Documento descargado de http://www.elsevier.es el 26/05/2013. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

VALIDACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA TECNOLOGÍA TISSUE-MICROARRAY DE CÁNCER DE UROTELIO. NUESTRA EXPERIENCIA(*)

A. LABORDA RODRÍGUEZ, F. VALLMANYA LLENA, R. CORTADELLAS ÁNGEL, J. LLORETA TRULL*, A. GELABERT MAS

*Servicio y Cátedra de Urología. *Servicio de Anatomía Patológica. Hospital del Mar. Universitat Autónoma de Barcelona-Universitat Pompeu Fabra.*

Actas Urol Esp. 28 (3): 215-220, 2004

RESUMEN

VALIDACIÓN HISTOPATOLÓGICA DE LA TECNOLOGÍA *TISSUE-MICROARRAY* DE CÁNCER DE UROTELIO. NUESTRA EXPERIENCIA

INTRODUCCIÓN: La tecnología array ofrece: gran ventaja a los investigadores clínicos y básicos, facilita aplicar gran cantidad de técnicas (inmunohistoquímica, FISH, proteómica) para comprender los mecanismos moleculares del cáncer, ofrece economía de escala en los reactivos versus los procedimientos convencionales. Dado que la representación de la muestra es muy reducida, es exigible previamente validar el array.

MATERIAL Y MÉTODOS: A partir de bloques de parafina de carcinomas de urotelio almacenados, cuya antigüedad oscilaba entre 5-7 años, se han seleccionado 52 casos consecutivos; se ha construido un array de tejido; los discos se colocaron en filas y columnas de manera aletoria, dibujando un topograma para guía de lectura. Se validó por otro patólogo ajeno a la selección de las muestras.

RESULTADOS: Se han obtenido 87 laminillas. La número 1 se ha teñido con HE. Ha habido discrepancia en el 27% de las muestras en el estadiaje. No ha existido discrepancia en el diagnóstico histológico. En 11 puntos (17%) no hay representación de la muestra.

DISCUSIÓN: Nuestros resultados ofrecen unos buenos resultados en la validación de las muestras. La antigenicidad del tejido está conservada. Las muestras seleccionadas en el array representan alrededor del 97%, similar a todo el conjunto de las secciones convencionales de la muestra problema.

PALABRAS CLAVE: Microarray. Cáncer vesical. Cáncer ureteral. FISH. Inmunohistoquímica.

ABSTRACT

HISTOPATOLOGICAL VALIDATION OF TISSUE-MICROARRAY TECHNOLOGY IN UROTELIAL CANCER. OUR EXPERIENCE

INTRODUCTION: The array technology offers: a big advance to clinic and basic investigator, it provides a variety of technics (immunohystochemistry, FISH, proteomics) to undestand the molecular mechanisms of cancer. It offers scale economy in reagents versus the conventional methods. Array most be ratified because the sample is so reduced.

MATERIAL AND METHODS: 52 consecutive cases have been cloosen from paraffin blocks of bladder and ureteral cancer which are 5-7 years old, a tissue array has been made; disks have been arranged in lines and columns, in an aleatory way, in order to guide it's reading. It has been evaluated by a pathologist with any relation to specimen selection.

RESULTS: 87 sheets ha been obtained. Number 1 has been dyed with HE. Has been discrepancy in 27% of sample's stage. Has not been a discrepancy in hystopathologic diagnostic. There is no sample's representation in 11 points (17%).

DISCUSSION: Our results offer good results in sample's validation. The sample's antigenicity of tissue is conserved. Array sample's represent a 97%, similary to all unit of conventional sections of the specimen.

KEY WORDS: Microarray. Bladder cancer. Renal pelvis cancer. FISH. Immunohistochemistry.

