

**DISCURSO DE RECEPCIÓN
DEL ACADÉMICO ELECTO ILMO. SR. DR.
D. Antonio Llombart Bosch**

**DISCURSO DE CONTESTACIÓN
DEL ACADÉMICO NUMERARIO EXCMO. SR. DR.
D. José María López Piñero**

Leídos el 15 de Febrero de 2001
VALENCIA

**DISCURSO DE RECEPCIÓN DEL ACADÉMICO ELECTO
Ilmo. Sr. D. Antonio Llombart Bosch**

De la anatomía patológica estructural a la patología molecular (Un ensayo sobre la Anatomía Patológica en el siglo XX y su proyección futura)

EXMO. SR. PRESIDENTE;
EXMOS. E ILMOS. SEÑORES;
ILMOS SRES. y SRAS. ACADEMICOS;
SEÑORAS Y SEÑORES:

CUANDO SE INICIAN los primeros días del siglo XXI resulta atrayente tratar de considerar lo que la Medicina Académica y Científica prevee como expectativa del milenio entrante, y analizar a modo de examen de conciencia nuestro pasado, tanto del que por vivido podemos y debemos dar testimonio, como también del que sin constituir una propia vivencia personal, se encarnó en nuestros maestros y en lo que nos transmitieron de los que fueron los suyos. De esta forma podremos establecer una cadena de transmisión a modo de eslabones continuos entre lo que ha sido la parcela de la Medicina, cultivada por nosotros y nuestros mayores durante el siglo XX y lo que es la que hoy estamos preparando para hacer entrega a quienes deberán tomar nuestro relevo en un futuro ya no lejano.

Evidentemente el concepto de tiempo es relativo y podríamos especular en su extensión y contenido aplicándolo a la vida profesional de una persona. Este es extremadamente limitado cuando lo comparamos con la inexorable y continua marcha de la humanidad, pero en términos concretos para todos y cada uno de nosotros, contiene el acerbo de experiencias almacenadas con mayor o menor rigor en ese siempre aparentemente corto espacio de vida, transcurrida entre el inicio de una actividad formativa y profesional y el cierre natural de la misma cuando llega el problemático tiempo de la jubilación.

Pocas veces la fortuna puede acompañar la vida científica de un profesional como en mi caso, la historia de mi propia vocación anatomopatológica se une no sólo por genética y familia sino también en un sentido entrañable de maestro a discípulo, de amigo a amigo con que se fundió mi niñez, juventud y madurez con mi padre y maestro, el profesor Antonio Llombart Rodríguez (1905-1997).

Por ello, al ocupar hoy el sillón de esta digna Real Academia de Medicina de la Comunidad Valenciana que él tan merecidamente ostentara durante cerca de 40 años, me encuentro en la muy satisfactoria situación de mantener vivos los acontecimientos que no solo marcaron mi vocación, sino que mantuvieron la ilusión y el rigor científico de quien me precedió en el mismo.

Las personas pasan pero las ideas y las instituciones en las que ellas encuentran respaldo perduran. Esta institución, la Real Academia de Medicina, entraña esa mansión de ideas

perdurables que enriquecen el conocimiento científico, a pesar de que quienes las elaboraron hayan causado con su muerte una pérdida histórica en la misma. Es responsabilidad de quienes hoy ostentamos esa representación mantener abierta la conciencia y crítico el juicio de esta misión temporal, sabiendo escudriñar el futuro con el conocimiento que nos ofrecen las experiencias ya vividas.

El tener la oportunidad de pronunciar un discurso de entrada en la Real Academia ofrece una ocasión muy especial de despertar y recordar acontecimientos experimentados por uno mismo en su vida profesional. Por este motivo, es frecuente el ver como la mayoría de cuantos discursos se pronuncian versan sobre aquella experiencia científica en que personalmente uno se ha visto envuelto o se halla inmerso en el presente momento.

Pero también para nosotros es una ocasión no despreciable el utilizar esta tribuna para tratar de enjuiciar y conjuntar el pasado reciente de mi especialidad en una parte vivida día a día y al mismo tiempo tratar de concretar, no solo su situación actual, sino lo que preveemos va a ser su futuro en los años próximos. El coincidir esto con el cambio de siglo le ofrece una dimensión aun mas particular y atrayente.

Confiamos que esta empresa llene las expectativas de quienes hoy nos acompañan y tan generosamente nos han acogido como miembros de esta Real Academia.

La anatomía patológica en los albores del siglo xx

Sería pretencioso por nuestra parte querer hacer una visión histórica completa de como se encontraba la Medicina y por ende la Anatomía Patológica cuando ahora hace cien años se iniciaba la andadura de un nuevo siglo.

Pretendemos solo hacer unos comentarios concretos de aquellos aspectos históricos que a nuestro juicio enriquecieron la evolución del pensamiento anatomoclínico en aquellos momentos y han permanecido como fundamentos desde entonces.

Un recorrido geográfico obligado pasa por Europa y se extiende hasta Estados Unidos como los dos puntos de mayor relieve. Ya dentro de Europa, queremos concretarnos en una visión del mundo centro europeo en donde el pensamiento anatomopatológico encontró su fundamento científico más sólido. Por extensión España supo aprovecharse de esta corriente científica e introducirse brillantemente en ella, iniciando con energía y efectividad la incorporación de las ciencias morfológicas a la Medicina.

La revolución del pensamiento médico-científico alcanzaba su máximo apogeo con la aplicación a la patología de la teoría celular y en la conjunción del método anatomoclínico: diagnóstico clínico, confirmación necropsica tanto a nivel macroscópico (autopsia clínica) con estudio microscópico (histopatología). A ello se unía el pensamiento etiológico (microbiología) y la naciente terapéutica (terapia sterilisans magna) junto con la conjunción fisiopatológica y el método experimental. Todas ellas fueron las grandes adquisiciones del siglo XIX. Esta era la rica herencia de un siglo en que la tecnología (vapor, electricidad, comunicación telefónica, rayos X, microscopio, anestesia, antisépticos, etc) abría un mundo lleno de extraordinarias expectativas.

A pesar de ello las expectativas de vida de la humanidad era de 50 años en los países avanzados y las enfermedades infecciosas (tuberculosis, sífilis, cólera, etc.) configuraban el cuadro fundamental de la patología y medicina. Habían de transcurrir otros 50 años mas para que la expectativa de vida alcanzara los 70 años y las enfermedades infecciosas dejaran paso a los procesos degenerativos, tumorales y vasculares, al mismo tiempo que hacían aparición nuevas formas de patología infecciosa (virus, sida, priones, etc.).

Por otro lado la patología tumoral y fibrilar había abierto sus puertas a la anatomía patológica necropsica y a la naciente anatomía patológica microscópica. Si la escuela francesa con los conocidos anatomistas Bichat, Laennec y Covisart había iniciado este camino con brillantez en los primeros años del siglo XIX, fue la Neue Wiener Schule con Carl Rokitansky quien tomó el relevo al tiempo

que se iniciaba la creación de Institutos de Anatomía Patológica en Alemania, Austria y otros países de la Europa central.

Por otro lado, el pensamiento biológico de la patología utilizando el microscopio, nacería con la escuela de Johannes Müller basado en los entonces nacientes descubrimientos de la teoría celular producidos por T. Schleiden y por J. Schwann. La escuela de J. Müller fue rica no solo en producción propia, sino también a través de sus discípulos y particularmente por el genio conocido como fundador de la teoría celular aplicada a la Anatomía Patológica, es decir, la "Patología Celular" (*omnia cellula ex cellulae*) de Rudolf Virchow.

Cuando se iniciaba el ahora concluido siglo XX el concepto de enfermedad se sustentaba no solo en el organismo humano a nivel de órganos y tejidos, sino también a nivel de la célula, origen de la vida y punto inicial de transformación patológica. Había sido la introducción rutinaria de la técnica microscópica la que permitió este paso gigantesco al poder amplificar imágenes no apreciables directamente con los sentidos (tejidos, células, microbios).

La historia de la Medicina ha acreditado a Giovanni Battista Morgagni (1682-1771) como el padre de la Anatomía Patológica e iniciador del método anatómico en la patología por su libro "De sedibus et causis morborum per anatomen indagatis". La Anatomía Patológica en su obra, nace con el fundamento de la observación de 750 autopsias analizadas con criterio científico buscando a través de sus hallazgos una explicación clínica de la enfermedad. Quizás los aspectos más esenciales de su obra pueden resumirse en los tres siguientes puntos:

- Definición del término de "lesión" como elemento inicial para definir las características anatómicas presentes en un órgano enfermo.

- Introducción del pensamiento anatómico en el pensamiento de la práctica médica con una terminología adecuada a cada proceso morboso: "ulcus, squirrhous, nodulus..." con ello nace la descripción anatomopatológica del proceso morboso.

- Asociación entre manifestaciones clínicas y esquema sindrómico con substrato anatómico: identificación de entidades clínicas con soporte anatómico.

Este pensamiento anatómico y patológico encontró admiradores y discípulos en distintos países de Europa. Un ejemplo decisivo en su proyección clínica se da con Xavier Bichat (1771-1802) en París. Busca en la disección y utilizando métodos anatómicos de tratamiento de órganos como son la aplicación de ácidos, alcalis, para macerar estructuras, pero sin el apoyo de la microscopía, establece el complemento del método de proyección no solo con la descripción de distintos tipos de procesos morbosos, como la propia tuberculosis, que sería causa de su muerte prematura (31 años). El análisis de la alteración anatómica va a extenderse en el concepto de "tejido" que introduce Bichat para localizar en él la alteración anatómica. Dispone pues la medicina de dos nuevas concepciones, por un lado el concepto de "lesión anatómica", lugar donde se localizaría el fenómeno patológico y en segundo lugar el "tejido patológico" en donde de modo más sutil encontraríamos la causa de la enfermedad.

En la primera mitad del siglo XIX Francia es rica en aportaciones decisivas en esta concepción clínica de la anatomía patológica. Leopold Auenbrugger (1722-1809) aplica la observación anatómica a la patología respiratoria, e introduce la percusión como método de diagnóstico clínico. Las modificaciones en la transmisión de sonido serían la expresión de una alteración anatómica de un órgano (pulmon neumónico, hepatomegalia, tumores abdominales). Solo años después este método sería recogido en la clínica francesa por Covisart, quien fuera su verdadero introductor.

La revolución francesa tuvo también un influjo decisivo en esta filosofía. La personalidad de René Laennec (1781-1826) es un buen ejemplo de ello. Establece un nuevo modelo de medicina al aplicar al diagnóstico la auscultación y la percusión y al mismo tiempo al participar en el estudio postmortem de sus propios enfermos en el Hospital Necker. Procesos como el de la cirrosis hepática en fase terminal atrofica, han quedado fundidos a su nombre en los anales de la medicina clínica (cirrosis hepática atrofica de Laennec). El estetoscopio fue una aplicación decisiva, complementando la auscultación en la patología pulmonar.

El mejor conocimiento de la anatomía patológica se expresa en obras aparecidas en esta primera mitad del XIX como es el libro de Jean Cruveilhier (1791-1874) "Anatomie Pathologique du corps humain". Esta obra publicada entre 1828 y 1842 en 40 entregas comprende 233 tablas ilustradas de distintas enfermedades y su base anatómica. Editada en 500 ejemplares constituye en el momento actual una joya de valor incalculable. Ella se complementa con el gran tratado de Anatomía

Patológica General "Traité d'Anatomie Pathologique General" (1849-1864) en el que con un carácter enciclopédico se recoge la patología de las degeneraciones, inflamación, crecimiento y reparación patológica, etc. La revisión de esta obra, magníficamente ilustrada con dibujos en color, es una muestra maestra de la riqueza descriptiva de las lesiones anatómicas orgánicas, tanto de procesos infecciosos, como tumorales y malformativos. La Société Anatomique de Paris (1803) nace con el propósito de fundamentar y discutir con un fin científico el cúmulo de nuevos hallazgos que estas observaciones proporcionan a la clínica. Se une así a la Leopoldina en Alemania y a la British Royal Society en Gran Bretaña.

La obra de Cruveilhier es el eslabón interpuesto entre la escuela de Medicina francesa y el aporte científico proporcionado por Carl von Rokitansky en Viena (1804-1878), con el afianzamiento científicamente más riguroso de la Anatomía Patológica. Hay que destacar como Cruveilhier fue nombrado primer ordinario de una Cátedra de Anatomía Patológica en París (1835). De hecho, la primera Cátedra de esta emergente materia fue Estrasburgo siendo ocupada en 1819 por Lobstein y sucedido por K.H. Ehrmann. Solo en 1844, Viena tendría una primera cátedra de Anatomía Patológica que sería ocupada por Carl V. Rokitansky.

Merece la pena detenerse en el análisis de este patólogo vienes por cuanto marca las bases de la relación anatomoclínica en la medicina apoyada fundamentalmente en las autopsias clínicas efectuadas de modo sistemático y relacionadas con el estudio clínico. Esto último se llevaría a cabo gracias a la estrecha colaboración con el conocido internista Freund Skoda contemporáneo en las Neue Wiener Medizinische Schule.

El pensamiento de esta escuela es esencialmente anatomopatológico estructural y macroscópico. La introducción del estudio microscópico con fines diagnósticos tendría un carácter secundario en la obra de Rokitansky.

Solo en 1842 y con motivo de una visita a París él compraría un microscopio en la entonces celebre casa Brunner. Las obras de Rokitansky, "Handbuch der Pathologische Anatomie" (en tres volúmenes (1842-1852) así como el "Lehrbuch der Pathologische Anatomie" (1855-1878) configuran su obra maestra y también de la escuela vienesa. Es en el tomo II de esta última obra donde introduce los mecanismos histológicos asociados a la arteriosclerosis. Coincidiría con la aparición en 1858 de la "Cellular Pathologie" de Rudolf Virchow.

Rokitansky, al igual que Virchow, defendería que detrás de cada enfermedad existe un sustrato material y que ella no constituye algo extraño a la propia existencia sino que esta ligada y es dependiente de la vida y espíritu. Su mundo se basó fundamentalmente en el proceso anatómico de la lesión a partir de la cual se derivaría una patofisiología. Sin embargo la filosofía de este patólogo estaría más cercana a la patología humoral que a la concepción tisular y orgánica de la enfermedad, por no señalar la celular, que emerge en la doctrina de Virchow. La teoría de las "discrasias" (Dyskrasien) y su división en 10 formas distintas serviría como base especulativa de la Anatomía Patológica General que nació como consecuencia de la observación macroscópica y en la que los humores y especialmente el sistema hemático serviría para establecer dos nexos de unión entre las distintas situaciones patológicas (el exudado en la inflamación, la degeneración fibrinoide en la arteriosclerosis). Las proteínas estarían presentes en toda la materia orgánica (sólida o soluble) y ellas serían en último lugar responsables de la patología configurando un tejido fluido (flusssiege Gewebe) que podría ser responsable de aquellas causas de muerte en que el hallazgo anatómico no encontrara justificación clarificadora.

La Anatomía Patológica nacida en la sala de autopsias y cultivada con esmero mostraba ya hace más de un siglo los límites de la observación macroscópica y permitía la especulación fisiopatológica sin una base bien conocida entonces. La necesidad de una química patológica (Pathologische Chemie) se esboza tanto en la obra de Rokitansky como en la propia de Virchow, años después. Esta necesidad condicionaría el que creara espacios para un laboratorio de "Pathochemie" cuando en 1862 (unos años antes de su jubilación en 1875) se construyera su nuevo Instituto de Patología en Viena.

El planteamiento anatómico de Virchow aparece fundamentado no solo en la doctrina de Rokitansky sino en la educación recibida de su maestro Joannes Müller y su escuela así como del patólogo Carl Froriep con quien trabajaría como asistente en el Hospital "Charité" de Berlín tras su promoción como doctor durante 1843-1844. Por otro lado la influencia de J. Müller en él y el grupo de biopatólogos que pertenecieron a su grupo (Th. Schwann, H.V. Helmholtz, E. Brücke, etc.) permitió que la obra de este gran patólogo tuviera no solo una concepción anatómica patológica necropsica

sino una visión biológica y patofisiológica haciendolo habitual con el uso del microscopio.

La conjunción de ambos modos de aproximación a la enfermedad permitiría basar la nueva Anatomía patológica más allá del mundo de la macroscopia e instaurara la histología (microscopía) como punto de arranque de la lesión. Se iniciaba así la segunda etapa de concepto de lesión con la conocida obra "Cellular Pathologie" (1858).

Merece la pena detenerse en el análisis de la vida científica de esta apasionante personalidad. Seguimos a W. Doerr (1978) para este análisis.

El origen de metodo anatomoclínico a traves de los museos anatomopatológicos

El fundamento de los museos anatomicos fué la recolección de piezas procedentes de necropsias para fines docentes y de colección médica. En cierto modo significa esta aproximación en el pasado a la que hoy ofrecen las bases de datos genéticos cuando reunen inmensa cantidad de información sobre la organización de los genes humanos (o animales) y a traves de ellas permiten un análisis comparativo de secuencias alteradas que se almacenan cuidadosamente con objeto de ofrecer al investigador posible semejanza con hallazgos propios que puedan explicar una nueva patología o aclarar tipos desconocidos de procesos morbosos.

Este sistema de recogida y análisis de datos tiene su predecesor en la historia cuando con caracter científico se reunen organos humanos con fines médicos. La práctica de la prosección de la autopsia justifica el almacenamiento de aquellos casos que, por su rareza o interés patológico, merecen ser conservados.

El museo anatomopatológico alcanzó su mayor apogeo en el Charite Krankenhaus de Berlin bajo la dirección del propio Virchow aunque su origen se remonta a principios de 1700 (1710) y su continuidad se mantiene hoy día con una vigencia mas histórica que de utilidad practica. Su ejemplo cundió en todo el ámbito anatomopatológico y buenos ejemplos de tales museos proliferaron en todo el mundo científico-médico.

Este museo nació bajo la forma de "Theatrum Anatomicum" bajo la dirección de Leibnitz (1713) y se mantuvo activo gracias a la familia Walter quienes consiguieron en 1803 que el gobierno de Prusia lo adquiriera y organizara como institución gubernamental. Contaba entonces con 3070 preparados anatómicos normales y patológicos. Este museo posteriormente se fundió con el que se iniciara en el Charite Krankenhaus a partir de 1831 en que se creó una prosectura e iniciaron las prácticas necropsicas con motivo de la epidemia de cólera que afecto Berlin. Fue su primer prosector Philipp Phoebus (1804-1880) quien inició la recogida de material patológico, siendo su continuador Robert F. Froriep (1804-1861). La conjunción de ambas instituciones la efectua Johanes Müller al hacerse cargo en 1833 del Instituto Anatómico y de su museo de Anatomia Normal, entonces conocido como "Königlichen Anatomischen Museum". Fue tambien J. Müller quien emprendiera desde la Anatomia la docencia primera de la Anatomia Patológica en el semestre de verano de 1834. Mientras tanto la prosectura del Charite se transformaria en un verdadero laboratorio de Anatomía Patológica (con histopatología) y fué precisamente aqui donde comenzó a trabajar el joven Virchow tras haberse doctorado en 1843 con el mismo J. Müller. El museo logró un importante impulso y se convirtió en la joya querida de Virchow hasta el final de su vida, consciente del valor del hallazgo anatómico en la medicina.

Si Rokitansky fue el gran prosector con su obra de más de 70.000 necropsias en la clínica de Viena, Virchow tuvo la visión de almacenar órganos y fetos malformados en un número no inferior. Primero durante su periodo de prosector comisario en el Charité de Berlin y posteriormente como catedrático de Anatomía Patológica cuando esta cátedra se creara para él en 1856 en la Universidad de Berlin. Su interés por la patología celular que partió de su estancia en Würzburg (1849-1856) junto con el histólogo Kölliker no merma su interes por la Anatomia Patológica macroscópica. Tanto la obra "Cellular Pathologie in ihrer Begründung auf Physiologische und Pathologische Gewebelehre" (1858) como la siguiente "Die Krankhaften Geschwülste" (1862/63) mantienen una clara correlación anatómica y microscópica, como fundamento del progresivo método anatomoclínico que entonces producía sus raíces mas fructíferas.

Si la colección anatómica alcanzó un número de 19.577 preparados en 1858 coincidiendo con la muerte del maestro J. Müller el conservador K.B. Reichert (1811-1883) lo aumentó a 26.356,

incluyendo interesantes piezas de paleopatología y zoología. En 1883 logra Virchow coordinar ambos museos, el anatómico y el propio del Charité Krankenhaus sumando al anterior más de 17.000 preparados propios y quedando como director del mismo Rudolf Jürgens.

La intención de Virchow fue dotar a este nuevo museo de una organización propia, obteniendo en 1886 fondos para la construcción de un edificio independiente que se iniciaría en 1896 e inauguraría tres años más tarde. Este museo recogería la colección anatomopatológica y antropológica más rica de Alemania con 40.833 preparados conservados y catalogados correctamente. Se reunía prácticamente todas las lesiones conocidas de la patología humana. Al mismo tiempo se construía un auditorio para 250 asistentes que se convertiría en el foro donde Virchow impartiría su doctrina hasta su jubilación y muerte (1902). El "Museo Virchow" mantiene su vigencia entrado el presente siglo no solo con carácter histórico, sino como fundamento docente. Allí se impartió docencia por sus sucesores, como los profesores ordinarios de la Catedra Johannes Orth (1847-1923), Otto Lubarsch (1860-1933) y Robert Rossle (1876-1945). Grandes conservadores del museo fueron Carl Kaiserling y Marx Westenhoeffler, ambos discípulos de Virchow.

La segunda guerra mundial con la destrucción de Berlín y posteriormente un desafortunado incendio en 1957 acabarían casi con la totalidad de esta obra, que representaba la estructura viva del método anatomopatológico en su versión macroscópica. Hoy día todavía se conservan restos de aquella colección entre los que cabe destacar la colección de craneos con lesiones de osteitis sífilítica o los celebres craneos microencefálicos de los hermanos Michael y Friedrich Söhn de Kiwitsblott.

Su papel difusor de cultivo anatómico ha tenido repercusión entre quienes fueron discípulos de esta escuela.

También el Museo Anatómico de Viena, nace con la creación de la cátedra de Anatomía Patológica en 1830, y nominación como catedrático en 1844 de Rockitansky, aunque había ya especímenes conservados en el edificio llamado "Narrenturm" del Hospital General de Viena desde 1784. Este museo posteriormente localizado en los bajos del Hospital llegó a tener una amplia representación de material anatómico, coincidiendo con el apogeo de la ciencia médica vienesa y la aplicación legal autorizando a efectuar estudios post mortem de modo obligatorio a los fallecidos en el centro.

Este periodo anatómico descriptivo de las grandes lesiones encontradas en las autopsias, tiene también su manifestación en Francia con la creación del que se llamaría Museo Duyputren siguiendo la escuela del celebre cirujano y patólogo Guillaume Duyputren (1777-1835) quien fundó la primera cátedra de Anatomía Patológica en París. El museo localizado en la Ecole de Medicine recibió importantes fondos de otros centros hospitalarios como la colección Charcot del Hospital Salpetriere gracias a la donación de Madame Dejerine, mujer del celebre neurólogo.

También un museo dermatológico existía desde principios de 1800 en el Hospital Saint Louis gracias a modelos efectuados por Jules Baretta (1834-1928). Ellos hacían especialmente referencia a procesos dermatológicos y cánceres cutáneos. Es interesante anotar como existía también otro gran museo dermatológico en Viena gracias al Prof. Ferdinand von Hebra (1816-1880) y a sus sucesores en la cátedra de dermatología, el Prof. Moriz Kaposi (1837-1902) y Karl Henning (1917).

En Inglaterra el Museo creado por John Hunter (1728-1793) en Londres para el Royal College of Surgeons constituye otra muestra del valor del pensamiento anatómico en este país. El "Hunter Museum", no solo fue una colección anatómica, sino también de anatomía comparada, con ejemplares animales, algunos procedentes de las expediciones de la Navy en territorios de ultramar. La colección anatomopatológica estaría agrupada en dos grandes áreas que hoy se condensarían en Anatomía Patológica General y Especial (patología sistémica). Muchos de los especímenes de este museo eran reproducciones de cera o material fijado en alcohol mantenido en jarras de vidrio. El conservador mayor de este museo fue William Clift (1776-1842) quien mantuvo la colección durante cerca de 50 años.

Un segundo museo inglés anatómico fue el "Gordon Museum" en el Guy's Hospital, también en Londres. Este como el de Hunter precedieron al Museo de Viena siendo contemporáneos del Museo de Berlín. Esta colección, que en parte tenía moldes de cera, fue creado por Joseph Towne (1808-1879) siendo especialmente un museo anatómico, al que se añadirían procesos dermatológicos procedentes del St. Thomas Hospital, utilizándose para la enseñanza de la Medicina. En la actualidad se mantiene este museo tras varias restauraciones en el Guy's Hospital encontrándose en él conservadas algunas celebres lesiones anatomopatológicas como son casos de enfermedad de

Adisson, enfermedad de Bright y linfomas Hodgkin. Es interesante reseñar como este museo sirve todavía hoy en día para la enseñanza de la Medicina en esa Facultad londinense.

Desde la obra de Giovanni Battista Morgagni también la colección de material anatomopatológico tuvo un gran impulso en diversas universidades italianas. Merece destacarse el Museo Anatómico (patológico) que coleccionó Antonio Scarpa (1752-1832) en Pavia, así como el existente en Florencia, donde se creó la primera cátedra de Anatomía Patológica en 1840, material que efectuado con modelos en cera todavía se conservan en la actualidad. Análogas consideraciones podemos hacer con el Museo de Bologna en donde se recogen unas interesantes colecciones de lesiones anatómicas con malformaciones congénitas. Este museo ha sido renovado recientemente con motivo del 900 centenario de la Universidad de Bologna (1988).

No pretendemos ser exhaustivos en esta revisión histórica de los Museos Anatomopatológicos como expresión del pensamiento médico del siglo pasado, pero si queremos resaltar como estos ejemplos reivindican una vez más el criterio naciente de la importancia del hallazgo lesional en el conocimiento y enseñanza de la Anatomía Patológica.

En España el museo anatomopatológico de la Universidad de Valladolid fue iniciado y mantenido por el discípulo de Rossle, Isaac Costero, quien introdujo el pensamiento anatomoclínico moderno no solo en España sino también en México y América latina. Continuador del mismo en Valladolid, fue nuestro predecesor en este sillón de la Academia y Cátedra de esta Universidad, el Prof. Antonio Llombart-Rodríguez. Él tuvo la posibilidad de seguir las lecciones del Prof. Rossle en Berlín (1931) en el Virchow Museum, y de continuar la tradición del método anatómico con la rigurosa proyección de anatomía patológica clínica tanto en la cátedra de Valladolid como aquí en Valencia creando una tradición y escuela que hoy pervive entre nosotros.

El museo anatomopatológico con fines docentes puede haber perdido buena parte de su valor cuando otros métodos técnicos lo han superado (iconografía, videos, bases de datos en ordenador), mantiene su vigencia testimonial y como tal pervive entre nosotros. Más de 7000 autopsias clínicas efectuadas desde 1944 hasta la fecha, perfectamente protocolizadas hoy en base de datos y con iconografía conservado en cintas de video o en una colección de más de 10.000 diapositivas en color atestiguan el valor de utilidad docente y científica de esta obra. La utilización como "casos de la semana" con fines docentes testimonian que el método anatomoclínico convencional "lesión-anatómica-lesión celular" mantiene su vigencia en la práctica médica del año 2000.

El nacimiento de la anatomía patológica quirúrgica (Surgical pathology)

Hemos visto como el siglo XIX se caracteriza por dar base al nacimiento del método anatomoclínico con fundamento en la anatomía patológica necróptica, así como de la concepción microscópica de la lesión tanto a nivel celular como la tisular. Las obras de Virchow, previamente mencionadas, "Cellular pathologie" y "Die Krankhaften Geschwülste" establecen las bases científicas de la anatomía patológica moderna que se iniciara en el siglo XX y culmina en estos albores del XXI.

La anatomía patológica en Europa sin embargo no logra el dinamismo que precisa la clínica manteniéndose, en buena parte, alejada del quehacer diario de la actividad asistencial. Los patólogos, situados en sus grandes institutos independientes de las áreas propiamente hospitalarias, tienen un contacto poco fluido con la actividad diagnóstica médico quirúrgica y se transforman, como hemos visto en la patología alemana, en los portadores del pensamiento biológico aplicado a la medicina, analizando sus fundamentos generales y los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad. La anatomía patológica general, aunque fusionada con la patología general (Allgemeine Pathologie) busca en el hallazgo anatómico de la observación necróptica o experimental su aplicación a la fenomenología patológica tratando de explicar esta fenomenología como la verdadera naturaleza de la lesión, cual es el caso del proceso inflamatorio, a modo de respuesta tisular local y de su participación celular o analizando los mecanismos de la transformación celular tumoral como expresión de restos embrionarios persistentes y transformados por causas exógenas. Ello por no citar el estudio de los mecanismos de la trombosis y su aplicación a la patología circulatoria o los iniciales estudios sobre la respuesta celular inmune y las enfermedades infecciosas. Un ejemplo clásico hoy

fué es estudio de la tuberculosis a través de los mecanismos de infección y reinfección tuberculosa (Ranke, Pühl, Assman, etc.)

Esta postura analítica contribuyó decisivamente al esclarecimiento de un buen número de mecanismos patológicos de la enfermedad (degeneración amiloide, enfermedades del colágeno, patología de la inflamación y respuesta inmune, etc.). Sin embargo, los patólogos dedicando su tiempo a la investigación, se mantenían alejados de la actividad diagnóstica biopsica aplicada directamente a la clínica. Mantenia toda su vigencia el discurso que Virchow pronunciara en la apertura del año académico de 1892/93 como Rector de la Universidad "Friedrich Wilhelms" en Berlin bajo el título "Lernen und Forschen" (aprender e investigar) en la que defendía la libertad por aprender y el "Lust am Lernen" (gusto por aprender). En ella insistía: "No se trata ya de la enfermedad, la que nosotros investigamos, sino el tejido alterado: aquí no se trata de un elemento extraño introducido en el espíritu de nuestro cuerpo, sino nuestra propia esencia (enferma) la que tratamos de investigar ..."

Con ello se enfrentaba a concepciones más prácticas, como la del cirujano-patólogo francés Cruveilhier quien buscaría el espíritu práctico como esencia del aprendizaje en la medicina defendiendo el criterio de "peu lire, beaucoup voir, beaucoup faire" (poco leer, mucho ver, mucho hacer).

En centro-europa la "Pathologie" guardaría la esencia de la medicina "Wissenschaft von der Krankheit" (La ciencia de la enfermedad). Sin embargo, el espíritu práctico y dinámico de la misma tendría un fundamento distinto y nacido en la emergente medicina norteamericana en donde la anatomía patológica sería esencialmente una Surgical Pathology y solo posteriormente a mediados del siglo XX volvería a los fundamentos de una "Pathology" con amplio fundamento científico, tal y como ha evolucionado hasta la situación presente para volver a ser la "Science of the disease".

Vamos a analizar este interesante proceso evolutivo que dió lugar al nacimiento del apasionante periodo de la patología quirúrgica en que el anatomopatólogo, unido con el cirujano en el propio quirófano, contribuye con su diagnóstico a la decisión terapéutica, guiando en cierto modo su mano a través del diagnóstico y orientación técnica. La obra editada recientemente por Juan Rosai "Guiding the surgical hand. The history of the American Surgical Pathology" es un magnífico documento que aclara el papel desempeñado por los patólogos americanos (muchos de ellos de origen europeo) en este proceso.

