

07/183

T.U.  
C/183



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA  
NORMAL Y PATOLÓGICA**

**TESIS DOCTORAL**

**“TIMOMAS: ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO  
Y VALOR PRONÓSTICO DE LAS  
CLASIFICACIONES DE MÜLLER-HERMELINK  
Y DE ROSAI-LEVINE”**

**INMACULADA CATALINA FERNÁNDEZ  
SEVILLA, 1998**



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA  
Dpto. de Citología e Histología  
Normal y Patológica

Prof. Hugo Galera Davidson

Avda. Sánchez Pizjuán, s/nº  
41009 Sevilla

Tfs. (34) 95 4371284  
(34) 95 4557451  
Fax. (34) 95 4371284

**DON HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRÁTICO DE HISTOLOGÍA Y EMBRIOLOGÍA GENERAL Y ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y DON JOSÉ LUIS VILLAR RODRÍGUEZ, PROFESOR ASOCIADO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,**

**CERTIFICAN:** Que bajo su dirección y en el Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica de esta Facultad de Medicina, ha sido realizado el trabajo titulado: **"TIMOMAS: ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO Y VALOR PRONÓSTICO DE LAS CLASIFICACIONES DE MÜLLER-HERMELINK Y DE ROSAI-LEVINE"** por **Dña. INMACULADA CATALINA FERNÁNDEZ** para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Sevilla, a treinta y uno de Julio de mil novecientos noventa y ocho.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral  
al folio 13 número 322 del libro  
correspondiente. **07 SET. 1998**  
Sevilla, \_\_\_\_\_

El Jefe del Negociado de Tesis.

## -.INDICE.-

<b>I.- INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>I.1.- EMBRIOLOGIA DEL TIMO</b>	<b>1</b>
<b>I.2.- ANATOMIA DEL TIMO</b>	<b>4</b>
I.2.1- Morfología general	4
I.2.2- Situación y relaciones	4
I.2.3- Vascularización e inervación	4
I.2.4- Peso y tamaño	5
<b>I.3.- HISTOLOGIA DEL TIMO</b>	<b>7</b>
I.3.1- Patrón estructural	7
I.3.2- Células epiteliales	7
I.3.3- Linfocitos T	11
I.3.4- Linfocitos B	13
I.3.5- Otros tipos celulares	14
I.3.6- Cambios con la involución	16
I.3.7- Hiperplasia tímica	17
<b>I.4.- NEOPLASIAS EPITELIALES DEL TIMO</b>	<b>19</b>
I.4.1- Concepto de timoma	19
I.4.2- Epidemiología	20
I.4.3- Clínica	20
I.4.4- Clasificación de los timomas	24
I.4.5- Anatomía Patológica de timomas	27
I.4.5.1- Características macroscópicas	27
I.4.5.2- Características histológicas	27
I.4.5.2.1- Clasificación de Rosai y Levine	27
a) Timoma encapsulado y timoma maligno I	28
b) Carcinoma tímico o timoma maligno II	30
I.4.5.2.2- Clasificación de Müller-Hermelink	32
a) Timoma cortical	32
b) Timoma organoide	33
c) Timoma medular	34
d) Timoma mixto	35
e) Carcinoma tímico bien diferenciado	37
f) Carcinoma tímico de alto grado	38
I.4.6- Estudios inmunohistoquímicos	39
I.4.6.1 Células epiteliales	39
I.4.6.2 Linfocitos	40
I.4.6.3 Matriz extracelular	42
I.4.6.4 Otras células	42
I.4.7- Factores pronósticos	43
I.4.7.1- Factores clínicos	43
I.4.7.1.1- Edad	43
I.4.7.1.2- Miastenia Gravis	43
I.4.7.1.3- Invasión	44

I.4.7.2-	Factores histológicos.....	45
I.4.7.3-	Otros factores pronósticos.....	47
I.4.7.3.1-	Citometría de flujo.....	47
I.4.7.3.2-	Análisis morfométrico.....	48
I.4.7.3.3-	Proliferación celular.....	49
I.4.7.3.4-	Metalotioneinas.....	51
I.4.7.3.5-	E-caderina y cateninas.....	52
I.4.7.3.6-	Oncogenes.....	53
<b>II.-</b>	<b><u>PLANTEAMIENTO DEL TEMA</u></b> .....	<b>58</b>
<b>III.-</b>	<b><u>MATERIAL Y METODOS</u></b> .....	<b>61</b>
III.1-	MATERIAL.....	62
III.2-	PROTOCOLO DE ESTUDIO CLINICO.....	62
III.2.1-	Datos epidemiológicos.....	62
III.2.1-	Datos clínicos.....	62
III.3-	PROTOCOLO DE ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO....	63
III.3.1-	Estudio macroscópico.....	63
III.3.2-	Estudio histológico.....	63
III.4-	PROTOCOLO DE ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO...	63
III.4.1-	Panel de anticuerpos utilizados.....	63
III.4.2-	Técnica empleada.....	64
III.5-	VARIABLES ANALIZADAS Y METODOLOGIA DE ESTUDIO.....	64
III.5.1-	Reproducibilidad histológica de la clasificación de Müller-Hermelink.....	64
III.5.2-	Variables analizadas en relación con ambas clasificaciones.....	65
III.5.2.1-	Características clínicas.....	65
III.5.2.1-	Estadio.....	65
III.5.2.3-	Evolución.....	65
III.5.2.4-	Marcadores pronósticos.....	66
III.6-	METODO ESTADISTICO.....	66
III.6.1-	Estadística descriptiva.....	66
III.6.2-	Estadística comparativa.....	66
III.7-	BIBLIOGRAFIA.....	67
<b>IV.-</b>	<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>68</b>
IV.1-	ESTUDIO CLINICO GENERAL.....	69
IV.2-	ESTUDIO MACROSCOPICO GENERAL.....	70
IV.3-	REPRODUCIBILIDAD HISTOLOGICA DE LA CLASIFICACION DE MÜLLER-HERMELINK.....	70
IV.4-	CLASIFICACION HISTOLOGICA DE LOS TUMORES...	70

IV.4.1-	Clasificación de Müller-Hermelink.....	70
IV.4.2-	Clasificación de Rosai y Levine.....	71
<b>IV.5-</b>	<b>RELACION DE FACTORES CLINICOS TIPOS HISTOLOGICOS.....</b>	<b>71</b>
IV.5.1-	Edad.....	71
IV.5.2-	Sexo.....	72
IV.5.3-	Myastenia grave.....	73
IV.5.4-	Estadio.....	74
IV.5.5-	Evolución.....	75
<b>IV.6-</b>	<b>RELACION ENTRE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS Y TIPOS HISTOLOGICOS.....</b>	<b>77</b>
IV.6.1-	Expresión de Ki-67.....	77
IV.6.2-	Expresión de p53.....	78
IV.6.3-	Expresión del EGFR.....	79
IV.6.4-	Expresión de bcl-2.....	81
<b>V.-</b>	<b><u>DISCUSION</u></b> .....	<b>82</b>
<b>V.1-</b>	<b>REPRODUCIBILIDAD HISTOLOGICA DE LA CLASIFICACION DE MÜLLER-HERMELIN.....</b>	<b>83</b>
<b>V.2-</b>	<b>RELACION ENTRE AMBAS CLASIFICACIONES.....</b>	<b>87</b>
<b>V.3-</b>	<b>RELACION ENTRE FACTORES CLINICOS Y TIPOS HISTOLOGICOS.....</b>	<b>88</b>
V.3.1-	Sexo.....	88
V.3.2-	Edad.....	89
V.3.3-	Myastenia gravis.....	92
V.3.4-	Estadio.....	94
V.3.5-	Evolución.....	98
<b>V.4-</b>	<b>RELACION ENTRE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS Y TIPOS HISTOLOGICOS.....</b>	<b>99</b>
V.4.1-	Expresión de citoqueratina 34BE12 y Tdt..	99
V.4.2-	Expresión de Ki-67.....	101
V.4.3-	Expresión de p53.....	104
V.4.4-	Expresión de EGFR.....	106
V.4.5-	Expresión de bcl-2.....	107
V.4.6-	Relación entre la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos.....	109
<b>VI.-</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>111</b>
<b>VII.-</b>	<b><u>ICONOGRAFIA</u></b> .....	<b>114</b>
<b>VIII.-</b>	<b><u>BIBLIOGRAFIA</u></b> .....	<b>120</b>

## **I. INTRODUCCION.**

### I.1.- EMBRIOLOGIA DEL TIMO.

El timo es un órgano especializado derivado de la tercera y, en menor extensión, de la cuarta bolsas faríngeas, que contiene elementos de las tres capas germinales y comparte un origen común con las glándulas paratiroides inferiores.

Durante la sexta semana de gestación, la porción ventral de la tercera bolsa forma una saculación pronunciada que dará lugar al primordio tímico. Se postula que, al mismo tiempo, el seno cervical lo reviste de una capa de células ectodérmicas (1).

Los esbozos tímicos migran en dirección caudal y medial como cordones o túbulos epiteliales hasta alcanzar el mediastino anterior donde proliferan y, tras perder su conexión con la luz de la faringe primitiva, se fusionan en la línea media. En este momento, los elementos mesenquimales circundantes forman una cápsula que emite septos y divide la glándula en lóbulos (2).

Sobre la novena-décima semana, los túbulos epiteliales proliferados son infiltrados por linfocitos y vasos sanguíneos, diferenciándose en la glándula una corteza y una médula (3) y apareciendo entonces las formaciones que darán origen a los corpúsculos de Hassall. La glándula alcanza su

desarrollo completo entre 14-16 semana de gestación (4).