*Trabajo financiado por el FIS, proyecto PI:02/0468

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 26/05/2013. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Los tejidos para estudio en los Servicios de Anatomía Patológica son preservados en formol y guardados en bloques de parafina para efectuar posteriormente secciones para examen microscópico; este método es el estándar actualmente para el análisis hispotopatológico[1]. El muestreo de tejido a razón de una sección por cm. cúbico de tumor era y sigue siendo el estándar para disponer del mínimo representativo de la muestra de la lesión. Con esta sistemática sabemos que en un tumor de 1 cc. de diámetro, el estándar de 5 micras de grosor de sección de tejido, representa 0,05% del tumor[2].

Hace pocos años, en 1998, Kononen y cols. en el laboratorio de Olli Kallioniemi, juntos inventaron un mecanismo para el examen de muchas secciones histológicas al mismo tiempo por almacenamiento de las mismas en un solo bloque de parafina: el *array*[3]. Estos *tissue-micro-array* están formados por la reunión de finas core-biopsias de tejidos parafinados pre-existentes y nuevamente reparafinados en un nuevo bloque *array* master. De esta manera varios centenares de especímenes pueden ser representados en un simple bloque de parafina y pueden ser analizados por una gran variedad de técnicas, incluidas inmunohistoquímica y FISH, en contraste con las técnicas tradicionales que requieren procesar centenares de laminillas; la tecnología de los micro-*array* permite el estudio de la cohorte entera de los casos en una laminilla sola[4]. Tienen además una gran ventaja adicional y es que todos los especímenes son estudiados en un solo tiempo y por lo tanto todos son procesados en condiciones idénticas[5]. Al mismo tiempo la gran cantidad de laminillas posibles permite disponer de toda la cohorte, que permanece archivada en espera de que otros investigadores efectúen nuevos estudios diagnósticos y/o pronósticos en el futuro[5,6].

Los recientes avances en el conocimiento de la genética molecular humana, las enfermedades basadas en anomalías funcionales o estructurales de nuevos genes, son mecanismos emergentes en muchas áreas de la medicina y que se van incorporando poco a poco a la toma de decisiones clínicas. El estudio de nuevos marcadores pronósticos y diagnósticos en una larga serie de especímenes es un importante aspecto en el traslado de los nuevos avances de la ciencia básica a la clínica práctica[4]. El reciente desarrollo de la tecnología de tissue micro-*array* camina en paralelo a los perfiles moleculares de especímenes clínicos con el DNA, RNA y perfiles de proteínas (proteómica). Esta técnica al alcance de los investigadores clínicos supone poder efectuar una amplia gama de análisis usando inmunohistoquímica, FISH o RNA-FISH, lo que conlleva un bajo coste y economía de escala, comparado con los métodos convencionales[7-11].

Uno de los mayores obstáculos que ha comportado la aceptación de los micro-*array* es que la reducida representación del tejido analizado en el disco, 0,6 mm de diámetro, no fuera representativa del estadiaje del tumor o de los patrones de expresión genética del mismo[12]. Al testear las expresiones genéticas de los *array* construidos con material bien conservado, se pone de manifiesto que la gran mayoría de proteínas conservan su antigenicidad, en algunos casos más de 60 años, lo que valida estos estudios con tejidos archivados. Por lo que se puede concluir que la técnica de los tissue micro-*array*, es un método adecuado y valorable para análisis de expresión en amplias cohortes archivadas, si bien cada grupo de investigación debe validar sus especímenes, que es lo que en su primera fase presentamos en este trabajo[13,14].

