstica de carcinoma neuroendocrino, y que los cánceres escamosos, adenoescamosos, o adenocarcinomas pueden expresar uno ó más de estos marcadores neuroendocrinos. Además estos tumores, tienen gránulos de argyrofila difuso definidos como marcadores neuroendocrinos, y tienen características histológicas bien definidas tales como organoides, trabeculas, patrón de cordones, células grandes con abundantes citoplasmas, núcleo vesicular y nucleolos prominentes (61).

El mecanismo por el cual la presencia de marcadores neuroendocrinos afecta el pronóstico de las pacientes estudiadas, aún no se conoce. Datos importantes de otros tumores sugieren que el valor pronóstico es dependiente del tipo de tumor específico. En cáncer de células no pequeñas por ejemplo, tres estudios (61-62) han demostrado diferenciación neuroendocrina se ha visto asociada con mejor pronóstico, aunque en otros estudios (63-64), los marcadores muestran una asociación con peor pronóstico.

La expresión de estos marcadores neuroendocrinos fue analizada en varias líneas celulares.

Los resultados demuestran que los hallazgos son similares a los observados a lo encontrado en las muestras, 10% de expresión en la líneas celulares.

Abona et al (57), demostró que algunos tumores que fueron negativos para CgA por inmunohistoquímica fueron positivos con RT-PCR. Porque la SYN, fue el único marcador detectado en estos tumores, fue escogido para el análisis de RNA en las líneas celulares, pero en ninguna otra línea celular más que C33A expresó el gen SYN, sugiriendo que no hay ventaja en utilizar la técnica de RT-PCR en estos tumores.

## **CONCLUSIONES:**

En conclusión, en este estudio retrospectivo con un análisis limitado por el número de pacientes, se demuestra que sólo un pequeño número de pacientes con cáncer de cérvix de células no pequeñas y en líneas celulares de cáncer de cérvix tienen los marcadores neuroendocrinos del tipo de SYN positivo, y que parece tener asociación con un mal pronóstico en las pacientes que expresan este marcador. Sin embargo, el análisis de este estudio es limitado, dado el número de pacientes, retrospectivo, entre otros, y se requieren más estudios para evaluar los marcadores neuroendocrinos en los tipos histológicos más frecuentes del cáncer de cérvix.

## BIBLIOGRAFIA

1. Wolfgang M.J. schoell,MD, Mike F. Janicek MD and Ramin Mirhashemi MD. Epidemiology and Biology of cervical Cancer. *Semin Surg Oncol* 1999; 16:203-211
2. Mohar et al.,2000. Mohar A, Frias-Mendivil M: Epidemiology of cervical cancer. *Cancer Invest* 2000;18:584-90.
3. McLachlin MD. Human papillomavirus in cervical neoplasia. *Clinics Lab Med.* 2000; 20: 450-62.
4. Hinojosa GL, Dueñas Gonzalez A. Papel de la quimioterapia en el tratamiento del carcinoma cervicouterino. *Revista Instituto nacional de cancerología.* 2000; 46:47-57.
5. Stephen A, Cannistra, Jonathan M. Niloff. Review article, cancer of the uterine cervix. *New Engl J Med* 1996 ;334 : 330-8.
6. Lanciano R. Optimizing Radiation Parameters for Cervical Cancer. *Semin Radiat Oncol*, 2000;10:36-43.
7. Lehman M, Thomas G. Is concurrent chemotherapy and radiotherapy the new standard of care for locally advanced cervical cancer. *Int. J gynecol Cancer* 2001, 11, 87-99
8. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, et al: A comparison of weekly cisplatin during radiation therapy versus irradiation alone each followed by adjuvant hysterectomy in bulky stage IB cervical carcinoma: a randomized trial of the Gynecology Oncology Group. *New Engl J Med* 1999; 340:1154-1161.
9. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB,et al: Concurrent cisplatin-based chemoradiation improves progression-free survival in advanced cervical cancer: results of a randomized Gynecologic Oncology Group study. *New Engl J Med* 1999; 340: 1144-1153.
10. Whitney CW, Sause W, Bundy BN, et al: A randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stages IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes. A Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1339-1348.
11. Morris M, Eifel PJ, Lu J, et al: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *New Engl J Med* 1999; 340:1137-1143.
12. Peters WA III, Liu PY, Barrett RJ 2<sup>nd</sup>, Stock RJ, Monk BJ, Berek JS, Souhami L, Grigsby P, Gordon W Jr, Alberts DS: Cisplatin, 5-fluorouracil plus radiation therapy are superior to radiation therapy as adjunctive therapy in high-risk, early stage carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *Procc Soc Gynecol Oncol* 1999; 28.
13. Wong LC, Ngan HYS, Cheung ANY, et al: Chemoradiation and adjuvant chemotherapy in cervical cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:2055-2060
14. Roberts KB, Urdueta N, Vera R, et al: Interim results of a randomized trial of mitomycin C as an adjunct to radical radiotherapy in the treatment of locally advanced squamous-cell carcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 2000;90:206-223
15. Pearcey R, Brundage M, Drouin P, Jeffrey J, Johnston D, Lukka H, MacLean G, Souhami L, Stuart G, Tu D. Phase III Trial Comparing Radical Radiotherapy With and Without Cisplatin Chemotherapy in Patients With Advanced Squamous Cell Cancer of the Cervix. *J Clin Oncol* 2002;20:966-972.
16. Disaia Philip, Cresman W. *Oncología iencológica* 1998; 5ta Ed:62-66.
17. DeVita 2003
18. Thomas C, Wright, Alex Ferenczy, Robert J Kurman. *Carcinoma and Other Tumors of the Cervix*
19. Lai CH, Hsueh S, Hong JH, et al. Are adenocarcinomas and adenoescamosoous carcinomas different from squamous carcinoma in stage IB and II cervical cancer patients undergoing primary radical surgery? *Int J Gynecol Cancer* 1999;9:28-36