El desarrollo de las estructuras epiteliales del timo ha sido objeto de controversia (5). Actualmente se admite que tanto el ectodermo como el endodermo contribuyen al desarrollo del componente epitelial del timo. Lobach y Haynes (6), basándose en estudios inmunohistoquímicos, proponen un origen ectodérmico de las células epiteliales subcapsulares y medulares y un origen endodérmico de las células corticales. Estudios recientes sobre la expresión de diversas proteínas y factores del crecimiento favorecen la hipótesis anterior al demostrar expresión positiva en células subcapsulares y medulares y negativa en células corticales (7,8,9).

El origen de los linfocitos también ha sido objeto de discusión. El timo es, durante la vida embrionaria, el primer órgano linfoide en el que aparecen linfocitos y el más activo de los tejidos linfopoyéticos. En la actualidad se acepta que los linfocitos derivan de células de la médula ósea que se diferencian en el microambiente creado por el epitelio tímico en desarrollo (2,3,5,10). Los linfocitos tímicos se han denominado también timocitos, término ahora restringido a los linfocitos tímicos T inmaduros (3).

#### **Anomalías en el desarrollo embriológico.**

Alteraciones en el desarrollo pueden dar origen a malformaciones congénitas (2,4). Una de las más frecuentes,

fácilmente explicable por la relación existente entre los dos órganos durante el desarrollo, es la presencia de tejido paratiroideo dentro del timo, en la cápsula o en estrecha proximidad con él (11).

También el timo puede aparecer en localización ectópica como consecuencia de un fallo en la migración (2). Nódulos ectópicos se han descrito en localizaciones como pulmón o base del cráneo aunque la localización más frecuente es la región cervical, en relación o no con las glándulas paratiroides y tiroides. Estos nódulos pueden sufrir cambios quísticos o dar origen a tumores (11-15).

\*\*\*

## **I.2.- ANATOMIA DEL TIMO.**

### **I.2.1. Morfología general**

La glándula tímica tiene una configuración piramidal y está formada por dos lóbulos fusionados englobados por una cápsula fibrosa.

El timo completamente desarrollado del niño tiene un color rosado que se vuelve gris tras la fijación en formol. Con el aumento de edad adquiere un color amarillo al ser el parénquima tímico sustituido por tejido adiposo (3,16,17).

### **I.2.2. Situación y relaciones**

Se encuentra situado en la parte más craneal y ventral del mediastino anterior. Su cara anterior está en relación con la cara dorsal del manubrio esternal y la parte interna de los primeros espacios intercostales. La cara profunda está en relación con la fascia pretraqueal que la separa de los grandes vasos. Sus caras laterales se relacionan con la pleura mediastínica (4,16,17).

### **I.2.3. Vascularización e inervación**

La irrigación arterial del timo deriva principalmente de ramas de las arterias mamaria interna, tiroideas superior e inferior y pericardiofrénicas. Los vasos entran por las trabéculas fibrosas y, en el córtex, están separados del

parénquima tímico por una sola capa de células epiteliales unidas por desmosomas. Esta configuración anatómica única es la responsable del concepto "barrera timo-sangre". Se ha demostrado la entrada de antígenos al timo por vía transcapsular o medular. El drenaje venoso se realiza a través de una sola vena (gran vena de Keynes), tributaria de la vena braquiocefálica.

Los vasos linfáticos se encuentran en los septos conjuntivos y están ausentes del interior del parénquima. Estos linfáticos drenan en los ganglios paraesternales, traqueo-bronquiales y mediastínicos anteriores.

La inervación corre a cargo de nervios simpáticos originados en ganglios torácicos y nervios parasimpáticos del vago, laríngeo recurrente y frénico (3,4,17).

#### **I.2.4. Peso y tamaño**

El timo crece rápidamente en el útero hasta alcanzar su mayor peso en proporción al peso del cuerpo al nacer. Tras el nacimiento continúa aumentando hasta la pubertad para sufrir posteriormente una atrofia progresiva hasta aproximadamente los sesenta años (10).

La velocidad de crecimiento tímico en el niño y de involución en el adulto son extremadamente variables, siendo muy difícil conocer el peso adecuado para una edad determinada. El peso aproximado en las diferentes edades es de 12-

15 gramos al nacer, 30-40 gramos en la pubertad y 10-15 gramos a los sesenta años (18).

El tamaño tímico varía también mucho de un individuo a otro y, a una edad determinada, un paciente puede tener una glándula mayor o menor de lo esperado. Sin embargo, la idea de que el timo desaparece en la vida adulta no se acepta actualmente y varios estudios han demostrado que la glándula, aunque atrófica, persiste durante toda la vida (3).

\*\*\*

### I.3.- HISTOLOGIA DEL TIMO

#### I.3.1. Patrón estructural

La unidad básica estructural del timo es el lóbulo. Cada lóbulo está compuesto de dos compartimentos morfológicamente distintos que pueden reconocerse fácilmente en las secciones histológicas: una corteza, con predominio de las células linfoides sobre las epiteliales, y una médula, en el centro del lóbulo, con predominio de las células epiteliales.

Los lóbulos están parcialmente rodeados por septos fibrosos de forma que las áreas medulares se continúan de un lóbulo a otro proporcionando al órgano una configuración característica (3,10,17).

#### I.3.2. Células epiteliales

Tradicionalmente las células epiteliales del timo se clasificaban en corticales y medulares. En la actualidad y en base a estudios histológicos y de expresión antigénica, se reconocen cuatro tipos de células epiteliales: subcapsulares, corticales internas, medulares y células de los corpúsculos de Hassall (3).

Las células **corticales internas** son células grandes con núcleo redondo u oval, cromatina laxa y nucléolo prominente. Las células **subcapsulares** se localizan en la periferia

del lóbulo tímico formando una capa de células planas, más pequeñas, situadas sobre una membrana basal continua. Ambos tipos de células se caracterizan ultraestructuralmente por presentar escasas organelas, filamentos intermedios y largas proyecciones citoplasmáticas recubiertas de material tipo membrana basal (2,19). Otro tipo de célula epitelial también presente en la corteza son las denominadas células "nodriza". Estas células contienen en su citoplasma grupos de linfocitos T inmaduros con actividad mitótica. Se cree que juegan un papel importante en la diferenciación y maduración de las células T (17).

En la **médula**, las células epiteliales son más polimorfas. Aunque pueden existir células similares a las corticales, las células epiteliales predominantes presentan un citoplasma eosinófilo y fusiforme con núcleos más pequeños, ovales o fusiformes, cromatina grosera y uno o dos pequeños nucléolos. Ultraestructuralmente, contienen tonofilamentos, desmosomas prominentes y proyecciones citoplasmáticas más cortas (2,19).

Los **corpúsculos de Hassall** constituyen la característica microscópica del timo más fácilmente identificable. Se localizan en la médula y son estructuras complejas formadas por células epiteliales dispuestas en capas concéntricas. Estas células presentan positividad intensa a queratinas de alto peso molecular consideradas como marcadores de la ma-

duración epitelial terminal (20). Los corpúsculos de Hassall pueden presentar variaciones morfológicas como degeneración quística, calcificación distrófica e infiltrados por linfocitos, histiocitos y eosinófilos, secundarias a cambios reactivos. Ultraestructuralmente presentan complejos procesos interdigitantes con desmosomas prominentes (2). Se ha descrito la presencia de inmunoglobulinas en estas estructuras (21).

Algunas de las características antigénicas de las distintas subpoblaciones epiteliales se expresan en la TABLA I (3,17,22).

Desde el punto de vista funcional, las células epiteliales crean un microambiente fundamental para la maduración de las células T. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado la presencia de timulina, timosina alfa-1, timosina beta-3, timopoyetina, factor humoral tímico y factor sérico tímico en las células epiteliales subcapsulares y medulares, representando estos dos subtipos celulares la porción funcional (secretora) del timo. Mediante la secreción de estas hormonas estas células inducen la proliferación y diferenciación de las células precursoras linfoides en células T postímicas (4,17).

TABLA I

CELULAS EPITELIALES DEL TIMO: CARACTERISTICAS ANTIGENICAS.

<u>ANTIG.</u>	<u>SUBCAPSUL.</u>	<u>CORT. INTERN.</u>	<u>MEDUL.</u>	<u>C.HASSALL</u>
K.POL	+	+	+	++
K.AE-1	+	+	-	-
K.AE-2	-	-	-	+
K.AE-3	+	+	+	-
A2B5	+	-	+	-
TE-4	+	-	+	-
Anti p19	+	-	+	-
HLA-I	+	+	+	-
HLA-II	+	+	-	-
TE-3	-	+	-	-
LEU 7	+	-	-	-
PE-35	-	-	+	-

A2B5: Antic.contra un gangliósido presente en neuronas.

TE-4: Antic. contra células epiteliales tímicas.

Anti p19: Antic. que define la proteína del core del HTLV.

HLA-I: Antígeno de histocompatibilidad clase I.

HLA-II: Antígeno de histocompatibilidad clase II.

TE-3: Antic. contra estroma tímico humano.

LEU 7 (CD57): Antígeno de diferenciación encontrado en células neuroendocrinas y células NK.

PE-35: Antic. contra el epitelio medular tímico.

### I.3.3. Linfocitos T.

Los linfocitos constituyen la población celular predominante en la corteza tímica donde pueden ser de tamaño pequeño, mediano y grande. En la región subcapsular se localizan los linfoblastos, células mitóticamente activas que representan el 15% de la población linfoide. Se caracterizan por un citoplasma amplio y basófilo y núcleo redondo u oval con uno o dos nucléolos prominentes. La mayoría de los linfocitos corticales mueren "in situ" por un proceso de apoptosis, produciéndose fenómenos de linfolisis y fagocitosis por los macrófagos corticales. Se especula que este proceso tendría como fin la eliminación de linfocitos autoinmunes (1,2,3).

En la médula, los linfocitos son más pequeños, con características de linfocitos maduros y no presentan mitosis (2,19).