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha construido un *tissue micro-array* de especímenes de cáncer de urotelio (vejiga y pelvis renal) a partir de los bloques de parafina almacenados con una antigüedad de entre 7 y 5 años, como primera parte de un estudio de investigación clínica-molecular. Se seleccionaron 52 casos consecutivos de carcinomas superficiales de urotelio del archivo de registro de tumores del Servicio de Urología, eligiendo sólo los grados GII y GIII y estadios pTa y pT1 y dos casos pT2 (infiltrantes). De los bloques de parafina archivados en el Servicio de Anatomía Patológica, se seleccionó de cada uno de ellos por un grupo de dos investigadores clínicos, el área más representativa de la que se tomó un cilindro para *core*-biopsia, de los casos más heterogéneos se tomaron dos cilindros y sólo en un caso se tomaron tres cilindros. Se colocaron en filas y columnas de manera aleatoria y al mismo tiempo se dibujó el

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 26/05/2013. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

topograma de situación en una plantilla de papel para el control de validación. Se colocaron de manera aleatoria cinco cilindros de otros tejidos epiteliales para controles internos (Tablas I y II), lo que sirve además para orientación de lectura y análisis.

Una vez construido el *array*, se reintrodujo en estufa para su consolidación definitiva y se efectuaron varias secciones de 3-5 micrómetros que se fijaron en portas, se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (HE) y se montaron y secaron.

TABLA I

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A		GIII pTa	GIII pTa	GIII pT1	GIII pT1	GIII pT1	GIII pT1	GIII pT1	GIII pT1	GIII pT1	GIII pT1
B	Control	GII pT2	GIII pTa	GIII pT1	GIII pTa	GIII pT2	GIII pT1	GIII pT1	GIII pTa	GIII pTa	GIII pT1
C	Control	Control	Control	Control					GII pTa	GIII pT1	GIII pT1
D					GII pTa	GII pTa	GII pTa	GII pT1	GII pTa	GII pT1	GII pTa
E		GII pTa	GII pTa	GII pT1	GII pT1	GII pT1	GII pT1	GII pTa	GII pTa	GII pT1	GII pT1
F		GII pT1	GII pT1	GII pT1	GII pT1	GII pTa	GII pTa	GII pTa	GII pTa	GII pTa	GII pTa
G		GII pTa	GII pTa	GII pTa	GII pT1	GII pT1	GII pT1	GII pTa	GII pTa	GII pTa	GII pTa
H		GII pT1	GII pT1	GII pT1	GII pT1						

Total: 23 GII pTa; 19 GII pT1; 1 GII pT2; 7 GIII pTa; 13 GIII pT1; 1 GIII pT2
64 core-biopsias. 52 casos

TABLA II

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A		GII	GI	X	X	GII	X	X	GIII	GIII	GIII
B	Control	GII	X	X	GIII	GII	GII	GII	X	GIII	GIII
C	Control	Control	Control	Control					GII	GII	GIII
D					GII	GI	GII	GII	GII	GI	GIII
E		GII	GI	GII	GII	GII	GI	GII	X	GI	GI
F		GI	GI	GII	GII	GI	GI	GI	GI	GI	GI
G		GI	GI	GI	GII	GII	GI	GI	GI	X	X
H		GII	GII	GI	X						

Total: 64 puntos de tejido.
27 han sido re-evaluados como estadíos inferiores: 42,2%. 37 han sido re-evaluados como estadios iguales: 57,8%.
11 faltas de punto de tejido: 17%. X ausencia de muestra de tejido.

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 26/05/2013. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Posteriormente se validó el *array* mediante la identificación del grado histológico de cada espécimen por otro investigador, patólogo, que no había intervenido ni en la selección de los casos ni en la construcción del *array*, colocando su diagnóstico en una plantilla idéntica a la del *array*, pero con las casillas en blanco. Se procedió finalmente a la comprobación de concordancias y discrepancias con la plantilla original así como al porcentaje estadístico de los mismos. No se valoró el estadio pT, se aceptó el efectuado en su día en el momento del diagnóstico ya que en base a éste se tomó la decisión terapéutica.

El grado de los casos había sido valorado inicialmente por diversos patólogos, utilizando a partir de 1999 los criterios de la ISUP/WHO: la re-evaluación posterior la llevó a cabo un mismo patólogo experto en tumores urológicos, aplicando los mismos criterios pero tan solo en las muestras incluidas en el *array*.