En realidad, hasta finales del XIX el patólogo solo se ocupaba de la anatomía patológica necrópsica, como ya hemos analizado, su actividad transcurría paralela pero sin intersección con la cirugía y la medicina clínica. Solo excepcionalmente se buscaba al patólogo para emitir un informe premortem y las consultas con casos clínicos eran excepcionales. El uso del microscopio con fines diagnósticos era una circunstancia casi casual y no un método de rutina. En 1854 aparece la obra de Lionel Beale (1828-1906) profesor de Medicina en el King's College de Inglaterra sobre "The microscope in its application to practical medicine", insistiendo en este método diagnóstico para diferenciar tejidos cancerosos. También en el ámbito de la ginecología, en Alemania se recomendaría el estudio de los endometriosis con el microscopio por parte del celebre ginecólogo alemán Kiwisch (1814-1852). Ello se continuaría en Berlin por J. Veit (1852-1917) en la Frauenklinik de Berlin. Tanto él como el cirujano C. Ruge (1846-1926) opinaban como una erosión cervical podía diferenciarse de un cáncer de cuello uterino gracias al estudio microscópico del tejido. Ruge sería nombrado jefe del Servicio de Anatomía Patológica de la clínica de Obstetrica, siendo probablemente el primer patólogo ginecológico de la historia, sin proceder de la escuela anatomopatológica convencional de los grandes institutos anatomopatológicos alemanes.

La historia poco afortunada de Virchow con la biopsia laríngea del Kaiser Federico III, a quien diagnóstico como leucoplasia un carcinoma escamoso, no considerándolo como maligno, pero que sin embargo acabó causando la muerte del Kaiser, tampoco fué una ayuda importante para la patología quirúrgica que pudieramos considerar como "oficial" si consideramos como tal aquella que se iniciara a partir de los "Institutos de Patología" de las Universidades. Ironicamente una de las últimas autopsias que efectuara el propio Virchow sería la del Kaiser!!

Una colaboración íntima entre cirujanos y patólogos se estableció en Estados Unidos cuando a principios de siglo se inicia una cooperación estrecha entre cirujanos y patólogos en varios centros hospitalarios de aquella nación. Era el nacimiento de la "Patología quirúrgica". En realidad en un principio este concepto no tenía un fundamento histológico, es decir, el patólogo quirúrgico era un

cirujano que tenía experiencia en anatomía patológica macroscópica, basando por tanto su diagnóstico en la observación directa de la pieza quirúrgica que era extirpada. Un modelo de esta patología fue el John's Hopkins Hospital en Baltimore, donde iniciaron su andadura simultáneamente William Henry Welch junto con William Stewart Halsted, como profesor de cirugía; William Osler, internista y Howard Kelly, ginecólogo, Welch fundó el primer laboratorio de Anatomía Patológica y fue decano de este centro en su fundación (1895) introduciendo la influencia europea en la docencia y práctica médica. Él había estado 3 años en Europa trabajando en Alemania (con Waldeyer, von Recklinhausen, Conheim, etc.) habiendo regresado en 1878 a América e iniciando la creación de un laboratorio de Anatomía Patológica en Bellevue Hospital. El laboratorio del John Hopkins uniría la Anatomía Patológica (necrópsica) junto con la bacteriología (había transcurrido un año trabajando con Robert Koch en Alemania) con la patología experimental. Este tipo de agrupación de laboratorios persistiría durante años en Europa y sigue siendo bastante común en USA (laboratory of clinical medicine). Junto a él iniciarían su trabajo otros conocidos patólogos como William J. Councilman. La patología anatómica sería, sin embargo, el fundamento de su trabajo.

Independientemente en el mismo centro WS Halsted, aun siendo buen amigo de Welch, mantiene su independencia como cirujano y patólogo quirúrgico. No es momento aquí de glosar la personalidad de este gran médico, sin embargo es importante reseñar como el mismo, observando la tipología macroscópica del proceso, tomaba la decisión de extender o no la cirugía. También sería el mismo quien continuara, tras la intervención, el estudio anatomopatológico e histológico de la muestra en el laboratorio de Welch. Ya en 1898 comunica a la Sociedad Americana de Cirujanos sus observaciones sobre esta metodología de trabajo. Otro residente suyo y luego célebre cirujano y patólogo mamario, Joseph Colt Bloodgood (1858) continuaría esta forma de trabajo logrando importantes contribuciones en el campo de la patología mamaria. En este momento el proceder diagnóstico hacia que el cirujano se transformara en patólogo. El empleo de nuevas técnicas de procesamiento rápido para efectuar secciones microscópicas con el sistema de microtomía de congelación usando nieve carbónica (descompresión brusca de CO² mantenido a presión) permitiría el sistematizar el diagnóstico histológico complementando el estudio macroscópico del proceso. Aunque Bloodgood utilizó lógicamente este método en su laboratorio de patología quirúrgica, el mérito de su primera aplicación se reconoce hoy a Thomas Cullen, profesor de ginecología en el John Hopkins y patólogo quirúrgico ginecológico. El manuscrito de su proceder diagnóstico rápido utilizando este método sería publicado en el Bulletin del John Hopkins Hospital en abril de 1895.

Evidentemente la técnica de la microtomía por congelación no tuvo su origen en América sino en Alemania a principios de 1870 (B. Stilling 1810-1879). El segundo avance importante requerido para que esta forma de corte fuera útil, era la fijación rápida con una solución distinta a la utilizada hasta entonces (fundamentalmente, alcohol o acetona) se trataría de una solución a baja concentración de aldehído fórmico (formol) que sería utilizada por F. Blum también en Alemania (1893). Otros fijadores como el kaiserling o el zenker (bicromato potásico, bicloruro de mercurio) mejorarían la técnica de fijación histológica de tal forma que aun siguen siendo utilizados en la actualidad. Aunque Bloodgood, al parecer, nunca reconoció la paternidad del método a Cullen, sin embargo lo utilizó sistemáticamente en el laboratorio de patología quirúrgica del mismo John Hopkins en donde desarrolló una magnífica labor en diversos campos de esta materia (mama, hueso, etc).

Nació, sin embargo, en estos primeros momentos la duda de la validez diagnóstica del método, ya que las posibilidades de error con una metodología imprecisa y unos conocimientos histológicos limitados, hicieron que se produjeran errores y surgieran numerosas críticas a esta actividad. Bloodgood diría ante la American Medical Association (1913): "The easier the diagnosis the worse the prognosis" refiriéndose a que los casos malignos de cáncer mamario se podrían diagnosticar fácilmente con la simple observación macroscópica de la lesión. Esta falta de concordancia nacida de situaciones diagnósticas dificultosas no impediría que la técnica de diagnóstico intraoperatorio alcanzara una predominante posición en los laboratorios de patología y se haya transformado en una sección de los mismos de una gran importancia.

Un segundo centro en donde floreció esta forma de patología fue en Rochester (Minnesota) donde los hermanos Will y Charles Mayo fundaron la celebre clínica que aun hoy día lleva su nombre. El nombre de Louis B. Wilson, primer patólogo y microbiólogo de los laboratorios de este centro, está también unido al reconocimiento del valor práctico de las secciones rápidas por congelación y tinción (azul de metileno). Existe una publicación también en 1905 en donde comunica su uso "A method for

the rapid preparation of fresh tissue for the microscope" (Jama, 1905). Es interesante destacar como existía en este periodo una clara divergencia entre el criterio anatómico quirúrgico naciente en América y la ya mencionada postura fundamentalista europea. Wilson visita en 1911 diversos centros europeos de patología y se queda impresionado por la falta de acercamiento existente en la práctica médica diaria entre los grandes institutos de anatomía patológica y los hospitales quirúrgicos. Ello le impulsó a crear un laboratorio de histopatología quirúrgica adyacente a la propia área de operaciones con objeto de facilitar la fluidez del diagnóstico microscópico, salvando grandes distancias arquitectónicas. El entusiasmo por esta técnica diagnóstica no limitó su dedicación a otras actividades como la práctica de autopsias, museo anatómico e incluso la creación de una importante colección iconográfica de piezas anatomopatológicas, utilizando ya la fotografía en color. Son importantes sus aportaciones en el campo de la patología del tiroides, particularmente los bocios funcionales y en los distintos tipos de cánceres. En sus últimos años se ocupó de la formación médica de post-grado contribuyendo decisivamente en la creación del "Council on Medical Education and Hospitals of the AMA". Falleció en 1943, dejando tras sí una de las escuelas americanas de patología que mejores contribuciones han tenido a esta materia en el pasado siglo. Nombres como William C. Maccarty (nomenclatura tumoral), Albert C. Broders (carcinoma in situ, histopronóstico tumoral), Malcom B. Dockerty (tumores ginecológicos), han contribuido decisivamente a consolidar la anatomía patológica hasta finales de 1950.

También otros grupos importantes de patólogos que impulsaron la anatomía patológica diagnóstica con criterio quirúrgico son los pertenecientes a la Columbia University así como el trabajo del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Sobre ambos grupos vamos también a hacer una especial mención. Por limitaciones de espacio y de orientación vamos a centrarnos en dos grandes personalidades de estos centros que condicionaron en buena medida la anatomía patológica de hoy. Nos referimos a Arthur Purdes Stout y a James Ewing que fueron pioneros de la moderna anatomía patológica, nacida en ese continente entre 1920 y 1940.

La escuela de patólogos de Harvard (General Massachusetts Hospital y Boston City Hospital)

No es nuestra intención hacer una revisión histórica de esta institución y de los importantes logros efectuados por los patólogos desde que en 1892 se iniciara el primer departamento de patología dirigido por William Thomas Councilman. Sus aportaciones a la patología moderna no pueden ser olvidadas, no solo por sus importantes contribuciones diagnósticas, sino también por la escuela creada y por su aportación a la modernización del pensamiento anatomopatológico tradicional. Esto último lo harían no solo combinando actividad asistencial e investigación conjunta, histológica y microbiológica, sino introduciendo nuevas técnicas de coloración así como iniciando la creación de un **registro de tumores**. Este último aspecto merece una especial mención ya que complementa los museos anatómicos, y sirve para establecer valiosas colecciones de casos anatomopatológicos que enriquecieron grandes colecciones de preparaciones histológicas con fines docentes y de investigación. El nacimiento de los registros abre también una nueva etapa en la patología.

El primer microscopio existente en Harvard para patología, no costó más de 50 dólares, siendo un modelo Oberhauser. Pionero en MGH fue Ferdinand Heber Friz quien había estado en Europa trabajando en el laboratorio de Virchow y su discípulo Orth. A él se debe el criterio diagnóstico de las apendicitis agudas. Sus orientaciones servirían para determinar a la cirugía como el método de elección terapéutico en este proceso durante su fase aguda (aquí también se debería comentar la aportación entre nosotros de Llombart R. sobre las apendicopatías crónicas neurogenas y su discusión con Pierre Masson en referencia a esta patología, surgida en los años 1945).

Otro gran innovador de la patología en esta institución fue William Thomas Councilman (famoso por su descripción de la hepatitis y los llamados cuerpos de Councilman). Él sería contemporáneo en el MGH con Frank Mallory que ocuparía análogo puesto en el Boston City Hospital. También había visitado Europa, trabajando con Chiari en Praga así como con Ziegler en Freiburg. Mallory tuvo especial interés en la clasificación de los tumores basado en métodos histológicos, acuñando tumores como el de "sarcoma de células redondas" "sarcomas fusocelulares" en un análisis comparativo con

los tejidos histológicos normales. Su interés por la técnica histológica fué notoria. Todavía utilizamos en los laboratorios la conocida técnica "tricomico de Mallory". Su libro sobre técnicas histológicas marcó historia en la primera mitad del siglo XX "Pathological technique. A practical manual for workers in pathology, histology and bacteriology". W.B. Saunders Ed. (1915). Fué un adelantado de la técnica histológica aplicada al diagnóstico.

En el MGH nace el primer **registro de tumores óseos** por el interés de E. Codman (triángulo de Codman, condroblastoma o tumor de Codman, ectra). Sería en 1920 cuando junto con Joseph C. Bloopood del J. Hopkins y J. Ewing (Memorial Hospital NY) crearían, bajo los auspicios del American College of Surgeons, este registro de tumores óseos.

Otro importante registro promotor del avance de la neuropatología se haría también en Harvard gracias a Harvey Cushing, cirujano de esta institución en el Hospital Brigham (1913). Aquí existió cierto enfrentamiento entre el departamento de Patología, que entonces dirigía el conocido patólogo Wolbach y el propio Cushing que pretendía estudiarse sus propios tumores, llegando a crearse su propio laboratorio y ocupándose del mismo Percival Bailey. Curiosamente, se inició una intensa competencia entre ambos laboratorios, ya que Cushing enviaba fragmentos de tumor a los dos laboratorios para mantener buena relación con ambos. De esta forma nacería la celebre clasificación de los tumores del sistema nervioso en la conocida monografía firmada por ambos Bailey-Cushing (Lippincott, 1926). También aquí nacería el registro de tumores del sistema nervioso y la clasificación de los gliomas que posteriormente sería revisada por Del Rio Hortega (1933).

Otro importante dato de la patología nace en Harvard cuando a través de su publicación regular en el New England Journal of Medicine se popularizan los llamados "Case records of the MGH". Estas conferencias anatomoclínicas publicadas semanalmente fueron fruto de la colaboración entre Mallory jr. (Burr, hijo de Mallory) y distintos clínicos del centro. Estos fueron continuados por Benjamin Castleman y actualmente se mantienen gracias a B. Scully, perviviendo más de 70 años. Gracias a este sistema se ha popularizado la Anatomía Patológica y logrado acercarla más a la clínica diaria.

También otros grandes patólogos de Harvard fueron Frederick C. Parker jr., Sidney Farber, William Meisser, Arthur T. Hertig y el ya citado Benjamin Castleman quien fundó y dirigió hasta su jubilación la prestigiosa revista "American Journal of Surgical Pathology". Esta publicación continúa en la actualidad manteniendo vivo el más alto standard de esta faceta diagnóstica de la anatomía patológica.

La patología en College of Physicians and Surgeons de Columbia University (NY) y la personalidad de Arthur Purdy Stout

El nacimiento del laboratorio de anatomía patológica en esta institución se produce a principio del siglo (1903) con una orientación de cirugía experimental, orientado al estudio de la cicatrización de las heridas en animales. Posteriormente, un par de años después, se amplía con un área de patología quirúrgica, como una extensión del departamento de Anatomía Patológica que dirigía el Dr. Prudden, haciéndose cargo del mismo no un patólogo sino el cirujano William C. Clarke. Los primeros estudios de biopsias se hacían utilizando la técnica de congelación y la tinción con hematoxilina-eosina. El gran avance de este laboratorio que se uniría al existente en el Presbyterian Hospital fue cuando en 1928 se edificara el entonces nuevo Columbia-Prebiterian Medical Center y la incorporación al mismo de Arthur Purdy Stout.

Stout tuvo desde su formación inicial particular interés por las correlaciones anatomoclínicas defendiendo como: "it is impossible to make an intelligent interpretation of pathology without a clear understanding of its clinical implications". Su interés por la patología tumoral le llevó a describir el primer "Neuroepitelioma periférico" localizado en el nervio ulnar (1918) así como el estudio de los ganglioneuromas. Inclinado por técnicas novedosas empleó junto con la doctora Margaret Murray la naciente **técnica de cultivos de tejidos aplicada a los tumores humanos**. Antes de la incorporación de la microscopía electrónica y otras tecnologías, esta técnica ofrecía una nueva dimensión en el estudio de los tumores al poder cultivarlos en pequeños explantes y analizar su génesis y diferenciación morfológica. Utilizando esta técnica participaría en la discusión histogénica sobre los sarcomas de células redondas del hueso que descubriría James Ewing, considerándolos

como primitivos del mesenquima pluripotencial del hueso, enfrentado a otras posturas como la de Willis quien opinaba que no se trataba sino de metastasis óseas de neuroblastomas extraóseos. Sobre esta controversia tendremos ocasión de volver mas adelante.

La evolución del pensamiento anatomoclínico alcanzó su máximo apogeo con esta escuela donde colaboraron cirujanos distinguidos como Haagensen, quien también sería un prominente patólogo quirúrgico, estudiándose él mismo las muestras que obtenía en cirugía y cooperando estrechamente con Stout en la histopatología de los tumores de mama de la mujer, así como en carcinogénesis experimental (el llamado factor lacteo de Bittner en el ratón C3H, como causante de la transmisión viral del cáncer de mama en esta cepa de ratones).

Este tipo de colaboración es un ejemplo de productividad científica altamente enriquecedora que fructificó en el laboratorio de Columbia y que estableció un nivel de entendimiento cordial entre cirujano y patólogo.

No es momento de analizar detalladamente la vida científica de Stout y la pleyade de importantes discípulos que se formaron junto a él y han contribuido de modo decisivo a la patología moderna y al nuevo pensamiento anatomopatológico, aunque si debemos mencionar los nombres de Raffael Lattes, Howard D. Dorfman, Vizenzo Ozzello, Virginia A. Livolsi, Cecilia M. Fenoglio-Preiser entre otros muchos. La oportunidad de conocer a todos ellos e incluso disfrutar de una buena amistad con algunos de los mismos, nos permite afirmar la rigurosidad y el valor de esta escuela americana de patología en el momento presente y su adaptación dinámica a la nueva forma de analizar el órgano enfermo.

La influencia de A.P. Stout queda plasmada en la patología actual a través de la llamada "Arthur Purdy Stout Society of Surgical Pathology" que reúne a distinguidos miembros de la anatomía patológica mundial y a la que nos honramos pertenecer desde 1994.

Cuando analizamos su personalidad en los albores de un nuevo siglo en donde la tecnología ha revolucionado de modo significativo el concepto de lesión, merece la pena recordar como Stout defendía que por encima de toda nueva tecnología era el estudio meticuloso de la histopatología (con técnicas convencionales) unida a una adecuada información clínica, la base definitiva para establecer un correcto diagnóstico y un adecuado pronóstico.

James Ewing, el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center y el nacimiento de la patología oncológica

Uno de los primeros hospitales oncológicos de América fue el el New York Cancer Hospital, inaugurado oficialmente en 1884 y posteriormente transformado en el hoy celebre Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Esta organización nació gracias al impulso de Elisabeth Hamilton, secretaria del Tesoro con George Washington, quien sufrió y murió de un cáncer de cuello de útero. Su cirujano, el Dr. J. M. Sims, le convenció de la importancia de fundar un hospital dedicado exclusivamente a la oncología. A esta Fundación contribuiría también el rico filántropo J. J. Astor, y entre ambos aportarían una suma de 360.000 dolares que sería fundamental para la construcción del centro.

En principio era conocido como "La Bastille of the Central Park" por su semejanza con las estructuras hospitalarias europeas y sus torres de estilo francés. Progresivas remodelaciones gracias a generosas ayudas de James Douglas, D. Rockefeller Jr. así como de Alfred Swan y Charles F. Kettering permitieron una nueva ubicación y la creación de un centro de investigación oncológico asociado al primero hasta transformarse en el actual centro conocido como "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center". Constituye un brillante ejemplo de la generosidad y altruismo de los magnates norteamericanos que, como en otros muchos casos, lograron crear una de las instituciones de tratamiento e investigación oncológica más importantes del mundo.

En ella también brillaría la naciente patología quirúrgica con una orientación anatomopatológica oncológica gracias a numerosos y célebres patólogos: James Ewing, Fred N. Stewart, Frank W. Foot, Heinz Spitz, Arthur C. Allen, en estos primeros años de su historia que alcanzaron la II Guerra Mundial. Posteriormente, ha habido un impresionante grupo de patólogos que han contribuido decisivamente a la posición actual de la patología en el terreno diagnóstico oncológico (por citar solo algunos de los mas significados merece la pena recordar los nombres de Pat

Fitzgerald, William Chistepherson, Stephen S. Sternberg, Robert McDivitt, H. Liebernan, P.P. Rosen y Juan Rosai). De esta pléyade de patólogos nacerían aportaciones científicas tan importantes como la revista "Cancer" (1948) de la que fué editor el Dr. Steward durante 14 años, así como la revista "American Journal of Surgical Pathology" editada durante numerosos años por S.S. Sternberg. Además de numerosísimas aportaciones científicas y varios fascículos de los Atlas of Tumor Pathology (Armed Forces Institute of Pathology AFIP). El libro de James Ewing "Neoplastic Diseases" (1919) fue un clásico de la histopatología tumoral y sirvió durante la primera mitad de este siglo a la mayoría de los patólogos en el mundo del diagnóstico histológico de los tumores y sus correlaciones clínicas.

No podemos decir que este centro fue donde germinó con exclusividad la histopatología y citología clínica diagnóstica, pero evidentemente ha sido uno de los que mayor protagonismo ha tenido en la primera mitad del siglo XX guiando magistralmente la patología quirúrgica hacia la oncología en la vertiente doble: histopatología y citopatología.

La personalidad de James Ewing tiene además una dimensión especial para nosotros por cuanto fue él quien en 1920 comunicó a la Academia de Medicina de N.Y. la existencia de un tipo de tumor, que crecía en los huesos de los niños extendiéndose hacia la médula y a partes blandas y que podía adquirir una gran malignidad, recidivando localmente y llegando a causar la muerte del enfermo. Este tumor se iniciaría a partir de células matrices del hueso no osteoformadas y sería considerado en un principio como "diffuse endothelioma of bone" siguiendo el concepto clásico reinante en la época, basado en la doctrina de Maximow sobre las células primordiales de la médula ósea no hematopoyética, sobre él volveremos más adelante.

Otro aspecto poco conocido de Ewing fué su apoyo a la naciente citología clínica diagnóstica. Una de las colaboradoras del laboratorio, la Dra. Elise Strang l'Esperance se incorporó en 1916 y trabajó en la patología del cáncer cervicouterino, iniciando al igual que G. Papanicolau las primeras tomas citológicas cervicales con orientación diagnóstica. Ella impulsaría no solo la sección de citología en el Memorial, sino que también fundaría dos clínicas de screening (diagnóstico precoz) del cáncer de cuello de útero (Strang Cancer Prevention Clinics) siendo pionera en esta faceta de la lucha contra el cáncer.

James Ewing reconocería el valor de la escuela histopatológica española con la siguiente frase: "los viejos patólogos analizaron exhaustivamente las posibilidades de la anatomía patológica e histología, pero cupo a figuras como Mallory, Ramon y Cajal y Del Rio Hortega el lograr alcanzar los niveles más elevados de las técnicas histopatológicas y con ello lograr contribuciones no conseguidas por otros métodos".

Además, la personalidad de J. Ewing destaca no solo como patólogo sino también como oncólogo, llegando a dirigir el Sloan Kettering Cancer Center, durante varios años hasta su jubilación.

El advenimiento de la medicina moderna en los albores del siglo xx

Hemos analizado con cierto detalle la evolución del pensamiento anatómico y los logros alcanzados por el sentido anatómico-clínico en la evolución de la Medicina del siglo XX. También hemos podido constatar como los avances técnicos conducían a principios del siglo XX a logros terapéuticos importantes y a una cirugía más efectiva en que la patología quirúrgica encontraría su adaptación más adecuada en el diagnóstico intraoperatorio de la lesión.

Hemos de reconocer sin embargo, que este avance esencial en lo que iba a ser la medicina clínica del siglo XX tiene un substrato filosófico basado en hechos experimentales que iba a cambiar sustancialmente el pensamiento vitalista de la organización humana evolucionando hacia un determinismo reduccionista en que la materia analizada científicamente y aplicando el método experimental y comparado, daría paso a la biología moderna y por ende a la medicina actual.

Desde Platon y Aristoteles e incluso el propio Descartes, siglos después, se había separado cuerpo y espíritu, de forma que la vida orgánica procedería de un principio de esencia superior irreductible a la propia materia. Este vitalismo podría implicar el "alma" para Stahl o un fenómeno vital para Barthez o bien las "sensibilidades específicas" propuestas por el anatómico Bichat. Sin embargo, a lo largo del siglo XIX se producen cambios científicos cualitativos importantes que modifican de modo radical, este pensamiento vitalista y introducen un determinismo técnico a través de la implantación objetiva por el desarrollo de la química, física y fisico-química, lo que va a

permitir un análisis científico de la materia orgánica que asegura el funcionamiento y la estabilidad del mundo vivo. Fueron principalmente en Francia Magendi y Claude Bernard quienes influenciados por los nuevos hallazgos de la química, introdujeron dos conceptos nuevos en la medicina, por un lado el **método experimental** como base de todo proceso biológico normal y su determinismo físico-químico y en segundo lugar la consecuencia directa de la unión entre anatomía (orgánico-celular) y función: **la fisiología**. La medicina experimental se hace reduccionista y determinista. Ella tiene como objeto el identificar la enfermedad, no solo como una lesión orgánica (Rockitansky) o celular (Virchow) y una sintomatología consecuente base del método anatomo-clínico (Skoda) sino como expresión de un desorden funcional. Para su conocimiento es indispensable la ayuda de la fisiología y una vez el desorden establecido, tendría progresivamente una doble vertiente: la causal (etiología) y la funcional (fisiopatología).

La obra "Introduction à l'étude de la médecine expérimentale" (1865) en donde se reunirían ya muchos de los experimentos biológicos de Claude Bernard vendría a confirmar como el mismo encontraría soporte en tres etapas del pensamiento y de la acción de carácter sucesivo: "observación" "experimentación" y "razonamiento experimental". Gracias a esta metodología de trabajo, el conocido "milieu intérieur" y su regulación, aceptado ya durante siglos por el pensamiento médico, alcanzaría su máximo significado al constituirse como el conjunto de líquidos y secreciones orgánicas exteriores al medio celular que establecería relaciones con el medio externo lo que en cierto modo configuraría el "milieu cosmique ambiant" la maquinaria animal estaría regulada por ambos sistemas. Es así como la fisiología, se aproxima a la anatomía tratando de penetrar a través de la función (reacción físico-química) en el elemento tisular o celular. El determinismo experimental daría un golpe definitivo al vitalismo anatómico.

El impulso complementario se produce también simultáneamente gracias a la aplicación por parte de Pasteur de este método experimental al estudio de la fermentación y los fermentos, pero fundamentalmente al estudio de las enfermedades contagiosas y a su aplicación práctica con las vacunas (cólera, rabia, viruela).

A partir del siglo XX, la medicina va a apoyarse definitivamente no solo en la anatomía (celular y tisular) sino esencialmente en la química, tanto a nivel clínico (mejor conocimiento de la dinámica orgánica) sino básico (funciones) en una conjunción química celular, intersticial y molecular. Esta evolución progresiva reduccionista del pensamiento médico va a presidir e ilustrar los grandes avances de la medicina del siglo pasado, como por caso desde las enfermedades innatas del metabolismo. Al mismo tiempo en el terreno de la investigación biomédica, la progresiva miniturización tecnológica va anunciando progresos fulgurantes en los más diversos terrenos (inmunidad, neurociencias, patología de la comunicación intercelular etc.).

Es también aquí donde la eclosión de la genética y biología molecular completan el paisaje en que hoy se desarrollan la medicina al finalizar el siglo XX. Es así como, en conjunción de estas nuevas fuentes de estudio, surge también de nuevo una anatomía patológica que ya no va a limitarse solo a lo estructural macroscópico (autopsias) o histopatológico (biopsias) sino a ampliar su margen de acción a través del estudio de la célula (citología clínica y básica) y ultraestructural (microscopía electrónica, microscopía de fluorescencia etc.). Este paso se logra en la primera mitad del siglo XX alcanzando su máxima expresión a finales de los años 60, en donde toma relevancia una nueva forma de aproximación estructural a la patología a través de la determinación de expresiones fenotípicas mediante técnicas inmunohistoquímicas y logra su máximo reduccionismo determinista al sustituir el *omnia cellula excellulae* (Virchow) por la estructura génica: un gen: una enzima.

La patología pasa de ser anatómica a considerarse elemental en la localización causal de las moléculas y los genes que los controlan. Vamos pues a revisar estos grandes avances a través de algunos modelos concretos.

La citología aplicada al diagnóstico y a la transformación conceptual de materia viva organizada

La citología al servicio del diagnóstico de los procesos morbosos: la citopatología clínica.

La evolución del estudio de la célula con fines diagnóstico es un ejemplo de la evolución del pensamiento anatomoclínico y de la técnica aplicada a este fin a lo largo del siglo XX.

También su nacimiento es previo y se debe a Johannes Müller, publicando años antes que Virchow postulara la teoría celular, una monografía sobre las características estructurales de la célula cancerosa (1838). El Atlas de Patología Histológica (Histological Pathology) publicado por Lebert en 1845 ofrece también numerosas imágenes de células neoplásicas aisladas. Podríamos continuar detallando estudios esporádicos que fueron abriendo el camino del conocimiento de las alteraciones celulares en los cánceres y procesos inflamatorios a lo largo del siglo pasado y principios del presente. Sin embargo vamos a obviar este largo recorrido y volvernos a centrar en la figura que dio impulso a la citología clínica ginecológica. Nos referimos al griego de nacimiento pero americano de adopción científica y profesional George N. Papanicolaou (1883-1962). Su nombre se ha transformado en epónimo de una técnica de citología diagnóstica del cáncer ginecológico, conocida y masivamente utilizada en el momento presente. Esta técnica basada en estudio microscópico de las células descamadas del epitelio cervical uterino (extensible a endocervix, fondo de saco vaginal y endometrio) se ha generalizado como uno de los métodos mas seguros y económicos para el diagnóstico y prevención del cáncer ginecológico en todo el mundo. Desde 1950, en que ella se generaliza a través de campañas de diagnóstico precoz, cientos de miles de mujeres deben su vida a esta técnica y el cáncer de cuello de útero ha descendido radicalmente en aquellas poblaciones femeninas que se someten con regularidad (cada 2-5 años) a este método diagnóstico. Al mismo tiempo, ella ha servido como un modelo de la carcinogénesis física y viral, siendo hoy día un tipo bien conocido de la patología molecular a través de la actuación de virus oncogénicos (virus del papiloma humano).

Pocas técnicas diagnósticas han tenido un mayor rendimiento a un menor costo en la medicina del siglo XX y hoy sigue vigente con carácter creciente. Señalamos a modo de ejemplo que los laboratorios de anatomía patológica responsables de su lectura y diagnóstico han tenido que crear escuelas de citotecnólogos con fines de screening y lectura. Un laboratorio como el nuestro, sin estar particularmente especializado en este trabajo, tiene una media de 20.000 citologías ginecológicas/año con un archivo que pasa del medio millón de casos desde hace mas de 30 años.

Paradójicamente los primeros estudios de Papanicolaou cuando tras estudiar en Munich, emigró a USA en 1913, se orientaron a la citología hormonal es decir al análisis de las modificaciones celulares del cuello uterino y vagina a través del ciclo femenino y durante la gestación (1925). Su impulso a la aplicación diagnóstica del cáncer lo tuvo gracias al contacto con Ewing en el laboratorio de Cornell-New York Hospital Center. Paradójicamente cuando a sus 65 años, en 1950, debía retirarse de su ejercicio profesional por motivos de edad, fue cuando al ser nombrado profesor emérito de Anatomía en esta Universidad Newyorkina, logró dar el mayor impulso y divulgación a la técnica que el propondría popularizándola entre los ginecólogos americanos y europeos.

Es paradójico señalar que otro patólogo europeo contemporáneo de Papanicolaou, el Dr. Aurel A. Barbes de Rumania, trabajando en Bucarest, publicara en 1927 una obra "Diagnostic du cancer du col utérin par le frotis" que pasó desapercibida durante años pero que precedió a la obra de Papanicolaou aparecida en 1941 "The diagnostic value of vaginal smears in carcinomas of the uterus". Bien es cierto que esta última publicación efectuada en inglés y en el American Journal of Obstetric and Gynecology encontraría un eco y repercusión científica no igualable por una publicación efectuada en francés y en una pequeña nación de la Europa de entre guerras.

Es este un ejemplo, entre los muchos, del peso del descubrimiento científico en base al lugar (nación) donde se efectúa y la lengua en que se disemina la información. Esta sería una dominante del siglo XX: America (USA) en particular y el inglés como idioma se iban a transformar en referentes imprescindibles de conocimiento científico no solo médico sino de toda la ciencia en general. En los albores del siglo que empieza esto se considera ya una norma obligada. Nada que no

sea publicado en una revista con alto índice de impacto y en idioma inglés va a ser tomado en consideración por la comunidad científica y su repercusión será prácticamente nula.

Quizás este aspecto, incidental en esta presentación, sea uno de los temas que mayor importancia tengan para la evolución histórica del pensamiento científico cuando la historia juzgue esta a través de los próximos siglos lo ocurrido en el siglo que acaba de concluir.