La población linfoide del timo muestra una marcada heterogeneidad inmunofenotípica y puede dividirse en tres tipos según el estadio de maduración. Las características antigénicas de los tres tipos se exponen en la TABLA II. De los marcadores expuestos, aquellos que pueden distinguir específicamente entre linfocitos T corticales y medulares son CD1, CD38, CD14 y TdT. Los linfocitos medulares (CD3 positivos) pueden reaccionar con CD8 o CD4 pero no con ambos, difiriendo en ésto de los corticales que presentan reacti-

vidad simultánea a ambos (3,23).

Estudios realizados sobre timomas han intentado establecer una correlación entre la apariencia morfológica del tumor epitelial y el grado de maduración de la población linfoide acompañante. Así, en los timomas con abundantes linfocitos, éstos tienen fenotipo de linfocitos corticales y se piensa que estos tumores recapitulan la estructura del compartimento cortical del timo. Por otra parte, los timomas con pocos linfocitos y gran componente epitelial simularían la médula del timo normal (23,24,25).

TABLA II

SUBPOBLACIONES LINFOIDES DEL TIMO: CARACTERISTICAS ANTIGENICAS.

<u>ANTIG.</u>	<u>SUBCAPSULARES</u>	<u>CORTICALES</u>	<u>MEDULARES</u>
<u>Tdt</u>	+	+	-
<u>CD5</u>	+	+	+
<u>CD8</u>	+	+	+/-
<u>CD4</u>	+	+	+/-
<u>CD3</u>	+	+	+
<u>CD2</u>	+	+	+
<u>CD1</u>	+	+	-
<u>CD7</u>	+	+	+
<u>CD14</u>	-	+	-
<u>CD38</u>	-	+	-

#### I.3.4. Linfocitos B

Linfocitos B pueden encontrarse en el timo formando folículos linfoides o como células aisladas.

Folículos linfoides con centros germinales activos existen en timos normales, especialmente en niños y adolescentes. Estudios ultraestructurales han demostrado su localización en los espacios perivasculares, espacios claramente separados del parénquima tímico por una membrana basal identificada con anticuerpos contra laminina y colágeno IV. Estos centros germinales se encuentran aumentados en pacientes con miastenia gravis y otras enfermedades autoinmunes, pero su presencia en un timo sin otras alteraciones no implica la existencia de un desorden inmunológico subyacente (1,17,26,27).

Linfocitos B aislados se encuentran en el timo normal adulto y fetal. Se encuentran también aumentados en la miastenia gravis, aumento considerado por algunos como más específico de la enfermedad. Se han descrito dos tipos celulares morfológicamente distintos: células con morfología claramente linfoide que se localizan en septos, unión cortico-medular y ocasionalmente en médula, y células más grandes, con proyecciones citoplasmáticas, que tienden a agruparse alrededor de los corpúsculos de Hassall. Estas células, denominadas por algunos células asteroides, presentan evidencia de activación y un inmunofenotipo particu-

lar no descrito en otras células B (positividad para CD19, CD20, CD22 e Ig M; negatividad para CD21, CD35 y KB 61) (28, 29). La histogénesis de las células asteroides no esta clara, relacionándolas algunos autores con las células B monocitoides del ganglio con las que comparten características morfológicas e inmunohistoquímicas. Otra subpoblación celular con inmunofenotipo de células B de la zona del manto se ha detectado también en el tejido conectivo de septos interlobulares en jóvenes y adultos (29).

El papel de los linfocitos B en el timo no está establecido claramente. Una posibilidad es que actúen como presentadoras de antígenos a las células T como parte del proceso educacional de éstas que conlleva la eliminación de clonas reactivas a antígenos propios (28,29).

#### **I.3.5. Otros tipos celulares**

Los eosinófilos son frecuentes en niños y ocasionales en adultos. Se localizan normalmente en los septos y médula aunque, a veces, pueden observarse en el interior de los corpúsculos de Hassall (2).

Las células neuroendocrinas son análogas embriológica y funcionalmente a las células C del tiroides (2). Se han descrito células con inmunoreactividad a oxitocina, vasopresina, neurofisina y otros neuropéptidos en médula, región subcapsular y, con mucha menor frecuencia, corteza

tímica (3). Se cree que el timo es el lugar de origen de la mayoría de los carcinoides mediastínicos: su localización en mediastino anterior, el hallazgo de tejido tímico alrededor de estos tumores y la presencia de las células descritas previamente sugieren un origen tímico (30,31).

Los **mastocitos** se localizan en los septos, en disposición perivascular. Estan aumentados en pacientes con inmunodeficiencia severa combinada y alinfoplasia tímica (32).

Los **macrófagos** presentan actividad fagocítica y son alfa-naftil-acetato-esterasa positivos, fosfatasa ácida negativos y HLA-DR negativos. Se localizan en corteza (1).

Las **células reticulares interdigitantes** están localizadas en médula y unión cortico-medular. Son HLA-DR y S-100 positivas (1,17).

Las **células de Langerhans** se localizan en médula y se encuentran aumentadas en la miastenia gravis. Se han descrito casos de afectación focal del timo por histiocitosis X en pacientes con Miastenia y, en niños, casos de histiocitosis X sólo con afectación mediastínica (3,33,34).

Aunque la presencia de **células germinales** no ha sido demostrada, se presume que puede ser otro elemento celular tímico por el hecho de que casi todos los tumores de células germinales mediastínicos se originan dentro del timo (2).

Las **células plasmáticas** son raras, normalmente se en-

cuentran en médula y septos. Aumentan con la involución y en enfermedades como miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico y anemia hemolítica autoinmune (35).

Las **células mioides** se encuentran en la médula, en pequeños grupos adyacentes a los corpúsculos de Hassall y son más frecuentes en recién nacidos y niños (1). Estas células reaccionan con anticuerpos frente a mioglobina, actina, desmina, componente M de creatin-kinasa y beta-enolasa. Ultraestructuralmente contienen tono y miofilamentos y, en ocasiones, desmosomas de unión con células epiteliales por lo que algunos autores piensan que ambos tipos celulares tienen un origen común en una célula madre pluripotencial (2,36,37).

El hecho de que las células mioides esten aumentadas en el timo de pacientes con miastenia gravis (38,39) y pacientes con hiperplasia tímica (40), sugiere que juegan un papel importante en los mecanismos de inmunoregulación.

#### **I.3.6. Cambios histológicos con la involución**

El timo experimenta un lento proceso fisiológico de involución con la edad que se acompaña de cambios graduales en la población de linfocitos y de alteraciones de las células epiteliales.

Los cambios más precoces consisten en una disminución en el número de linfocitos corticales con preservación de los

elementos epiteliales. Sin embargo, los cambios histológicos más llamativos están relacionados con la disposición y características citológicas de las células epiteliales, adquiriendo algunas células una apariencia mesenquimal, fusiforme, mientras otras forman pseudorosetas (26).

Un tipo de cambio no relacionado con la edad es la denominada **involución accidental o por stress**. En ésta se observa una prominente cariorrexis de linfocitos con fagocitosis de éstos por macrófagos y aspecto característico "en cielo estrellado" en la corteza tímica. Si el estímulo persiste se producen alteraciones en células epiteliales y corpúsculos de Hassall quedando, al final, el timo reducido a tejido adiposo con islotes de células epiteliales y pocos linfocitos (2).

La **involución aguda en la infancia** se ha correlacionado significativamente con la duración de la enfermedad aguda proponiéndose que parámetros como la presencia de abundantes macrófagos en córtex, el aumento de tejido fibroso interlobular y la deplección linfoide pueden ayudar a estimar la duración de la enfermedad aguda antes de la muerte (41).

#### **I.3.7. Hiperplasia tímica**

Hay dos tipos de hiperplasia en el timo: la **hiperplasia tímica verdadera** caracterizada por un aumento de tamaño y peso de la glándula que retiene una morfología adecuada

para la edad y la hiperplasia linfoide o folicular caracterizada por la presencia de folículos linfoides con centros germinales independientemente del tamaño y peso de la glándula que suele ser normal. Dentro de la primera se incluyen la hiperplasia con agrandamiento masivo y la hiperplasia de rebote tras tratamiento de tumores en la infancia (42-44).

\*\*\*

### 3.I.4. NEOPLASIAS EPITELIALES DEL TIMO.

#### I.4.1. CONCEPTO DE TIMOMA.

En la glándula tímica se originan neoplasias benignas y malignas con distintas características morfológicas y diversa histogénesis (26). El concepto de timoma ha permanecido confuso durante mucho tiempo al considerarse sinónimo de tumor tímico. De esta forma, neoplasias originadas a partir de cualquier tipo de célula normalmente presente en el timo como linfocitos B ó T, células epiteliales, células neuroendocrinas y otras, se consideraban timomas simplemente por su localización anatómica en la glándula (45).

En 1917, Bell reconocía ya un probable origen epitelial de los timomas. Posteriormente, en 1955, Castleman definió los timomas como neoplasias constituidas por células epiteliales y linfocitos aunque sin llegar a establecer cuál de los dos componentes era el neoplásico (46).

En 1976 Rosai y Levine proponen que el término timoma se aplique exclusivamente a neoplasias de células epiteliales tímicas, independientemente de la presencia o no de un componente linfoide (26). Esta definición es la actualmente aceptada en todo el mundo ya que estudios posteriores han demostrado claramente el carácter reactivo, no neoplásico, del componente linfoide (47,48).

#### I.4.2. EPIDEMIOLOGIA.

Los timomas son tumores infrecuentes que representan el 5-10% de todos los tumores mediastínicos y el 20-30% de los encontrados en el mediastino anterosuperior (45).