20. Bethwaite P, Ycong ML, Holloway L, Robson B, Duncan GA, Lamb D. The prognosis of adenosquamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1985;65:416-22
21. Shingleton HM, Bell MC, Fremgem A, et al. Is there really a difference in survival of woman with squamous cell carcinomas , adenocarcinoma , and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? *Cancer* 1995;76:1948-55.
22. Pekin T, Kavak Z, Yildizhan B, Kaya H. Prognosis and treatment of primary adenocarcinoma, and adenocarcinoma of the cervix? *Eur J Gynecol Oncol* 2001;22:160-3.
23. Waldestron A.C., Hovath G. Survival of patients with adenocarcinoma of the uterine cervix in western Sweden. *Int J Gynecol Cancer* 1999;9:18-23.
24. FIGO annual report of the results of treatment in gynecological cancer. *J Epidemiol Biostat* 2001;6:5-44.
25. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurgan RJ et al. *Histological Typing of female genital tract tumors*, 2nd ed. S pringer- Verlag, Berlin 1994:
26. Miller B, Dockter M, El Torry M, and Photopulos. Small cell Carcinoma Of ther Cervix: A Clinical and Flow Cytometric Study. *Gynecologic Oncology* 1991;42:27-33
27. Albores- Saavedra J, Gersell D, Gilks CB, et al. Terminology of Endocrine Tumor of the Uterine Cervix: results of a workshop sponsored by the College of American Pathol and the National Cancer Institute 1997; 121: 34-39.
28. Warner TFCS. Carcinoid tumors of the uterine cervix. *J Clin Pathol.* 1978;31:990-995.
29. Abeler VM, Holm R, Nesland JM, et al. Small cell carcinoma of the cervix a clinicopathologic study of 26 patientes. *Cancer.* 1994;73:672-677.
30. Inoue T., Yamaguchi K., Suzuki H., Abe Kaaoru, Chihara T. production of immunoreactive Polypeptide Hormones in Cervical Carcinoma. *Cancer* 1984;53:1509-1513.
31. Gilks B, Young R, Gersell D, and Clement P. Large Cell carcinoma of Uterine Cervix: A clinicopathologic Study of 12 Cases. *Am J Surg Patol.* 1997;21; 905-914.
32. Rhemtula H, Grayson W, Iddekinge B, Tiltman A. Large cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix- a clinicopathological study of five cases. *S. Afr Med J* 2001;91:525-528.
33. Gersell DJ, Mazoujian G, Mutch DG, et al. Small cell undifferentiated carcinoma of the cervix. *Am J Surgn Pathol.* 1988;12:684-698.
34. O'Hanlan K, Goldberg G, Jones J, Runowics C, Ehlich L, Rodriguez L. Adjuvant Therapy for Neuroendocrine small Cell carcinoma of the cervix: Review of the Literature. *Gynecologic Oncology*:1991;43:167-172.
35. Crum Christopher P. The Molecular Biology of Neuroendocrine Cervical Carcinoma: Are We witnessing early of late Events? *Gynecologic Oncology* 1999;72:1-2
36. Wistuba I, Thomas B, Behrens C, Onuki N, Lindberg Guy, Albores J, Gadzar A. Molecular Abnormalities Associated with Endocrine Tumor of the Uterine Cervix. *Gynecologic Oncology* 1999;72:3-9
37. Stahl R, Demopoulos R, Biegelow B. Carcinoid Tumor within a Squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology* 1981;387-392
38. Chan J, Tsui W, Stewart Y, Tung, Ching R. Endocrine Cell Hyperplasia of the Uterine Cervix. *A.J.C.P.* 1990;92:825-830.
39. Barret R, Davos I, Leuchter R, Lagasse L. Neuroendocrine Features in Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas of the Cervix. *Cancer* 1987;60:2325-2330
40. Savargaonkar P, Hale RJ, Mutton A, Manning V, Buckley C. Neuroendocrine differentiation in cervical carcinoma. *J. Clin Pathol* 1995;49:139-41.
41. Travis W, Linnoila R, Tsokos M, Hitchcock C, Cutler G, anaieman al, Chrousos G, et al. Neuroendocrine Tumors of the Lung with proposed criteria for Large cell Neuroendocrine Carcinoma. *Am J of Surg Pathol* 1991;15:529-553
42. Iyoda A, Hiroshima K, Toyozaki T, Fujisawa T, Ohwada H. Clincial Characterization of Pulmonary Large Cell Neuroendocrine carcinoma and large cell carcinoma with neuroendocrine morphology . *Cancer* 2001;91:1992-2000.