Como todo descubrimiento científico el método de Papanicolau, tardó unos años en abrirse camino y fue una vez más en USA, más abiertos que Europa para toda nueva tecnología, en donde logró mayor popularidad. Ginecólogos como J.E. Ayre en Canadá, y patólogos como J.N. Reagan en Ohio serían sus apóstoles más destacados. Merece también destacarse a Ruth M. Graham, citopatóloga de Massachusetts y fundadora de un grupo de citotecnólogos y autora de uno de los libros de diagnóstico más populares "The cytodiagnostic of cancer" (1950).

Es a partir de la post-guerra en los años 1950, cuando esta técnica, sencilla y barata se populariza primero en manos de ginecólogos, ginecopatólogos y finalmente entre los patólogos quienes en principio y sobretodo en Europa fueron extraordinariamente escepticos en aceptarla como científicamente suficiente para ser introducida en un laboratorio de Anatomía Patológica. La primera publicación regular nace en 1957 "Acta cytologica" y se funda la Academia Internacional de Citología para albergar y dar soporte científico a esta nueva subespecialidad médica que incluso pretendió en algunos países de Europa, como el nuestro, alcanzar el reconocimiento de especialidad independiente dentro del Consejo Nacional de Especialidades Médicas en los años 70.

Nosotros vivimos aquella época de incorporación de la citología a través de las Sociedades Españolas de Citología y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (fundada en 1959 por el Prof. Sanz Ibañez) y tuvimos ocasión de reivindicar la citología ginecológica como parte integrante de la Anatomía Patológica diagnóstica en todas sus implicaciones y responsabilidades. Otra pequeña batalla se desarrolló también en otros países europeos con diversos resultados ya que todavía existen citólogos sin una formación anatomopatológica adecuada, cosa que es imprescindible para desarrollar una especialidad con una base científica seria. En España, como en el resto de la Unión Europea, la citología clínica es una parte integrada dentro de la especialidad de anatomía patológica (Patología).

El screening de grandes masas de población mediante esta técnica llevó sin embargo a otro problema importante: la implantación del estudio y control de calidad de la técnica (toma ginecológica y lectura). Numerosos programas educativos han sido puestos en marcha por Sociedades Internacionales y diversos organismos científicos (Academia Internacional de Citología) concediendo títulos específicos de formación.

El problema de la nomenclatura ha sido y continúa siendo motivo de controversia. La primera propuesta de Papanicolau abarcaba 5 grados de I a V, extendiéndose desde el frotis citológico normal (grado I) al frotis con células cancerosas (grado V). La extrema variabilidad de los grados III y IV hacía difícil un consenso y nuevas propuestas surgieron en los años 70 (CIN I / CIN II/ CIN III) con carácter simplificador. Fue sin embargo en diciembre 1988 en que bajo la orientación del Instituto Nacional de Cáncer (National Cancer Institute, Bethesda, USA) se reunieron un grupo de especialistas para efectuar una nueva propuesta el hoy llamado "Sistema Bethesda para la información del cáncer cervico-vaginal por diagnóstico citológico". Este sistema provee información sobre la calidad de la muestra obtenida y categorización general sobre los hallazgos citológicos así como diagnóstico descriptivo de las anomalías citológicas presentes. Este sistema es abierto a métodos de computarización por ordenador y análisis automático de datos, caracterizándose por su simplicidad y buena estandarización. Además se desenvuelvo una nueva nomenclatura alternativa a la que propusiese Papanicolau. Así hoy ya no hablamos de grados pero si señalamos si el frotis es normal (grado I de Papanicolau), inflamatorio (grado II de Papanicolau), alteraciones de significado dudoso (AGNUS/ AGUS) equivaldría al grado III de Papanicolau), el LGSIL (grado III-IV) y HGSIL (grado V de Papanicolau). Estos serían también equiparables al sistema CIN: CIN I= LGSIL, CIN II y CIN III= HGSIL. A nuestro juicio el problema del diagnóstico no se centra en la terminología, de por sí importante, sino en el diagnóstico dado por el patólogo, es decir en la postura personal del mismo cuando emite el informe.

Pero como señalábamos antes, la citología clínica ha evolucionado a partir de los años 70 en un solo sentido que expresa el cambio surgido en la patología estructural a partir de la introducción de la nueva tecnología en medicina (sistemas de automatización) y al mismo tiempo la nueva biología y patología molecular: influencia de los virus Herpes y Condiloma en la génesis del carcinoma

cervicouterino y la posibilidad de utilizar metodos de diagnostico molecular (sondas génicas) en esta patología.

Vamos a comentar algunas de estas situaciones:

La automatización en el diagnóstico citológico ginecológico:

El objetivo de la misma es conseguir una máxima rapidez en el diagnóstico, manteniendo una calidad diagnóstica óptima. Hay que tener presente que la lectura por medios convencionales entraña no solo numeroso personal bien entrenado, sino también consume un tiempo largo (se calcula unos 5 a 10 minutos por frotis leído por un citotecnólogo experimentado). El lograr una alta sensibilidad y especificidad serian las metas ideales si un equipo automatico pudiera substituir la lectura de los frotis por un citotecnico.

Son numerosos los sistemas de lectura propuestos y en la actualidad hay mas de 6 equipos en el mercado que ayudan y simplifican sustancialmente este problema, sin embargo al finalizar este milenio, el problema no está todavía resuelto y los diversos citoanalizadores disponibles presentan problemas técnicos y un coste económico dificilmente abordable. Ninguno de ellos ha logrado el sacrosanto label de calidad que hoy significa la aprobación por la US Food and Drug Administration.

Hoy por hoy, el trabajo de investigación diagnostica que representa el estudio de un frotis vaginal o una sección histológica de una lesión solo puede ser interpretada con seguridad y garantia por los ojos experimentados de un patólogo, estudiándolos al microscopio.

Sin embargo los sistemas de integración de imágenes así como las nuevas redes neuronales artificiales, en desarrollo, permitirán con seguridad alcanzar esta meta en los próximos años.

La atipia coilocítica, el condiloma y los virus del papiloma se asocian al cancer cervical: la citopatología abre el camino de la carcinogénesis y patología molecular.

Uno de los problemas mas complejos de la patologia estructural durante este siglo ha sido relacionar los factores etiológicos (patología causal: etiopatologia) con la fenomenología formal (fisiopatologia) de forma que se pudiera lograr una interpretación completa del proceso morboso causante de la lesión.

Hemos visto como el mundo de los microbios iniciaria sus primeros avances a finales del pasado siglo con los descubrimientos de Pasteur y Koch. La virología seria otro de los grandes logros del presente siglo y su posición en la patologia infecciosa se extenderia al terreno de otros procesos (cáncer, enfermedades degenerativas etc...). Desde el virus del mosaico del tabaco (Ivanoski, 1892) a los agentes filtrantes (ultravirus) (Chamberland, 1922) el mundo de la virologia, siguiendo los postulados defenidos por Koch para las bacterias, encontrarian un soporte valiosísimo con las técnicas de cultivos de tejidos y en huevos de embriones (Woodruff, Goodpasture, 1931) asi como con la introducción de la microscopía electrónica (1950) que permitiría su visualización ultraestructural. Los descubrimientos de los bacteriofagos y la lisogenia abrirán las puertas a la biología molecular conjugando los hallazgos bacterianos con los nuevos postulados biológicos (virus DNA, RNA) y priones.

Nuestra intención es revisar esta patologia cervical uterina en donde el modelo de lesión celular (coilocitosis) infección vírica (virus papiloma humano) y efecto consecuente: carcinoma de cuello uterino, está hoy ya comprobada científicamente.

A finales de 1949, J.E. Ayre publicaba un trabajo describiendo e ilustrando una lesión celular de caracter particular que se asociaba a las lesiones cervico uterinas escamosas preinvasivas y al cancer de cuello uterino en su periodo inicial. Seria Koss y Durpee en 1956 quien le dieran el nombre de "atipia coilocítica" tomándola de la palabra griega koilos (cavidad, augero) ya que las células adoptan una imagen particular de una gran vacuola central envolviendo el núcleo que tiende a la retracción. La sospecha de que ello representara una infección viral fue puesta de manifiesto por el propio Ayre en 1960. Transcurririan unos años (1976) hasta que Meissels y Fortin asociarian a su vez el fenómeno de la coilocitosis con los conocidos condilomas de cervix. Los condilomas habian sido ya descritos en los conejos (Shope) y en otras localizaciones del hombre (laringe, mucosa oral, mucosa rectal). En 1976, Zu Hausen demostraria que estos condilomas podrian estar asociados a una transmisión sexual. La relacion virus del papiloma humano (HPV), transmisión sexual, condiloma y coilocitosis fue defendida por Meissels y numerosos citólogos (Purola y Savia, 1977; Koss, 1978). Hoy

día esta circunstancia está confirmada en numerosos estudios: el HPV (variantes 16, 18, 31, 33, 35) se encuentra en el 90% de los HGSIL y carcinomas invasores de cervix.

Las técnicas de biología molecular han permitido un avance rápido en este terreno y si bien la morfología es incapaz de determinar que tipo de virus HPV infecta una célula, sin embargo con técnicas de hibridación molecular si es factible hacerlo demostrando la presencia del DNA viral dentro de ella. Esta nueva aproximación diagnóstica va a permitir conocer si las variantes de HPV (existen mas de 100) son de tipo cancerígeno (mutógeno a través de los genes E6 y E7) o por el contrario carecen de esta capacidad y aunque producen imágenes de coliocitosis no se va a producir el paso hacia HGSIL-carcinoma.

También esta nueva tecnología complementaria de la citología convencional permitirá seleccionar aquellas poblaciones de alto riesgo que deberán ser seguidas con mayor rigurosidad que el resto de la población portadora de una HPV no cancerígeno. El futuro del diagnostico citopatológico se orienta por este camino.

La citopatología no ginecológica. Citología por aspiración con aguja fina (PAAF)

Este siglo ha sido testigo de otra de las grandes evoluciones en el diagnóstico microscópico clínico con la aplicación de la citología al arsenal técnico de la Anatomía Patológica, estableciendo un puente de continuidad entre la patología quirúrgica y la citología. Sus distintas modalidades: exfoliativa, fluidos, lavados, cepillado y aspirado ha permitido complementar de modo rápido y económico el diagnostico tumoral en múltiples facetas clínicas, constituyendo en el momento presente un arma imprescindible para la moderna anatomía patológica.

El diagnóstico citológico de los tejidos se había iniciado ya a mediados del 1800 (1847) cuando se comenzó por Kun la aspiración mediante punción de procesos sospechosos de corresponder a tumores. Sin embargo fue a partir de 1920 cuando esta técnica se inicia sistemáticamente en el "Memorial Cancer Center de NY" en el laboratorio del Dr. James Ewing combinando el uso de la técnica histológica con los extendidos citológicos de la misma lesión. El miedo a que la punción de cánceres pudiera contribuir a diseminar el proceso hizo que su empleo fuera restringido y controvertido, no popularizándose hasta años mas tarde. El grupo de patólogos de Karolinska (Suecia) encabezados por Dahlgren y Nordenstrom (1966), merecen el crédito de haber lanzado esta técnica diagnóstica para el uso clínico al popularizar la punción aspiración con agujas finas, poco traumáticas, casi no dolorosas y proveedoras de material suficiente para ofrecer un diagnóstico adecuado sobre el tipo de lesión útil para el tratamiento clínico.

Hoy existe una estrecha interdependencia entre la biopsia (punción, cilindro, a cielo abierto) y la PAAF.

¿En qué aspectos es la citología complementaria o incluso sustitutiva de la extracción de muestras tisulares?

Son muy numerosas sus aplicaciones y un estudio exhaustivo de las mismas esta fuera de nuestro objetivo. Señalamos solo aquellos que consideramos de mayor protagonismo:

- El diagnóstico de masas palpables superficiales de fácil acceso.
- La utilización en órganos profundos mediante guiado radiológico, ecográfico (radiología intervencionista).
- La complementaridad en la cirugía intraoperatoria, auxiliando o sustituyendo a la biopsia extemporánea.
- La exploración de lesiones radiológica o senograficamente sospechosas sin presencia de masa tumoral palpable (ej. PAAF de la glandula mamaria en microcalcificaciones).
- El análisis de fluidos o exudados procedentes de diversas cavidades orgánicas.
- Monitorización, diagnóstico y seguimiento de posibles metástasis en enfermos portadores neoplásicos con sospecha de recidiva.
- Sin olvidar la citología exfoliativa y los lavados (bronquiales, cáncer broncopulmonar, cáncer vesical, tumores ováricos, etc.)

Practicamente las posibilidades de la citología son equiparables a las de la patología quirúrgica haciendolas al mismo tiempo menos agresivas, mas rápidas y mucho mas económicas.

¿Es posible utilizar la moderna tecnología diagnóstica con los numerosos métodos auxiliares a la citología?

La asociación citología-biopsia resulta un método ideal y complementario, no excluyente, en el diagnóstico de masas sólidas y linfomas. Por ello prácticamente pueden hacerse aspirados o extensiones por contacto de todo tipo de tejido con fines diagnósticos.

Todas las técnicas de tinción histológica son también aplicables a los extendidos citológicos, si bien ello suele limitarse a algunos tipos de tinción mas adecuada según el tipo de estudio (HE, Papanicolau, Giemsa, PAS, etc.).

El material citológico también puede ser sometido a distintas pruebas complementarias como inmunohistoquímica, microscopia electrónica, cultivos y citogenética, biología molecular, citometría estática o de flujo, etc... Tan solo los límites se establecen por el tamaño de la muestra obtenida que el factor limitante en la mayoría de ocasiones.

¿Qué órganos son los más agradecidos, tecnicamente considerados para este tipo de diagnóstico, excluyendo cuello uterino?

- 1.- La glándula mamaria ha alcanzado mayor difusión y popularidad.
- 2.- Los órganos endocrinos (tiroides, suprarrenal, ovario, testes) pueden permitir diagnósticos válidos sin mayor agresividad quirúrgica.
- 3.- Los lavados y aspirados bronquiales constituyen un método selectivo en patología pulmonar.
- 4.- Los órganos internos: pancreas, hígado, riñón, pulmón, se han hecho accesibles por PAAF guiada ecográficamente como método diagnóstico extremadamente útil.
- 5.- También el SNC es objeto de la citología y un particular interés ofrecen los extendidos intraoperatorios de muestras aspirativas de muy limitado tamaño, en referencias a tumores, quistes y lesiones pseudotumorales.
- 6.- El seguimiento del rechazo de transplantes renales y/o cardíacas así como hepáticos también ha sido motivo de descripción diagnóstica.

Haciendo una breve referencia a esta técnica podemos señalar la experiencia de nuestro departamento en esta área asistencial diagnóstica. Analizando solo la actividad diagnóstica arroja las siguientes cifras en los últimos 20 años: PAAF: 700 / año; Líquidos y exudados: 1.300 / año; Otras citologías: 15.000 / año

La realidad presente equipara el valor de la citología diagnóstica al de la histología, sin que los límites de la primera superen a esta última.

Resta por determinar el grado de seguridad diagnóstica de la citología. Este tema sigue siendo controvertido, pues aunque supera con mucho otras metodologías diagnósticas queda limitado a un campo algo mas reducido que el diagnóstico histológico. La razón es obvia, al disponer de material tisular el diagnóstico es teóricamente de mayor exactitud pudiendo además permitir mejor conocimiento del tipo histológico de neoplasia así como de los parámetros relativos a su capacidad infiltrativa, grado de malignidad, factores pronósticos, diagnóstico diferencial, respuesta terapéutica, etc.

Sin embargo la complementariedad con la biopsia o la sustitución de ella por el PAAF se justifica no solo por la mayor rapidez diagnóstica sino también por un coste asistencial considerablemente reducido.

Esta tecnología continuará expandiéndose en años venideros y se va a transformar en uno de los pilares más sólidos de la relación clínico-patológica.

Por tanto resulta imprescindible no solo un entrenamiento adecuado por parte de los patólogos en formación, como ya está considerado en el sistema de residentes sino también la adecuación de espacios para que independientemente o en colaboración con el Servicio de Cirugía y de Radiología se pueda llevar a cabo la obtención de muestras de modo ordenado, en los hospitales y policlínicas.

Qué proyección ofrece para el próximo futuro:

- Aumento del número de muestras ginecológicas
- Aumento del número de aspirados con aguja fina
- Expansión de otros tipos de muestras (orina, lavados bronquiales, líquidos pleurales).

- Complementaridad en las biopsias intraoperatorias
- Utilización de muestras para diagnóstico complejos: inmunohistoquímica, FISH, microscopia electrónica, biología molecular, citogenética, citofluorimetría, etc.
- Aplicación en protocolos de seguimiento oncológico (ensayos clínicos)
- Utilización en biología molecular avanzada (microarrays de DNA), etc.

De la biología y patología celular a la medicina molecular

El largo viaje exploratorio de la biología y medicina al interior del organismo humano que comenzó con los estudios anatómicos y se continuó gracias al microscopio con el análisis de tejidos y células, prosigue su marcha a través de la química y la exploración de las estructuras elementales buscando aquellas partículas más diminutas como componentes de los fluidos orgánicos y de las propias células. El término de “molécula” como “pequeña masa” fue empleado por primera vez en 1811 por Amadeo Avogadro. Sería posteriormente cuando Meyer (1862) definiera a la molécula como “la fracción de materia más diminuta poseedora de las mismas propiedades que la materia original y constituida por átomos”.

Sin embargo la medicina molecular no nacería hasta los años 1920 cuando Garrod propondría el concepto de “enfermedades innatas al metabolismo” por alteraciones hereditarias de una enzima como proteína activada de los procesos de transformación química y degradación molecular. Su ausencia condicionaria el acumulo patológico de la proteína no degradada causando una manifestación patológica a nivel celular o tisular. Se uniría además el concepto de transmisión del efecto como una anomalía hereditaria transmitida de una manera recesiva. La enfermedad por “fenilcetonuria” constituiría un ejemplo de esta patología molecular hereditaria.

Los trabajos de Linus Pauling en 1945 sobre las alteraciones moleculares de la hemoglobina representaron el gran impulso hacia esta nueva visión de la medicina al analizar las distintas formas de “drepanocitosis” hereditarias y las consiguientes alteraciones de los glóbulos rojos en forma de anemia de células falciformes (drepanocitos). Las consecuencias anatómicas con la consiguiente hemolisis (hepato-esplenomegalia) establecería el sustrato clínico (ictericia, anemia) consiguiente, situando la lesión no a nivel celular o tisular sino como consecuencia del trastorno molecular (producción de la hemoglobina S en lugar de la HbA). El método de aproximación también sería novedoso, la química sustituiría al microscopio. Pauling utilizaría la electroforesis en fase líquida analizando las modificaciones en los campos de emigración eléctrica de las proteínas en base a su distinto peso molecular. La invención por Tiselius (1947-49) de la electroforesis en papel (acetato de celulosa, gel de poliacrilamida) abriría las puertas a un mejor conocimiento de esta patología permitiendo a Igman (1956) caracterizar la anomalía de la HbS. Él utilizaría varios sistemas de aproximación (fraccionamiento de la proteína por tripsinización, electroforesis seguida de una cromatografía bidimensional) de forma que las proteínas teñidas aparecerían dibujadas en forma de huellas digitales (se conocería como “finger prints”). Es así como se podría definir con exactitud que el “ácido glutámico” de la cadena Hb B (normal) había sido reemplazado por el aminoácido “valina” a nivel del HbA de cada una de las dos cadenas beta. Esta misma metodología serviría para detectar otras hemoglobinopatías como la Talasemia mayor y menor. De hecho habría que esperar a 1976 en que Kan describiera un nuevo método para la cuantificación de los genes alfa de las globinas por hibridación con un ADN y pudiera determinarse su localización y segregación independiente, estando localizados en autosomas distintos.

También sería preciso otro tipo de conocimientos nacidos a lo largo del periodo de entreguerras para avanzar en esta naciente medicina molecular. Particularmente era preciso un cambio de nivel en la escala de la investigación biomédica. De la percepción sensorial del método anatomoclínico y de la clínica analítica y fisiología, nacidas del método experimental, se inicia el análisis molecular más fino, pero más complejo y más elegante. La patología lesional no solo se limita al tejido y la célula ni tampoco son los gérmenes bacterianos los agentes patógenos desencadenantes del proceso morboso, sino que la enfermedad se situaría a nivel funcional en la estructura celular misma, pero localizada en una alteración de un producto metabólico alterado de ella: una molécula proteica o una enzima.

La aproximación filosófica reduccionista a escala molecular habla de una “*philosophie moléculaire*” (1986) por Claude Debru o del “*Esprit des proteines*” (1983).

La nueva interrogante filosófica concierne al hombre en su totalidad pero como consecutivo análisis de sus componentes más elementales a escala molecular. Ya no hablamos de órganos, células o tejidos sino de enzimas, moléculas de transporte, receptores etc. El nacimiento de este nuevo lenguaje técnico científico para la nueva biología molecular relaciona a una determinada molécula como escalon de interacción entre otras receptoras o efectoras en una compleja cadena de reacciones e interacciones.

La primera mitad del siglo XX habría sido dominada por la descripción de las vías metabólicas, hidratos de carbono, aminoácidos, cadenas fermentativas y oxidativas. La cuestión sobre la naturaleza génica no habría encontrado solución conceptual sino en términos de función (recombinación o de mutación) y faltaba lograr una definición, basada en un conocimiento más claro del “**gen**” así como de la verdadera naturaleza del material genético con objeto de conjugar científicamente la relación entre genes y proteínas (un gen una enzima, Garrod, 1941). También era preciso establecer la localización exacta de los genes y su posible patología. Para ello se precisaba conjugar los nacientes conocimientos de la genética con los conocimientos de las proteínas y las enfermedades innatas al metabolismo. Sin embargo quedaba definitivamente demostrado que la célula dejaba de ser la “primera representante de la vida” para transformarse en una “compleja unidad de materia viva” y que la enfermedad no sería ya considerada como lesión celular simple, sino como una expresión de la lesión genética-molecular en cualquiera de sus posibles dimensiones.

La biología molecular se apoyaría por un lado en la estructura celular pero además en la genética, como encargada del estudio de las distintas modalidades de la transmisión de los caracteres hereditarios.

La genética presta soporte a la anatomía patológica

Hubiera sido imposible a Garrod formular en 1908 el concepto de “error congénito del metabolismo” al describir la alcaptonuria como trastorno metabólico constitucional relacionado con la herencia génica si no hubiera ya dispuesto de una serie de premisas nacidas de una genética de poblaciones y una incipiente citogenética que iniciaban su andadura a principio de siglo.

La teoría celular y la patología celular modifica radicalmente los conceptos reinantes sobre la herencia y la transmisión de los caracteres hereditarios así como también sobre la fecundación. La descripción del núcleo celular y de los cromosomas, como filamentos intercambiables durante la división permitieron a Hertwig (1875) formular el concepto de fecundación y el nacimiento de la embriología moderna, mientras que T. Boveri (1889) aportaría las pruebas definitivas de la fecundación nuclear por un espermatozoide utilizando erizos de mar. Quedaban atrás las especulaciones ovistas y animaculistas que habían tenido su vigencia en las teorías sobre la generación nacida del pensamiento aristotélico e hipocrático. Al mismo tiempo se abría un mundo nuevo y fascinante en el que un monje checo T. Mendel postulando los factores de segregación hereditaria y un naturalista-biólogo C. Darwin (El origen de las especies) defendería la distribución estadística de los caracteres en poblaciones definidas y condicionadas no solo por la herencia sino también por el medio ambiente, lo cual permitiría la aparición de nuevos caracteres cuyas variaciones se establecerían de un modo progresivo y sin pérdida de continuidad.

Estas posturas encontrarían su mayor fundamento científico basándose en la teoría celular, la importante ayuda del microscopio, así como de las distintas técnicas de coloración histológica surgidas a finales del pasado siglo. Los trabajos de la escuela de Morgan (1902) utilizando como modelo experimental la mosca drosófila servirían para proponer la teoría cromosómica de la herencia y con ello el nacimiento de la genética moderna, estableciendo los conceptos de alelismo múltiple y ligamiento genético. La descripción del intercambio de material cromosómico en la meiosis a través del “crossing over” significaría el punto culminante del intercambio informativo entre dos alelos.

El concepto de “**gen**” nacería del botánico W. Johannessen (1911) y éste vendría a equipararse a las “unidades físicas” propuestas por Mendel, al ocupar un determinado lugar o espacio “loci” físico en el interior de un cromosoma. Paradójicamente, los trabajos de la escuela de T. Morgan sobre una

mosca iban a ser útiles para todo el reino animal incluido el propio hombre, definiéndose con carácter universal el concepto de gen, sus mutaciones y la distribución cromosómica.

Años mas tarde, se repeteria este mismo hecho biológico en el descubrimiento de la organización molecular del organismo (ADN-ARN-Proteínas) (lo que es valido para una mosca lo es también para un elefante (J. Monod).

El nacimiento de la “citogenética” sin embargo, avanzaría con lentitud durante la primera mitad del siglo XX y entraría en conjunción con la actual genética molecular a partir de los años 1970, fundiéndose con la biología molecular y abriendo paso a la actual patología molecular. Esta ultima sería por tanto conjunción afortunada de una patología celular y tisular (citopatología, histopatología) con una bioquímica y fisiopatología avanzada gracias a la nueva tecnología no solo nacida de la observación microscópica, sino ayudada por la microscopía electrónica y las técnicas de ultracentrifugación, electroforesis, cromatografía, marcaje radioisotópico, cultivo de tejido y difracción de rayos X (entre otras, y solo a título de ejemplo).

El conocimiento exacto del número, la forma y configuración de los cromosomas no se ha logrado de modo definitivo hasta los años 90 y hoy en día todavía es una importante materia de investigación básica y clínica a la que se dedican numerosas y prestigiosas publicaciones (Genes, Chromosomes and Cancer, Cancer, Genetics and Cytogenetics, Human Genetics, Nature Genetics etc...)

Es interesante el recordar las dudas numéricas sobre el componente global del cariotipo humano: durante mucho tiempo se considero como 48 (Winiwanter, 1912; Oguma y Okkaido, 1922), sería en 1952 Hsu y posteriormente Levan y Luschka quienes defendieran gracias a mejoras microscópicas y técnicas de separaciones de los cromosomas, mediante shock hipotónico, confirmar que el número de cromosomas en la especie humana era 44 XX (Tjio y Levan, 1956) así como 44 XY en el varón (Ford y Hamerton, 1968) describiendo en el espermatozoide el cromosoma X y el cromosoma Y.

Este conocimiento permitiría rápidamente describir (solo tres años después en 1959) al genetista francés J. Lejeune que una vieja patología “el mongolismo” estaba asociada a una patología del cariotipo: la trisomía 21, uno de los cromosomas humanos mas pequeños. Las lesiones ya no se localizarían en la célula ni en el tejido, sino en la distribución numérica de un cromosoma normal, pero patologicamente emigrado durante la meiosis. Esta patología encontraría rápida réplica en otras patologías: síndrome de Turner (45X), síndrome de Klinefelter (47,XXY) etc. El estudio del cariotipo encontraba su ubicación en el diagnóstico clínico mejorando con nuevos aportes técnicos microscopía de fluorescencia, tinción de bandas prometáfásicas, tinción bandas G, tinción con bromodeoxiuridina para el estudio de la replicación de material génico etc.

Hoy la citogenética convencional mantiene su aplicación en el diagnóstico prenatal del líquido amniótico o de las vellosidades coriales permitiendo en un trabajo de rutina descubrir numerosas anomalías numéricas y estructurales, así como la determinación de puntos frágiles (X frágil) asociado al síndrome de debilidad mental en el varón debido a una fragilidad localizada en la porción distal del brazo largo del cromosoma X.

La anatomía patológica encuentra por tanto continuidad en la citogenética, no solo como intérprete de los procesos genéticos y malformativos en la patología pediátrica y neonatología sino también como causa aclaratoria de patología gestacional. Sin su ayuda sería imposible encontrar explicación racional a numerosos procesos de esta naturaleza.

Desde 1979 el Departamento de Patología que nosotros fundamos y dirigimos hasta la actualidad, en que por limitaciones administrativas nacidas de una LRU y estatutos universitarios proclives al igualitarismo (seudo-democrático) impidieron nuestra continuidad al frente del mismo, hemos desarrollado un fructífero proyecto de investigación aplicada al diagnóstico de la subnormalidad y enfermedades genéticas con la invaluable ayuda del grupo de profesores de Biología y Citología que se desarrolla en colaboración con la Conselleria de Sanidad y ha servido para efectuar 8790 cariotipos y detectar alrededor de 600 patologías cromosómicas.

Pero la citogenética humana ha encontrado también nuevas vertientes en el área de la patología tumoral y ha expandido su campo diagnóstico a través del conocimiento de nuevas reordenaciones (deleciones, translocaciones, pérdidas específicas, etc.) así como en su fusión con la biología molecular naciendo una nueva genética molecular.

De la biología molecular a la patología molecular

Los inicios de la biología molecular no están asociados a la anatomía patológica sino que se soportan en dos áreas de conocimiento, disciplinas que estudian el mundo vivo: genética y bioquímica, esta última heredera de la química fisiológica. También hay que reconocer que la física ha contribuido de manera esencial a su nacimiento tanto a nivel conceptual como técnico poniendo a disposición de los biólogos nuevas técnicas de análisis de las macromoléculas.

No es nuestra misión en este apartado hacer una revisión de la compleja, si bien breve historia, del desarrollo de esta nueva faceta de la ciencia moderna, tampoco creemos tener una merecida competencia para ello.

Nuestra visión va a buscar solo el soporte preciso para caminar al encuentro de la moderna Anatomía Patológica en aquellos procesos en que la morfología convencional precisa de su soporte como base de profundización en el diagnóstico de la enfermedad. Tampoco pretendemos con esta revisión ser exclusivistas en el conocimiento de la enfermedad. Es cierto que la anatomía, como estructura y en cuanto a fenomenología patológica, presenta unos límites cuyas fronteras todavía no están claramente definidas. Es más, la moderna medicina esta borrando lo que hasta ahora configuraban los límites clásicos de las distintas disciplinas, abriendo puertas y estableciendo puentes de continuidad entre todos ellos. Es posible que lo hoy llamado "Biología / versus Patología molecular encuentre su posición mas finalista distribuida entre todas las distintas facetas del saber médico hasta llegar al diagnostico del enfermo y a su aplicación terapéutica.

Sin lugar a dudas la revolución que supuso hace ahora un siglo la introducción del método anatomoclínico, basado en la patología celular, se renueva una vez mas con la patología molecular, queda sin embargo abierta la disyuntiva de su aplicación diagnóstica y terapéutica, para lo cual solo ahora se inicia el balbuceo de esta atrayente manera de aproximarnos a la enfermedad y al ser doliente.

Es evidente que sólo hace ahora 50 años el sueño de la medicina molecular así como el conocimiento del genoma humano y en parte ya de su patología era una especulación propia del terreno de la ciencia ficción. Sin embargo, hoy la ciencia se centra de lleno en esta nueva posición de la patología.

Naturaleza y estructura del material genético

El conocimiento del llamado "factor transformante" bacteriano en los neumococos y los estudios sobre el fago lambda, demostraron que el ácido desoxirribonucleico constituía el componente básico necesario para la síntesis de un fago completo y era la base química de los fenómenos genéticos (Avery, Macleod y McCarthy, 1935; Hershey y Chase; Lipmann y Chargaff, 1945). A ello se añadirían los estudios del grupo alemán de Delbrück, físico de formación pero involucrado en la biología de las mutaciones inducidas por irradiaciones. Acabaría formándose el gran club de estudio del fago formado entre otros por S. Wria y A. Hershey y Chase. A través de numerosos trabajos demostrarían que DNA era el elemento básico para la reproducción del fago.

También las aportaciones de la física a la biología fueron esenciales para la descripción de la estructura macromolecular en doble hélice del ADN propuesta por Crick y Watson en 1953, confirmada posteriormente por Wilkins y Franklin en el King's College de Londres. Ellos mismos propondrían en una nueva publicación (1953) la separación de las dos bridas de ADN para remodelar un nuevo ADN con un carácter semiconservador (Neselson y Stahl, 1958).