No muestran predilección por ningún sexo y, aunque pueden afectar a pacientes de cualquier edad, la mayoría de los casos se han descrito en pacientes mayores de cuarenta años (26,49-53). De hecho, casi el setenta por ciento de los pacientes están en la quinta o sexta década de la vida.

Aunque son tumores infrecuentes en niños (5% de las neoplasias mediastínicas), cuando aparecen presentan características clínicas y patológicas diferentes a las del adulto: suelen ser invasivos, se presentan con sintomatología local y no suelen asociarse con enfermedades sistémicas. Desde el punto de vista histológico, faltan características típicas de los tumores en adultos, como la lobulación, y presentan un marcado predominio de zonas con diferenciación medular y abundantes corpúsculos de Hassall (54-58).

#### I.4.3. CLINICA.

En un 50% de los casos, el tumor se encuentra de forma casual en enfermos asintomáticos. El 25-30% de los pacientes presentan síntomas locales como disnea, disfagia, tos, dolor torácico, síndrome de la vena cava superior y otros,

como resultado de la compresión o invasión de estructuras adyacentes (53,59-64).

El inusual interés despertado por las neoplasias epiteliales del timo, a pesar de su infrecuencia, se debe a su asociación con otras enfermedades y neoplasias o síndromes clínicos:

- Renales: síndrome nefrótico, nefropatía de cambios mínimos (65).

- Oseas: osteoartropatía hipertrófica (66).

- Endocrinas: hiperparatiroidismo, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison (67).

- Dermatológicas y del colágeno: pénfigo vulgar y pénfigo eritematoso, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerodermia, síndrome de Sjögren, colitis autoinmune (68-71).

- Neurológicas: distrofia miotónica, síndrome de Eaton-Lambert, encefalitis límbica, esclerosis sistémica progresiva (72-75).

- Hematológicas: linfocitosis T, leucemias, leucopenia, agranulocitosis, pancitopenia, mieloma múltiple (76-81).

- Otras neoplasias: enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkin, carcinomas del tracto gastrointestinal, aparato genitourinario, mama, pulmón, cerebro y tiroides (82-84).

- Síndromes de inmunodeficiencia: hipogammaglobulinemia, síndrome de déficit de células T, infecciones por el virus

de Epstein-Barr (85-87).

Los tres principales síndromes clínicos asociados con timomas son la aplasia pura de células rojas, el síndrome de Good o hipogammaglobulinemia y la miastenia gravis.

La aplasia pura de células rojas se caracteriza por la ausencia casi total de eritroblastos en médula ósea y reticulocitos en sangre periférica (80,88-91). Los timomas aparecen en el 50% de estos pacientes, pero sólo un 5% de enfermos con timomas presentan este raro desorden hematológico (94). Se asocia principalmente con timomas no invasivos y de células fusiformes (59,88,92). El papel de la glándula tímica o de los tumores en la patogénesis de la enfermedad no está claro. Se han descrito autoanticuerpos (antieritroblastos, antieritropoyetina...) y alteraciones del sistema inmune (aumento de las células T supresoras, aumento del gamma-interferón y disminución de interleuquina 3).

Aproximadamente un tercio de los pacientes muestra remisión de los síntomas tras la timectomía (93).

El síndrome de Good es una forma de hipogammaglobulinemia que produce episodios repetidos de infecciones bacterianas, víricas y micóticas (86,87). Aunque la mayoría de los pacientes presentan un número normal de células T, en algunos, se ha descubierto una población de células T supresoras que inhiben la síntesis de inmunoglobulinas.

El primer síndrome clínico descrito en asociación con

los timomas fué la **miastenia gravis**, enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de anticuerpos circulantes contra los receptores de acetil-colina (Ach). Del 8-15% de pacientes con miastenia tienen un timoma y aproximadamente el 30% de los timomas se acompañan de miastenia (90,94,95).

Aunque se reconoce que las alteraciones tímicas juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, este papel no se comprende claramente aún. El hecho de que alteraciones diferentes como la hiperplasia folicular, la aplasia o los tumores del timo puedan asociarse a la enfermedad, sugiere que pueden existir varios mecanismos desencadenantes de la alteración inmune (96).

En timos normales asociados con la enfermedad, existen determinantes antigénicos relacionados con el receptor de Ach en las células mioides y en algunas células epiteliales. Sólo en las células mioides se han identificado receptores completos y, de forma general, se acepta que las células epiteliales del timo, neoplásicas o no, contienen sólo receptores incompletos o moléculas similares (97). Dado que las células mioides son escasas en los timomas, la identificación de determinantes antigénicos relacionados con el receptor de Ach en tumores presupone un origen de éstos en las propias células epiteliales neoplásicas (97, 98).

Para algunos, el hallazgo patológico más significativo

asociado a la miastenia es la presencia de centros germinales en el tejido tímico no neoplásico adyacente al tumor (99). Sin embargo, también se han encontrado en el tejido no tumoral de pacientes sin el síndrome clínico (26). Otros estudios in vitro han demostrado la producción de anticuerpos contra receptores de Ach por parte de las células B del timo, relacionando además los niveles de anticuerpos con el número de centros germinales presentes (17).

#### I.4.4. CLASIFICACION DE LOS TIMOMAS.

Se han propuesto múltiples clasificaciones en un intento de correlacionar diferentes subtipos histológicos con el comportamiento clínico y pronóstico de estos tumores.

\* Las clasificaciones utilizadas hasta 1976 presentaban múltiples errores como:

- La inclusión de tumores como carcinomas, seminomas, linfomas de Hodgkin y carcinoides.
- El frecuente uso de linfoma, linfoepitelioma y linfosarcoma como sinónimo de timoma.
- La utilización de criterios morfológicos descriptivos, como la presencia de rosetas o granulomas, para definir subtipos histológicos (26).

\* En 1976, Salyer y Eggleston (100), clasifican los timomas en función de la relación existente entre el número de células epiteliales y linfocitos. Ese mismo año, Rosai y

Levine (26), proponen una clasificación basada en la forma de las células epiteliales (redonda-oval, fusiforme y mixta) y en la cantidad de linfocitos acompañantes (ausente, escasa, moderada o predominante). Esta clasificación presentaba varias desventajas como:

- Dado que los timomas son neoplasias epiteliales, una clasificación basada en el componente linfoide no es satisfactoria desde el punto de vista histogenético.

- La adición de un subtipo de células fusiformes complica la clasificación ya que estas células fusiformes son también epiteliales.

- La proporción entre células epiteliales y linfocitos puede variar en zonas de un mismo tumor por lo que biopsias pequeñas o muestreos reducidos de un tumor pueden no ser representativos.

- Los diferentes subtipos histológicos sólo tienen una débil asociación con el pronóstico y, por otra parte, no actúan como variables independientes del factor pronóstico más importante que es la presencia o no de invasión (50-52,60,101).

\* Al demostrarse la importancia como factor pronóstico de la existencia o no de invasión, Levine y Rosai en 1978 (102), propusieron una clasificación más simple que distinguía entre tumores benignos o encapsulados y tumores malignos. Dentro de los últimos diferenciaban dos grupos:

- Timoma maligno tipo I o invasivo.
- Timoma maligno tipo II o carcinoma tímico.

\* En 1985, Marino y Müller-Hermelink, propusieron una nueva clasificación basada en la similitud de las células neoplásicas con subtipos de células epiteliales presentes en el timo normal (19,103). En un principio reconocieron tres tipos de tumor: timoma cortical, timoma medular y timoma mixto. Posteriormente, se añadieron dos tipos nuevos:

- Timoma organoide (104).
- Carcinoma tímico bien diferenciado (105).

Actualmente (106), la clasificación de Müller-Hermelink establece los siguientes tipos de neoplasias epiteliales del timo:

- Timoma cortical.
- Timoma organoide.
- Timoma medular.
- Timoma mixto medular-cortical.
- Carcinoma tímico bien diferenciado.
- Carcinoma tímico de alto grado.

Para algunos autores existe una estrecha relación entre estos tipos de timoma y factores clínicos y pronósticos (52,53,101,106-113), mientras que para otros la clasificación de Müller-Hermelink no ofrece ninguna ventaja frente a la de Levine y Rosai (114-118).

\* En el último fascículo de la AFIP dedicado a tumores del

Mediastino, Shimosato y Mukai clasifican los timomas en base a su extensión (circunscrito, invasivo o metastásico), histología (predominio linfocítico, predominio epitelial o mixto), tipo celular (fusiforme, poligonal o mixto) y presencia o ausencia de atipia citológica (4).

#### I.4.5. ANATOMIA PATOLOGICA DE LOS TIMOMAS.

##### I.4.5.1 CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS:

Los timomas son tumores de tamaño muy variable y forma redonda u oval (59). Ocasionalmente pueden presentarse como masas tumorales aplanadas adheridas a la pared torácica.

Presentan una superficie de corte nodular con septos fibrosos que dividen el parénquima. Pueden existir calcificaciones y focos de degeneración quística, necrosis y hemorragias (26,50). Infrecuentemente el tumor es completamente quístico, requiriéndose múltiples secciones histológicas de áreas sólidas de la pared para diferenciarlo de los quistes tímicos (119).

Aunque la mayoría de los timomas estan bien encapsulados (26,50,59,100), del 7 al 33% tienden a invadir estructuras torácicas adyacentes como pleura, pulmón, grandes vasos y nervios mediastínicos (64).

##### I.4.5.2 CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS:

###### I.4.5.2.1 CLASIFICACION DE LEVINE Y ROSAI.

a) Timoma benigno o encapsulado y timoma maligno tipo I:

Rosai y Levine definen el timoma maligno tipo I o invasivo como aquel tumor con características citológicas benignas que presenta invasión. La subclasificación de estos timomas se basa en las proporciones relativas de los dos tipos celulares presentes en el tumor: linfocitos y células epiteliales. Así, los timomas de **predominio linfocítico** se caracterizan por presentar más del 66% de linfocitos y menos del 33% de células epiteliales, los de **predominio epitelial** presentan más del 66% de células epiteliales y menos del 33% de linfocitos y los de **tipo mixto** ambos tipos celulares en la misma proporción (50).