RESULTADOS

Existen 11 puntos sin representación de tejido en esta laminilla, que es la número 1 de las 87 que hemos obtenido. Todas las muestras existentes presentan una muy buena representación de tejido con abundante celularidad urotelial. La tinción con HE muestra una uniforme captación de los colorantes en toda la extensión de la muestra y en todos los puntos de *core*-biopsia.

Los resultados contabilizados de manera global manifiestan una discrepancia del 27%, y en todos los casos esta discrepancia es por sobreestadiaje en el dictamen histórico; sólo existe un caso de infraestadiaje en la re-evaluación. No existe ninguna discrepancia en relación al diagnóstico histológico.

DISCUSIÓN

Está admitido hasta un 15% de discrepancia interobservadores en los diagnósticos de Ca. de urotelio en relación al grado, pero ello en los exámenes de laminillas de casos individuales. Al tratarse de micro-*arrays* no existe un porcentaje de discrepancias establecido ya que los criterios pueden verse muy afectados por muchas causas: variación entre diversos patólogos, variación de criterios con el tiempo transcurrido, por ejemplo es posible que haya casos diagnosticados con los criterios de la OMS/1974, variación en la precisión en la selección de la zona al tomar la muestra y finalmente que el criterio subjetivo del re-evaluador sea también distinto.

En la re-evaluación esta discrepancia está muy aumentada respecto al porcentaje aceptado en el examen de casos individualmente y en los que se puede examinar la totalidad de la muestra, en cambio en el *array* hay que centrarse en la representación mínima del espécimen problema, lo que conlleva mayor probabilidad de variación de criterio diagnóstico. Pero como comentario importante que debemos hacer es que esta discrepancia es por sobreestadiaje del grado; es interesante constatar que en todos los casos la discrepancia estriba en que la valoración histórica atribuía un grado GII, y el evaluador actual lo califica de GI, excepto en un caso en que el dictamen histórico era de GIII y el actual de GI. Este infraestadiaje actual uniforme es de menor importancia ya que los criterios actuales son más benévolos que los de antaño y además entonces la clasificación se basaba en cuatro grados y actualmente en tres, lo que explica de manera muy aproximada el porqué de esta discrepancia. No existe ninguna discrepancia con la histopatología representada en el *array*.

Existen en nuestro caso 11 fallos con ausencia de representación de espécimen en el punto donde debería haber muestra, lo que representa un 17%, y se admite que hasta un 20% puede ser habitual en las laminillas, ello nos permite dar como muy aceptable el porcentaje de muestra para estudio incluida en cada laminilla.

En algunos casos, muy pocos, la ausencia de tinción con la HE justifica la exclusión de dicho espécimen para su análisis. Los protocolos de fijación, procesado de tejidos y las condiciones de almacenamiento de bloques puede variar con el tiempo, por ello se ha sugerido que cada década los *array* sean re-validados mediante una tinción inmunohistoquímica estandarizada[15]. Un aspecto también muy importante es la duración de la antigenicidad. El potencial de esta tecnología permite usar grandes cohortes de pacientes, a veces con largo tiempo de seguimiento, y es interesante determinar si los bloques de parafina retienen la antigenicidad, antes y después de la sección.

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 26/05/2013. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

Además, dado que también las preparaciones pueden variar en su manejo de institución a institución, también se ha sugerido que cada centro prepare sus *array* y los valide para su propio archivo y estudios ulteriores[16].

Creemos que esta técnica de tissue micro-*array* es mucho más eficiente que la técnica simple. Una o dos *core*-biopsias por caso representa alrededor del 95%, similar a todo el conjunto de las secciones convencionales del tejido a estudiar. Este estudio permite ser optimista dados los buenos resultados conseguidos usando especímenes archivados a lo largo de mucho tiempo, y que pueden pertenecer a pacientes aún vivos en el momento del estudio, por lo que estaríamos ante cohortes amplias de pacientes con largos tiempos de evolución y seguimiento, lo que hasta ahora era muy poco probable que pudieran efectuarse estos trabajos.