43. Jiang S, Kameya T, ShoojiM, Dobashi Y, Shinada J, Yoshimura H. Large cell neuroendocrine carcinoma of the Lung. *Am J Surg Pathol* 1998;22:526-537.
44. Linnoila I, Mulshine J, Steinberg S, Funa K, Matthews J, CAotelingam J, Gazdar A. Neuroendocrine Differentiation in Endocrine and Nonendocrine Lung Carcinomas. *A.J.C.P.* 1988;90:641-651
45. Baldi A, Groger A, Esposito V, DiMarino M, Ferrara N, Baldi F. Neuroendocrine differentiation in Non Small cell Lung Carcinomas. *In vivo* 2000;14:109-114
46. Syversen U, Halvorsen T, Marvik R, Waldum HL. Neuroendocrine differentiation in colorectal carcinomas. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:667-674
47. Hamada Y, Oishi A, ShojiT, Tkada H, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M. Endocrine Cells and Prognosis in Patients with colorectal Carcinoma. *Cancer* 1992;69:2641-2646
48. Perez B, Salvatoe M, Caruana M, Huvos A, Shah J. Small Cell Neuroendocrine Carinoma of the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses. *Human Pathology* 1998;29:827-832.
49. DeLellis R, Dayal Y. Neuroendocrine System. *Histology for Pathologists* 1997;second Ed. Edited by Stephen S. Sernberg:1133-1151.
50. Baudin E, Gigliotti A, Ducreux M, Ropers J, Saborin J, Bidart J, Cailleux A, Bonacci R, Ruffié P, Schlumberger M. Neuron- specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumors. *British Journal of Cancer* 1998;78:1102-1107
51. Lacroix J., Becker HD., Woerner SM., Rittgen W., Drings P., von Knebel Doeberitz M. Sensitive detection of rare cancer cells in sputum and peripheral blood samples of patients with lung cancer by preproGRP-specific RT-PCR. *Int. J. Cancer*, 2001; 92:1-8.
52. Dueñas GonzalezA, Mota A, Lopez Graniel C et al. Neoadjuvant chemotherapy in squamous carcinoma of the cervix uteri stages Ib2 Ila. Preliminary results of a randomized study. *Rev Nac Cancerol* 2000;46:21-7.
53. Dueñas Gonzalez A., Lopez Graniel C, Gonzaaez A, et al. A phase II study of gemcitabine and cisplatin combination as induction chemotherapy for untreated locally advanced cervical carcinoma. *Ann Oncol* 2001;12:541-7.
54. TateshiR, Wada A, HayakawaK, Hongo J, Ishi S. Argyrophil cell carcinoma (apudomas) of the uterine cervix. Light and electron microscopic observations of 5 cases. *Vqirchows Arch A Pathol Anal Histopathology* 1975;366:257-74.
55. Mullins JD, Hiliard GD. Cervical carcinoid (“argyrophil cell carcinoma”) associated with an endocervical adenocarcinoma. A light and ultrastructural study. *Cancer* 1981; 47: 785-90.
56. Stahl R, Demopoulos R1,Bigelow B. Carcinoid tumor within a squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1981;11:387-92.
57. Abbona G, Papoti M, Viberti L, Macri L, Stella A, Bussolati G. Chromogranin A gene expression in non- small cell lung carcinomas. *J Pathol* 1998; 186:151-6.
58. Van Nagell JR, Donaldson Es, Wood EG, et al. Small cell cancer of the uterine cervix. *Cancer* 1977;40:2243-9.
59. Ueda G, Shimizo H, Satto J, TanakaY, Inoue M, Tnixawa O. An immunochemical study of small-cell and poorly differentiated carcinomas of the cervix using neuroendocrine markers. *Gynecol Oncol* 1989; 34:164-9
60. Sehleusener JT, Tazelaar HD, Jung SH, et al. Neuroendocrine differentiation is an independent prognostic factor in chemotherapy treated nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1996;77:1284-9.
61. Carles J, Rosell R, Ariza A et al. Neuroendocrine differentiation as a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1993;10:2099-19.
62. Graziano SL, Tatum A, Hendon JE 2<sup>nd</sup>, Box J, Memoli V, Green Mr, Kern JA. Use of neuroendocrine markers, p53, and HER2 to predict response to

chemotherapy in patients with stage III non small cell lung cancer: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Lung Cancer* 2001;33:115-23

63. Hage R, Elbers HR, Brutel de la Rivera A, Van den Bosch JM. Neural cell adhesion molecule expression: prognosis in 889 patients with resected non small lung cancer. *Chest* 1998;114:1316-20.
64. Kwa HB, Verheijen MG, Litvinov SV, Dijkman JH, Mooi WJ, Van Krieken JH. Prognostic Factor in resected non small cell lung cancer: an immunohistochemical study of 39 cases. *Lung Cancer* 1996;16:35-45.