Las células epiteliales pueden ser de forma redonda, oval o fusiforme. Las células ovales y redondas tienen un citoplasma pálido, eosinófilo o anfófilo, de bordes mal definidos, y un núcleo vesicular con nucléolo grande. Pueden encontrarse como células aisladas o grupos en el infiltrado linfoide. En ocasiones, pueden disponerse formando lóbulos bien delimitados compuestos casi exclusivamente por células epiteliales simulando un carcinoma aunque no existe atipia citológica (26).

Las células fusiformes presentan núcleos ovales o elongados, de cromatina uniforme y nucléolo pequeño. Pueden adoptar distintos patrones: estoriforme, hemangiopericitoides o distribución en haces paralelos (51).

En la mayoría de estos timomas, los linfocitos son pe-

queños y de apariencia madura, aunque algunos pueden ser grandes con núcleo vesicular y nucléolo pequeño. Estos linfocitos se disponen formando un infiltrado difuso y, en el 24% de los casos, forman agregados mal definidos que simulan centros germinales. Auténticos centros germinales se observan en menos del 10% de los timomas.

Posteriormente, Moran y Suster introdujeron dentro de esta clasificación el concepto de **timoma atípico** como tumor que, manteniendo características propias de los timomas presenta cierto grado de atipia citológica (120).

Otras características microscópicas observadas en estos tumores son la presencia de: **rosetas** formadas por células epiteliales elongadas distribuidas radialmente alrededor de una zona central con material eosinófilo amorfo (26), **pseudoglándulas** o espacios redondos o alargados revestidos por células fusiformes o cúbicas, que pueden aparecer vacíos o contener células degeneradas (26,63), **glándulas verdaderas** revestidas por células caliciformes o epitelio mucoso ciliado (17), **áreas de diferenciación medular** definidas como áreas redondas, claras, bien delimitadas, que se distribuyen de forma regular sobre un fondo linfoide más oscuro (17), **corpúsculos de Hassall** en distintos estadios de maduración, **células mioides** de citoplasma eosinófilo con estriaciones similares a las del músculo estriado y positividad para desmina, actina y mioglobina, **espacios perivascu-**

lares que pueden contener material proteináceo, linfocitos, células plasmáticas, mastocitos, eritrocitos y/o macrófagos, o puede estar ocupado por tejido fibroso hialinizado, células espumosas y melanocitos.

**b) Carcinoma tímico o timoma maligno tipo II:**

Los carcinomas tímicos representan un pequeño grupo de neoplasias epiteliales del timo caracterizadas por la presencia de marcada atipia citológica (tamaño celular grande, aumento del cociente núcleo/citoplasma, nucléolos prominentes), atipia arquitectural, frecuentes mitosis y necrosis (120-132). No muestran predilección por ningún sexo y se pueden presentar a cualquier edad.

Se han descrito nueve variantes de carcinomas tímicos atendiendo a las características histológicas del tumor: carcinoma de células escamosas, carcinoma similar al linfopitelioma, carcinoma indiferenciado, carcinoma basaloides, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de células claras, carcinoma sarcomatoide y carcinoma mixto de células pequeñas y escamosas. El **carcinoma de células escamosas** es la variante más frecuente (121-124). Histológicamente está formado por nidos sólidos de células poligonales con núcleos vesiculares, nucléolos visibles y citoplasma eosinófilo bien definido. Estas células están separadas por bandas fibrosas. Los carcinomas escamosos pueden originarse

"de novo" o desarrollarse a partir de un timoma preexistente (120,122,125). El **carcinoma linfoepitelioma-like** está formado por grupos sólidos de células epiteliales grandes con núcleos claros, nucléolos pequeños y citoplasma mal definido, mezclados con un prominente infiltrado linfoide. Algunos autores lo consideran una variante del carcinoma escamoso (122). Se le ha relacionado con el virus de Epstein-Barr (126,127). El **carcinoma basaloide** puede presentar focos quísticos. Las áreas sólidas consisten en nidos sólidos y trabéculas de células poligonales uniformes, pequeñas, formando empalizada cerca de la membrana basal (123). El **carcinoma mucoepidermoide** presenta un amplio espectro de lesiones que varían desde tumores bien diferenciados a tumores pobremente diferenciados. Existen grupos e islotes sólidos de células escamoides entremezclados con espacios revestidos por epitelio mucosecretor (128). El **carcinoma de células pequeñas** está formado por nidos y trabéculas de células pequeñas dispuestas en un patrón organoide (129). El **carcinoma de células claras** está constituido por células poligonales uniformes de citoplasma claro con presencia ocasional de septos fibrosos (121,130,131). El **carcinoma sarcomatoide** formado por células fusiformes elongadas distribuidas en fascículos o en patrón estoriforme (121), el **carcinoma indiferenciado** con células con marcado pleomorfismo y el **carcinoma mixto de células pequeñas y escamosas** (122).

Otras variantes más raras son el carcinoma adenoescamoso, carcinoma neuroendocrino melanocítico y el carcinoma con diferenciación neuroblástica focal (132,133).

#### I.4.5.2.2 CLASIFICACION DE MÜLLER-HERMELINK.

##### a) Timoma cortical.

Caracterizado por la proliferación de células epiteliales y linfoides morfológicamente similares a las existentes en la corteza tímica normal.

##### Características citológicas:

- Células epiteliales: Células de tamaño medio-grande, núcleo redondo u oval, cromatina vesicular y nucléolo central prominente. Estas células son de mayor tamaño y más abundantes que las existentes en el timo normal y el timoma organoide.

- Células "nodriza": Aparecen en algunos timomas y se caracterizan por tener un citoplasma amplio que contiene linfocitos mitóticamente activos.

- Células linfoides: Predominan los linfocitos de tamaño mediano y grande con núcleos redondos o hendidos y escaso citoplasma basófilo. Se encuentran presentes en menor número que en timo normal y el timoma organoide.

##### Patrón histológico:

Presenta un patrón de crecimiento con lóbulos de tamaño variable que pueden estar parcial o totalmente delimitados por septos de tejido conectivo. Características histológi-

cas adicionales son la presencia de espacios perivasculares, quistes, disposición de las células en empalizada alrededor de vasos, patrón en cielo estrellado y áreas de diferenciación medular. Estas últimas son raras, no suelen contener corpúsculos de Hassall y son menos definidas que las existentes en timomas organoides. Normalmente se localizan en la periferia del tumor, en la unión con el timo normal (19,52,53).

**b) Timoma organoide.**

Incluido en un principio dentro de los timomas corticales, actualmente se considera una entidad clínico-patológica bien definida. Son tumores que imitan la arquitectura tímica normal con áreas de diferenciación medular distribuidas de forma difusa en un componente neoplásico de tipo cortical.

Características citológicas:

- Células epiteliales: Las células de tipo cortical presentan núcleos ovales y vesiculares pero de menor tamaño y con nucléolo menos prominentes que en timoma cortical. Las células de las zonas de diferenciación medular son más pequeñas y con núcleos elongados.

- Células linfoides: Linfocitos de tamaño pequeño y mediano. En las áreas de diferenciación medular los linfocitos son de aspecto maduro pero en menor cantidad que en timoma medular.

Patrón histológico:

Normalmente presentan un patrón lobular similar al timo normal. Ocasionalmente pueden presentar un patrón difuso.

Características histológicas adicionales son la presencia de diferenciación escamosa y corpúsculos de Hassall en áreas medulares y patrón en cielo estrellado en áreas corticales (52,53,104).

**c) Timoma medular.**

Caracterizado por la proliferación de células epiteliales y linfoides similares a las de la médula normal.

Características citológicas:

- Células epiteliales: Aunque pueden existir células similares a las corticales, predominan las células fusiformes, de tamaño medio, núcleo oval o fusiforme, cromatina fina y nucléolo poco llamativo. El citoplasma es escaso y eosinófilo.

- Células linfoides: Predominio de linfocitos pequeños con núcleos oscuros y redondos.

Patrón histológico:

La distribución de las células epiteliales y la cantidad de linfocitos presentes originan diferentes patrones histológicos. Aunque el más frecuente muestra un marcado predominio de las células epiteliales, pueden observarse áreas donde las células linfoides son más abundantes. Pueden exhibir patrones de crecimiento estoriforme o hemangioperici-

toide y otras características histológicas adicionales como focos de degeneración macro y microquística y formación de rosetas y espacios glandulares.

Estos timomas presentan abundante reticulina pericelular y células dendríticas interdigitantes S-100 positivas. Por el contrario, no se observan áreas de diferenciación escamosa ni corpúsculos de Hassall, aunque pueden existir espacios quísticos revestidos por células epiteliales simulando corpúsculos abortivos (19,52,53).

**d) Timoma mixto.**

Caracterizados por la proliferación de células epiteliales de tipo cortical y medular. La proporción entre ambos tipos de células epiteliales y entre el componente linfoide y epitelial varía entre casos distintos y entre áreas diferentes de un mismo tumor. Sin embargo, el número de linfocitos presentes es generalmente alto.

Características citológicas:

- Células epiteliales: Citológicamente similares a las corticales y medulares del timo normal. Las células de tipo cortical son de menor tamaño que las de los timomas corticales. Se observa también un tipo de célula que presenta características intermedias entre las anteriores. Son células cilíndricas, de tamaño medio, citoplasma de bordes mal definidos y núcleo redondo u oval, sin nucleolo prominente. Estas células suelen encontrarse revistiendo espacios peri-

vasculares y en estructuras papilares.