Varios estudios han demostrado que algunas proteínas se expresan preferentemente en las células de los márgenes, frente a las del centro del tumor (en los tumores de pequeño volumen), y de manera especial en el cáncer de mama. En el carcinoma de urotelio no hemos podido constatarlo en ninguno de nuestros experimentos ni tenemos constancia de ello en la bibliografía consultada, por lo que la expresión proteica la consideramos uniformemente representada en toda la histopatología afectada.

La cuestión de cuantos *cores- punchs* hay que efectuar de cada caso está influenciada por varios factores. Uno de ellos es la *expertise* en la construcción de bloques de *array*s; en nuestro laboratorio, una sola persona está efectuando esta labor y el número de discos usados varía en los sucesivos *array* construidos. Otro factor es la habilidad para identificar áreas de tumor de distinto grado, zonas de displasia severa, epitelio normal y/o carcinoma "in situ". Otro factor puede ser la dificultad para distinguir ciertos tipos de carcinoma "in situ" y/o de carcinoma invasor, esto puede suceder con *array* de otros especímenes: carcinoma de colon, melanoma y el carcinoma "in situ" de mama; pueden tener en ciertos casos un componente de invasión incrementando los cambios espúreos de la lectura. Estos datos deben ser detectados por el técnico y verificados por el investigador.

Respecto al grosor de las secciones del micro-*array* tiene una doble importancia: a) puede afectar al número de laminillas últiles para ser cortadas del bloque *master*; y b) el grosor puede ser determinante para permitir estudios de FISH: el grosor ideal para esta técnica sería obtener cortes de preparaciones monocapa, y las secciones mayores de 3 micras contienen como mínimo más de 3-4 capas de células y ello puede dificultar la lectura-interpretación de señales así como una fácil llegada de la sonda a las capas intermedias y profundas. Al aplicar esta técnica a laminillas de *arrays*, deben modificarse los parámetros de manipulación de la muestra para que sea válida para estudios moleculares.

La facilidad y potencialidad de usar archivos de tejido de muchas décadas ofrece grandes ventajas como: a) en los tumores raros de baja incidencia, se requiere archivos de un número suficientemente amplio para analizar: se ve la facilidad; b) las combinaciones de casos de varias décadas puede conllevar que haya muestras de especímenes que han sido sometidas a tratamientos diferentes en contraposición con las cohortes de seguimiento de tiempo corto: se facilita la comparación; c) un largo tiempo de seguimiento de los pacientes asegura que las recurrencias no se escapan: metodología que potencia análisis de supervivencia.

Esto último es particularmente importante en cáncer de mama y en los de urotelio en que los tumores pueden recurrir algunos lustros después de la presentación inicial[14,17,18].

REFERENCIAS

1. WRIGHT JR JR.: The development of the frozen section technique, the evolution of surgical biopsy, and the origins of surgical pathology. *Bull Hist Med* 1985; **59**: 295-326.
2. NORTON A, JORDAN S, YEOMANS IP.: Brief high-temperature heat denaturation (pressure cooking): a simple and effective method of antigen retrieval for routinely processed specimens. *J Pathol* 1994; **173**: 371-379.
3. KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, BARLUND M, SCHRAML P, LEIGHTON S, TORHORST J, MIHATSCH MJ, SAUTER G, KALLIONIERNI OP.: Tissue micro-*array*s for high-throughput molecular proflling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; **4**: 844-847.
4. SCHRAML P, KONONEN S, BUBENDORF L, MOCH H, BISSIG H, NOCITO A, MIHATSCH MJ, KALLIONIEMI OP, SAUTER G.: Tissue micro*ARRAY*s for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 1966-1975.

Documento descargado de http://www.elsevier.es el 26/05/2013. Copia para uso personal, se prohíbe la transmisión de este documento por cualquier medio o formato.