Sin embargo, a pesar de estos grandes hallazgos científicos, faltaba establecer de modo claro la relación y naturaleza entre la molécula de ADN, las proteínas y los mecanismos de replicación del sistema biológico.

La llama de la biología molecular sin embargo volvería a estar en manos de los bioquímicos. Precisamente sería un español, Severo Ochoa, y sus discípulos a quienes cabría el éxito espectacular del descubrimiento de aquellas enzimas implicadas en el ensamblaje y replicación tanto del DNA como del RNA. A. Kornberg consiguió purificar a finales de los años 50 una enzima "ADN polimerasa" capaz de sintetizar ADN in vitro, en presencia de los 4 desoxirribonucleotidos; esta matriz de una sola brida daría lugar a una segunda, complementaria de la primera confirmando así el modelo propuesto por Watson y Crick y además demostrando que la nueva cadena sintetizada

tenía una polaridad inversa a la de su matriz. Ochoa sintetizaría también otra enzima esencial en este proceso conocida como "polinucleotido fosforilasa". Ambos recibirían en 1959 el Premio Nobel por estos hallazgos incluso antes de que se otorgara esta distinción a Watson y Crick en 1962. Nuevas enzimas de replicación del ADN serían descubiertas en los años siguientes uniéndose a la ADN polimerasa I de Kornberg. También aquí la microscopía electrónica jugaría un papel esencial al visualizar como la replicación se iniciaría a nivel de un determinado punto del cromosoma bacteriano, procediendo de una manera bidireccional en forma de dos horquillas de replicación. La polimerización de los nucleótidos se llevaría a cabo en los llamados sentidos 5'→3' y 3'→5' (Okazaki, 1969).

Los pasos siguientes de esta fascinante aventura científica serían establecer por un lado la relación entre DNA y proteínas y su mecanismo de síntesis. Al modelo hasta entonces defendido del carácter polienzimático para la síntesis proteica, se revelaría como válido el modelo de "templado" (molde, guía) en la que el ARN jugaría un papel intermedio entre el ADN y la proteína (Dounce, 1953).

Los orígenes de este modelo tienen también un cierto sustrato morfológico ya que tanto J. Capersson como J. Brachet (1940) habrían demostrado citofotométricamente que existía un paralelismo evidente en el citoplasma celular entre síntesis de proteínas y contenido en RNA y que esta síntesis podría proseguir incluso en células a las cuales se les había sustraído el núcleo (Brachet, 1955). También los trabajos de citología llevados a cabo por Claude (1943) y continuados por Palade vinieron a demostrar con bases bioquímicas y con la ayuda del microscopio electrónico que el ARN se localizaría en las estructuras ribosómicas del citoplasma. Ello les valdría el premio Nobel en 1974. A principios de los años 1960 era ya evidente a través de numerosas aportaciones que las proteínas eran sintetizadas en contacto con los ribosomas (microsomos) y que existía una secuencia de hechos relacionados en sentido ADN→ARN microsomos→proteína. La secuenciación de la insulina (1954) lograda por el método propuesto por Sanger, mostraría que los aminoácidos (AA) ocuparían una secuencia específica en el seno de una cadena de polipéptidos.

El paso siguiente sería encontrar el "mensajero" capaz de transmitir la información desde el ADN nuclear al ARN ribosomial. Esto sería mérito de los investigadores franceses F. Jacob y J. Monod el demostrar que un ARN de vida corta sería capaz de jugar el papel intermediario entre el gen y la cadena de proteína sintetizada a nivel ribosomal. En los laboratorios de Meselson en Pasadena, estos investigadores lograrían demostrar esta circunstancia (1960). Existiría además una nueva categoría de ARN de renovación rápida asociado a los ribosomas y con la tipificación del ARNm.

A partir de este momento dos vías distintas tenderían a confluir en el campo de la biología molecular. Por un lado el desarrollo de la genética bacteriana con el esclarecimiento de los fenómenos de conjugación, sexualidad y cromosomas bacterianos, estableciéndose los modelos de regulación de la expresión génica en fagos y bacterias así como los fenómenos de transducción y lisogenia. Es lo que en argot científico se conoció como "PA-JA-MO" o "pijama" (A. Pardee, F. Jacob y J. Monod, 1957-1967).

El conocimiento del código genético, por otro lado, basado en el modelo de ADN de Crick permitiría ofrecer la posibilidad de un sistema de bases (A,G,C,T/yoU), que ofrecieran un mínimo de 64 posibilidades con el cual codificar los 20 AA. Fueron los laboratorios de J. Matthdes, Crick, Ochoa y Nirenberg los que entrarían en una dura competencia que abocó en 1966 al desciframiento del código y sentaría la base del dogma fundamental de la biología molecular: la transferencia unidireccional de la información siguiendo la secuencia ADN→ARN→proteínas. Como veremos este dogma se tambalearía y pondría en entredicho con el descubrimiento de la enzima "transcriptasa inversa: ARN-ADN polimerasa", a nivel de los retrovirus (Temin, 1964).

Otro avance esencial fue el inicio de la llamada "ingeniería genética" a través de las primeras recombinaciones génicas llevadas a cabo *in vitro* por Berg (1971) utilizando el virus oncogénico SV40 y la enzima de restricción EcoK1, pudiendo obtener una molécula híbrida entre este virus y el fago (fago lambda-SV40) que podría ser amplificada en las bacterias y ofrecería la posibilidad de introducir genes en organismos diferentes a los de su origen al mismo tiempo que se podrían producir un importante número de copias de los mismos.

Para esta nueva tecnología dos avances fueron decisivos: por un lado el desarrollo de nuevas enzimas de restricción (Arber, 1960) capaces de fragmentar el ADN en puntos específicos de la

cadena. Esto valdría en 1978 el Premio Nobel a Smith y Nathans. En segundo lugar el disponer de moléculas capaces de multiplicar dentro de las bacterias y transformarse en vectores, aparte del ya conocido fago lambda. El descubrimiento de los "plasmidos" (Cohen, 1973) que poseían genes resistentes a los antibióticos ofrecería una gran ventaja para su replicación autónoma. Otra serie numerosa de plasmidos vectores sería posteriormente desarrollada (PBR322, Bolívar, 1977) capaces de adquirir un ADN extraño. A los plasmidos se añadirían posteriormente otros vectores más potentes capaces de aceptar fragmentos de ADN de un mayor tamaño: los cosmidos y el empleo de YAC (yeast artificial chromosomes) (cromosomas artificiales de levaduras).

Durante estos mismos años se descubren técnicas para analizar el ADN, indispensables para un cartografía física del mismo. La publicación de Southern, describiría la modalidad de la detección de una secuencia de ADN mediante una sonda radioactiva tras la separación electroforética del ADN fragmentado y transferido a una hoja de papel de nitrocelulosa (1975). Esta fue seguida por análogo proceder para el ARN (1977) conocido como Northern blotting. Gracias a ello este mismo año A. Maxam, W. Gilbert y F. Sanger podrían determinar la secuencia específica de un fragmento de ADN. Otro paso fundamental para el análisis del genoma fue la puesta a punto por K. Mullis de la técnica universalmente conocida como "Reacción en cadena de la polimerasa" (Polimerase Chain Reaction) o vulgarmente llamado "PCR" que le valió recibir el premio Nobel de 1993. Este método permite amplificar varios millones de veces copias de una molécula determinada de ADN permitiendo así obtener este material (muy resistente biológicamente frente a lo inestable del ARN) a partir de muestras minúsculas lo que permitiría trabajar en material humano fresco o incluso conservado en parafina así como en muestras citológicas aisladas (una sola célula patológica o un núcleo). La conjunción entre el mundo de la Biología molecular y la Anatomía Patológica se abría para el diagnóstico molecular de las enfermedades, lo mismo que un siglo antes lo fuera para el mundo de la célula con la generalización del microscopio y las técnicas auxiliares que hemos descrito.

Los avances en estos últimos 20 años (1980-2000) han sido espectaculares y ni la más brillante imaginación hubiera podido superar la realidad de estos logros que han culminado hace pocos meses con la secuenciación completa del genoma humano.

Los avances técnicos de la observación microscópica revolucionan la histopatología

Ninguno de los análisis efectuados hasta este momento hubieran adquirido un nivel científico sin disponer del útil que revolucionó la biología y medicina, tanto el pasado siglo como en este siglo XX. Nos referimos a la posibilidad de analizar objetos (células, tejidos, bacterias, virus) con el microscopio. Este útil sirvió para definir la teoría celular por Schleiden y Schwann, así como para abrir las puertas, ya comentadas, a la patología celular (R. Virchow). Más de un siglo después su vigencia en el mundo de la biología y patología es indiscutible.

La búsqueda de lograr mayores índices de resolución, superiores a los $0.2\mu\text{m}$ que provee el máximo de un microscopio de luz transmitida ha estimulado no solo la mejora sustancial de la óptica y su poder resolutivo sino también de métodos alternativos que pudieran superarla.

En la actualidad este límite de $0.2\mu\text{m}$ con luz transmitida a nivel de microscopía óptica puede mejorarse utilizando videocámaras e imágenes digitalizadas sobre objetos diminutos de hasta 5nm (esferas de oro) fijadas previamente con anticuerpos específicos a determinadas estructuras celulares (protéicas) e incluso con células vivas.

Otras formas de microscopía óptica rinden grandes servicios a la patología e investigación, señalemos los más importantes:

“La microscopía de fluorescencia” es capaz de revelar la presencia de proteínas específicas así como orgánulos, cromosomas o genes (productos de fusión), como ya hemos comentado con anterioridad.

También gracias a la microscopía de fluorescencia estamos en condiciones de medir concentraciones locales de Ca^{2+} iónico así como de determinar el pH celular, lo cual sirve para analizar la dinámica del metabolismo celular. La propiedad fluorescente de determinados colorantes como el “fura 2” permite analizar estos niveles de Ca^{2+} en el citosol de una célula viva. Las modificaciones del Ca^{2+} iónico se expresan tanto en condiciones fisiológicas como patológicas

(movimientos, activación hormonal, apoptosis, transformación neoplásica, etc) y sirven como espejo de la situación biológica de una célula viva (Taylor y Wang, 1990).

En estos últimos años (1992) se ha introducido un nuevo avance en la visión microscópica de las estructuras con el empleo de la “microscopía confocal”. Esta microscopía permite observar, escaneando la superficie de una preparación histológica teñida con un fluorocromo, aquellas moléculas localizadas exclusivamente en un mismo plano, lo cual permite crear una imagen de fluorescencia mucho más definida, sin dañar con la excitación lumínica la antigenicidad del resto de la prueba. Esta forma refinada de disección óptica en planos, permite también almacenar en imágenes digitalizadas sobre ordenador distintos niveles de una misma estructura y combinarla a diversos niveles en una reconstrucción tridimensional (por ejemplo la distribución de una determinada proteína dentro de una célula).

Mención particular también lo merecen técnicas como la “microscopía de contraste de fases” y la “microscopía de interferencia” para el estudio de células vivas.

Sin duda el mayor avance en el estudio del mundo microscópico en el siglo XX lo representa la “microscopía electrónica” en sus distintas variantes.

Vamos a ocuparnos con mayor detalle de ella ya que a partir de los años 1950 proporcionó el avance más significativo en el mundo científico, revolución que luego sería superada por la inmunohistoquímica y biología molecular, pero que aun hoy mantiene plena vigencia en la morfopatología.

Los sucesivos descubrimientos que se realizaron desde los últimos años del siglo XIX en el campo de la física abrirían el camino a una nueva rama de esta ciencia, la llamada “óptica electrónica”. Sobre estos descubrimientos se basaría el francés Louis de Broglie para establecer en 1924 los fundamentos de la mecánica ondulatoria que sería confirmada posteriormente empleando electrones lentos y rápidos de forma que se demostraría que en los rayos electrónicos una onda va asociada a un electrón. En 1937 Davisson y Thomson recibirían el premio Nobel de Física por estos descubrimientos.

Así, una energía de 150 kilovatios produciría una onda electrónica de 0.03 amstrongs de longitud de onda, es decir hasta 100.000 veces menor que en la luz ultravioleta. La primera lente electrónica sería construida por Busch (1926), basada en que todo campo eléctrico o magnético con simetría de revolución alrededor de un eje, es susceptible de focalizar los haces de rayos electrónicos (lentes electrónicas o lentes magnéticas) siguiendo la misma terminología que la empleada para la microscopía de luz, de forma que actúa como un haz luminoso al atravesar una lente ordinaria.

Basados en estos principios, Knok y Ruska en el laboratorio de la Technische Hochschule en Berlin (1932) construirían un microscopio electrónico que sería operativo en 1934. Los primeros microscopios electrónicos de uso investigador fueron desarrollados por Borries y Ruska en la Siemens Halske AG de Berlin obteniéndose a partir de ellos las primeras imágenes de diatomeas y bacterias. Diversos artilugios técnicos permitieron visualizar estructuras celulares y tisulares, aunque fué el desarrollo de un ultramicrotomo por Fernandez Moran (1952), el que ofreció el gran avance de la biología y patología al permitir estudiar sistemáticamente tejidos y células normales y patológicas.

No es objeto de la presente revisión el plantear con detalle lo que este aparato de investigación ha significado para la citología e histología normal y patológica durante el periodo de 1960-1990. Estos treinta años han sido testigos del auge y en cierto modo también del parcial ocaso de la ME aplicada al diagnóstico en anatomía patológica. Nosotros hemos sido testigos de excepción de este ciclo y será motivo de un análisis en profundidad en el futuro.

Sin embargo, si es importante comentar en este lugar lo que ha significado y continúa haciéndolo tanto en el campo de la virología, como en el de la biología molecular y en la morfología (citología, histología, anatomía patológica). Es especialmente en este último en el que nosotros hemos sido testigos y protagonistas de su evolución.

El ME dirige un haz de electrones a través de una muestra, previamente preparada y situada en una cámara en alto vacío. Los electrones, emitidos por un cátodo de tungsteno con un potencial eléctrico de 50.000-100.000 voltios, chocan con el ánodo próximo a los 0 voltios, produciendo una aceleración de electrones que son condensados y proyectados atravesando una rejilla donde se sitúa la muestra ultrafina, sobre una pantalla fluorescente o una placa fotográfica. La muestra, por tanto, debe ser de un grosor no superior a 50-100 nm y haber sido contrastada con un metal pesado (ácido ósmico) para que puedan difractar (scatter) los electrones incidentes y configurar la imagen sobre la

pantalla. Aquí no existe color (imágenes en blanco y negro) ya que la placa fotográfica no está impresionada por fotones con diversa longitud de onda, sino por electrones.

La microscopía electrónica de barrido (scanning) permite al investigador observar superficies de muestras nativas, no seccionadas en cortes ultrafinos, que no podrían ser visualizadas con ME de transmisión.

Aquí la muestra deberá ser fijada y deshidratada a la vez que cubierta por una fina capa de un metal pesado, como por caso platino, mediante un sistema de evaporación al vacío. El haz de electrones en lugar de atravesar la muestra, la escanea, excitando las moléculas pesadas que liberan electrones secundarios, los cuales son focalizados hacia un detector que se expone sobre un tubo de rayos catódicos. La microscopía electrónica de barrido ofrece imágenes del objeto de tipo tridimensional, atendido que los electrones secundarios producidos por cualquier punto de la muestra dependen del ángulo de incidencia del eje de electrones en relación con la superficie. Sin embargo ofrece otras limitaciones como es por caso un menor poder resolutivo (aproximadamente no superior a 10nm).

El laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Valencia recibió a principio de los años 1970 una dotación ministerial que permitió la puesta a punto de un Servicio de Microscopía electrónica con la adquisición de dos microscopios electrónicos (Jeol 100B y Jeol 7B) y los correspondientes ultramicrotomos. En 1975 se pondría en funcionamiento un microscopio electrónico de barrido (Scanner, Phillips 500) también con un equipo de preparación de muestras adecuado al mismo. Durante 30 años el trabajo de investigación y diagnóstico ha sido rico en publicaciones científicas y diagnósticas que han sido aplicadas a la clínica médica (oncología, hematología, dermatología, nefrología, urología, etc).

No es este el momento de resaltar con detalle la actividad del citado servicio. Un número de 14.000 muestras estudiadas avalan su efectividad. Más de 300 publicaciones en revistas nacionales e internacionales atestiguan la continuidad y seriedad de esta acción.

En la actualidad la continuidad del mismo está asegurada para el futuro, disponiendo de nuevos microscopios electrónicos (Jeol 100C, Zeiss A10), en un área también renovada del departamento.

En estos últimos años se ha puesto en duda la efectividad de estos equipos aplicados al diagnóstico histopatológico. El haber tenido la oportunidad de vivir el ciclo de la microscopía electrónica aplicada a la medicina y a la investigación biomédica desde principio de los años 1960 hasta estos momentos y haber seguido día a día su evolución, nos autoriza a defender su vigencia actual e imprescindible necesidad para el próximo futuro.

La inmunología aplicada al diagnóstico anatomopatológico (inmunohistoquímica y citoquímica)

El nacimiento de la inmunología en la segunda mitad del siglo XIX se asocia al descubrimiento de las primeras vacunas así como al de los gérmenes patógenos como agentes infecciosos (desde la lepra, descrito por Hansen en 1875 hasta el tifus por Nicolle en 1909). Las vacunas abrirían un nuevo camino a la terapéutica preventiva de numerosas enfermedades gracias a los trabajos de Louis Pasteur, Calmette, Guérin, etc. Se conseguiría así que la vacuna confiriera al organismo una inmunidad activa al fabricar anticuerpos específicos para cada tipo de antígeno bacteriano. También la seroterapia aseguraría una inmunidad pasiva, al administrar al hombre un suero de un animal que previamente hubiera contraído la enfermedad o fuera inmunizado. La inmunidad humoral reencontraba la vieja doctrina hipocrática de los “humores” que atribuía un papel fundamental a los líquidos circulantes en el organismo. Sería Elie Metchnikoff quien demostraría el fenómeno de la fagocitosis capaz de destruir por parte de las células con capacidad macrofágica cuerpos y sustancias extrañas al organismo. La “inmunidad celular” complementaría la inmunidad sérica. Nuevos descubrimientos ampliarían el cuadro de la inmunopatología como el de la “fijación del complemento” por Jules Bordet (1901) o los fenómenos de aglutinación y lisis por Fernand Widal así como el importante descubrimiento de los grupos sanguíneos por Karl Landsteiner. También a principios del siglo XX se descubriría la compatibilidad humoral, por Charles Richart (1859-1929) así como las enfermedades autoinmunes (Paul Ehrlich 1854-1915).

El nacimiento en los años 1940 de la llamada inmunocitoquímica (inmunohistoquímica) representa una unión afortunada en que se conjuga la especificidad de una reacción inmunitaria (antígeno-anticuerpo) con el color y la morfología a nivel tisular o celular. Hasta entonces el objeto esencial de la técnica histológica en sus distintas variantes había sido el teñir células o tejidos con objeto de impartir color y contraste a los distintos componentes químicos presentes (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) basándose especialmente en el carácter ácido/básico de los mismos. También las técnicas de histoquímica enzimológica promovieron un importante avance al poder fijar estructuralmente funciones enzimáticas específicas (enzimas respiratorias, fermentativas, etc) si bien bajo el hecho de que ellas se producen simultáneamente en múltiples células/tejidos independientemente de otras funciones más específicas.

La inmunohistoquímica por el contrario ofrecería el potencial de demostrar de un modo específico la presencia de un determinado antígeno y su localización específica dentro de la célula (membrana, citoplasma, núcleo) utilizando un anticuerpo determinante previamente marcado con una sustancia coloreada.

Las técnicas de inmunofluorescencia puestas a punto por Albert H. Coons (1941) abrirían las puertas de esta nueva visión de la morfología. En principio habría sido años antes von Dungern (1903) quien por vez primera sería capaz de utilizar un antígeno marcado con un colorante con el fin de visualizarlo, sistema que utilizaría posteriormente Heidelberger y Kendall (1929) para cuantificar anticuerpos, que ellos mismos identificarían como de naturaleza proteica. Basado en estos dos hallazgos Coons ideó su aplicación a la microscopía, utilizando luz de fluorescencia marcando los anticuerpos con fluoresceína. El objeto de su investigación inicial fue analizar la naturaleza del nódulo reumático de Aschoff en la patología miocárdica. Posteriormente su generalización ha servido para dotar a la morfología normal y patológica de un útil diagnóstico que alcanzaría una total credibilidad científica para el marcaje específico de anticuerpos en células aisladas o tejidos. Su aplicación en la actualidad mantiene una completa vigencia.

Sin embargo las técnicas de fluorescencia que ofrecen un valor total para la detección de partículas celulares o como marcadores de sondas cromosómicas, centroméricas o teloméricas así como de sondas génicas en determinados loci cromosómicos, presentan una limitación ya que la luz de fluorescencia no permite visualizar con claridad las estructuras tisulares o la morfología de la célula.

Para evitar esta situación se han puesto a punto diversas técnicas con objeto de visualizar con microscopía de luz o microscopía electrónica la reacción cruzada antígeno-anticuerpo. Hoy disponemos de toda una compleja tecnología utilizando distintos marcadores como la peroxidasa de rábano (técnica conjugada directa o indirecta) así como la técnica PAP (peroxidasa-antiperoxidasa) utilizando un anticuerpo específico frente al anticuerpo primario y el complejo PAP como reactivo de unión entre ambos. Otros métodos han logrado mayor sensibilidad y especificidad como el complejo avidina-biotina, conocido como método ABC en el que el anticuerpo primario es biotinizado y al mismo se une el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Sternberger, 1969; Hsu, 1981). La peroxidasa de rábano continúa siendo el marcador enzimático empleado con mayor frecuencia si bien las fosfatasa alcalinas o la glucosa oxidasa también han encontrado una amplia aplicación. Esta última ofrece la ventaja de no necesitar bloquear la peroxidasa endógena que normalmente existe en las células. También se han empleado distintos cromógenos en conjugación con la peroxidasa para obtener el marcaje final. La aminobencidina, a pesar de su toxicidad, continúa siendo la más utilizada; otros numerosos cromógenos han sido también propuestos (carbazol o el cloronaftol).

Otro gran avance tecnológico fue el no solo utilizar anticuerpos policlonales obtenidos previa inmunización a conejos, sino también utilizar anticuerpos monoclonales.

Como es conocido, los anticuerpos son sintetizados por los linfocitos B de forma que cada linfocito es capaz de producir un tipo de anticuerpo dirigido frente a un epítipo específico en una molécula antigénica. Atendido que la mayoría de los antígenos naturales poseen numerosos determinantes antigénicos (varios epítipos), la exposición de un organismo ante un antígeno de este tipo desencadena la formación de varios clones linfocitarios B, cada uno de ellos produciendo un distinto anticuerpo. La mezcla de anticuerpos que reconocen los diferentes epítipos de un determinado antígeno se conoce como "anticuerpo policlonal".

Frente a estos anticuerpos, Kohler y Millerstein en 1975 propusieron una técnica específica para obtener anticuerpos monoclonales sin necesidad de costosisimas técnicas de purificación de un

“anticuerpo policlonal”. Para ello fusionaron linfocitos B con células de un mieloma (línea HGPRT-) produciendo hibridomas. Atendido que solo las células fusionadas proliferan en el medio de cultivo conteniendo la enzima HAT, ello permite seleccionar la línea estimulada antigenicamente frente a la cual se pretende obtener el anticuerpo monoclonal buscado. El cultivo a larga escala de este hibridoma permite obtener cantidades de Ab a nivel industrial.

Estos “Ab monoclonales” han resultado tener un valor excepcional tanto desde el punto de vista diagnóstico como incluso terapéutico, abriendo nuevas perspectivas al diagnóstico inmunohistoquímico y serológico así como al tratamiento de enfermedades infecciosas e incluso neoplásicas.

El avance más definitivo para su aplicación a la histopatología diagnóstica fue la posibilidad de emplear tejidos fijados en formol e incluidos en parafina para la detección antigénica sin necesidad de partir de cortes de criostato sin fijar.

En efecto, estas técnicas solo pueden detectar antígenos bien preservados y no alterados por las técnicas de fijación que destruyen proteínas, modificando su capacidad de reconocimiento. Se deben por tanto diferenciar aquellos antígenos demostrables tras fijación tisular y procesamiento con inclusión en parafina (la formalina neutra tamponada continua siendo un excelente medio para preservar proteínas) de aquellos que han de ser preservadas en cortes de criostato admitiendo solo la fijación por frío. Independientemente hoy se han desarrollado nuevos sistemas de recuperación antigénica mediante choque por calor a altas temperaturas (microondas) que permiten recuperar antígenos encubiertos y poder visualizarlos con microscopía de luz.

No podemos entrar en detalles relativos a lo que ha significado este avance tecnológico en el mundo del diagnóstico histopatológico y citológico pero es evidente que ha cambiado el planteamiento existente de una patología predominantemente estructural en una patología diagnóstica dinámica y etiopatogenicamente más exacta. Pero además ha abierto el mundo del diagnóstico histológico a nuevos criterios pronósticos no basados en observaciones estructurales sino en determinaciones específicas de expresiones proteicas relacionadas con el ciclo celular, diferenciación o muerte celular. Nuevos conceptos de la patología como el de “apoptosis” (muerte celular programada) se han establecido gracias a esta tecnología.

El carácter antigénico de cada una de las proteínas producidas por las células ya sean normales o patológicas, permite detectarlas gracias a la posibilidad de anticuerpos frente a la molécula completa o frente a alguno de sus determinantes antigénicos (epítomos). La microscopía tanto de luz como electrónica ha logrado una nueva dimensión.

Su aplicación práctica en el mundo de los tumores ha transformado esta técnica en una rutina obligada en todos los laboratorios de diagnóstico e investigación. La caracterización de tumores epiteliales, conjuntivos, indiferenciados, melanomas, linfomas, embrionarios, nerviosos, etc. pasa necesariamente por su complementaria detección de la expresión antigénica que va a marcar un diagnóstico diferencial e incluso una proyección pronóstica como ejemplo de lo que constituye esta tecnología.

En nuestro laboratorio de inmunohistoquímica desde que inició su trabajo sistemático hace ahora más de 15 años se han determinado anticuerpos frente a más de 120 antígenos celulares y tisulares lo que significa un número de pruebas que en estos momentos alcanzan 150.000 en total con una media de 12.000 anuales. Esta cifra es orientativa de la necesidad que hoy tiene un moderno laboratorio de Anatomía Patológica de disponer de esta metodología.

Las infecciones cambian el ritmo de la medicina moderna

A lo largo de la década de los 80, se consideró que el triunfo de los antibióticos sobre las enfermedades infecciosas condicionaba el fin de esta patología, sobre todo en aquellos países más evolucionados y técnicamente industrializados. Sin embargo, no se tenía en consideración la enorme resistencia de numerosos gérmenes, así como la capacidad de adaptación a condiciones hostiles gracias a su posibilidad de mutaciones sucesivas. Hoy en día, las enfermedades infecciosas continúan siendo la primera causa de muerte en el mundo. Además, entre los años 1980 y 1990 se ha visto la aparición de nuevos gérmenes patógenos, cuya repercusión clínica y epidemiológica está lejos de estar controlada.

Virus como los asociados al síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el virus Hanta, causante del síndrome pulmonar o el grupo de virus Herpes condicionantes de procesos inflamatorios o tumorales (epitelioma de cuello uterino, sarcoma de Kaposi) han cambiado la faceta de las enfermedades infecciosas y las han aproximado a los procesos degenerativos y tumorales aunando las fronteras entre la respuesta inflamatoria crónica y los mecanismos de reparación y regeneración tisular que en última instancia pueden condicionar procesos cancerosos. La infección por germen bacteriano aparentemente vanal como el *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica y su asociación con la úlcera péptica crónica, la gastritis crónica y los linfomas tipo MALT son otro modelo de esta novedosa patología cuyo control dista todavía mucho de estar resuelto y mantiene su problemática por resolver en este momento.

Además, surgen nuevas patologías como es el caso de las enfermedades degenerativas del SNC secundarias a las infecciones por priones (encefalopatía espongiiforme) como es la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y sus distintas variantes, cuya repercusión médica sanitaria está lejos de conocerse en la actualidad.

Por otro lado prevalecen procesos "clásicos" con nuevas facetas patogénicas. El ejemplo más preocupante sigue siendo las micobacteriosis y el bacilo de Koch en nuevo resurgir asociado o no a otros germen patógenos. A ello se unen procesos endémicos que aunque parecían controlados, resurgen con renovada virulencia en el tercer mundo (ej. enfermedad del sueño o el virus de Ebola). La desaparición de las fronteras y disminución de las distancias (de meses a días y horas) ha universalizado estas formas insidiosas de patología que o bien nunca se consideraron presentes en una determinada área geográfica o que habían desaparecido de ella.

Con ello la Anatomía Patológica en su vertiente morfológica tanto necropsica como microscópica y biológica, ha encontrado nuevas fuentes de conocimiento y servido de base para una renovada actuación de utilidad clínica.

Basados en nuestra propia experiencia podemos señalar como el declinar de tuberculosis se hizo patente en las autopsias clínicas practicadas en nuestro Departamento en los años 70, 80 hasta casi desaparecer. Por contra resurge en estos años 90, coincidiendo con la aparición de una nueva enfermedad: el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

Nuestra experiencia en este sentido ha sido enriquecedora y aleccionante. Un total de 112 casos necropsicos de enfermos fallecidos por SIDA nos han permitido coleccionar una amplia gama de procesos infecciosos y tumorales que considerábamos como exóticos, caducos o controlados. De otros no conocíamos tan siquiera su existencia, excluida la información exótica de los libros de consulta (micosis, viriasis, parasitosis).

Análogas consideraciones podemos hacer con el síndrome de Creutzfeldt-Jacobs y la encefalopatía degenerativa espongiiforme. Como Centro de Referencia en la Comunidad Valenciana hemos tenido la responsabilidad de estudiar necropsias de un número de fallecidos por esta enfermedad y testimoniar morfológicamente el dramático cambio involutivo neuronal presente en el sistema nervioso central de estos enfermos.

Por lo exótico y hoy por hoy poco conocido de este proceso patógeno y de sus posibles repercusiones médicas en los próximos años merece la pena un análisis más detallado del mismo.

Enfermedad de priones

La encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) también ha sido llamada recientemente "enfermedad de las vacas locas" pertenece a un grupo de procesos degenerativos del SNC causado por priones. Ocurre tanto en el hombre como en animales (ganado vacuno, corderos, cabras, monos) recibiendo distintas denominaciones en función del tipo de animal afecto y de sus manifestaciones clínicas dominantes.

En el hombre se conoce como enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) en su forma clásica, según las descripciones de estos autores a principios del siglo XX. También se asocia a esta infección el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker correspondiente al cuadro clínico de insomnio familiar fatal y a la forma familiar del CJD. La variante humana de la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) conocida como CJD, ha sido considerada como causada por infección cruzada de la BSE al hombre por contaminación al consumir carne o derivados de vacas contaminadas por los priones. Sin embargo, no solo es enigmático el germen desencadenante sino también como una enfermedad puede

ser simultáneamente hereditaria (familiar) e infecciosa.

Es interesante también detenerse en el conocimiento de los germenos patógenos conocidos como "priones" ya que ellos difieren tanto de las clásicas bacterias como de los conocidos "virus" en numerosos aspectos. Así, son resistentes a calor prolongado (100°C) y a los productos desinfectantes usuales que resultan ineficaces para su inactivación, siendo por tanto muy difícilmente biodegradables. La proteína constitutiva del prion tiene dos formas estructurales: la llamada configuración normal (PrPC) cuya función es desconocida pero que se expresa en hombres y animales en numerosos tejidos (cerebro, bazo, linfáticos, pulmón, músculo) y una variante particular específicamente asociada a los procesos patógenos (PrPSc) que teniendo la misma secuencia de aminoácidos su forma de plegamiento (organización secundaria) es distinta de la PrPC. Sin embargo, ambas están codificadas por el mismo gen. Al producirse la infección las formas de plegamiento PrPC se transforman en PrPSc. En algunos tipos de CJD se ha podido determinar mutación del gen codificante de la PrPC interpretándose como base del desencadenamiento del proceso.