- Células linfoides: Se observan linfocitos de tamaño medio y grande en áreas ricas en células epiteliales corticales, aunque en número menor que en los timomas corticales, y linfocitos pequeños y maduros en áreas ricas en células medulares.

Patrón histológico:

La densidad de células epiteliales y la proporción existente entre células corticales y medulares puede variar entre zonas de un mismo tumor. Las características histológicas van a ser también diferentes según el número de linfocitos presentes. Se reconocen tres patrones:

- Lóbulos constituidos por células de tipo medular alternando con lóbulos de predominio cortical ricos en linfocitos.

- Lóbulos de tipo medular rodeados por áreas de tipo cortical.

- Mezcla de ambos tipos celulares.

En todos los tipos se observan las células intermedias descritas adoptando un patrón sólido de crecimiento con espacios quísticos y pseudoglándulas, en disposición perivascular o revistiendo estructuras papilares. Los corpúsculos de Hassall son muy raros (19,52,53,104).

**e) Carcinoma tímico bien diferenciado (CTBD).**

Aunque no incluido en la clasificación inicial, actualmente se reconoce como un tumor con características clínicopatológicas definidas. Son tumores que presentan leve atipia citológica y un número aumentado de mitosis pero en los que pueden reconocerse características arquitecturales y citológicas de timoma.

Características citológicas:

Son células de menor tamaño que las existentes en los timomas corticales. Presentan núcleos irregulares de cromatina grosera, con ocasionales pliegues nucleares y nucléolos menos llamativos, y citoplasma claro u oxifílico de bordes bien definidos. El número de mitosis varía entre cero y cinco por diez campos de gran aumento. Los linfocitos acompañantes son escasos y de tipo inmaduro.

Características arquitecturales:

Presentan una arquitectura lobular mal definida con esclerosis llamativa y amplias bandas fibrosas que rodean nidos irregulares de células. Puede existir queratinización individual, disposición de las células en empalizada perivascular, quistes y áreas estoriforme y hemangiopericitoides parecidas a las existentes en el tipo medular del que se diferencian por la atipia citológica, el número de mitosis y la ausencia de reticulina intratumoral (52).

La diferenciación entre los tres tipos de tumor de ori-

gen cortical (timoma cortical convencional, timoma organoide y CTBD) representa uno de los principales problemas de esta clasificación. Areas de timomas cortical y organoide pueden verse en el CTBD y focos de diferenciación epidermoide en el timoma cortical (53,108,134). Kirchner (105) define el CTBD como un tumor en el que las áreas de diferenciación epidermoide constituyen más del 50 % del tumor y justifica la separación de este tipo histológico en base a su comportamiento agresivo. Otros autores consideran los tres tipos como variedades morfológicas de un mismo proceso neoplásico y no como entidades diferentes (114,116,118).

El uso del término "carcinoma" para definir un tumor incluido dentro del grupo de los timomas ha sido también objeto de crítica. Kornstein (118) afirma que este término debería reservarse sólo para tumores con potencial metastásico y Moran y Suster (120) consideran el nombre de carcinoma tímico bien diferenciado inadecuado proponiendo el de **timoma atípico** para estos casos (120).

**f) Carcinoma tímico de alto grado.**

Presenta marcada atipia citológica y no guarda similitud alguna con el timo normal. Se reconocen los mismos subtipos histológicos que en la clasificación de Rosai y Levine.

#### **I.4.6 ESTUDIOS INMUNOHISTOQUIMICOS.**

##### **I.4.6.1 Células epiteliales:**

Las células epiteliales de los timomas comparten con las células del timo normal la expresión de determinados antígenos. La presencia de inmunoreactividad frente a diversas citoqueratinas es considerada por algunos autores como útil para diferenciar entre los diferentes tipos histológicos al coincidir la expresión de las células tumorales con la existente en los tipos celulares descritos en el timo normal. Así, los timomas corticales reaccionarían frente a citoqueratinas normalmente expresadas por las células de la corteza tímica y los timomas medulares frente a las expresadas por las células de la médula (23,135-137). Para otros autores la expresión de citoqueratinas se presenta en todos los tipos de timomas sin que existan diferencias consistentes en la expresión de las células entre timomas definidos por su morfología como corticales o medulares (52,138-141).

Se ha descrito la presencia de CD5, receptor expresado por los linfocitos T durante varios estadios de diferenciación y por subpoblaciones de linfocitos B en la zona del manto, en las células epiteliales del carcinoma tímico bien diferenciado. Su expresión permitiría diferenciar entre éste y timomas organoides y cortical cuando las características histológicas por sí solas no los permitan (142-144). También se ha descrito en células epiteliales la presencia

de CD20, marcador de células B (145).

En tumores con diferenciación medular se han detectado escasas células mioides mediante el uso de anticuerpos a mioglobina, creatinfosfoquinasa y beta-enolasa. La presencia de inmunorreactividad a estos anticuerpos se ha descrito también en células epiteliales (37).

#### **I.4.6.2 Linfocitos:**

Los estudios realizados con anticuerpos monoclonales han demostrado que la mayoría de las células linfoides presentes en los timomas son células T. Por otra parte, estudios inmunohistoquímicos y estudios realizados con técnicas modernas de biología molecular, han demostrado claramente el carácter no neoplásico de estas células (47,48).

Las características inmunofenotípicas de los linfocitos T fueron expuestas al hablar de la histología de la glándula. De forma general, se diferencian dos tipos de linfocitos T: corticales o inmaduros y medulares o maduros. Para Müller-Hermelink, el fenotipo inmunológico de los linfocitos presentes en los distintos tipos de timomas comparte las mismas características de diferenciación medular y cortical que las propias células epiteliales. Así, timoma cortical y carcinoma tímico bien diferenciado se acompañan de linfocitos inmaduros, y timoma medular, de linfocitos maduros. Los otros dos tipos de timomas, organoide y mixto, presentan un predominio de linfocitos inmaduros salvo en

áreas de diferenciación medular, donde predominan las células maduras (24,52,103,146).

Un dato importante para el diagnóstico diferencial con otros tumores mediastínicos no derivados del epitelio tímico y asociados con infiltrados linfocíticos, es la presencia de estos linfocitos inmaduros ya que este fenotipo (positividad a CD1,CD3 y TdT) no se expresa en los linfocitos que acompañan a otros tumores. Un marcador recientemente descrito que caracteriza también a los linfocitos inmaduros es el anticuerpo CD99 (anticuerpo normalmente utilizado para el diagnóstico del sarcoma de Ewing y tumores neuroectodérmico periféricos) (147).

Se ha descrito también la presencia de linfocitos B en timomas. Se distinguen dos poblaciones de células B:

- Todos los tipos de timomas presentan linfocitos B en espacios perivasculares.
- Una segunda población de células B se localiza entre las células epiteliales neoplásicas, sobretudo en áreas de diferenciación medular organoide caracterizadas por la presencia de células epidermoides o corpúsculos de Hassall. Esta población frecuentemente comprende grandes células con prolongaciones dendríticas y expresión de CD23 que simulan las células B intramedulares del timo normal. En contraste, las células B son infrecuentes en timomas mixtos que muestran diferenciación medular con células fusiformes

y están casi completamente ausentes en áreas de epitelio cortical (148,149).

#### **I.4.6.3 Matriz extracelular:**

Estudios sobre la distribución de fibronectina y lamina en timomas han demostrado que, en timomas con células fusiformes, existe una distribución pericelular. Por el contrario, los timomas con otros tipos celulares, sólo presentan fibras positivas en septos fibrosos y espacios perivasculares (150).

#### **I.4.6.4 Otras células:**

Los timomas pueden presentar macrófagos con fenotipo PAM-1/MAC positivos, HLA-DR negativos y pobremente activos en la producción de interleuquina-1 y factor alfa de necrosis tumoral; células reticulares interdigitantes con positividad a CD4,CD5,HLA-DR y S-100 y células de Langerhans con positividad a OKT6 y S-100 (2,151,153).

Las células reticulares interdigitantes son más frecuentes en los timomas con células fusiformes. Su distribución es también variable, así, en timomas organoides y mixtos se localizan formando grupos en las áreas de diferenciación medular, mientras que en los medulares se distribuyen de forma difusa por todo el tumor (154,155).

Otros estudios recientes han demostrado que los timomas corticales carecen de actividad alfa-naftilacetatoesterasa mientras que los medulares presentan una fuerte actividad

enzimática (146).

#### **I.4.7. FACTORES PRONOSTICOS.**

##### **I.4.7.1 FACTORES CLINICOS.**

###### **I.4.7.1.1 EDAD:**

Los estudios realizados sobre el pronóstico de los timomas en niños han obtenido resultados muy discordantes. algunos autores señalan un peor pronóstico (156), mientras que para otros, son tumores de evolución favorable (57). En general, se acepta que el pronóstico de los timomas en niños depende del grado histológico y estadio clínico en el momento del diagnóstico (54).

###### **I.4.7.1.2 MIASTENIA GRAVIS:**

El significado pronóstico de la presencia de miastenia en pacientes con timomas ha sido también objeto de controversia. Durante mucho tiempo se aceptó la presencia de miastenia como signo de mal pronóstico (60,100,157). Estudios posteriores demostraron que su presencia no afecta al pronóstico (49,51,95). Se han comunicado incluso mejores índices de supervivencia ya que la presencia de la enfermedad permitiría el descubrimiento del tumor en estadios iniciales (99). Las mejoras en el cuidado clínico de enfermos con miastenia han restado importancia a la enfermedad neuromuscular como factor pronóstico.

#### I.4.7.1.3 INVASION:

La presencia de invasión capsular y/o extensión del tumor a estructuras torácicas adyacentes es el único factor de valor pronóstico aceptado hasta el momento. De hecho, la mayoría de los autores clasifican los timomas en benignos o malignos en función de la presencia o no de invasión.