5. MOHR S, LEIKAUF GD, KEITH G, RIHN BH.: Micro*ARRAY*s as cancer keys: an *array* of possibilities. *J Clin Oncol* 2002; **20**: 3165-3175.
6. HOSS A, CORDON-CARDO C.: Tissue micro-*array* profiling of cancer specimens and cell lines: oportunities and limitations. *Lab Invest* 2001; **81**: 1331-1338.
7. SHIBATA D, MARTIN WJ, ARNHEIM N.: Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res* 1998; **48**: 4564-566.
8. PERRONE EF, THEOHARIS C, MUCCI NR, HAYASAKA S, TAYLOR JM, COONEY KA, RUBIN MA.: Tissue micro-*array* assessment of prostate cancer tumour proliferation in Aflican American and white men. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**: 937-939.
9. MUCCI NR, AKDAS G, MANELY S, RUBIN MA.: Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput tissue micro-*array*s to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol* 2000; **31**: 406-414.
10. MOCH H, SCHRAML P, BUBENDORF L, MIRLACHER M KONONEN J, GASSER T, MIHATSCH MJ, KALLIONIEMI OP, SAUTER G.: High-throughput tissue micro-*array* analysis to evaluate genes uncovered by cDNA micro-*array* screening in renal cell carcinoma. *Am 3 Pathol* 1999; **154**; 981-986.
11. BUBENDORF L, KOLMER M, KONONEN J, KOIVISIO P, MOUSSES S, CHEN Y, MAHLAMAKI E, SCHRAML P, MOCH H, WILLI N, ELKAHLOUN AG, PRETLOW TG, GASSER TC, MIHATSCH MJ, SAUTER G, KALLIONIEMI OP.: Hormone therapy failure in human prostate cancer. Analysis by complementary DNA and tissue micro-*array*s. *J Natl Cancer Inst* 1999; **91**: 1758-1764.
12. CAMP RL, CHARETTE LA, RIMM DL.: Validation of tissue Micro-*array* technology in breast carcinoma. *Lab Invest* 2000; **80**: 1943-1949.
13. LAYFIELD U, SARIA E, MOONEY EF, LIU K, DODGE RR.: Tissue heterogeneity of immunohistochemically detected estrogen receptor. Implications for image analysis quantification. *Am 3 Clin Pathol* 1998; **110**: 758-764.
14. KATOH AK, STEMMLER N, SPECHT 5, D'AMICO F.: Immunoperoxidase staining for estrogen and progesterone receptors in archival formalin fixed, paraffin embedded breast carcinomas after microwave antigen retrieval. *Biotech Histochem* 1997; **72**: 291-298.
15. SHIN HJ, KALAPURAKAL SK, LEE JJ, RO JY, HONG WK, LEE JS.: Comparison of p53 immunoreactivity in fresh-cut versus stored slides with and without microwave heating. *Mod Pathol* 1997; **10**: 224-230.
16. MILLS SE, FECHNER RE, FRIERSON HF, KEMPSON RL, WICK MR, DEHNER LP, SWANSON PE, HUMPHREY PA.: Guardians of the wax and the patient. *Am J Clin Pathol* 1995; **104**: 365-367.
17. IBRAHIM SO, JOHANNESSEN AC, VASSTRAND EN, LILLEHAUG JR, NILSEN R.: Immunohistochemical detection of p53 in archival formalin-fixed tissues of lip and intraoral squamous cell carcinomas from Norway. *APMIS* 1997; **105**: 757-764.
18. JACOBS TW, PRIOLEAU JE, STILLMAN IE, SCHNITT 53.: Loss of tumour markerimmunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**: 1054-1059.

Dr. A. Gelabert Mas
Servicio de Urología. Hospital del Mar
Passeig Maritim, 25-29
08003 Barcelona
agelabert@imas.imim.es

(Trabajo recibido el 29 octubre de 2003)