Sin embargo, hoy sabemos que los "priones" a diferencia de los virus o bacterias, carecen de ácidos nucleicos que puedan integrarse en el genoma celular y transmitir información específica a la célula infectada.

¿Como pueden, por tanto, los priones proveer información codificable a un genoma celular?. Hay que aceptar la hipótesis solo confirmada en algunas formas de levaduras (URE3, PSE) que el propio tipo de plegamiento proteico presente en la estructura del prion tiene capacidad de producir información codificante al DNA celular. Esta hipótesis es apasionante ya que abre una nueva forma de patología hoy todavía no concebible.

¿Cuántas enfermedades hoy aun no etiologicamente determinadas pueden tener el mismo mecanismo genético?

Como es posible concebir que un tipo de plegamiento de una proteína, componente habitual de nuestro organismo (no patógena) pueda hacerse patógena y ser infecciosa así como genéticamente transmisible (familiar) por esta simple circunstancia de un tipo de plegamiento modificado (PrPSc).

Si estas cuestiones son apasionantes desde el punto de vista genético-molecular, no lo es menos desde la situación epidemiológica.

Las vías de transmisión de los priones no están totalmente dilucidadas. La CJDc era conocida por las manifestaciones clínicas de la demencia progresiva y pérdida de movimientos coordinados, teniendo un largo periodo de incubación (hasta 10 años en humanos). Sin embargo, la CJDv se suele iniciar por síntomas psiquiátricos, correspondiendo a cambios de la personalidad, depresión, etc. seguidos secundariamente de los trastornos motores y la demencia. La CJD ha sido transmitida por productos farmacológicos contaminados (hormona de crecimiento extraída de hipófisis de animales portadores) o en actuaciones quirúrgicas (transplante corneal, implante de duramadre). Por otro lado la forma CJDv aparecida en Inglaterra, Francia, Irlanda, está relacionada con la BSE (Encefalopatía Bovina Espongiforme) que puede ser transmitida al hombre por la ingestión de carne bovina contaminada. La presencia de priones en el sistema hemolinfático ha planteado la prohibición por FDA de usar sangre procedente del Reino Unido.

La forma como el proceso se extiende en el SNC y actúa como neurotóxico es todavía mal conocida. El sistema linfocitario T y B así como las células reticulares dendríticas actúan como elementos de transporte y quizás como nicho de replicación. La consecuencia anatómica es la destrucción neuronal específica así como la reacción glial con la consiguiente neuropatía espongiforme, afectando la sustancia gris cortical, núcleos caudados y putamen. La presencia de placas tipo kuru, corresponden a depósitos agregados de la proteína patológica siendo PAS y Rojo Congo positivas y localizándose en la capa de los granos del cerebelo.

La carcinogénesis y la oncopatología clínica

El atrayente terreno de las neoformaciones malignas encontró ya hace un siglo sustrato científico válido al atribuirse a la célula el punto de arranque de toda patología. La Teoría Celular daría una vez más explicación al por qué de los procesos tumorales como expresión de un crecimiento celular anárquico irreversible, no controlable por el organismo, capaz de diseminarse a distancia (metastatizar) y acabando por sustituir los tejidos normales del portador hasta causar su muerte.

Estos hechos vistos con un siglo de perspectiva no han variado sustancialmente. El estadiaje tumoral clínico (TNM, Clinical Staging) y el reconocimiento precoz del inicio de la enfermedad (diagnóstico precoz) base del método anatomoclínico del pasado siglo, sigue siendo la clave para un éxito terapéutico que a pesar de los fantásticos avances en los tres campos: cirugía, radioterapia y quimioterapia, permanece limitada a un 50% de los enfermos.

Sin embargo es preciso reconocer que el siglo transcurrido ha revolucionado sustancialmente los conceptos que teníamos de estos procesos y abre la puerta esperanzada a que esta serie de alteraciones no controladas de la biología celular, sean sometidas a un riguroso control científico en un futuro no lejano.

Numerosas hipótesis han dividido y tratado de buscar explicación a estos mecanismos celulares de transformación maligna. Factores químicos, físicos, hereditarios-biológicos e inmunes han ido desarrollando distintas hipótesis y transformándose progresivamente en tesis demostradas tanto en el mundo animal como en la especie humana.

Las técnicas clásicas (inducción de cánceres por radiaciones, agentes químicos, etc) que configuraron el mundo de la cancerología experimental durante la primera mitad de este siglo, sufrieron también modificaciones sustanciales con el advenimiento de la genética moderna y la biología molecular.

Por un lado a partir de los años 60, los análisis citogenéticos de los tumores permitieron reconocer que existían a nivel cromosómico una serie de reorganizaciones numéricas y estructurales clonales que tipificaban ciertas neoplasias, algunas de ellas con carácter familiar hereditario (retinoblastoma). El estudio sistemático de estas alteraciones, utilizando técnicas de biología molecular llevaría rápidamente a principios de los años 80 a caracterizar determinados genes específicamente relacionados con la transformación maligna (oncogenes) que se encontrarían como constituyentes normales de las propias células (proto-oncogenes). Mutaciones de los mismos llevaría a su transformación biológica y a la aparición de nuevas propiedades biológicas a través de las proteínas cuya síntesis ellos mismos continúan dirigiendo en la célula. Pero también se pudo ver como la pérdida de otros genes, operativos en el genoma humano o bien su inactivación biológica condicionaba también la misma transformación neoplásica (genes supresores). Por un lado se trataba de la aparición de nuevas proteínas producto de los nuevos genes de fusión, que codificarían nuevos factores de transcripción o nuevos receptores de membrana. Pero por otro lado sería la pérdida de la función de otras proteínas (fundamentalmente relacionadas con el control del ciclo celular (Rb, P53, P15, P16, etc.) o incluso con la renovación de los propios cromosomas (telomerasas) que causarían la inmortalización de una célula dotándola de una capacidad vital y de reproducción superior al resto del organismo.

No pretendemos analizar detalladamente esta nueva cancerología. Las teorías sobre el origen del cáncer evolucionan en el momento presente hacia una síntesis que conduce a comprender el proceso en términos de modificaciones de las relaciones existentes entre diferentes genes y distintas proteínas productos controlados por los primeros participantes simultáneamente en numerosas funciones celulares en base a la regulación perdida de la expresión génica. Durante más de 30 años, hemos seguido uno de estos procesos de transformación maligna en el hombre con continuado interés, utilizando la tecnología disponible en cada uno de estos tres decenios. Es interesante revisar este modelo de cáncer humano, ya que paradójicamente ha servido como ejemplo fructífero de la evolución surgida en el terreno de la oncología. Nos referimos al llamado sarcoma de Ewing, tumor de alto grado de malignidad que describiera James Ewing en 1921 a nivel de los huesos de los niños y que se ha transformado 80 años después en uno de los paradigmas de la nueva patología oncológica.

Sarcoma de Ewing y tumor neuroectodérmico primitivo periférico de hueso y partes blandas

Bajo el término de sarcoma de Ewing (*Es*) incluimos a un grupo heterogéneo de neoplasias formadas por células redondas de pequeño tamaño, que ofrecen localizaciones anatómicas muy diversas, afectando preferentemente al hueso pero también apareciendo en partes blandas y en distintos órganos (ovarios, testes, riñón, pulmón, mediastino, dermis, etc.).

Significa uno de los tipos histológicos mas indiferenciados de tumor maligno, habiéndose propuesto numerosas hipótesis histogénicas. Entre todas existe una preferente concordancia para aceptar que estas células redondas y pequeñas (srct) entrarían dentro de la categoría de aquellas derivadas de la cresta neural y tendrían un caracter neuroectodérmico, semejando a los neuroepiteliomas periféricos (pPNET) si bien expresando un diverso grado de diferenciación y variable capacidad maturativa, lo que condiciona un cierto grado de heterogeneidad fenotípica. Ella se va a manifestar por una complicada diversidad histológica y también con una expresión genética compleja, que causa en ultima instancia una clínica variada, aunque siempre muy maligna.

A pesar de los logros obtenidos en el tratamiento de estos tumores, su pronóstico continua siendo infausto en un buen número de casos. El estudio de factores predictivos pronósticos es por tanto importante tanto a nivel morfológico como genético y de biología molecular. También se hace necesario el ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas, distintas de las empleadas en la actualidad.

Aspectos históricos. Perspectivas presentes

En 1921 James Ewing comunicó a la New York Society of Pathology sus observaciones sobre 7 casos de sarcomas no osteogénicos del hueso diagnosticados en pacientes juvenes. El tumor infiltraba la cortical y se extendía hasta el canal medular asi como rompiendo periostio afectaba partes blandas teniendo una alta incidencia metastática. Aunque era un tumor muy radiosensible, mostraba tendencia a recurrir.

En una segunda publicación en 1924, recogía 30 casos insistiendo en que la imagen histológica constituia un problema muy complejo. Suponia que esta neoplasia constituia una nueva entidad clínico-patológica, posiblemente iniciada a expensas del componente vascular óseo y consiguientemente lo diagnóstico como un "endotelioma de hueso".

Estos hallazgos serían confirmados en 1928 por el patólogo francés Charles Oberling, quien defendería que el "sarcoma de Ewing" como él así lo denominaría, derivaba de una célula mesenquimal pluripotencial de la médula ósea, en cierto modo equiparable con las células reticulares primitivas multipotentes propuestas por Maximow. Entre otras posibilidades tendría una capacidad prospectiva endotelial.

El tumor fué motivo de fuerte controversia en los años 1930-1940 por cuanto Willis (1940) defendió la posibilidad de que en realidad el *Es* no fuera sino la expresión local de la metastasis de un neuroblastoma (Nb) oculto, basándose no solo en su heterogeneidad histológica sino también en su presencia multiorgánica asi como en su extrema semejanza con los neuroblastomas indiferenciados de la infancia. Arthur Pourdy Stout en New York (1944), utilizando cultivos de tejidos, defendería la independencia biológica del *Es* y su diferencia frente a los Nb en contra del criterio de Willis.

En los años 50, Fritz Schajowicz (1956, 1959) publicó en Argentina una serie de trabajos relacionados con este tumor asi como con los entonces denominados por J. Stewart "Sarcomas reticulares de la médula ósea" (reticulosarcomas de hueso), señalando como atributo fundamental de los mismos su alto grado de indiferenciación (sarcoma de células redondas pequeñas) y la presencia de abundante glucógeno citoplásmico detectable mediante el carmin de Best o el PAS y siendo sensible a la diastasa. Ello significó un avance importante en su diagnóstico, teniendo sin embargo presente la presencia de glucógeno también en otros tumores malignos y poco diferenciados (rabdomyosarcomas, linfomas) e incluso en el Nb.

Progresiva complejidad se vió cuando Tefft (1969) describió la presencia de estos tumores a modo de masas paravertebrales capaces de causar compresión epidural. Unos años mas tarde (1975) Angervall y Enzinger recogerían una amplia serie de tumores localizados en partes blandas sin dependencia ósea, no solo presentes en adolescentes sino también en juvenes y adultos, todos ellos tendrían un imagen semejante a la vista en el *Es* de hueso.

Coincidiría esta época con nuestras primeras descripciones de los *Es*, en las que señalabamos su gran heterogeneidad estructural tanto a nivel morfológico como ultraestructural (1970, 1974, 1978). De esta suerte, junto al sarcoma de Ewing convencional, existiría también un Ewing atípico con células grandes y aspectos de diferenciación endotelial como también serían confirmados por otros autores (Nascimento y col., 1980).

Otro aspecto importante del problema se originaría al señalarse las semejanzas estructurales ópticas y electrónicas de estos tumores con los también llamados "neuroepiteliomas periféricos" de los nervios (Stout, 1918) y con los neuroblastomas periféricos del adulto (Bolande, 1969). La aparición de imágenes tipo Homer-Wright con formaciones de rosetas típicas y filamentos centrales o pseudorosetas ópticamente vacías en su centro o imperfectamente configuradas, haría que el diagnóstico diferencial entre todos estos tumores fuera casi imposible sin la ayuda de técnicas específicas (Schmitt y col., 1982).

En 1979 Askin y cols. comunicaron la existencia de un grupo de neoplasias indiferenciadas formadas por células redondas de localización toracopulmonar, presentes también en niños y jóvenes; algunas tendrían origen en las costillas aunque en otras ocasiones serían inicialmente de partes blandas y solo posteriormente infiltrarían hueso. Histológicamente presentan rasgos semejantes al *Es* e histogenéticamente propondrían para ellos también un origen neuroectodérmico. Los casos publicados por estos autores sin embargo no solo serían *Es*/pPNET sino también variantes con diferenciación rabdosarcomatosa embrionaria.

El componente neuroectodérmico encontraría no solo refrendo ultraestructural con la presencia de granulaciones neurosecretoras (Llombart-Bosch y col., 1982) sino también con base a estudios inmunohistoquímicos. La naciente técnica inmunohistoquímica permitió detectar marcadores neurales en el *Es* (Lipinsky y col., 1986) que posteriormente sería confirmado por numerosos patólogos y serviría de base para defender la naturaleza neural del *Es* (Dehner, 1985; Triche, 1986; Cavazzana y col., 1987).

Sin embargo está demostrado que excepcionalmente estas neoplasias tienen capacidad osteoformadora en ratones atímicos (Bauer y col., 1981; Bussolatti y col., 1994) acercándose por ello al grupo de sarcomas primitivos multipotenciales con variada expresión fenotípica neural, osteogénica incluso muscular (Triche y cols., 1986; Kamamoto y col., 1987; Parham y col., 1992) así como epitelial (Moller y col., 1987; Llombart-Bosch y col., 1989).

La detección en 1983 por Aurias y col. de una translocación genética balanceada presente en gran número de *Es* y de pPNET a nivel de los cromosomas t(11;22)(q24;q12) abrió una nueva perspectiva diagnóstica para este grupo de sarcomas. Posteriormente se detectarían otras nuevas (vease más adelante). Sería ya a principio de la pasada década cuando en 1992 el grupo francés Thomas, encabezado por Delattre demostraría que esta translocación está asociada a una fusión génica aberrante entre el llamado gen EWS localizado a nivel 22q12 y el gen FLI1 perteneciente a una familia conocida como ETS (Erythroblastic Transforming Sequence) situado en el cromosoma 11q24. Otros genes de la misma familia ETS están también implicados en este grupo de neoplasias (Kovar H. 1998).

Nos encontramos por tanto no ante un solo tumor, sino ante una familia de neoplasias formadas por células redondas, pequeñas, indiferenciadas que presentan una expresión fenotípica neuroectodérmica y una alteración genotípica común. Sin embargo, histológicamente, su morfología es variada y compleja. También la clínica y la localización, tanto en hueso como en partes blandas así como en diversos territorios orgánicos, hacen de este grupo de sarcomas un modelo interesante de estudio y un reto para la clínica, no resuelto en la actualidad.

Epidemiología

Se conoce muy poco acerca de los factores etiológicos relacionados con estos tumores. Hay diversidad clara cuando se comparan con los osteosarcomas, que también aparecen en edades juveniles. No parece tener relación con este tipo de sarcoma. Hay tendencia a producirse en gente joven durante la fase de mayor crecimiento y en los huesos largos (correspondiendo con el período de mayor crecimiento esquelético). No existe agregación familiar aunque ha sido descrito en algunos gemelos. Tampoco se han podido relacionar con irradiación médica y ambiental o con factores relacionados con el trabajo paterno o materno. Ninguna de las enfermedades genéticas conocidas como predisponentes al cáncer en la infancia aparecen relacionadas con el *Es*.

La única diferencia sensible tiene carácter racial por cuanto la raza negra presenta una sensible disminución de estos sarcomas comparando poblaciones equiparables en USA. No es conocido el factor genético que puede influenciar esta diferencia. Otras razas como la china, japonesa o india, sufren análogo índice de tumores que la raza blanca (caucasiana).

Edad y sexo

Es/pPNET aparece con mayor frecuencia en la segunda década de la vida. Es infrecuente en niños por bajo de los 4 años (si bien nuestro paciente más joven presentó un tumor al mes de nacimiento). Alternativamente a partir de los 30 años este tipo de tumor tiende a desaparecer, aunque hemos tenido ocasión de diagnosticar casos aislados en edades más avanzadas de la vida (Llombart-Bosch y col., 1986). En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo (Terrier y col., 1993) estudiando 315 enfermos de distintas instituciones de Europa y América pudimos hallar una relación hombre/mujer de 1/1.6 y una media de edad de 14.0 años con valores de 14.2 en los varones y 13.7 en las mujeres.

Analizando las distintas variantes histológicas del *Es(pPNET)*, con referencia a la edad, hemos podido encontrar ciertas variaciones de interés: el llamado sarcoma de Ewing clásico (convencional) presenta una distribución por sexos de 1:1 varón/hembra. El sarcoma de Ewing atípico con grandes células ofrece una distribución 1:2 (varón/hembra), por contra el tumor con diferenciación neuroectodérmica (*pPNET*) ofrece una distribución contraria de 2:1 (varón/hembra). También hemos visto diferencias relativas de la edad y el tipo tumoral. El *Es* clásico tiene una media de edad de 13.7 años, el *Es* atípico de células grandes 14.9 años y la variante neuroectodérmica se presenta con mayor frecuencia en edades superiores (17.5 años de media). También se ha visto y nosotros hemos podido confirmar que el *Es* de localización en partes blandas ocurre en edades más tardías (aproximadamente a hacia los 20 años) sin verse claras diferencias de sexo (Angervall y Enzinger, 1975). Estos datos coinciden también con los obtenidos por otros autores (McCormack y col., 1952; Prichard y col., 1975). En resumen, corresponde a un sarcoma que tiene una predominancia masculina y una mayor incidencia en la segunda década de la vida.

Anatomía Patológica

Hemos de distinguir varias formas de presentación, la más frecuente es en hueso, seguida de partes blandas (tejidos esqueléticos) y en vísceras (riñón, cavidad abdominal), área toracicopulmonar, columna vertebral y SNC. También se han descrito casos de localización primitiva en piel (dermis). Estos últimos tendrían un comportamiento clínico menos agresivo. Excepcionalmente, se han descrito casos en miocardio, vulva y meninges.

Referidos a hueso existen las siguientes posibilidades:

- *Es/PNET* de hueso (médula ósea y canal medular)
- *Es/PNET* periostal con extensión medular y a partes blandas.
- *Es/PNET* parostal (yuxtacortical) con preferente extensión a partes blandas.
- *Es/pPNET* de partes blandas semejando un sarcoma de otra histología (sinovial, FHM).

En lo concerniente a las localizaciones anatómicas esqueléticas, debemos distinguir dos grandes grupos que tienen significado pronóstico: aquellos que se localizan en las extremidades (fémur, tibia, perone, huesos del pie o de la mano) y los presentes en el tronco y cabeza/cuello (pelvis, costillas, región torácica, vértebras, etc.). Los primeros tienen, en líneas generales, mejor pronóstico que los últimos.

Basados en nuestra propia experiencia de 351 pacientes revisados (Terrier y col., 1993) la localización más frecuente en nuestros casos fueron los huesos largos (48% de casos) de los cuales el 26% se produjeron en las extremidades distales. Un 45% de pacientes tenían tumores en el tronco, dividiéndose en 20% para localizaciones costales y vertebrales y un 25% de enfermos con localización primaria en pelvis. Casos con multicentricidad (o metástasis óseas al diagnóstico) lo vimos en el 7% de enfermos.

Existe también una cierta evidencia sobre la predominancia de tumores con diferenciación neuroectodérmica en localización corporal central como son costillas, pelvis y cuerpos vertebrales. Los tumores con localización primitiva visceral (riñón) semejan a tumores con otra histología (carcinomas, sarcomas). Lo mismo ocurre para los casos vistos en ovario y testículos, quienes tienden a asociarse a tumores germinales de tipo neural.

La localización dérmica superficial merece una atención particular. Los casos descritos semejan a un tumor de dermis media con lento crecimiento, y sin tendencia a ulcerarse. Solo la histología y genética determinarán su verdadera naturaleza biológica. El comportamiento clínico es menos agresivo comparado con aquellos de localización visceral o hueso.

Histopatología

Desde las primeras descripciones de Ewing numerosos patólogos hemos efectuado importantes contribuciones al diagnóstico histopatológico de los mismos, como ya hemos indicado en la introducción. Hemos de tener presente un dato importante: no se trata de un solo tipo de tumor, sino de una familia de neoplasias, todas ellas indiferenciadas (en variado grado), con una expresión fenotípica múltiple pero todos ellos con una alteración génica en la que se afecta el gen EWS (cromosoma 22q12). En consecuencia podemos distinguir los siguientes subtipos o variedades histológicas:

1. Ewing sarcoma clásico (convencional)
2. Ewing sarcoma atípico
 - 2.1. Células grandes
 - 2.2. Células claras
 - 2.3. Diferenciación neuroectodérmica
3. Neuroepitelioma periférico (pPNET)
4. Es con diferenciación vascular (endotelial)

Además hay tipos de sarcomas primitivos de hueso con presencia de elementos mixtos: Ewing, osteosarcoma microcelular y rhabdomyosarcoma).

Un diagnóstico diferencial, frente otras entidades que semejan el *Es*, lo describimos más adelante.

Técnicas histológicas convencionales a utilizar:

- Hematoxilina eosina
- PAS/Carmin de Best
- Tricrómico de Masson
- Reticulina de Gomori

El estudio inmunohistoquímico lo consideramos independientemente.

1.- Sarcoma de Ewing clásico (Convencional)

La morfología es difusa y desestructurada a bajos aumentos. Presenta un aspecto homogéneo con una gran celularidad, compuesta por células redondas pequeñas conglomeradas y compactas, dando un aspecto azulado tipo linfoma difuso, que ha servido para llamar a estos tumores también "sarcomas de células redondas pequeñas y azules" (small round blue cell sarcomas), al estar intensamente teñidos por la hematoxilina.

El estroma tumoral es escaso o inexistente, solo aparecen algunos vasos alrededor de los cuales se disponen los nidos celulares. Hay frecuente hiperplasia endotelial que no debe confundirse con las células tumorales. Existen coronas de células perivasculares por fuera de las cuales aparece abundante necrosis. Estos campos necróticos tienden a confluir dando aspecto geográfico. La red reticular se limita a las áreas perivasculares pero no envuelve a las células aisladamente ni tampoco a grupos celulares.

La citología es el factor dominante del tumor: las células tienen núcleos "blandos" con cromatina laxa, nucleolo único prominente, citoplasmas de límites imprecisos que se pierden confluyendo con el vecino, aspecto vacuolado debido al contenido en glucógeno. Junto a estas células dominantes llamadas "células principales" hay un segundo tipo celular más denso, elongado, de igual tamaño pero de apariencia más eosinofílica, son las llamadas células oscuras. Algunas muestran claros signos de condensación cromática y de apoptosis. Su distribución es irregular con respecto a las

anteriores apareciendo entremezcladas y en cierta transición o continuidad. Las mitosis son frecuentes aunque solo aparecen en las células principales. Ninguna de estas células adopta en el Es clásico una disposición arquitectónica específica. Por tanto lo esencial del tumor es la ausencia de arquitectura definida. Ello también implica la ausencia de rosetas oseudorosetas de tipo neuroectodérmico.

Cuando afecta al hueso se adapta a los canales medulares ofreciendo una apariencia plexiforme. Puede sustituir la médula grasa o mezclarse con los elementos hematopoyéticos, semejando mieloblastos. También se confunden con osteoblastos cuando se infiltran a lo largo del borde de osificación reactiva. Es importante diferenciarlos de las células osteoformadoras, como ocurre en el osteosarcoma microcelular.

La infiltración de partes blandas y músculo produce otro tipo de imagen histológica en tablero de damas (chest-board) o con aspecto arrosariado entremezclándose en filas o hileras con el tejido muscular que queda englobado en su interior. Esta apariencia reticulada ha sido valorada junto con la extensión de la necrosis tumoral como posible factor pronóstico evolutivo con un carácter negativo (vease mas adelante).

La presencia de glucógeno es un marcador muy interesante (Schajowicz y col., 1959). Aproximadamente un 80% de los Es presentan glucógeno citoplasmático en grumos masivos o con carácter puntiforme, ocupando parcial o totalmente el citoplasma e incluso extendiéndose fuera del mismo ocupando en depositos del intersticio. Con frecuencia las células presentan un típico ribete perinuclear ocupado por granulaciones PAS positivas. La fijación ideal para la determinación del glucógeno es la alcohólica (teñir improntas fijadas en alcohol de 96°) pero también una buena fijación formólica produce resultados adecuados seguida de una buena inclusión en parafina. Hay también que tener presente que existen casos de Es con escaso glucógeno o incluso sin glucógeno, lo cual no invalida un diagnóstico de Ewing.

2. Variantes Atípicas de Es

2.1. Sarcoma de Ewing de células grandes

Algunos tumores, con caracteres semejantes al Es, presentan una marcada heterogeneidad celular; esta heterogeneidad no solo se limita al tamaño, sino también a la forma (mas irregular) con indentaciones nucleares y con ocasional binucleación. La cromatina es más densa y conglomerada. Se encuentran uno o dos nucleolos prominentes. El citoplasma en estas células es denso y acidófilo dando una apariencia histiocitoide. El contenido en glucógeno es más escaso y tiende a adoptar un ribete periférico.

Hay además grupos de células fusiformes, con núcleos ovalados, ofreciendo imágenes en empalizada. Esta participación celular no suele alterar de modo esencial la arquitectura, que suele ser semejante a la de Es convencional. Hay también algunas células secundarias densas y picnóticas.

En algunos casos hemos visto diferenciación neuroectodérmica con pseudorosetas y con mayor contenido fibrilar en el estroma. También estas imágenes mas atípicas pueden coexistir con un Es convencional.

La presencia de esta variante atípica puede asociarse a estados de post tratamiento por quimioterapia o radioterapia, así como a recidivas tumorales.

También, ocasionalmente, adoptan apariencia vascular con hendiduras bordeando espacios rellenos por eritrocitos, confiriendo apariencia hemangioendoteliomatosa.

En resumen: es significativa la heterogeneidad celular y variable su organización arquitectónica, sin embargo continúa siendo un Es.

2.2. Es con diferenciación neuroectodérmica (pPNET)

Llama la atención en un Es convencional o atípico la presencia de un número variable de estructuras rosetoides o en típicas empalizadas, distribuidas convergiendo a un polo central hacia donde se orientan los núcleos que mantienen características de Es. Pueden llegar a conformar rosetas Homer-Wright, sin embargo esta arquitectura es mas incompleta y pobremente elaborada si la comparamos con las vistas en el neuroblastoma o el neuroepitelioma periférico de los nervios. Estas imágenes han sido descritas en repetidas ocasiones por distintos autores (Jaffe y col., 1984; Llombart-Bosch y col., 1988).

El número y la distribución de estas seudorosetas varia de un campo histológico a otro, estando en continuidad con áreas de Es convencional o de células grandes. También el número de estas estructuras varía de un área a otra del tumor. En ocasiones no son fácilmente reconocibles necesitándose de una observación detallada y cuidadosa.

Existe además un segundo componente visible en esta variante que se refiere a la presencia de un fondo fibrilar mal definible que envuelve a grupos celulares de modo caprichoso y poco preciso. No son fibras de reticulina, sino proyecciones del propio citoplasma que adopta aspecto fusiforme.

El estroma es más rico en fibras reticulínicas que en el sarcoma de Es convencional. Estas fibras tienden a adoptar una disposición en cesta, englobando a varios grupos celulares conjuntamente. A ello se une una mayor densidad vascular y la existencia de depósitos de colagena hialina.

La extensión de la necrosis es semejante a la vista en el Es convencional.

Los estudios inmunohistoquímicos se superponen con los del Es, si bien presentan una mayor positividad frente a marcadores neuroectodérmicos, además de los específicos del Es.

A nivel ultraestructural existe también diferenciación neuroectodérmica.

2.3. Neuroepitelioma periférico

Conocido desde principios de siglo (Stout 1921) como un tumor específico de localización en vainas nerviosas periféricas distinto del sarcoma de vainas nerviosas periféricas, este pPNET ha quedado progresivamente incorporado a la familia de tumores de células redondas y pequeñas con carácter neural. Sería la última cadena de maduración de un Es convencional o clásico.

La expresión fenotípica más característica es la presencia de típicas rosetas de Homer-Wright. Así como en el caso anterior hay que buscar estas estructuras para hallar su diferenciación, en el pPNET la imagen sobresale en la visión microscópica ante la magnitud y número de las mismas. Además se encuentran bien configuradas, como las describiera Homer-Wright en los neuroblastomas inmaduros.

Son grupos de 6-8 células que se elongan y buscan un hipotético punto central hacia donde confluyen las prolongaciones apicales de las células. Las células de estas rosetas contienen también glucógeno. La red reticular y los depósitos de colagena amorfa, PAS positiva son más abundantes que en el Es.

Estos tumores se han confundido y descrito en más de una ocasión como neuroblastomas periféricos del adulto. Sin embargo, esta confusión puede aclararse con técnicas inmunohistoquímicas (ausencia de CD99 en el Nb y positividad en el Es) así como también mediante biología molecular. Alteraciones de 1p16 en el Nb no visibles en Es y presencia en este último de translocaciones ausentes en el Nb, t(11;22).

Sin embargo, durante bastantes años a estas dos entidades Nb del adulto y el pPNET han sido confundidas siendo motivo de diagnóstico diferencial complejo.

2.4. Es atípico de células claras

En varias ocasiones hemos tenido dificultad para diagnosticar un Es, pudiéndolo confundir con un sarcoma de células claras o incluso con un carcinoma de células claras. Ello es especialmente problemático cuando aparece infiltración de partes blandas.

El Es tiene una impresionante plasticidad y puede llegar a formar nidos de células epitelioides relativamente grandes con citoplasma vacuolado en agua de roca y núcleos desplazados y retraídos. Estas estructuras quedan englobadas en bandas fibrilares con componente desmoide dando lugar a áreas hialinosas.

Esta variante de Es, sin embargo mantiene un alto contenido en glucógeno y su comportamiento genético es superponible al resto de sarcomas de células redondas y pequeñas. En uno de los casos estudiados el tumor también presentaba disposición focal de Es convencional.

Estos Es con células claras mantienen a nivel inmunohistoquímico y ultraestructural caracteres de Es. Nosotros recientemente hemos publicado un nuevo caso de esta variante mostrando translocación infrecuente t(2;22) y reorganización génica excepcional: variante nueva del EWS/FEV (Llombart-Bosch y col., 2000).

La rareza de este caso precisa nuevas confirmaciones, cosa que no es sencilla, atendido lo infrecuente de esta nueva variante tumoral.

3. Estructuras vasculares en el *Es*

La presencia de una rica red vascular fue ya reconocida por Ewing y Oberling en las primeras descripciones de estos tumores. Incluso se propuso considerarlos como un hemangioendotelioma óseo.

La rica red vascular existente y la presencia de frecuentes necrosis pueden producir esta falsa apariencia pseudovascular. A ello se une la fuerte hiperplasia de los endotelios vasculares que adoptan patrón epitelioide prominente y que en algunas secciones se entremezclan con células tumorales, sin embargo la presencia de basales suele ser visible en casi todos los casos.

No referimos sin embargo a otra circunstancia distinta. Es la presencia de lagunas vasculares y de diferenciación angioblásticas incipientes en el propio *Es* (o en áreas focales del mismo). Las células tumorales bordean estructuras lacunares y se ven acompañadas de basales, así como adquieren texturas capilaroides permeabilizadas o no.

Estas células tienen citoplasma más amplio y a nivel superficial se aprecian diferenciaciones de membrana (colagena amorfa). También la red reticular es mucho más compleja que la de un *Es* convencional, viéndose apariencia lobulada o en cesta.