En 1981, Masaoka (93), propuso para los timomas los siguientes estadios clínico-patológicos:

- Estadio I: Tumor completamente encapsulado.
- Estadio II: 1- Invasión macroscópica de tejido adiposo o pleura mediastínica.  
2- Invasión microscópica de la cápsula.
- Estadio III: Invasión macroscópica de órganos vecinos como pericardio, grandes vasos o pulmón.
- Estadio IV: a- Diseminación pleural o pericárdica.  
b- Metástasis por vía linfática o hemática.

En su estudio, Masaoka, demuestra una correlación entre el estadio clínico-patológico y la supervivencia. Aunque estos estadios se han utilizado en múltiples trabajos, en los últimos años se ha discutido su utilidad: se ha demostrado que no existen diferencias significativas en la supervivencia global entre los estadios I-II y III-IV por lo que, considerando el pronóstico, bastaría sólo una división entre timoma no invasivo (tumor confinado al timo o mediastino anterior) y timoma invasivo (tumor que afecta a órga-

nos vecinos como pulmón y pericardio) (4,53). Por otra parte, la existencia de timomas no invasivos capaces de dar metástasis a distancia no apoya la relación entre el estadio y el pronóstico. Recientemente se ha propuesto también una clasificación TNM de los timomas (158).

#### I.4.7.2 FACTORES HISTOLOGICOS.

\* Aunque ciertos trabajos comunicaban un peor pronóstico para los timomas de predominio epitelial (23,51,92,99), en estudios posteriores, no se ha demostrado correlación significativa entre los subtipos histológicos de predominio linfocítico, predominio epitelial y mixto linfocítico-epitelial, y parámetros importantes como edad, invasión y pronóstico (100,108,157,159,160).

Actualmente se cree que la clasificación basada en la proporción existente entre células epiteliales y linfocitos no presenta correlación clínico-patológica (108).

\* Cuando Marino y Müller-Hermelink publicaron su clasificación de timomas, encontraron una buena correlación entre el tipo de timoma y algunas características clínicas. Así, los timomas corticales tenían un carácter invasivo y eran frecuentes en enfermos más jóvenes, los timomas medulares no eran invasivos y aparecían en enfermos mayores y los timomas mixtos presentaban características intermedias (19).

Estudios posteriores relacionando el tipo histológico con factores clínicos y pronósticos han intentado demostrar que la clasificación de Müller-Hermelink presenta correlación con factores clínicos y pronósticos (52,53,107,108, 110,112). De esta forma, los **timomas corticales** se comportan como timomas malignos que tienden a la invasión, aparecen en enfermos más jóvenes, se asocian a miastenia gravis, tienden a recaer y tienen un pronóstico intermedio; los **timomas medulares** suelen ser no invasivos, se dan en personas mayores, se asocian a otras alteraciones como aplasia pura pero no a miastenia y no recaen por lo que su pronóstico es bueno; los **timomas mixtos** presentan características intermedias pero tampoco suelen recaer por lo que su pronóstico es bueno; los **timomas organoides** presentan un comportamiento menos agresivo que los timomas corticales aunque recaen y presentan un pronóstico intermedio y, finalmente, el **carcinoma tímico bien diferenciado** es el de peor pronóstico ya que siempre es invasor y presenta un alto índice de recaídas y muerte.

Otro hecho importante de esta clasificación es la posibilidad de influir en el tipo de tratamiento ya que, ante tumores como timomas corticales y carcinoma tímico bien diferenciado, sería conveniente realizar un tratamiento más agresivo.

Para otros autores esta clasificación no tiene ventajas

sobre la tradicional (114-118), bien porque no es fácilmente reproducible desde el punto de vista histológico o porque no encuentran relación con el pronóstico. Uno de los principales inconvenientes es la ya mencionada dificultad que encuentran para diferenciar los tres tipos de tumores de origen cortical (cortical convencional, organoide y carcinoma bien diferenciado) debido al uso de criterios muy subjetivos y a la presencia de áreas "borderline" entre los tres tipos. Actualmente, sin embargo, los tres tipos se reconocen como entidades clínico-patológicas bien definidas (104,105,134). Por otra parte, los tres tipos se caracterizan por un pronóstico peor con mayor riesgo de recidivas y, en el caso del carcinoma, muerte, por lo que a efectos de distinguir entre timomas de mejor pronóstico (medulares y mixtos) y timomas de peor pronósticos (los tres tipos de origen cortical), la clasificación sigue siendo de utilidad (106).

#### I.4.7.3 OTROS FACTORES PRONOSTICOS.

##### I.4.7.3.1 CITOMETRIA DE FLUJO:

El estudio del contenido nuclear de DNA mediante citometría de flujo ha demostrado ser un factor pronóstico significativo en muchos tumores (161,162).

Los estudios realizados en timomas han obtenido resultados muy variables. Dos estudios independientes (163,164)

encuentran un mayor número de recidivas y un acortamiento del intervalo libre de enfermedad en timomas aneuploides. En estos estudios, la actividad proliferativa medida según el porcentaje de células en fase S no tiene significado pronóstico probablemente debido al efecto de los linfocitos asociados al tumor que enmascaran el valor de esta fase. Sin embargo, cuando se considera la presencia o no de invasión, la mayoría de los trabajos publicados no encuentran diferencias significativas (163-165), existiendo aneuploidía tanto en tumores invasivos como no invasivos. A pesar de esto, un reciente estudio (166) muestra una mayor proporción de aneuploidía en tumores macroinvasivos que en tumores microinvasivos y no invasivos.

#### **I.4.7.3.2 ANALISIS MORFOMETRICO:**

Los estudios con técnicas morfométricas realizados en células epiteliales de timomas han obtenido los siguientes resultados (167,168):

- Las células neoplásicas son mayores que las células epiteliales de la hiperplasia tímica y del timo normal.
- Las áreas nucleares de células epiteliales en timomas invasivos son mayores que en timomas no invasivos.
- Timomas no invasivos en pacientes con miastenia gravis tienen células mayores que lesiones similares en pacientes sin enfermedad asociada.
- No se han encontrado diferencias entre los subtipos his-

tológicos de la clasificación tradicional.

- Los timomas corticales tienen células mayores que los timomas medulares.

#### **I.4.7.3.3 ESTUDIO DE LA PROLIFERACION CELULAR:**

##### **a) PCNA.**

El antígeno nuclear de proliferación celular es una proteína de 36 KDa que aparece en el núcleo durante la fase de síntesis del ciclo celular. El uso de anticuerpos monoclonales frente al PCNA es útil en la evaluación de la proliferación celular y, en algunos tumores, el porcentaje de células positivas se correlaciona con el grado histológico del tumor (169-171).

Se ha demostrado un mayor porcentaje de células positivas en los carcinomas tímicos frente a timomas invasivos y no invasivos. No se han encontrado diferencias entre los dos últimos (172).

##### **b) AgNOR.**

El número y distribución de los AgNOR es útil para diferenciar entre células benignas y malignas y se ha asociado con el grado histológico, estadio patológico y pronóstico en muchas neoplasias humanas (173-176).

Se han demostrado diferencias morfológicas y cuantitativas entre timomas y carcinomas tímicos (172,177). Así, en timomas, los AgNOR son pequeños, redondos y regulares estando localizados en nucléolos, mientras que en los carci-

nomas son grandes, pleomórficos e irregulares, distribuyéndose por todo el núcleo. Aunque se ha descrito una menor cantidad de AgNOR en subtipos histológicos de pronóstico favorable como el timoma medular y un pronóstico desfavorable en timomas con más 5.75 AgNOR por célula, no se han encontrado diferencias significativas entre timomas invasivos y no invasivos (172,177,178,179).

Una curiosa aplicación de los AgNOR en el estudio de los timomas es su utilidad para diferenciar entre células epiteliales y linfocitos en aquellos casos donde sea histológicamente difícil la identificación de las células epiteliales por la abundancia de células linfoides. Las células epiteliales presentan siempre más de tres AgNOR y los linfocitos sólo contienen uno o dos. Este método permite también medir la actividad proliferativa de las células neoplásicas en tejidos en parafina ya que otros métodos no diferencian entre linfocitos y células epiteliales (citometría y PCNA) o deben realizarse en material sin fijar (178).

c) Ki-67.

En 1983, Gerdes y cols. (180), presentan el anticuerpo monoclonal Ki-67. Este anticuerpo detecta un antígeno presente en todas las fases del ciclo celular excepto G<sub>0</sub>. Es un marcador de la proliferación celular que influye en el pronóstico, siendo su presencia significativamente mayor en la

aneuploidía. Se asocia también con un alto índice mitótico y el grado histológico del tumor (181).

En timomas, la expresión de Ki-67 no varía entre timomas encapsulados e invasivos o metastásicos, ni muestra correlación con parámetros clínicos como la miastenia gravis. Sí se ha observado una mayor expresión en tumores grandes lo que se considera indicativo de una intensa proliferación celular (182).

Al considerar la clasificación de Müller-Hermelink se ha descrito una mayor expresión en carcinomas tímicos bien diferenciados encontrándose relación estadísticamente significativa al compararlo con la expresión del anticuerpo en los timomas de tipo medulares. Esta diferencia de expresión serviría para el diagnóstico diferencial entre el carcinoma tímico bien diferenciado de tipo fusocelular y el timoma medular (183). En los restantes tipos de esta clasificación se ha encontrado un aumento en la expresión de Ki-67 proporcional al número de células epiteliales de tipo cortical presentes (183).

Algunos trabajos publicados describen una relación inversa entre las expresiones de Ki-67 y receptor del factor de crecimiento epidérmico (182).

#### **1.4.7.3.4 METALOTIONEINAS:**

Las metalotioneínas son un grupo de proteínas intracelulares de bajo peso molecular con afinidad para Zinc, Cobre,

Mercurio, Cadmio y Platino. Aunque pueden encontrarse en tejidos normales, su sobreexpresión se ha observado en varios tumores humanos y se correlaciona con un comportamiento más agresivo de éstos (9,184).