Estos casos carecen de diferenciación neuroectodérmica, pero expresan marcadores de *Es* (CD99) así como marcadores mesenquimales y vasculares (CD34; FXII)

En realidad todavía no está excluido el carácter mesenquimal del *Es*, combinado o no a su propiedad prospectiva neuroectodérmica. Estando formado por células primordiales pluripotenciales pueden ofrecer diferenciación divergente con fenotipos extraños (osificación, músculo, endotelios, etc.) (Bauer y col., 1981; Bussolati y col., 1997; Sorensen y col., 1998)

Es desafortunado que en estos casos, muy raros, no se haya podido determinar el genotipo tumoral de la variante vascular y solo se base su conocimiento en hallazgos morfológicos, ópticos, inmunohistoquímicos y ultraestructurales, que no son aceptados en la actualidad por todo el mundo científico.

Inmunohistoquimia

La distinta expresión fenotípica ofrece una ayuda considerable para el diagnóstico de estos *sret*, ya que a través de ella se consigue un perfil específico que complementa perfectamente tanto la histología como la citología.

Más del 80% de los *Es* y sus distintas variantes expresan vimentina. Esta posibilidad sirve para confirmar el correcto estado de conservación del tejido así como para excluir un linfoma. Sin embargo alguno de los pPNET carece de expresión de vimentina, si bien expresan diversos marcadores neuroectodérmicos. Ellos en cierto modo se superponen con el *Nb* del adulto y pueden precisar estudios complementarios.

Está descrita la positividad de los *Es* frente a distintos marcadores de membrana basal (laminina, colageno tipo IV) así como fibronectina y colageno tipo III. Estos hallazgos postularían en favor de un origen mesenquimal del *Es* (Meattinen y col., 1982; Lönning y col., 1985; Llombart-Bosch y col., 1986; Scalpa y col., 1987). Esta hipótesis mesenquimal para el *Es* se vería reforzada por la positividad frente al LeuM2 (Lönning y col., 1985)

Independientemente una larga serie de antígenos neuroectodérmicos se han detectado en este grupo de tumores con una caprichosa y variada frecuencia. Estos marcadores son: Enolasa neuronal específica (NSE), HNK-1 (Leu7) equivalente al CD57, S-100, PGP 9.5, neurofilamentos, receptores de transferrina y antígenos HLA-C II. La expresión de estos epitopos neurales serviría para marcar un mayor grado de diferenciación neuroectodérmica. En general, pueden aparecer positivities variables e independientes del tipo o variante histológica previamente descritas, sin embargo hay una mayor positividad del número de marcadores neurales en aquellos que presentan diferenciación neuroectodérmica con rosetas tipo Homer-Wright.

Smitd y col. (1992) han defendido la necesidad de que se expresen 2 o 3 marcadores neurales para aceptar el carácter neuroectodérmico del *Es*, independientemente de su configuración morfológica (presencia o no de rosetas de Homer-Wright). Ello tendría implicaciones pronósticas más peyorativas.

Nosotros hemos encontrado relación entre el grado de diferenciación neural y la presencia/ausencia de marcadores, de forma que los pPNET expresan con regularidad 2 o 3 epitopos neuroectodérmicos, mientras que el *Es* clásico puede también hacerlo, aunque es más inusual así como también puede tan solo expresar vimentina.

La presencia de marcadores epiteliales ha sido vista en diversos tipos de *Es*, tanto en cultivo de tejidos como en material fresco. Recientemente, se han publicado nuevos datos sobre este tema descubriéndose positividad hasta de un 20% de casos de células aisladas tipo *Es* entre la citoqueratina CAM 5.2 y EA1, EA3 (Gould y col., 1987). Este hallazgo hay que considerarlo en el diagnóstico diferencial frente a tumores como el sarcoma sinovial monofásico o carcinomas de células pequeñas que pueden expresar ambos tipos de epitopos.

También hay diferenciación y expresión de marcadores neuroendocrinos en el *Es*. El análisis de la familia de cromogranina (CgA, CgB y CgC0SgII) ha sido estudiado tanto en tumores originales como también en líneas de cultivo de *Es*, viéndose positiva expresión de CgC-SgII.

También en nuestro laboratorio hemos podido determinar la positividad del *Es*/pPNET ante los receptores del Trk. El receptor *trk-A* se expresa más intensamente en el tumor neuroectodérmico, mientras que el *Trk-B* y *Trk-c* se expresan más frecuentemente en los tumores indiferenciados tipo *Es* convencional.

El gen MIC2X es un gen pseudo-autosómico localizado en la región homóloga X-Y y se ha localizado a nivel Xp2.2-2.3p-ter. El producto de este gen es una glicoproteína de membrana que fue reconocida por Levy y col. usando un anticuerpo monoclonal 12E7 obtenido tras inmunización de células T de una leucemia linfoblástica aguda. Otros anticuerpos reconocen diversos epitopos de la misma molécula proteica de 30.000 kilo-dalton de peso molecular, reconocida como p30/32. Esta glicoproteína de localización membranosa también es reconocida por el anticuerpo 0.13 procedente de inmunizar una línea celular de un melanoma y también el anticuerpo HBA-71 que procedía de inmunizar una línea celular de tipo *Es*/pPNET ósea. Los tres anticuerpos 12E7, 0.13 y HBA-71 ofrecen una buena sensibilidad para todos los *Es*/pPNET. Los tres funcionan adecuadamente en material incluido en parafina (Fellinger y col., 1971; Hamilton y col., 1973). En la actualidad se comercializan los tres anticuerpos (DAKO: 12E7; Signet: HBA71 y 013). La positividad de este anticuerpo alcanza hasta el 90% de los tumores con una tinción membranosa específica que puede extenderse hasta el citoplasma.

Desafortunadamente, la especificidad de este anticuerpo no es exclusiva del tumor *Es*/pPNET y se han descrito expresiones positivas en otras neoplasias (Stevenson y col., 1994). Hay positividad en el 20% de los rhabdomyosarcomas, en los linfomas linfoblásticos y leucemias linfoblásticas agudas (100%), así como en algunos osteosarcomas (23%). Sin embargo, ello no limita la utilidad diagnóstica del CD99 que en el momento actual es el anticuerpo de uso más extendido para estos tumores, siendo negativo para el neuroblastoma.

Recientemente se han estudiado una serie de nuevos marcadores.

Chung y col., (1998) han publicado resultados positivos en el *Es* frente a la β -1 integrina proteínica-kinasa.

Ricolti y cols (1998) encuentran positividad del *c-kit* y el SCF (stem cell factor) en los *Es*. Esta proteína está ligada a la proliferación celular previniendo la apoptosis.

También se han efectuado estudios inmunohistoquímicos empleando el producto del gen EWS/FLI-1 para lo cual se ha utilizado el péptido correspondiente a la región c-terminal del FLI-1 (Nilsson y col., 1999).

Nosotros hemos estudiado también esta proteína, no solo frente al *Es*/pPNET, sino también frente a linfomas, rhabdomyosarcomas, sarcomas sinoviales y neuroblastomas (Lombart-Bosch y col., 2000). El anticuerpo se expresa en el 100% de los srct, pero también es positivo en los linfomas, linfocitos normales y células endoteliales. Sin embargo los neuroblastomas y los rhabdomyosarcomas fueron negativos.

En resumen: si bien no disponemos de un anticuerpo con especificidad absoluta frente a este grupo de tumores, si existen una serie de anticuerpos con una buena sensibilidad y especificidad que pueden ayudar decisivamente en el diagnóstico diferencial frente a otras neoplasias que histológicamente presentan un cierto grado de semejanza y sin embargo pertenecen a otras categorías tumorales. El CD 99 y CD57 junto con los marcadores neurales ENS, S-100, NF y PgP 9.5

continúan ofreciendo suficiente soporte para este diagnóstico.

Microscopia electrónica

Esta técnica ha aportado contribuciones importantes en el estudio de estos sarcomas confirmando la mayoría de hallazgos histológicos y ayudando a comprender su histogénesis.

A bajos aumentos el tumor demuestra estructura compacta y homogénea, con un conglomerado celular masivo sin semejanza alguna con algún tejido normal. Las células se adosan estrechamente entre sí dando una imagen en sabana difusa. Hay escaso estroma y solo destacan capilares con endotelios prominentes que pueden confundirse con células tumorales si bien siempre existe una membrana basal de separación.

La configuración celular ofrece dos tipos predominantes:

Células principales y células secundarias (oscuras). Ambos tipos celulares aparecen entremezclados en los mismos campos y existe transición entre los dos por progresiva condensación citoplásmica y retracción nuclear.

La célula principal es redondeada o poligonal de superficie lisa, estrechamente adosada a las células vecinas, atendida la ausencia de material interpuesto. Hay uniones celulares en forma de uniones estrechas así como aislados desmosomas de diferenciación incompleta.

El citoplasma es abundante si bien contiene escasos orgánulos siendo la estructura más frecuente y llamativa la presencia de glucógeno que se distribuye bien de forma amorfa o bien se organiza en rosetas de polisacáridos complejos. Suelen distribuirse caprichosamente ocupando buena parte del citoplasma. Sin embargo, no todas las células principales contienen glucógeno habiendo numerosas células carentes del mismo con un citoplasma vacuolado claro. Cuando domina esta textura hablamos de "células claras" por el aspecto histológico en agua de roca translucido. También existen aislados orgánulos como mitocondrias, RER y campos de Golgi. Los filamentos de tipo intermedio aparecen asociados a las mitocondrias.

En los Es de "células grandes" existe mayor riqueza de orgánulos citoplásmicos y el hialoplasma es más denso al mismo tiempo que existen más acúmulos de filamentos. Existen inclusiones lisosomiales aisladas que no deben confundirse con granulaciones neurosecretoras. Estas últimas son de tamaños entre 100-200 nm de diámetro y tienen un cuerpo denso osmiofilo rodeado por una membrana. Su contorno es redondeado o elongado. Pueden localizarse en el citoplasma, en áreas perinucleares o en las prolongaciones citoplásmicas, cuando el Es adopta una configuración de pPNET con proyecciones citoplásmicas dendríticas o con apariencia elongada, periforme. Estas estructuras solo son visibles en aquellos casos en que existe una diferenciación neuroectodérmica pero no se ven en los Es convencionales.

También en los casos con maduración neural encontramos proyecciones citoplásmicas ocupadas por filamentos en bandas así como neurotúbulos. Ocasionalmente, hemos podido también ver terminaciones celulares a modo de contactos sinápticos con una vesícula terminal dilatada y una membrana densa en contacto con un soma celular. En el interior de la vesícula sináptica existen granulaciones neurosecretoras.

El núcleo de las células principales es redondeado u oval y ocupa una amplia porción de la célula. Tiene cromatina laxa periférica, reticulada y uno o dos nucleolos. Estos contornos celulares se hacen más irregulares e indentados en las formas de Es atípico entremezclándose células blastemales inmaduras con otras binucleadas o de núcleos indentados. También en estas células hay un nucleolo más prominente que adopta patrón reticular.

Los Es atípicos de células grandes destacan por la irregularidad de sus células y variación en el tamaño de las mismas así como también de sus núcleos.

Las células secundarias son también conocidas como células oscuras. Tienen contornos irregulares y los contactos entre ellas son menos precisos, su citoplasma es denso, habiendo glucógeno y orgánulos variados. Se encuentran también lisosomas. Hay filamentos densos. Algunas de estas células presentan núcleos elongados de cromatina conglomerada y nucleolo poco prominente. Hay núcleos en apoptosis.

Existe progresiva o bien brusca transición entre células principales y secundarias en proporción variada pero visible en todos los tipos de Es típicos y atípicos así como en el pPNET.

La diferenciación tumoral neuroectodérmica (pPNET) es también claramente determinable con ME. Las células son más irregulares y con ricas prolongaciones de variada longitud y orientación. Ellas se tienden a polarizar hacia un hipotético centro o bien adoptan un aspecto reticular dando aspecto dendrítico entremezclándose las distintas prolongaciones. Hay algunas células piriformes y otras estrelladas junto con redondas u ovals. Las uniones intercelulares aparecen mejor desarrolladas con presencia de desmosomas bien configurados (positividad ante la desmoplakina)

El intersticio de estos tumores es pobre o ausente en el Es convencional, aumentando progresivamente en el Es atípico y en el pPNET. En estos últimos se encuentran depósitos de colagena no estructurada (tipo IV) así como cuerpos de Luse con estructuras periódicas y colagena periódica convencional.

La vascularización varía de un tumor a otro. En general hay una rica red capilar con numerosas células endoteliales muy prominentes pero sin aspecto neoplásico. Debe distinguirse estos endotelios reactivos de los neoplásicos vistos en la variante endotelial del Es. En ellos aparece siempre una fina basal de separación entre célula tumoral y célula reactiva endotelial.

La variante endotelial del Es está configurada por grandes células de amplio citoplasma muy vacuolizado pero con escaso glucógeno. Estas células se agrupan estrechamente pero dibujan vacuolas intracitoplasmicas o fisuras y hendiduras intercelulares de progresivo diámetro. Tienen citoplasma con microvellosidades, vacuolas de pinocitosis y también cuerpos Weible-Palade como las células endoteliales típicas. Existen basales de soporte que dibujan texturas pseudocapilares. Alguna de la luz intercelular está ocupada por eritrocitos.

Semeja a los hemangioendoteliomas, pero se asocia por otro lado a células más indiferenciadas que poseen la textura de las células principales del Es atípico con células grandes.

En resumen: hay una doble población celular en el Es (células principales y secundarias). Existe una variabilidad ultraestructural en la participación celular no semejando a ninguna estructura celular histológica normal. El glucógeno es abundante pero de disposición caprichosa. Existen granulos neurosecretorios que son más abundantes en los tumores con diferenciación neuroectodérmica pero que también son aisladamente visibles en los Es convencionales.

La presencia de estroma con colagena amorfa y cuerpos de Luse se encuentran en los pPNET. Hay casos con diferenciación endotelial semejando un tumor vascular maligno.

En todo caso, es un tumor de células muy indiferenciadas e inmaduras sin otros atributos morfológicos reconocibles.

Genética. Patología Molecular

En 1983 se descubrió la existencia de una translocación cromosómica balanceada $t(11;22)(q24;q12)$ que ha resultado ser un marcador fenotípico extraordinario (Aurias y col., 1983; Turc-Carel y col., 1984). Posteriormente, se han ido describiendo nuevas translocaciones cromosómicas, independientemente de la variante histológica del tumor. En un orden de frecuencia descendiente son las siguientes: $t(21;22)(p22;q12)$ en aproximadamente 10% de casos (Giovannini y col., 1994; Dunn y col., 1994); $t(7;22)(q22;q12)$ en un 1% de tumores (Jeon y col., 1995); $t(17;22)(q12;q12)$ en menos de un 1% (Kaneko y col., 1996) y finalmente una translocación muy inusual $t(2;22)(q33;q12)$ descrito solo en tres casos de sarcomas (Peter y col., 1997). Es decir que por lo menos existen cinco tipos de translocaciones en las que el locus 22q12 aparece implicado.

Consecuencia de ello ha sido la caracterización de los puntos de fractura del Es en el cromosoma 22q12 y la subsiguiente secuenciación y clonaje de un transcripto quimérico cDNA, resultado de la fusión entre los genes EWS y el factor de transcripción FLI-1 de la familia ETS (Delattre y col., 1992; Zucman y col., 1992). Además varias de las otras reorganizaciones cromosómicas señaladas previamente también han podido ser clonadas e identificadas (Kovak, 1998; Kovak, 1998). Es interesante señalar que todos estos genes fusionados pertenecen a una misma familia de factores de

transcripción conocida como ETS (Erythroblastic Transforming Sequence).

Recientemente también se ha conocido que la proteína producto de la fusión EWS/FLI-1 puede detectarse mediante Western blotting utilizando un anticuerpo policlonal frente a la región c-terminal del FLI-1. El 80% de los Es expresan esta proteína nuclear, siendo negativa en los neuroblastomas (Nilsson y col., 1999). Nosotros también lo hemos podido confirmar (Llombart-Bosch y Navarro, 2000) si bien la especificidad del anticuerpo no es total (hay positividades frente a linfomas y sarcomas sinoviales).

Sin embargo hay que tener presente que aproximadamente un 5% de estos sarcomas no expresan ninguna de estas translocaciones o expresiones génicas reorganizadas, utilizando tejido fresco y RT-PCR. Además, ciertos sarcomas presentan un fenotipo múltiple con expresión neural, muscular y mesenquimal (Parham y col., 1992) y muestran también transcritos EWS (Sorensen y col., 1995; Pagani y col., 1995). En estos casos el empleo de técnicas de FISH (hibridación fluorescente in situ) utilizando pruebas de cosmidos que delimitan los puntos de fractura del Es, pueden aportar resultados positivos estudiándolos en núcleos interfásicos (Kovar, 1998; Monforte-Muñoz y col., 1999).

Distintas mutaciones adicionales también han sido halladas en estos tumores. Ellas no son necesariamente específicas pero pueden contribuir a la heterogeneidad clínica e histológica. Destaca la trisomía 8 que aparece en un 50% de casos y la trisomía 12 en un 20%. También se ha descrito una translocación t(1;16) en varios tumores con fenotipo Es (Armengol y col., 1997).

Además numerosos oncogenes han sido detectados en los Es, como el ras, cMYC, MDM2, p53, p16 y Rb, si bien la creencia general es que estas mutaciones o sobre-expresiones no son significativas para la biología del sarcoma.

Solo alguno de ellos parece tener significado, como es la mutación p53 que se produce en un 10% de casos, mientras que el gen Rb no está inactivado. Por contra, se ha visto una delección homocigótica del gen p16 sin observarse aberraciones cromosómicas a nivel 9q21.

Diagnóstico diferencial

Este diagnóstico incluye un número relativamente extenso de sarcomas de hueso y partes blandas compuestos por células redondas pequeñas que semejan el Es o algunas de sus variantes. Su diagnóstico diferencial es importante por cuanto el pronóstico y tratamiento varía radicalmente.

Los siguientes tipos tumorales merecen especial atención:

1. Osteosarcoma anaplásico microcelular
2. Condrosarcoma mesenquimal
3. Condrosarcoma mixoide
4. Sarcoma primitivo de hueso y partes blandas
5. Linfoma no Hodgkin
6. Neuroblastoma

Vamos a analizar algunas de sus características más fundamentales:

1. Osteosarcoma anaplásico microcelular

Se trata de una neoplasia ósea muy infrecuente. Su incidencia se calcula entre el 1.2% al 2.4% de todos los sarcomas óseos. Su mayor frecuencia ocurre entre los 10-30 años de edad.

Histologicamente está formado por células redondas fusiformes o epitelioides, generalmente pequeñas, semejando en cierto grado el Es de células grandes. En algunas áreas puede también adoptar aspecto de linfoma o de sarcoma sinovial monofásico. Esta heterogeneidad no suele ocurrir en el Es. También cabe destacar el mayor desarrollo del componente estrófico, formado tanto por fibras reticulares como por mayor componente vascular. Hay que buscar en estos casos posibles depósitos de elementos osteoides a modo de inclusiones intersticiales de pequeños acúmulos de material acidófilo amorfo alrededor del cual se sitúan células con apariencia de osteoblastos.

La microscopía electrónica muestra grandes diferencias frente al Es, tanto a nivel celular como intersticial. Las células, aunque indiferenciadas, son más irregulares que en el Es, su citoplasma es más abundante y con riqueza de orgánulos con mayor desarrollo del RER y depósitos intracisternales de material grumoso granular. Carecen de granulos de neurosecreción.

A nivel intersticial hay depósitos frecuentes de material floculante adoptando aspecto pseudomembranoso. Está en proximidad con depósitos intracisternales citoplásmicos de análogo material (Papadimitrov y Druchemberg, 1994).

La inmunohistoquímica también presenta netas diferencias. Algunos casos presentan positividad focal frente al HBA/71 (CD99), pero no tiene carácter membranoso y no tiñe todas las células tumorales. También de modo inconstante, aparece positividad frente al CD57 (HNK-1) así como aisladas células con HHF-35 (actina) positivas. Tanto la osteonectina como la osteocalcina son positivas (Termine y col., 1987)

La existencia de tumores plurifenotípicos con expresión de marcadores de Es y osteosarcoma han sido vistos por varios autores (Bussolati y col., 1998; Hutter, 1966). Incluso alguno de ellos sufren la translocación $t(11;22)(q24;q12)$ semejante al Es (Noguera y col., 1990), además estos mismos tumores presentaron la reorganización génica EWS/FLI-1. Esto permite aceptar la existencia de tumores plurifenotípicos con expresión neuroectodérmica y mesenquimal osteogénica (multipotential primary sarcoma of bone) como ya fueran descritos por Jacobson (1977). Su rareza hace difícil estandarizar la biología molecular de esta variante neoplásica.

2. Condrosarcoma mesenquimal

Esta neoplasia es bastante infrecuente habiéndose descrito en 1959 por Lightenstein y Bernstein. Está microscópicamente formado por acúmulos celulares inmaduros y pequeños, redondeados en organización difusa o nodular. Muestras biopsicas pequeñas pueden hacer difícil un diagnóstico diferencial con un Es.

Pueden localmente encontrarse aislados puntos de maduración condral con células más diferenciadas acompañadas de áreas de depósito intersticial más abundante, llegando incluso a formar lagunas o condroceles. Estos campos alternan con otros inmaduros sin diferenciación estrófica en donde las células adoptan patrón hemangiopericitario, o fusocelular tipo sarcoma sinovial monofásico.

La microscopía electrónica muestra células más heterogéneas que las propias del Es, con citoplasmas vacuolados y un rico desarrollo del RER, teniendo cisternas dilatadas y rellenas de material proteináceo amorfo. La matriz intercelular es también más rica que en el Es, asociada a la presencia de fibras colágenas y de material amorfo.

La inmunohistoquímica no es diagnóstica directamente sino por exclusión. El marcador más específico es la positividad frente a la proteína S-100, mientras que la HBA-71 (CD99) es negativa, pero algunas células expresan CD57 (HNK-1) y NSE, así como también la osteonectina es focalmente positiva.

A nivel genético se han descrito casos aislados en que se detectó la translocación $t(11;22)(q24;q12)$, semejante a la vista en el Es (Sainati y col., 1993).

3. Condrosarcoma mixoide

Nos encontramos con un tumor que aparece en partes blandas (media 50 años) con una proliferación de células redondas poligonales pequeñas, de hábito condroide ordenados en trabéculas o cordones suspendidos en una matriz basófila mixoide que posee caracteres histoquímicos de cartilago. Esta matriz puede alternar en zonas, con áreas abundantes y áreas desprovistas de ella que recuerdan el Es. Algunas zonas semejan un condroblastoma (Mels-Kindblom y col., 1996). La ultraestructura presenta células con citoplasmas provistos de filopodios, abundante RER con vesículas distendidas por el material depositado en su interior, depósitos de glucógeno y aisladas vacuolas de lípidos. En las cisternas del RER pueden verse acúmulos complejos de microtubulos. La matriz extracelular también es rica en depósitos proteináceos de apariencia mixoide o condral.

La inmunohistoquímica confirma, con la positividad frente a la vimentina y la S-100, su carácter condral, siendo negativa la HBA/71 (CD99) y los marcadores neuroectodérmicos o epiteliales (EMA, citoqueratinas).

Los estudios citogenéticos han demostrado la translocación cromosómica $t(9;22)(q22;q12)$ que sería diagnóstica. Implica la reordenación génica entre el gen EWS y otro gen localizado a nivel 9q22 conocido como TEC. Ello es detectable con FISH y RT-PCR en material incluido en parafina.

4. Sarcoma primitivo de hueso

El llamado sarcoma de hueso primitivo configura un grupo excepcional de sarcomas óseos compuestos por células blastémicas indiferenciadas con capacidad multifenotípica

Algunos semejan Es atípicos, o bien son confundibles con condrosarcomas mesenquimales o osteosarcomas microcelulares. Los casos descritos son aislados y muy esporádicos, estando pendientes de una confirmación con técnicas de biología molecular y genética con el fin de poder llegar a su mejor identificación.

Los primeros casos fueron recogidos por Hutter y col (1966) habiéndose descrito posteriormente casos aislados (Fugi y col., 1989; Frydman y col., 1995; Tsokos y col., 1996).

Nosotros hemos podido recoger 12 casos que cumplirían los requisitos señalados. La histología muestra una heterogeneidad importante, aunque algunas áreas semejan un Es atípico con células grandes o fusiformes. Los núcleos presentan mayores irregularidades. Hay glucógeno citoplásmico. El estroma varía desde áreas pobres en fibras o depósitos de material proteico frente a otras que recuerdan un osteosarcoma microcelular con depósitos de colagena hialina pero sin material osteoide. La inmunohistoquímica muestra positividad para la vimentina y algunos marcadores neuroectodérmicos aparecen positivos en grupos celulares aislados (NSE, proteína S-100, PGP 9.5). El CD99 (HBA-71) fue positivo en depósitos citoplásmicos (no membranosos) solo en 2 casos. También algunas células expresaron citoqueratina CAM 5.2 pero el EMA fue negativo. Un elemento de diagnóstico diferencial sería frente al sarcoma sinovial monofásico indiferenciado si bien la EMA negatividad tiende a excluirlo. También debe establecerse diferenciación frente al "intra abdominal desmoplastic small round cell tumor (DSRCT)".

La microscopia electrónica de los casos estudiados por Tsokos y nosotros muestra un tumor heterogéneo con células de hábito mesenquimal pero con presencia de uniones desmosómicas. Algunos casos contenían granulaciones neurosecretoras semejando las vistas en el pPNET.

Este grupo de tumores continúa estando mal identificado desde el punto de vista biológico y molecular. Se comportan como sarcomas de alto grado en la clínica pero su localización nosológica definitiva está todavía pendiente de determinar.

Es posible que puedan relacionarse con los raros "ectomesenquimomas malignos" que poseen componente multifenotípico con presencia de estructuras tipo PNET, junto con elementos rabdoblásticos y neurogénicos semejando a un sarcoma de vainas nerviosas periféricas o rhabdomyosarcoma. En ellos también se han descrito otros componentes como: liposarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma, melanoma (Kawamoto y col., 1987).

Una pausable histogénesis podría encontrarse a nivel de las crestas neurales que poseen potencial prospectivo multifenotípico: mesenquimal, osteogénico, muscular y, obviamente, diferenciación neuroectodérmica (L.E Doharin, 1992; Martín García-Castro y Bronner-Fraser, 1999).

5. Linfoma no-Hodgkin primitivo de hueso y partes blandas

Se trata de casos muy infrecuentes, aceptando una manifestación clínica primaria como tumor y no la extensión ósea /partes blandas de una generalización de un linfoma de alto grado primitivamente ganglionar.

El diagnóstico diferencial frente a los srct/*Es* es muy importante ya que la terapéutica y el pronóstico es diferente.

El viejo concepto de "reticulosarcoma óseo" defendido por Jackson y Parker (1939) ha sido totalmente superado, no teniendo en la actualidad equivalencia clínica. Solo cabría aceptar la existencia de un sarcoma histiocítico compuesto por células reticulares de la médula ósea y distinto de cualquier linfoma convencional de células grandes o de un fibrohistiocitoma maligno de dominio histiocítico (Llobart-Bosch y col., 1984).

Utilizando las clasificaciones vigentes para los linfomas, la mayoría de estos tumores deben encuadrarse en el grupo de linaje B, como linfomas difusos de origen folicular (centrofolicular, grado III) (Bacci y col, 1986; Howat, 1987; Pettit y col., 1999). También se han descrito linfomas tipo T si bien siendo más infrecuentes (Lenington, 1990), lo mismo que linfoma Ki-1 (CD30) positivos de linaje B o T (Chan y col., 1991).

La inmunohistoquímica provee un buen diagnóstico diferencial con material incluido en parafina (CD45, CD79a, CD79RO, CD4, CD5, CD10, CD20, CD23, CD43) entre células B, T y natural killer.

6. Neuroblastoma

Es el tumor que aparece con una mayor frecuencia en los niños (tercer tumor en cuanto a incidencia). Si bien el hueso suele tener una localización metastásica lo mismo que en partes blandas. Sin embargo en el tronco puede causar problemas de diagnóstico diferencial frente a un *Es*.

La histología semeja mucho la de un *Es*, con nidos de células redondas o fusiformes de escaso citoplasma. Hay nidos y rosetas tipo Homer-Wright típicas, análogas a las descritas en el pPNET y zonas indiferenciadas homogéneas con células azules, redondas y pequeñas. La heterogeneidad celular puede ser mayor en los *Nb* con maduración ya que existen células ganglionares mezcladas con neuroblastos inmaduros.

También el estroma varía considerablemente ya que existen *Nb* con estroma escaso (pobre) y otros con abundante estroma. Este se encuentra formado por células de Schwann y prolongaciones citoplásmicas, así como fibras de colágena. Pueden tener una disposición lobular. Hay además microcalcificaciones frecuentes no visibles en el *Es/pPNET*.

Los tipos de *Nb* más evolucionados, como el ganglioneuroblastoma, no presentan problemas de diagnóstico diferencial atendido que en el *Es/pPNET* no encontramos, salvo excepciones, células ganglionares.

La inmunohistoquímica permite un claro diagnóstico diferencial: los *Nb* presentan positividad frente a numerosos marcadores neuroectodérmicos y neurosecretorios: NSE, S-100, PGP 9.5, neurofilamentos, así como sinaptofisina, cromogranina. Sin embargo, el *Nb* es negativo frente al CD99 (HBA71). También el N-CAM es negativo en el *Es/pPNET* y positivo en el *Nb* (Garin-Chesa y col., 1991).

También la microscopía electrónica es una buena ayuda para el diagnóstico diferencial: si bien existen granulaciones neurosecretorias, éstas son masivas en número y su tamaño varía entre 50-200 nm, siendo equiparables a las vistas en *Es*. Se localizan en grupos tanto en el citoplasma como en las prolongaciones celulares. También hay microtúbulos y neurofilamentos, como los vistos en los pPNET, pero también son mucho más numerosas. Pueden hallarse típicas células ganglionares y células de Schwann (Romansky, 1978; Taxy, 1980).

La citogenética es también distinta: el *Nb* exhibe una delección del brazo corto del cromosoma 1 (1p36.1;1p36.3). También son frecuentes otras anomalías cromosómicas como la presencia de dobles minutos, HSRS (regiones de tinción homogénea) así como trisomías de 1 y 17 (Fong, 1989). Además se han descrito algunos casos con translocación t(1;17)(p36;q12) (Van Roy y col., 1994). Ninguna de estas alteraciones genéticas han sido detectadas en el grupo de tumores *Es/pPNET*.

La amplificación del gen MYCN es propia del *Nb* y se asocia a estadios clínicos más avanzados y con agresividad tumoral mayor (Brodeur y col., 1981; Noguera, 1996).

Otros tumores con posible diagnóstico diferencial pero localizados en partes blandas son:

- Rabdomyosarcoma (embrionario/alveolar)
- Tumor maligno primitivo de vainas neurales
- Liposarcoma de células redondas
- Sarcoma sinovial monofásico indiferenciado
- DSRCT (Tumor desmoplásico de células redondas)
- Sarcoma rabdoide extrarrenal
- Leiomyosarcoma epitelioides
- Tenosinovitis difusa pigmentada
- Tumor melanocítico neuroectodérmico de la infancia (progonoma melanocítico)

Remitimos a revisiones del tema a quienes deseen un estudio más detallado de estos tumores (Seminars in Diagnostic Pathology, 1996).

Pronóstico y criterios terapéuticos

No hay criterios pronósticos aceptados con un carácter definitivo para este grupo de sarcomas. Son criterios fundamentales: la localización del tumor primario y la presencia o ausencia de

metástasis en el momento del diagnóstico. La edad también parece tener una débil relación pronóstica, mientras que no existen diferencias pronósticas relacionadas con el sexo.

Una evolución clínica más agresiva presentan los Es de localización toracopulmonar y en pelvis, quizás por lo tardío del diagnóstico y la afectación visceral.

En general, los tumores localizados en el tronco tienen un pronóstico evolutivo peor que los localizados en las extremidades y particularmente los tumores de localización en extremidades distales ofrecen mayores supervivencias.

En la actualidad se buscan insistentemente criterios clínico-patológicos que indiquen una mayor o menor agresividad clínica que justifique un tratamiento más intensivo o menos agresivo. Estos criterios se buscan a distintos niveles: histopatológicos, citogenéticos, biología molecular. Hasta ahora, los resultados son contradictorios si bien nuevas puertas se abren a la esperanza.

A nivel histológico, la presencia de una estructura reticular en damero de ajedrez o "filigree" descrita por Kissane (1983) vendría asociada a una mayor malignidad tumoral y a una supervivencia más corta. Nosotros pudimos confirmar estos hallazgos en casos de enfermos no metastásicos (Llombart-Bosch y col., 1986) aunque otros investigadores no pudieron hacerlo (Hartman y col., 1991).

Un segundo factor de mayor agresividad clínica de estos sarcomas es la presencia de necrosis tumoral extensa en tumores no tratados con quimioterapia neoadyuvante (Llombart-Bosch y col., 1986).

La heterogeneidad histológica ha sido motivo de análisis para establecer criterios pronósticos, especialmente el estudio de la diferenciación neuroectodérmica frente a los tipos más indiferenciados (Es versus pPNET) ha sido motivo de controversia. Schmidt y col. en Alemania y Hartman y col. (1991) en USA han señalado la relación de un pronóstico más adverso en los pPNET con clara diferenciación neuroectodérmica (presencia de rosetas de Homer-Wright y más de un marcador neuroectodérmico a nivel inmunohistoquímico). En un amplio estudio contando con casos de USA y Europa (Terrier y col., 1993) no pudimos confirmar estos hallazgos.

Nuevas aportaciones se han llevado a cabo: hay varios estudios en marcha tratando de determinar si **determinadas modificaciones moleculares** pueden tener un significado pronóstico. El análisis del producto de la translocación génica EWS/FLI-1, al compararse los puntos de fusión de los exones 1-7 del EWS (90% de los casos) y los exones 6-9 del FLI-1 (50% de los casos). La fusión más frecuente en los Es/pPNET es la llamada tipo 1: EWS/FLI-1 exones 7/6, mientras que la fusión 7/5 ocurre en un tercio de los casos (fusión tipo 2). Tipos más infrecuentes son las fusiones que afectan a los exones 9, 10 del EWS (10% de casos) con los exones 4 o 6 del FLI-1 (Ladanyi y col., 1995; Obata y col., 1999). Diversos estudios recientes (Zoubek y col., 1996) demuestran que el pronóstico evolutivo clínico de los Es/pPNET favorece a aquellos tumores con fusión tipo 1. Ello sería válido no solo para los tumores no metastásicos, sino también en los casos con metástasis en el momento del diagnóstico (de Alava y col., 1998).

¿Hacia dónde va la patología?

A través del análisis histórico precedente hemos tenido ocasión de conocer como la medicina se enfrenta a un incontable número de retos, que se extienden desde los trastornos genéticos pasando por los inmunitarios, metabólicos, reparativos, inflamatorios, tumorales, etc.

Por no citar sino estos últimos hoy conocemos que bajo el nombre de “cáncer” se esconden varios miles de procesos neoformativos cada uno de los cuales posee su propia biología y pueden en distinto grado llegar a condicionar la vida del enfermo. También sabemos que a pesar de los tremendos avances de la quimioterapia, radioterapia y cirugía oncológica más del 50% de estos cánceres comprometen la vida del enfermo y que tipos aparentemente análogos de ellos tienen un comportamiento clínico muy diverso y en ocasiones impredecible.

Las limitaciones de los criterios histológicos e histogenéticos para la clasificación de las neoplasias quedan constantemente al descubierto a medida que se desvelan los secretos de la biología y genética celular. El mejor conocimiento de las células progenitoras con capacidad multipotencial, ha permitido abrir nuevas expectativas diagnósticas y terapéuticas. Así hoy sabemos que una célula progenitora de la médula ósea no solo en un organismo fetal sino también adulto tiene la propiedad de actuando como elemento de reserva, sustituir diferenciándose en estructuras varias como condrocitos, adipocitos, osteocitos e incluso células musculares (Pittanger y col. 1999) o incluso pueden actuar como células germinales de órganos distantes como el hígado (Petersen y col, 1999).

Además la nueva tecnología nacida en estos últimos 5 años gracias a los “DNA arrays” (micro chips de DNA) localizados sobre chips del tamaño de una preparación histológica (portaobjetos) permite escrutar varios miles de genes dispuestos a modo de minúsculos puntos (dots), como pruebas para detectar que genes están activados en una determinada célula, lo cual viene a proveer una masiva información sobre el número y tipo de genes funcionantes en un determinado momento de la vida celular

Hasta ahora, la genética molecular había considerado exclusivamente el funcionamiento de uno o varios genes simultáneamente activos en un tipo celular; ahora con esta nueva tecnología son miles de genes los que podemos detectar simultáneamente en una misma muestra.

Esta nueva visión ya empieza a proporcionar datos de extremado interés en el diagnóstico del cáncer que hasta ahora era imposible de disponer.

El nuevo sistema se basa en la comparación simultánea de cDNA procedente de mRNA de células cancerosas teñidas con un fluorescente rojo, hibridadas frente a DNA de células normales marcadas con un fluorescente verde. Cuando cantidades análogas de ambos DNA se aplican en un “array” la coloración roja detectable indica una sobreexpresión de un determinado gen en una célula cancerosa, mientras que la excitación fluorescente verde señala sobreexpresión de un gen normal y el amarillo que los niveles de expresión son iguales en ambos DNA, normal y patológico.

Estas tecnologías, aparentemente sencillas, obligan sin embargo a un sistema extremadamente complejo de análisis en que solo gracias a poderosos ordenadores se puede integrar los resultados escrutados. El análisis interpretativo pasa por la selección de grupos de genes que se encuentran alterados y su comparación con los parámetros clínicos: tipo histológico de neoplasia, pronóstico clínico conocido y respuesta terapéutica previsible.

Por citar solo algunos de los últimos resultados obtenidos, merece señalarse las investigaciones de Golub y col., en el Instituto Whitehead de Massachusetts logrando una nueva diferenciación entre leucemias mieloblasticas agudas y leucemias linfoblasticas agudas (AML y ALL) tras haber analizado 6800 genes de cada uno de los 38 enfermos estudiados. Esta diferenciación sin embargo (distinción entre AML y ALL) se basó en criterios morfológicos convencionales proporcionados por la morfología, genética e inmunohistoquímica. Lo esencial de esta experiencia es que una máquina, seleccionando un número determinado de genes (en este caso opto por 50 genes entre los 6800 disponibles) fue capaz de clasificar estas leucemias de igual manera que se consigue con la metodología tradicional, lograda con 100 años de experiencia morfológica.

Nuevos grupos de trabajo emergen con esa impresionante biotecnología. Así el “Lymphomas Leukemia Molecular Profiling Project” está en estos momentos analizando cientos de linfomas B y tratando de subclasificarlos con vistas a nuevas implicaciones pronósticas y terapéuticas.

No solo son las lesiones hematológicas objeto de estudio avanzado. El grupo de Standford (California) dirigido por Botstein, ha podido subclasificar un grupo de cánceres mamarios en base a

su diversidad génica y su implicación en la expresión de receptores hormonales así como del oncogén Erb-B/2. También los melanomas están siendo motivo de nueva subclasificación con base genética tratando de explorar la diferencia existente entre aquellos casos que ofrecen alta capacidad metastásica para distinguirlos de aquellos que no producen metástasis, aunque morfológicamente y sus parámetros anatomoclínicos (estadio, tamaño, grado) serían semejantes. Estas investigaciones ofrecerían no solo nuevas clasificaciones de las neoplasias sino también nuevos criterios pronósticos y terapéuticos (Marx, 2000). Toda esta tecnología probablemente va a proporcionar una impresionante cantidad de nueva información médica que obligará en los años venideros a reescribir los textos médicos y especialmente en el terreno de la oncología (Staudt, 2000).

¿Qué papel le quedará a la morfopatología en los próximos años?

Hemos pasado del estudio del tejido al de la célula y la expresión génica. La moderna tecnología ha pasado de los museos anatómicos y anatomopatológicos a los bancos de datos recogidos por ordenador y almacenados siendo transferibles a través de la red (Internet). Lo mismo ocurre con la información bibliográfica y las publicaciones científicas que pasan a tener un depósito virtual de acceso rápido vía red de ordenadores. Los científicos se conectan gracias a la red en directo y pueden intercambiar la información de sus hallazgos in situ. Los nuevos sistemas de telepatología y telemedicina permiten transmitir en directo información contenida en preparaciones histológicas y comentarlas intercambiando experiencias, diagnósticos dificultosos o casos de gran rareza. La globalización de la información ha reducido el mundo científico rompiendo todas las barreras conocidas.

Nos podemos por tanto preguntar:

- ¿Qué queda de la morfopatología tradicional?
- ¿Tiene sentido el diagnóstico histológico o citológico convencional?
- ¿Qué cabida les queda a procesos como las autopsias clínicas?
- ¿Debe el patólogo abandonar el microscopio y sustituirlo por los microchips de DNA y computadores?

Estas y otras muchas cuestiones agobian hoy el mundo de la medicina. ¿Debemos transformar los genuinos anatomopatólogos en patólogos moleculares?

Esta situación ha alcanzado incluso la conciencia de las asociaciones científicas y profesionales cuestionando su propia identidad. Recientemente la Sociedad Española de Anatomía Patológica, fundada hace 40 años, sometía a encuesta entre sus miembros el cambio de nombre proponiendo pasar a denominarse, siguiendo el ejemplo anglosajón como “Sociedad Española de Patología”.

Son numerosos los patólogos que en estos últimos años han expresado sus inquietudes buscando contestación a estas preguntas (Gown, Rosai, 2000). Nosotros mismos nos ocupamos de esta problemática recientemente ante la Sociedad Helénica de Patología (Atenas, Abril 2000) y en el Symposium sobre “Message to Young Pathologists” en el reciente Congreso Internacional de la Academia Internacional de Patología (Nagoya, Octubre 2000).

Sintetizamos en este final de nuestro discurso ante Uds. distinguidos miembros de la Real Academia de Medicina nuestra seguridad de que la morfopatología continua jugando un papel esencial en esta nueva era molecular de la medicina.

Creemos sin embargo que la patología ira progresivamente diferenciándose en dos categorías distintas, aunque imbricadas entre si y necesariamente complementarias: aquella aplicada al diagnóstico de rutina diaria y la otra orientada a complementar estos diagnósticos con técnicas cada vez más complejas y con un fundamento genético-molecular. Además la especialización en el diagnóstico anatomo-clínico obliga a un trabajo en equipo coordinado, perdiéndose la situación privilegiada del patólogo enciclopédico conocedor de todo tipo de lesiones y procesos.

Hay que tener presente que la cantidad de información producida y distribuida diariamente en la ciencia se renueva a una tremenda velocidad. Datos hoy válidos y novedosos no tienen una vigencia superior a 5 años.

En ellos la morfopatología sigue proveyendo nuevas entidades y procesos morbosos. La morfología (citoarquitectura) representa la gran síntesis de todos los atributos genéticos y

epigenéticos que presenta la célula patológica, especialmente la tumoral. La tecnología mas sofisticada no sustituirá en un proximo tiempo a técnicas tan sencillas como la histopatología con una hematoxilina-eosina o una citología obtenida por punción aspirativa. Lo que estas técnicas aportan a la medicina diagnóstica y terapéutica resultan insustituibles atendido su bajo costo (el metodo diagnóstico mas barato y rentable) y mas rápido (citodiagnóstico o histodiagnóstico intraoperatorio). Los patólogos quirurgicos y citopatólogos mantendran una vigencia nacida de la rutina clínica diaria y estas técnicas permaneceran en los proximos años como los “gold standard” de la anatomía patológica.

“La nueva biotecnología solo remplazará al microscopio cuando la información que ella produzca sea mas válida y económica” (Quirke, 1999).

Por otro lado las nuevas clasificaciones moleculares de las enfermedades obligan al patólogo a adoptar un criterio abierto y crítico y estar en condiciones de evaluar las consecuencias de estos hallazgos contribuyendo a los mismos a través de los tejidos de los cuales es depositario natural (bancos de tumores criocenservados, histotecas y bancos de bloques de parafina). La mayoría de nuevas técnicas utilizadas en el siglo XX, como son la microscopia electrónica, inmunohistoquímica, hibridación in situ, citogenética, etc) en manos de patólogos permiten hoy y mantendran esta vigencia en el futuro, integrando la morfología convencional y encontrando explicación racional a los hallazgos histopatológicos clásico nacidos de la doctrina de la teoría celular.

El papel del patólogo frente al médico asistencial seguira siendo el eje central de la decisión terapéutica, al mismo tiempo que como científico deberá estar en condiciones de evaluar, desarrollar y contribuir al estudio de la expresión genotípica y fenotípica de los tejidos participando en el conocimiento de la nueva biología de la enfermedad.

Es asi como la Anatomía Patológica del siglo XX se incorporará con plena vigencia en la medicina del siglo XXI.

He dicho

BIBLIOGRAFIA SELECCIONADA Y OBRAS CONSULTADAS GENERALES

- Alberts A, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: Molecular biology of the cell. New York, London. Ed. Garland, 1998
- Altmann HW: Pathologie in Deutschland. Ahnung und Gegenwart. Pathologie 7: 128-135, 1986
- Allen GE: Life Sciences in the Twentieth Century. Cambridge. Cambridge Univ. Press, 1971
- Aschoff L: Vorträge über Pathologie. Jena: Fischer Verlag, 1925
- Babes A: Diagnostic du cancer de col uterine par le frottis. Press Med 36: 451-454, 1928
- Becker V, Doerr W, Schiprerges: Krankheitsbegriff und Krankheitsforschung im Lichte der Präsidiahansprachen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (1897-1992) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, 1993
- Bernard J: Etat de la Medécine. Paris. Ed. Buchet-Chartel, 1960
- Beutner EH, Nisengard RS, Albin B: Defined immunofluorescence and related cytochemical methods. New York. Ann New York Acad Sci, vol 420, 1983
- Bishop JM: Cellular oncogenes and retrovirus. Ann Rev Bioch 52: 301-354, 1983
- Daremberg G: Le grand medecins du XIX siecle. Paris. Ed. Masson, 1907
- Debre P: Louis Pasteur. Paris. Ed. Flammarion, 1995
- Doerr W: Jean Cruveillier, Carl v. Rokitansky, Rudolf Virchow. Virchows Arch. Abt. A Path Anat und Histol 378: 1-16, 1978
- Doerr W: Morphologie und Krankheitsforschung. En: W. Doerr, Ars longa, vita brevis, 168-181, Springer Verlat, Berlin, 1991
- Doerr W: Wandlungen eines Faches kritische Bemerkungen zur aktuellen Pathologie. Arzenblatt Baden-Württemberg 55: 750-755, 1980
- Du Mesnil R, Bonnel-Roy F: Les medecins celebres. Paris. Ed. Mazenod, 1947
- Erlich M: PCR technology: Principes and Applications for DNA Amplification. WH Freeman and Company Ed. N.Y., 1992
- Fields N, Knipe DM eds: Fundamental Virology. Raven Ed. Amsterdam. New York, 1990
- Fischer RW, Gruber G: Fünfzig Jahre Pathologie in Deutschland. G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1949
- Gown AM, Asa SL: The changing nature of Pathology and the changing role of the pathologist in the new millenium. Long Course USCAP New Orleans, March 29, 2000, ed. IAP
- Griffith JD: Electron Microscopy in Biology. Vol I-II. New York, Brisbane, Toronto. Ed. John Wiley and Sons, 1981

- Jacob F, Monod J: Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J Mol Biology* 3: 318-356, 1961
- Jacob F: *La logique du vivant. Un histoire de la heredité.* Paris. Ed. Gallimard, 1970
- Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975
- Kuhn T: *The structure of scientific revolutions.* Paris. Ed. Flammarion, 1972
- Ladanyi M: Diagnosis and classification of small round cell tumors of childhood. *Am J Pathol* 155: 2181-2182, 1999
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: *Principes of Biochemistry.* Worth Ed. New York, London, 1993
- Lennert K, Feller A: *Histopathology of non-Hodgkin lymphomas (2nd edition)* New York. Springer Verlag, 1992
- Levine RP: *Genetique.* Paris. Edisciences, McGraw-Hill, 1971
- Lewin B: *Genes VI.* Oxford, New York, Tokyo. Oxford Univ. Press, 1998
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Darnek J: *Molecular cell Biology.* 3^a ed. Scientific American Books. New York, 1995
- Lubarsch O: *Ein bewegtes Gelehrtenleben.* Berlin, Springer Verlag, 1931
- Magendie F: *Phenomenes physiques de la vie.* Paris. Ed. J.B. Baillere, 1842
- McManus JFA: The pathologist as the Hospital biologist: pathology as biology. *Pathol Ann* 1: 371-377, 1966
- Meisels A, Morin C: *Cytopathology of the Uterus.* 2nd edition. Chicago. ASCP theory and practice of cytopathology 1. William W. Johnston Editor. American Society of Clinical Pathologists, 1997
- Meyer P, Triadou P: *Leçons d'histoire de la pensée medicale.* Paris. Ed. Odile Jacob, 1996
- Meyer P: *L'irresponsabilite medicale.* Paris. Ed. Grasset, 1993
- Meyer P: *Lecons sur la vie, la mort et la maladie.* Paris. Ed. Hachette, 1998
- Milstein C: Monoclonal antibodies. *Sci Am* 243: 66-74, 1980
- Monod J, Changeuz JP, Jacob F: Allosteric Proteins and Cellular Control System. *J Mol Biology* 6: 306-329, 1963
- Monod J: *Le hasard et la necessité.* Paris. Ed. Seuil, 1970
- Montagnier L: *Des virus et des hommes.* Paris. Ed. Odile Jacob, 1994
- Morange M: *Histoire de la biologie moleculaire.* Paris. Ed. La Decouverte, 1994
- Morange M: The discovery of cellular oncogenes. *Hist Phil Life Sci* 15: 45-58, 1993

- Papanicolau GH: Atlas of Exfoliative Cytology. Cambridge Mass. Harvard Univ. Press, 1954
- Pease DC, Porter KR: Electron microscopy and ultramicrotomy. J Cell Biol 91: 287-292, 1981
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD y col: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284: 1168-1170, 1999
- Prusnier S: Les maladies a prions. Pour la science 209:42-50, 1995
- Rey B: Hipermicroscopio. Proyección de mundos invisibles. Madrid. Ed. Dossati, 1944
- Richardson JG: A Handbook of Medical Microscopy. Philadelphia Pa. JB Lippincott ed., 1871
- Rössle R: Die Bedeutung der Anamnese für den Pathologen. Münch. med. Wschr, 78: 1, 1931
- Rössle R: Die konstitutionelle Seite des Entzündungsproblems. Schweiz. med. Wschr. 53: 1053, 1925
- Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF, ed: Molecular Cloning. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, 1989
- Sanger F: Determination of nucleotide sequences in DNA. Science 214: 1205-1210, 1981
- Schleiden MJ: Grundzüge der Wissenschaftlichen Botanik. Leipzig. Wilhem Enghmann ed., 1849
- Slayter EM: Light and Electron Microscopy. Cambridge Univ. Press. Cambridge, London, 1993
- Sournta JC: Histoire de la Medicine. Paris. Ed. La Decouverte, 1997
- Sternberger LA: Immunocytochemistry. 2nd edition New York, Brisbane, Toronto. Ed. John Wiley and Sons, 1979
- Thuillier P: La science existe-t-elle?. Le cas Pasteur. D'Archimede a Einstein. Paris. Ed. Payard, 1988
- Tubiana M: Histoire de la Pansee medicale. Le chamins d'Esculape. Paris. Ed. Flammarion, 1995
- Virchow R: Cellular pathologie. Berlin. A. Hirschwald Ed., 1858
- Virchow R: Cellular Pathologie. Virchows Arch Path Anat 4nd.Therapie 8: 1-39, 1855
- Virchow R: Lernen und Forschen: Rektoratsrede Friedrich-Wilhelms Universität. Berlin, 1892
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR y col: Genetic alterations during colorectal tumor development. New Engl J Med 319: 525-532, 1988
- Watson JD, Crick FHG: A structure for Deoxyribose Nuclei Acid. Nature 171: 737-738, 1953
- Watson JD: The double helix. A personal account of the discovery of the structure o DNA. Hardmond Sworth. Ed Penguin, 1970

- Watt IM: The Principles and Practice of Electron Microscopy. Cambridge Univ. Press Ed. Cambridge, London, 1985
- Weinberg R: Les genes du cancer. Pour la science 4: 82-89, 1994
- Wied GL: Clinical Cytology: past, present and future. Beitr Onkol 38: 1-58, 1990
- Zur Hausen M: Viruses in human cancers. Science 254: 1167-1173, 1991

BIBLIOGRAFIA DEL AUTOR RELACIONADA CON EL SARCOMA DE EWING-PNET

- Llombart-Bosch A, Peydro A, Lopez Fernandez A, Zuzuarregui C: Sur les sarcomes reticulaires de la moelle osseuse type Ewing. Annales d'Anatomia Path 15: 431-452, 1970
- Llombart-Bosch A, Blache R: Studies on morphology and ultrastructure of Ewing's tumor of bone. Verh Dtsch Ges Path 58: 459-466, 1974
- Llombart-Bosch A, Blache R, Peydro Olaya A: Ultrastructural study of 28 cases of Ewing's sarcoma: Typical and atypical forms. Cancer 41: 1362-1373, 1978
- Llombart-Bosch A: Sobre la heterogeneidad del sarcoma de Ewing oseo: Caracterización ultraestructural de dos variantes morfológicas. Rev Esp Cir Ost 13: 303-322, 1978
- Llombart-Bosch A, Peydro Olaya A, Gomar F: Ultrastructure on Ewing's sarcoma of bone with endothelial character and a comparative review of the vessels in 27 cases of typical Ewing's sarcoma. Path Res Pract 167: 71-87, 1980
- Llombart-Bosch A, Blache R, Peydro-Olaya A: Round-cell sarcomas of bone and their differential diagnosis (with particular emphasis on Ewing's sarcoma and reticulosarcoma). Pathol Ann 17: 113-145, 1982
- Llombart-Bosch A, Peydro Olaya A, Contesso G: Caracterización morfológica del sarcoma de Ewing y sus distintas variantes. Patologia 15: 365-391, 1982
- Llombart-Bosch A, Peydro Olaya A: Scanning and transmission Electron Microscopy of Ewing's Sarcoma of bone (Typical and Atypical variants). Virchows Arch Path Anat 398: 329, 1983
- Llombart-Bosch A, Perez-Bacete M, Peydro-Olaya A: Atypical Ewing's sarcoma of bone with neuroectodermic appearance (Neuroectodermic small round cell sarcoma of bone). Pathol Res Pract 3: 292, 1985
- Llombart-Bosch A, Contesso G, Henry-Amar M, Lacombe MJ: Histopathological predictive factors in Ewing's sarcoma of bone and clinicopathological correlations. Virchows Arch Pathol Anat 409: 627-640, 1986
- Llombart-Bosch A, Perez Bacete M, Triche TJ: Immunohistochemical untersuchungen der Ewingsarkome und ihre differential diagnose gegenüber anderen "small round blue cell" sarkomen des kindersalters and der jugend. Verh Dtsch Ges Path 70: 321-324, 1986

- Llombart-Bosch A, Lacombe MJ, Contesso G, Peydro Olaya A: Small round blue cell sarcoma of bone mimicking atypical Ewing sarcoma with neuroectodermal features. An analysis of five cases. *Cancer* 60: 1570-1582, 1987
- Cavazzana AO, Navarro S, Triche TJ, Llombart-Bosch A: Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma compared. *Lab Invest* 56:12, 1987
- Llombart-Bosch A, Carda C, Peydro-Olaya A, Noguera R, Perez M, Pellin A, Boix J: Soft tissue Ewing's sarcoma: characterization in established cultures and xenografts with evidence of a neuroectodermic phenotype. *Cancer* 66: 2589-2601, 1990
- Navarro S, Gonzalez Devesa M, Ferrandez Izquierdo A, Triche TJ, Llombart-Bosch A: Scanning electron microscopic evidence for neural differentiation in Ewing's sarcoma cell lines. *Virchows Archiv A* 416:383-391, 1990
- Noguera R, Arakawa S, Navarro S, Reynolds CP, Llombart-Bosch A, Triche TJ: Modulation of antigenic expression by Ewing's sarcoma cell with differentiation. *Lab Invest* 62:74AA (433), 1990
- Noguera R, Navarro S, Llombart-Bosch A, Triche TJ, Tsokos: Immunohistochemical analysis of differentiated and undifferentiated Ewing's sarcoma in vitro with a panel of antibodies. *Lab Invest* 62,1:6P (31), 1990
- Noguera R, Navarro S, Tsokos M, Triche TJ, Llombart Bosch A: Modulation of oncogene expression in Ewing's sarcoma cell lines with differentiation.
- *Lab Invest* 64:7A (34), 1991
- Noguera R, Triche TJ, Navarro S, Tsokos M, Llombart-Bosch A
- Dynamic model of differentiation in Ewing's sarcoma cells. Comparative analysis of morphological, immunocytochemical and oncogene expression parameters. *Lab Invest* 62:143-151, 1992
- Noguera R, Navarro S, Peydro Olaya A, Llombart-Bosch A: Patterns of differentiation in extraosseus Ewing's sarcoma cells. An in vitro study. *Cancer* 73:616-624, 1994
- Navarro S, Cavazzana AO, Llombart-Bosch A, Triche TJ: Ewing's sarcoma and peripheral neuroepithelioma compared. An immunocytochemical and ultrastructural analysis of two peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Arch Pathol Lab Med* 118:608-615, 1994
- Terrier Ph, Henry-amar M, Triche TJ, Horowitz ME, Terrier-Lacombe MJ, Miser JS, Kinsella TJ, Contesso G, Llombart-Bosch A: Is neuroectodermal differentiation of Ewing's sarcoma of bone associated with an unfavorable prognosis?. *Europ J Cancer* 31: 307-314, 1995
- Pagani A, Fisher-Colbrie R, Eder U, Pellin A, Llombart-Bosch A, Bussolati G: Neural and mesenchymal differentiations in Ewing's sarcoma cell lines. Morphological, immunophenotypic, molecular, biological and cytogenetic evidence. *Int J Cancer* 63: 738-743, 1995
- Terrier P, Llombart-Bosch A, Contesso G: Small round blue cell tumors of bone: Prognostic factors correlated to Ewing's sarcoma and neuroectodermal tumors. *Seminar in Diagnostic Pathology* 13: 250-257, 1996

- Nogueira E, Navarro S, Pellin A, Llombart-Bosch A: Activation of trk genes in Ewing's sarcoma. Trk A receptor expression linked to neural differentiation. *Diagn Mol Pathol* 6:10-16, 1997
- Llombart-Bosch A, Peydro-Olaya A: Ewing's sarcoma of bone. In: *Orthopaedic Pathology. Bone tumors and tumor like conditions*. Eds A Schiller & A Rosenberg WB Saunders, 1997
- Navarro S, Carda C, Ibañez-Calle T, Llombart-Bosch A: Sarcoma de Ewing extraesquelético de meninges. *Rev Esp Patol* 31:403-408, 1998
- Llombart-Bosch A: Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumor of bone and soft tissue. *Int J Surg Pathol* 7: 185-192, 1999
- Llombart-Bosch A, Pellin A, Carda C, Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A: Soft tissue Ewing/PNET (Es/pPNET) with atypical "clear cell" pattern showing a new type of EWS/FEV fusion transcript. *Diagn Mol Pathol* 9: 137-144, 2000
- Llombart-Bosch A, Navarro S: Immunohistochemical detection of EWS and Fli-1 proteins in Ewing's sarcoma (Es) and primitive neuroectodermal tumors (PNET). Comparative analysis with CD99 (MIC2) expression. *Lab Invest* 80:12A , 2000
- Llombart-Bosch a, Navarro S: Immunohistochemical detection of EWS and FLI-1 proteins in Ewing's sarcoma (ES) and primitive neuroectodermal tumors (PNET). *Al Immuno & Mol Morphol* (enviado public.), 2000

DISCURSO DE CONTESTACIÓN DEL ACADÉMICO NUMERARIO

Excmo. Sr D. José María López Piñero

EXCMO. SR. PRESIDENTE;
EXCMOS. E ILMOS. SEÑORES;
ILMOS. SEÑORES ACADÉMICOS;
SEÑORAS Y SEÑORES:

NO ME RESULTA POSIBLE ni tampoco deseo ocultar la entrañable amistad que me une al Prof. Llombart Bosch. Por supuesto, no voy a cometer la descortesía de descender en este acto académico al terreno de lo personal. Me limitaré a recordar la distinción y las relaciones entre amistad y camaradería establecidas por mi maestro, Pedro Laín Entralgo, en su célebre obra sobre el tema, porque en nuestro caso han estado inseparablemente unidos durante casi medio siglo el afecto y la condición de compañeros de trabajo al servicio de la enseñanza y la investigación médicas, compartiendo valores y esperanzas, satisfacciones y contrariedades.

En los años cincuenta, cuando ambos residíamos en Munich, aprendí una ordenación canónica de la biografía de los científicos que voy a aplicar a la del nuevo académico. Básicamente, dicha ordenación consiste en estructurar la vida y la obra del biografiado en tres etapas: “Lehrjahre” o años de formación; “Wanderjahre”, literalmente “años de viaje”, es decir, de peregrinación con la finalidad de integrar la propia actividad en la comunidad científica nacional e internacional de la correspondiente disciplina; y “Meisterjahre” o años de magisterio. Adelantaré que, como en la de todos los científicos que viven su labor con inquieto apasionamiento, en la biografía del nuevo académico se solapan hasta el presente las tres etapas.

Nacido en octubre de 1935, Antonio Llombart Bosch tuvo sus “Lehrjahre” condicionados desde su inicio por la privilegiada circunstancia de tener como padre a Antonio Llombart Rodríguez, una de las grandes figuras de la cuarta generación de la Escuela Histológica Española, quien fue asimismo su maestro. Cursó medicina en el decenio de los cincuenta, cuando empezaban a rendir frutos los esfuerzos realizados durante la que el Prof. Gomar Guarner ha llamado “edad de hierro” de la Facultad de Medicina de Valencia, obteniendo el título de licenciado en 1959 y el de doctor en 1963. Sus “Wanderjahre” se solaparon tempranamente con esta primera etapa, ya que en 1959 se trasladó al Instituto de Anatomía Patológica de la Universidad de Munich, con una beca del Ministerio de Educación del “Land” de Baviera. Durante tres años, amplió y consolidó su formación especializada principalmente con los medios y en el ambiente del Hospital situado en el distrito múniqués de Schwabing, de significado polisémico y recuerdo imborrable para todos los que estuvimos allí entonces. Sin embargo, no se limitó a los firmes fundamentos adquiridos en el mundo centroeuropeo. La meta de integrarse en la comunidad internacional de su disciplina, motor central de los “Wanderjahre”, le condujo inmediatamente, a partir de 1962, a trabajar en el Chester Healthy Research Institute, de Londres, así como a una larga relación con el Institut Goustave Roussy, de Villejuif, junto a París, que se prolongó hasta 1970. Ello le permitió asumir plenamente las perspectivas propias de la Escuela Española y de la patología germánica, anglosajona y francófona, sin el sesgo que limita muchas formaciones científicas. Esta es una de las claves necesarias para entender adecuadamente su posterior actividad investigadora.

En sentido estricto, los “Meisterjahre” de Llombart Bosch comenzaron en 1970, al ser nombrado catedrático de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Murcia, que existía desde hacía muy poco tiempo. Como murciano de nacimiento, debo recordar que Murcia ha sido, tras la muerte de Alfonso X el Sabio, la región más duramente marginada por los gobernantes castellanos y españoles desde el punto de vista académico y que, al fundarse tardíamente su Universidad y luego su Facultad de Medicina, se convirtió en una mera estación de paso para la carrera de numerosos profesores dentro del sistema centralista. También es un deber de gratitud –haciendo completa abstracción de nuestra amistad personal- destacar que los seis años de magisterio murciano de Antonio Llombart Bosch estuvieron en el polo opuesto del comportamiento de tales profesores. Así lo reflejan muchos hechos, entre ellos, su elección como miembro de número de la Real Academia de Medicina de Murcia, en la que pronunció un discurso de recepción paralelo al del día de hoy hace exactamente un cuarto de siglo y de la que fue nombrado académico de honor tras su definitivo

regreso a Valencia, en agosto de 1975.

Valencia ha sido desde entonces el escenario nuclear de su actividad docente e investigadora. No se trata de glosar un *curriculum*, brillante pero reducido, de un nuevo académico de corta trayectoria biográfica, sino de las iniciativas y contribuciones de más de cuatro decenios consagrados en exclusiva, de modo continuado e infatigable, a la patología y más en concreto a la cancerología. Desde 1959 hasta la actualidad un tema constante de dichas iniciativas y contribuciones viene siendo la histogénesis de los tumores humanos; en el curso de los años sesenta se sumaron las líneas de investigación sobre carcinogénesis hepática y renal comparadas; y a partir de 1970, la relativa a los sarcomas de Ewing humanos, cuestión en la que quizá su obra ha alcanzado la más amplia repercusión internacional. Una veintena de libros y capítulos de libro, más de cuatrocientos artículos, casi trescientas ponencias y comunicaciones en congresos y medio centenar de tesis doctorales dirigidas son cifras que dan idea de la magnitud de dicha obra, aunque, por supuesto, no manifiestan su elevado nivel científica y su influencia. La Profesora Terrada Ferrandis ha estudiado esta última mediante la técnica del análisis de citas y referencias y con materiales procedentes del *Science Citation Index* y de los índices de citas de revistas médicas españolas por ella creados. La conclusión ha sido rotunda, ya que Llombart Bosch figura entre los médicos actuales de nuestro país con más elevada repercusión y visibilidad tanto a nivel nacional como internacional. No digo “impacto” porque utilizado con este significado es uno más de los toscos y surrealistas anglicismos hoy tan ampliamente difundidos como los galicismos y germanismos que los de nuestra generación tuvo que soportar en su juventud.

No ignoro -como hace la degradada gestión de la política científica española- que en los últimos años ha sido completamente refutado por los especialistas en bibliometría el modelo de citación formulado por Merton acerca de la citación científica a mediados del siglo XX, que venía siendo el fundamento sociológico del análisis de citas y referencias. Por razones obvias, soy uno de los muchos lectores de la detenida revisión sobre el tema publicada recientemente por la Profesora Terrada y he aprendido que “el llamado ‘factor de impacto’ es un falso indicador bibliométrico”. A pesar de ello, pueda afirmarse con rigurosidad que el elevado número de citas que en las revistas angloamericanas reciben las publicaciones del nuevo académico corresponde a un fenómeno de repercusión que está en una línea tradicional de la Escuela Histológica Española. Como es sabido, Cajal es el “clásico” médico y biológico más citado actualmente por las revistas en inglés, que también mencionan con frecuencia los trabajos de Río Hortega, el gran maestro de Antonio Llombart Rodríguez, a pesar de que la producción de ambos está mayoritariamente en castellano. El propio Río Hortega fue autor del artículo *La ciencia y el idioma*, redactado en 1936 en la ciudad de Valencia, durante el trágico inicio de la guerra civil, en el que critica demoledoramente a los desorientados y oportunistas que creen que para publicar trabajos “importantes” hay que hacerlo en el idioma “importante”. Teniendo en cuenta lo que hemos anotado acerca de su formación hasta 1970, resulta lógico que Llombart Bosch haya tenido ideas muy claras a este respecto y que su producción escrita esté también mayoritariamente en castellano, junto a muchos artículos en las mejores revistas americanas y europeas de su disciplina.

Idéntica orientación tiene la vertiente institucional de su actividad. Baste decir que, por un lado, ha sido miembro fundador de las Sociedades Españolas de Anatomía Patológica, Citología y Oncología, así como presidente de la primera; por otro, presidente de la Sociedad Europea de Patología y de la Academia Internacional de Patología, además de miembro de honor de las Sociedades Húngara, Portuguesa, Chilena y Alemana de Anatomía Patológica.

El solapamiento de las etapas canónicas de la biografía de un científico, al que antes hemos aludido, llega a su máximo en el pleno mantenimiento de los “Wanderjahre” durante los tres decenios de magisterio de Llombart Bosch. Hasta fechas cercanas a las pasadas vacaciones de Navidad y Milenio Nuevo, su profunda integración en la comunidad científica internacional de la patología y la cancerología le ha conducido a peregrinar constantemente a cualquier lugar del mundo: en Europa, desde Islandia hasta Moscú, Kiev y Rodas; en América, a los Estados Unidos, Brasil y la mayoría de naciones de lengua castellana; en Asia, al siempre convulso Oriente Próximo, Hong Kong y Tokio; en África, no sólo a los países mediterráneos, sino incluso a su corazón ecuatorial.

Desde la constitución de la moderna historiografía médica como disciplina hace poco más de cien años, personalidades destacadas de todas las áreas de las ciencias de la salud. no solamente la han

asumido como una especialidad importante, sino que han realizado personalmente trabajos historicomédicos. Entre ellas se encuentran figuras de primer rango, como los patólogos Virchow y Aschoff, además de Cushing, Fahraeus, Fulton, Kraepelin, Leriche, Osler, Rolleston, Politzer, etc. y los españoles Barcia Goyanes, García Tapia, Grande Covián, Marañón, Ortiz Picón y Sanchis Bayarri. Sus brillantes aportaciones ponen en ridículo el llamado “presentismo”, desenfoque vulgar muy extendido que consiste en estimar exclusivamente actuales los conocimientos válidos y las técnicas avanzadas, reduciendo cualquier trayectoria anterior a una serie arbitraria de “antecedentes”, como suele hacerse en las pintorescas cabalgadas pseudohistóricas que sirven de introducción a numerosos libros y artículos médicos.

Tras el discurso de recepción que acabamos de escuchar, resulta evidente que la postura de Llobart Bosch ante nuestra disciplina coincide con la de las ilustres personalidades que acabo de mencionar. Solamente cabe recordar que ha realizado anteriormente otros trabajos historicomédicos, entre los que sobresale *El concepto de forma normal y patológica en el contexto de la medicina actual y su proyección futura*, que expuso en 1971 como discurso de apertura del curso académico de la Universidad de Murcia. Junto a una excelente síntesis a partir de la Baja Edad Media y el Renacimiento, resulta muy significativo que incluyera hace justamente treinta años un capítulo titulado “Hacia una anatomía patológica molecular”.

La medicina del siglo XX ha consistido en buena parte en pervivencias y perfeccionamientos de aspectos procedentes de los decisivos cambios producidos durante el siglo XIX. La publicidad consumista de las “nuevas tecnologías”, directamente relacionada con las cotizaciones bursátiles, y el desenfoque “presentista” no pueden ocultarlo, ni tampoco el terrible retroceso de la salud pública en sus dos últimos decenios. El triunfalismo de mis clases, tras declararse en 1979 la erradicación mundial de la viruela, me parece el ridículo sueño de un iluso en la situación actual, cuando la tercera parte de la humanidad padece tuberculosis –que crece con rapidez incluso en los países más desarrollados- y la mitad, paludismo, que se ha reintroducido en zonas en las que estaba erradicado, como los Estados Unidos, lo mismo que lo han hecho la poliomielitis, la difteria y otras afecciones que parecían superadas en países que entonces tenían sistemas de salud modélicos. El contenido de *2001, Odisea en el espacio* nada tiene que ver con los patéticos fracasos actuales de la NASA y las demás pomposas agencias espaciales.

La vertiente positiva de la medicina del siglo XX es la introducción de un amplio número de auténticas novedades de primer rango, tanto en el terreno científico como en el técnico. La más importante es precisamente la constitución de la biología molecular como disciplina fundamental, cuyo relieve histórico no puede limitarse a un extraordinario progreso cuantitativo, ya que ha significado un replanteamiento del llamado “Denkstil” científico, es decir, de supuestos básicos y conceptos fundamentales, sobre todo con la introducción de una mentalidad “informacionista” procedente del ambiente en torno a la mecánica cuántica, que al principio intentó ser descalificada por grupos poderosos de la comunidad médica internacional.

El texto completo del discurso de Llobart Bosch es un amplio y detallado análisis histórico de esta trascendental novedad, desde la perspectiva de la anatomía patológica. Incluye, además, una indispensable “Semblanza del Profesor Antonio Llobart Rodríguez” ¿Cómo puede un historiador profesional de la medicina corresponder a la generosa distinción que se le ha hecho al encargarle el discurso de contestación? La opción más oportuna a mi alcance es quizá aportar los materiales que recientemente he podido reunir en torno a Luis Simarro como maestro de Cajal durante más de dos decenios, ya que contribuyen a fundamentar un diagnóstico: la obra de nuevo académico lo convierte en una sobresaliente figura de la quinta generación de la Escuela Histológica Española, concretamente de la llamada “rama histopatológica” a la que sucesivamente pertenecieron Simarro, Achúcarro, Río Hortega y Llobart Rodríguez.

El conocimiento histórico de la Escuela Histológica Española ha estado principalmente obstaculizado por la mitificación gravemente falseada de Cajal, como un autodidacta sin raíces en la trayectoria científica de nuestro país. Ortega y Gasset llegó a decir que había “surgido por generación espontánea”, en una de sus afirmaciones terminantes de mandarín cultural. Una discípula del Profesor Llobart Rodríguez, María Luz Terrada Ferrandis, fue a partir de 1963 la adelantada de la investigación acerca de la histología y la anatomía patológica en la España anterior a Cajal, consiguiendo que se dedicaran al tema otros médicos, entre los que me encuentro. En un homenaje a su maestro, publicado en 1965, firmé junto a ella, por ejemplo, un artículo sobre la contribución al

origen de la anatomía patológica moderna realizada a mediados del siglo XVI por Juan Tomás Porcell, en el mismo anfiteatro zaragozano en el que comenzó Cajal la práctica de la disección.

En la actualidad, nadie medianamente informado desconoce que el fundador de la Escuela Histológica Española fue Aureliano Maestre de San Juan, a quien Cajal dedicó, entre otros, el siguiente emocionado recuerdo: “El buenísimo de don Aureliano, a quien tanto venerábamos sus discípulos, sucumbió a las resultas de un accidente de laboratorio. Una salpicadura de sosa cáustica, producida por la ruptura de un frasco, determinó la pérdida de la vista, a que siguió una pasión de ánimo tan grande, que arrebató en pocos meses al maestro. Fue el doctor Maestre un excelente profesor que sabía comunicar sus entusiasmos a quienes le rodeaban. Yo le debo favores inolvidables. Tras haberme apadrinado en la ceremonia de la investidura de doctor, me animó insistentemente durante mis ensayos de investigador, fortaleciendo mi confianza en las propias fuerzas. Las cartas con que acusaba recibo de mis publicaciones constituían para mí tónico moral de primer orden”. Otros discípulos de Maestre fueron el histopatólogo Manuel Tapia Serrano, Eduardo García Solá, catedrático de patología en Málaga, Leopoldo López García, catedrático de histología en Valladolid – donde fue el primer maestro de Río Hortega- y Luis Simarro. Una rama de la Escuela estuvo fundamentalmente integrada por Pedro Ramón y Cajal, Domingo Sánchez, Jorge Francisco Tello, Fernando de Castro y Rafael Lorente de No, todos ellos discípulos directos de Cajal. Aunque éste influyó decisivamente en ella, hay que diferenciarla de la rama encabezada sucesivamente por Simarro, Nicolás Achúcarro y Río Hortega, que puede llamarse “histopatológica”, sin olvidar sus importantes contribuciones a la histología normal. La separación entre ambas ramas fue el motivo básico del duro enfrentamiento de 1920 entre Cajal y Río Hortega, sobre el que se hicieron diversas suposiciones hasta que la cuestión quedó plenamente aclarada con la publicación en 1986 del manuscrito del Río Hortega *El maestro y yo*, junto a las cartas que ambos se cruzaron, en un volumen cuyo estudio introductorio escribió el Profesor Llombart Rodríguez.

En 1887, durante la misma temporada en Madrid en la que vio por última vez a Maestre de San Juan, Cajal estuvo en varios laboratorios histológicos que había en la ciudad, entre ellos, el de Luis Simarro. La estancia en este último influyó decisivamente en su trayectoria científica, decidiéndole a consagrarse a la investigación histológica del sistema nervioso.

Nacido en Roma en 1851, Luis Simarro Lacabra era hijo del pintor valenciano Ramón Simarro Oltra, quien entonces estaba pensionado en la capital italiana. Quedó huérfano a los tres años en trágicas circunstancias: su padre murió muy joven, víctima de la tuberculosis pulmonar, y su madre, trastornada por el fallecimiento, se suicidó. Acogido por un tío materno, tuvo una educación muy cuidada. Estudió, lo mismo que Peregrín Casanova y otros médicos darwinistas valencianos, en el Instituto Provincial de Segunda Enseñanza, de Valencia, y desde su adolescencia fue influido, además, por el círculo en torno a Vicente Boix Ricarte, catedrático de dicho centro y figura destacada del liberalismo progresista. Tras obtener el título de bachiller, en diciembre de 1867, por recomendación de Boix comenzó a dar clases de historia natural en el Colegio de San Rafael, pero fue expulsado por los religiosos que lo regentaban cuando descubrieron que estaba leyendo a Darwin y quizá difundiendo sus ideas. En el otoño de 1868, coincidiendo prácticamente con la revolución democrática, ingresó en la Facultad de Medicina, en la misma Valencia, donde tuvo entre sus maestros al naturalista Rafael Cisternas Fontseré y al clínico Joaquín Serrano Cañete, ambos darwinistas, quienes contribuyeron a profundizar su adhesión al evolucionismo. Por otra parte, se integró plenamente en el ambiente revolucionario, significándose muy pronto como un radical desde el punto de vista político e intelectual. Fue uno de los dirigentes de la juventud republicana local, estuvo en las barricadas durante el levantamiento de 1869, dio cursos sobre higiene laboral en el Centro Republicano de la Clase Obrera (1870-71) y publicó en el *Boletín-Revista del Ateneo Científico y Literario* una vibrante defensa del positivismo (1872). Resultó inevitable su enfrentamiento con los profesores de ideología política conservadora, uno de los cuales -el cirujano Enrique Ferrer Viñerta- le suspendió, a pesar de ser el alumno más brillante del curso.

Para terminar la carrera, Simarro se trasladó en el otoño de 1873 a Madrid, donde entró en relación con Pedro González de Velasco. Trabajó en el laboratorio micrográfico de su Museo Antropológico, enseñó en la Escuela Libre de Medicina y Cirugía que allí funcionaba y fue redactor de su revista *El Anfiteatro Anatómico Español*. Por otra parte, completó su formación, asistiendo a las sesiones de la Sociedad Histológica Española que había fundado Aureliano Maestre de San Juan. En 1876, al comenzar a funcionar la Institución Libre de Enseñanza, Simarro se encargó de dar en

ella cursos de divulgación científica y de fisiología del sistema nervioso. El mismo año, ganó una plaza en el Hospital de la Princesa y durante el siguiente fue nombrado director del Manicomio de Santa Isabel en Leganés. En esta última institución chocó bien pronto con las autoridades eclesiásticas, que le obligaron finalmente a dimitir en 1879. En sus publicaciones, cursos y conferencias de estos años anteriores a su estancia en París, Simarro se presentó como un seguidor del darwinismo, influido principalmente por la obra de Haeckel. Aparte de cuestiones generales y teóricas, se ocupó, desde una perspectiva evolucionista, de temas concretos de anatomía comparada, embriología e histología, sobre todo del sistema nervioso, basándose especialmente en los trabajos de Haeckel y Gegenbaur.

Desde 1880 a 1885, trabajó en París junto a figuras como Mathias Duval, Louis Antoine Ranvier, Jean Martin Charcot y Valentin Magnan. El primero confirmó su adhesión al darwinismo, tema sobre el que siguió publicando trabajos y pronunciando conferencias. Ranvier, además de perfeccionar su ya notable preparación de micrógrafo, le orientó de modo definitivo hacia la neurohistología. Charcot y Magnan fueron los principales responsables de su posterior orientación como neuropsiquiatra.

De regreso a Madrid, Simarro se consagró al ejercicio privado de la neuropsiquiatría, con una clientela que fue evolucionando y que, en los años finales de la centuria, era ya casi exclusivamente psiquiátrica. Como clínico, fue un fiel seguidor de las doctrinas de Emil Kraepelin, que combinó con los puntos de vista de sus maestros en París. Prestó especial atención a la relación entre la psiquiatría y el derecho penal, participando en numerosos casos, como el célebre del psicópata Cayetano Galeote, asesino del obispo de Madrid (1886). Encabezó la oposición de los médicos españoles a las teorías de Enrico Ferri y Cesare Lombroso, a pesar de lo cual, colaboró con los juristas partidarios de las mismas para promover la fundación de la Escuela de Criminología (1903), en la que fue profesor de psicopatología.

De acuerdo con los supuestos de su mentalidad como neuropsiquiatra, Simarro mantuvo un interés primordial por dos disciplinas básicas: la neurohistología y la psicología experimental. Varios de sus discípulos, como Nicolás Achúcarro y Gonzalo Rodríguez Lafora, ambos grandes figuras de la Escuela Histológica Española, cultivaron igual que él la psiquiatría y la investigación microscópica. Otros, en cambio, como José Sanchis Banús y José María Sacristán, se consagraron principalmente a la clínica.

Sin detenernos en sus ideas psicológicas, recordaremos que en 1902 ganó por oposición la cátedra de psicología experimental de la Universidad de Madrid, la primera de su clase en España. Creó después una fundación dotada de un laboratorio y una biblioteca importantes, que sirvió de núcleo originario a la constitución de la disciplina en España. Por otra parte, fue el principal impulsor de la Asociación Española para el Progreso de las Ciencias, que se fundó en 1907 y un año más tarde celebró su primer congreso, en el que Cajal pronunció el discurso inaugural y se encargó de resumir las comunicaciones de la Sección de Ciencias Naturales. También participó activamente, junto a Cajal y otras personalidades, en la organización inicial de la Junta para Ampliación de Estudios e Investigaciones Científicas.

En sus *Recuerdos*, Cajal se refirió a su primera estancia en el laboratorio de Simarro en los siguientes términos: “Debo a L. Simarro, el afamado psiquiatra y neurólogo de Valencia, el inolvidable favor de haberme mostrado las primeras buenas preparaciones con el proceder del cromato de plata, y de haber llamado la atención sobre la excepcional importancia del libro del sabio italiano, consagrado a la inquisición de la fina estructura de la sustancia gris. Merece contarse el hecho porque sobre haber tenido importancia decisiva en mi carrera, demuestra una vez más la potencia vivificante y dinámogena de las cosas vistas”. Se refería, por supuesto, a Camillo Golgi, con quien compartiría en 1906 el premio Nobel de medicina, a su tratado sobre la histología del sistema nervioso central (1886) y a su método de impregnación cromoargéntica, primera técnica que permitió teñir de modo preciso y selectivo las células nerviosas y sus prolongaciones. No suele tenerse en cuenta que Simarro le enseñó también entonces la técnica ideada por Carl Weigert y modificada por Jakob Pal, que tiñe con hematoxilina la mielina de las fibras nerviosas, utilizada asimismo durante largo tiempo por Cajal y sus discípulos. En sus *Recuerdos*, dice a continuación: “Entre otras visitas instructivas mencionaré la girada al Museo de Historia Natural, donde conocí al modestísimo cuanto sabio naturalista D. Ignacio Bolívar; la consagrada al Laboratorio de Histología de San Carlos, dirigido por el benemérito Dr. Maestre, y cuyo ayudante, el doctor López García, mostróme las

últimas novedades técnicas de Ranvier, de quien había sido devotísimo y aprovechado discípulo; la efectuada a cierto Instituto Biológico no oficial ... en el cual trabajaban varios jóvenes médicos, entre ellos el Dr. D. Federico Rubio y, sobre todo, D. Luis Simarro, recién llegado de París y entregado al noble empeño de promover entre nosotros el gusto hacia la investigación; y en fin, la realizada al laboratorio privado del prestigioso neurólogo valenciano, quien, por cultivar la especialidad profesional de las enfermedades mentales, se ocupaba en el análisis de las alteraciones del sistema nervioso (asistido, por cierto, de copiosísima biblioteca neurológica), ensayando paciente y esmeradamente cuantas novedades técnicas aparecían en el extranjero. Fue precisamente en casa del Dr. Simarro, donde por primera vez tuve ocasión de admirar excelentes preparaciones del método de Weigert-Pal, y singularmente, según dejó apuntado, aquellos cortes famosos del cerebro, impregnados mediante el proceder argéntico del sabio de Pavía", insistiendo en "la sorpresa sentida al conocer *de visu* la maravillosa potencia reveladora de la reacción crómo-argéntica".

"A mi regreso a Valencia -sigue diciendo Cajal en sus memorias- decidí emplear en grande escala el método de Golgi y estudiarlo con toda la paciencia de que soy capaz. Innumerables probaturas, hechas por Bartual y por mí, en muchos centros nerviosos y especies animales, nos convencieron de que el nuevo recurso analítico tenía ante sí brillante porvenir". Estos ensayos con su discípulo Juan Bartual Moret, quien sería luego el primer catedrático de histología de la Facultad de Medicina de Valencia, quedaron interrumpidos por el traslado de Cajal, a finales de aquel mismo año, a Barcelona, ciudad que iba a ser el escenario de una etapa radicalmente distinta de su trayectoria científica.

La vinculación de Cajal al grupo de médicos y científicos de orientación experimentalista al que perteneció durante su estancia en Valencia se mantuvo durante largo tiempo, tanto en Barcelona como después de su traslado a Madrid. Ello explica que enviara libros suyos dedicados a la Facultad de Medicina de Valencia, que cuatro de sus primeros trabajos con el método de Golgi aparecieran en el *Boletín del Instituto Médico Valenciano*, y en *La Crónica Médica*, y que expusiera por vez primera la ley de la polarización dinámica de las neuronas –una de sus aportaciones teóricas más importantes– en una comunicación que presentó al Primer Congreso Médico Farmacéutico Regional celebrado en Valencia en julio de 1891 y que se publicó después en sus actas. La tituló "Comunicación acerca de la significación fisiológica de las expansiones protoplasmáticas y nerviosas de las células de la sustancia gris" y es actualmente considerada un texto clásico crucial de las neurociencias contemporáneas.

A partir de 1887, Cajal y Simarro se mantuvieron en relación, directamente y a través de la correspondencia. El primero se refiere en sus *Recuerdos* a una carta que le dirigió en 1889 el neuropsiquiatra valenciano que no ha sido localizada: "A [las] veleidades de la impregnación crómo-argéntica se debió, sin duda, el que Simarro, introductor en España de los métodos y descubrimientos de Golgi, abandonara desalentado sus ensayos. En carta suya de 1889 me decía: 'Recibí su última publicación sobre la estructura de la médula espinal, que me parece un trabajo notable, mas no convincente, a causa del método de Golgi, que aun en sus manos de usted, que tanto lo ha perfeccionado, es, más que demostrativo, un método sugestivo'. Desgraciadamente, Simarro, dotado de un gran talento, carecía de la perseverancia, la virtud de los modestos".

La relación entre Simarro y Cajal atravesó un período de tensión con motivo de las oposiciones a la cátedra de histología y anatomía patológica de la Facultad de Medicina, de Madrid, que quedó vacante tras el fallecimiento de Maestre de San Juan en 1890. La llamada Universidad Central, con todas sus limitaciones, ofrecía entonces a un profesor consagrado a la docencia y la investigación unas posibilidades claramente superiores a las del resto del país, calificadas "de provincianas" desde la tajante perspectiva centralista que dominaba la organización de la enseñanza en todos sus niveles. Deseoso de aprovechar dichas posibilidades, Cajal presentó a finales de septiembre del citado año la solicitud para presentarse a las correspondientes oposiciones, que habían sido convocadas dos meses antes. La plaza hubiera podido cubrirse mediante concurso de traslado, pero lo impidió la lucha por el poder académico que entre los mandarines universitarios solía desencadenar el acceso a las cátedras madrileñas. En una carta que Simarro escribió a Cajal en junio de dicho año, poco antes de que apareciera la convocatoria de las oposiciones, describió la situación y le dijo que no se presentaría si él lo hacía a pesar de cual acabó presentándose. Dadas las circunstancias, no resulta extraño que se llegara a un enfrentamiento crispado, en el que participaron muy diversos grupos científicos, intelectuales y políticos. El hecho de que algunos miembros de los tribunales designados

hubieran sido discípulos de Cajal motivó su recusación, lo que hizo suspender varias veces las oposiciones, que no concluyeron hasta comienzos de 1892.

A pesar de todo, la amistad de Cajal y Simarro no llegó a romperse. En los años de transición del siglo XIX al XX continuó su relación directa y epistolar, mientras Cajal se refería a "mi amigo el Dr. Simarro" en su correspondencia con Gustaf Retzius y otros histólogos extranjeros. Ello explica que Simarro publicara en la revista de Cajal y demostrara públicamente en su laboratorio un método de tinción que había ideado y con el que volvió a influir de modo decisivo en la trayectoria científica de éste.

Cuando terminó la publicación de su gran obra *La textura del sistema nervioso*, en 1904, Cajal había alcanzado brillantemente la meta que se había propuesto con el examen sistemático de todos los territorios nerviosos con el método de Golgi: demostrar la individualidad de las neuronas, aclarar su génesis y ofrecer un modelo estructural del funcionamiento del sistema. Sin embargo, poco antes se le había planteado la necesidad de conocer la estructura interna de la célula nerviosa, problema para el que le resultaba indispensable una nueva técnica. En 1896 había dedicado a la cuestión un trabajo titulado *Estructura del protoplasma nervioso*, que presentó a la Sociedad Española de Historia Natural y que después apareció en sus *Anales*, publicándose también el mismo año en la *Revista Trimestral Micrográfica* que acababa de fundar, así como una traducción alemana. En él resumió con cierta amplitud el resultado de unas investigaciones de Simarro que éste, según su costumbre, no había dado a conocer directamente, sino a través de una tesis doctoral. Consistía en que "Los husos cromáticos faltan por completo en el arranque y trayecto del cilindro-eje, hallándose constantemente en el cuerpo celular y porción inicial de las prolongaciones protoplásmicas. Estas investigaciones de Simarro son tanto más interesantes, cuanto que han sido hechas en estado fresco a favor de un modo especial de aplicación del azul de metileno ... método que, dicho sea de paso, excluye la idea de que los husos cromáticos se deban a la acción coagulante del alcohol o bicloruro de mercurio". Un año después, Simarro realizó un trabajo, asimismo relativo a la estructura interna de la célula nerviosa, sobre el que informó en una carta a Cajal, escrita a finales de abril, que refleja de modo muy expresivo la manera en la que le comunicaba el resultado de sus investigaciones: "Amigo Cajal: no sabe cuanto siento no haber podido terminar el trabajo sobre la lombriz de tierra. Pero si Vd. no publica enseguida su revisión, es posible que llegue a tiempo para que Vd. lo utilice. Tengo hecha una lámina principal, y como ahora terminan las lecciones del Ateneo, espero tener más tiempo para ocuparme de este asunto que me parece de interés, pues resulta que las fibras de la lombriz son en verdad tubos que contienen una sustancia granulosa central y también una fibra espiral. Las impregnaciones argénticas de Retzius son (sin duda en algunos casos) de neuroglia. No le envió a Vd. el dibujo por temor de no poder terminar ahora el escrito; pero si Vd. lo quiere se lo remitiré para que vayan preparando el cliché. Le doy a Vd. las gracias por los 2 tomos de Retzius que le envió. No creo que los necesite más, pues los resultados que he obtenido van por muy diferente camino". Como tantos otros trabajos suyos de los que daba noticia a sus discípulos y colegas, Simarro no llegó a publicar el relativo a la lombriz de tierra, pero sí envió sus materiales a Cajal. En una carta a Gustaf Retzius de 2 de enero de 1898, éste le dijo: "La fibra espinal del axón hace más de 1 año que pude observarla ya en preparaciones de la lombriz de tierra ejecutadas por mi amigo el Dr. Simarro, con ayuda de un método especial (coloración por el ácido ósmico y el ácido pirogálico). Estas preparaciones no se muestran, sin embargo, muy demostrativas en lo relativo a las fibras intraprotoplasmáticas".

La necesidad de conocer la estructura interna de las células nerviosas pasó a primer plano porque se hicieron críticas frontales a la teoría de la neurona, reformulando la teoría reticular sobre la base de que las neurofibrillas existentes en su interior formaban una red continua interneuronal que sería responsable del impulso nervioso. La cuestión fue principalmente planteada por István Apáthy, Albrecht Bethe y Hans Held en los primeros años del siglo XX, con la consecuencia de que muchos neurohistólogos pusieron en duda la teoría de la neurona y algunos la abandonaron abiertamente.

Convencido de que la solución del problema residía en "contemplar las susodichas neurofibrillas en preparaciones irreprochables", lo que en modo alguno habían conseguido los seguidores del reticularismo, Cajal trabajó intensamente en busca de la técnica de tinción apropiada. Tras numerosos ensayos infructuosos la encontró, por fin, en octubre de 1903, partiendo del "proceder fotográfico" original de Luis Simarro, quien lo había dado a conocer tres años antes en un artículo

publicado en la *Revista Trimestral Micrográfica*, del propio Cajal. La importancia de la técnica residía en que se conseguía con ella impregnar las neurofibrillas, permitiendo así investigar su disposición en el interior de las células nerviosas y sus prolongaciones, mientras que el método de Golgi solamente ofrecía imágenes del perfil de las mismas. En sus *Recuerdos*, Cajal afirmó: "Consagré en 1903 particular atención al método del doctor Simarro, primer autor que logró teñir las neurofibrillas mediante las sales de plata. Consta la técnica del ilustre neurólogo español de seis operaciones esenciales", que detalló a continuación.

En el XIX Congreso Internacional de Medicina celebrado en Madrid en abril de 1903, Cajal presentó unas *Consideraciones críticas sobre la teoría de A. Bethe acerca de la estructura y conexiones de las células nerviosas*, que fueron seguidas por comentarios de Luis Simarro y el belga Arthur van Gehuchten favorables a la teoría neuronal y del italiano Arturo Donaggio, que mantuvo una posición ambigua. Entre los congresistas españoles destaca Cajal en sus memorias "muy señaladamente al Dr. Simarro, quien en presencia de numerosos sabios extranjeros mostró, en el Laboratorio de Investigaciones Biológicas, excelentes preparaciones de la red neurofibrilar con un método original". Tras analizarlo meticulosamente, Cajal introdujo una modificación del "proceder fotográfico" de Simarro: el célebre método del nitrato de plata reducido.

La muerte de Simarro en 1921 le impidió leer el generoso reconocimiento que Cajal hizo, en la edición de 1923 de sus *Recuerdos*, de la influencia que había ejercido sobre su obra. A ello se refiere en una carta que escribió el 8 agosto de 1922 a Carlos María Cortezo, uno de los mejores amigos de ambos: "Oportuno y justo está usted al hablar de Simarro, que no ha sido apreciado en toda su valía por haberse dejado prender en las redes de la 'Institución Libre', uno de cuyos cánones sacrosantos consiste en estudiar y no escribir. Yo procuraré siempre hacer justicia al que, discípulo de Ranvier, trajo de París la buena nueva de la histología, esparciéndola a los cuatro vientos y beneficiándonos a todos. De su generoso magisterio guardo los mejores recuerdos y así, en mi autobiografía procedí como con todos aquellos sabios a quienes debí el inestimable favor de una enseñanza práctica. Desgraciadamente, Simarro, que fue uno de mis íntimos amigos antes de las oposiciones, se apartó después un tanto de mí, aunque sin romper jamás del todo vínculos de compañerismo y confraternidad y murió sin haber leído mis "Recuerdos" y sin saber lo mucho que yo le veneraba y quería".

Las raíces no pueden ser más directas: Maestre, Simarro, Achúcarro, Río Hortega, Llombart Rodríguez. La obra científica del nuevo académico tampoco ha "surgido por generación espontánea".