En la glándula tímica normal, la expresión de metalotio-neína se observa sólo en células de la médula y ocasionales células subcapsulares. Su aplicación al estudio de tumores epiteliales tímicos ha demostrado expresión en dos subtipos histológicos de comportamiento muy diferente como son el timoma medular (generalmente benigno) y el carcinoma tímico bien diferenciado (tumor de comportamiento agresivo), por lo que no se considera un marcador útil a la hora de predecir el comportamiento de estas neoplasias (9).

#### **I.4.7.3.5 E-CADERINA Y CATENINAS:**

Las caderinas son glicoproteínas de membrana que intervienen en la adhesión celular. La E-caderina se localiza en tejidos epiteliales y juega un importante papel en la organogénesis. Las cateninas (alfa, beta y gamma) son proteínas citosólicas que se unen a la E-caderina para que la adhesión intercelular funcione adecuadamente.

En timomas se ha observado expresión débil o negativa en timomas medulares y mixtos y expresión intensa en timomas corticales y carcinoma tímico bien diferenciado, asociándose la presencia de expresión más con los tipos histológicos que con el comportamiento del tumor (185,186).

#### I.4.7.3.6 ONCOGENES:

El estudio de las bases moleculares del cancer ha llevado a la identificación de distintos oncogenes y anti-oncogenes involucrados en los procesos de diferenciación celular cuya amplificación y sobreexpresión pueden influir en el comportamiento de algunas neoplasias. En estudios realizados con tumores del timo se han obtenido los siguientes resultados:

- Receptor del Factor de crecimiento neural (NGF-r) y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-r):

Ambos factores juegan un papel importante en el desarrollo embriológico promoviendo el crecimiento y la diferenciación celular. Sus propiedades biológicas dependen de su unión con receptores específicos localizados en la superficie celular (EGF-r y NGF-r). La expresión de estos receptores se ha demostrado en diferentes tipos de neoplasias (carcinomas, sarcomas, tumores neuroendocrinos) sugiriéndose su implicación en la regulación del comportamiento neoplásico (7,187).

En el parénquima tímico normal, el NGF-r es expresado por células medulares y subcapsulares. En relación al EGF-r los resultados sobre su expresión son muy variables, desde trabajos en los que no se observa ninguna expresión (182), hasta otros, en los que todos los tipos celulares presentes en el timo normal expresan positividad (7).

Los estudios realizados en timomas utilizando el EGF-r han obtenido resultados muy diversos, con series en las que todos los tipos histológicos lo expresan sin relación con la presencia o no de invasión (7,182), hasta otras en las que se observa un aumento de la expresión en estadios avanzados (188).

Se ha observado mayor expresión del NGF-r en timomas medulares, áreas fusocelulares de timomas mixtos y áreas de diferenciación medular en timomas organoides (7).

Como dato de interés, cabe resaltar que en enfermos con miastenia gravis, se ha encontrado una relación directamente proporcional entre el aumento en la expresión del EGF-r y el grado de severidad de la enfermedad (182).

**- Proto-oncogen RET:**

Su expresión se ha detectado en la médula tímica normal. En tumores epiteliales tímicos y, siguiendo la clasificación de Rosai y Levine, su expresión sólo se ha demostrado en timomas de predominio epitelial (expresión homogénea) y timomas mixtos (expresión focal) por lo que, según algunos autores, podría utilizarse como marcador de la agresividad al expresarse en tumores que conllevan un peor pronóstico (189).

**- Ras p21:**

Se ha demostrado que las células neoplásicas de los timomas contienen más p21 que el tejido tímico normal. La

alta incidencia de una proteína con movilidad electroforética anómala en timomas metastásicos hace pensar en su posible uso como marcador de comportamiento agresivo (190).

- p53:

El gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica una proteína que tiene un papel esencial en la regulación de la proliferación celular e inhibe la transformación neoplásica. Esta proteína tiene una vida media corta y normalmente no se detecta con técnicas inmunohistoquímicas. Mutaciones del gen se cree que producen una proteína anómala con una vida media aumentada y alteraciones de su función que puede detectarse inmunohistoquímicamente.

Estudios realizados sobre timomas han obtenido resultados muy discordantes. Considerando los tipos histológicos los resultados varían desde ausencia de expresión (182) hasta expresión en todos los tipos, más intensa en los timomas de origen cortical (8,191,192). En relación con la presencia o no de invasión, se ha demostrado la expresión de p53 en timomas encapsulados e invasivos aunque más intensa en los últimos (188,193). Algunos autores defienden que la expresión de p53 en timomas no invasivos podría utilizarse como factor pronóstico (194) mientras que otros no reconocen su valor pronóstico al considerar que tumores con baja-moderada expresión son capaces de invadir o metastati-

zar (193).

Sí parece existir claramente un aumento en la expresión del gen mutante p53 en carcinomas tímicos, dato de interés a la hora de realizar el diagnóstico diferencial con timomas que presenten cierto grado de atipia citológica de forma que, en tumores donde más del cincuenta por ciento de las células expresan p53, el diagnóstico se inclinaría hacia carcinoma (194,195).

- **bcl-2:**

El oncogen bcl-2 bloquea la muerte celular programada o apoptosis y se cree podría regular la génesis de neoplasias al prolongar la supervivencia celular y aumentar la oportunidad de adquirir defectos genéticos adicionales en genes que controlan el crecimiento, proliferación o supresión tumoral (192).

En el parénquima tímico normal, sólo las células de la médula expresan bcl-2. En el estudio de las neoplasias epiteliales del timo, al aplicar la clasificación de Rosai y Levine, se observa un aumento en la expresión desde timomas no invasivos a invasivos, diferenciando los tumores de comportamiento más agresivo (192). Por el contrario, al aplicar la clasificación de Müller-Hermelink, se observa mayor expresión positiva en los timomas medulares, timomas de comportamiento usualmente benigno por lo que no puede utilizarse como marcador de agresividad (192,195). También según

esta clasificación, se han publicado trabajos que muestran una relación inversa entre la expresión de Bcl-2 y p53 (8).

Otra proteína recientemente estudiada que se cree bloquea la apoptosis de forma diferente, es la proteína Mcl-1, encontrándose mayor inmunorreactividad frente a ella en carcinomas tímicos (196).

\*\*\*

## **II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA.**

Aunque han sido varias las clasificaciones propuestas sobre neoplasias epiteliales del timo, aún no se reconoce ninguna que cumpla claramente los criterios de base científica sólida, importancia clínica y reproducibilidad. Actualmente, dos clasificaciones son las que adquieren una mayor relevancia, la clasificación propuesta por Rosai y Levine en 1976, basada en las proporciones existentes entre células epiteliales y linfocitos, y la nueva clasificación histogenética propuesta por Müller-Hermelink y colaboradores, basada en la similitud entre las células neoplásicas y las células presentes en el timo normal.

Los intentos de correlacionar los distintos subtipos histológicos de ambas clasificaciones con factores epidemiológicos, clínicos y pronósticos han obtenidos resultados muy diversos. Aunque la mayoría de los autores reconocen la ausencia de correlación clínico-patológica en la clasificación de Rosai, la clasificación de Müller-Hermelink ha sido objeto de discusión, existiendo múltiples estudios que apoyan o niegan su utilidad clínica y pronóstica.

Por otra parte, los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de marcadores tumorales cuya expresión se relaciona con una mayor agresividad tumoral. Considerando que la morfología de los timomas invasivos o metastásicos no difiere significativamente de la de los timomas

benignos encapsulados, se han intentado encontrar marcadores útiles a la hora de predecir el comportamiento maligno de estas neoplasias. Los resultados obtenidos hasta el momento han sido discordantes sin que se haya encontrado un marcador específicamente relacionado con la capacidad invasiva de los timomas.

De acuerdo con lo reseñado previamente, los objetivos planteados en este trabajo se priorizan en:

- \* Establecer la reproducibilidad histológica de la clasificación de Müller-Hermelink mediante un estudio ciego realizado por tres patólogos diferentes.

- \* Estudiar la posible utilidad clínica y pronóstica de ambas clasificaciones.

- \* Estudiar la relación existente entre la expresión de cuatro marcadores tumorales determinados (Ki-67, p53, Bcl-2 y EGFr) y la capacidad de invasión o recurrencia de estas neoplasias.

\*\*\*

### **III. MATERIAL Y METODO.**

### **III.1.- MATERIAL.**

Se han revisado 62 casos de timomas procedentes de los departamentos de Anatomía Patológica de los Hospitales Universitarios Virgen del Rocío y Virgen Macarena de Sevilla y del Hospital Universitario Infanta Cristina de Badajoz durante el periodo comprendido entre los años 1972 y 1996.

De los 62 casos originalmente diagnosticados de timomas, siete fueron excluidos: cuatro eran linfomas, dos carcinomas tímicos de alto grado y en un caso no se localizaron preparaciones histológicas ni bloques de parafina. Los 55 casos restantes constituyen el material sobre el que se ha realizado el presente estudio.

### **III.2.- PROTOCOLO DE ESTUDIO CLINICO.**

Se realizó en todos los casos obteniéndose los datos de las hojas de petición de estudio anatomopatológico y de las historias clínicas en los casos en que éstas fueron localizadas. Se incluyeron los siguientes apartados:

#### **III.2.1 - Datos epidemiológicos.**

- \* Edad y sexo
- \* Asociación con miastenia gravis.

#### **III.2.2 - Datos clínicos.**

- \* Síntomas iniciales
- \* Estadio clínico
- \* Procedimiento quirúrgico
- \* Evolución

### III.3 - PROTOCOLO DE ESTUDIO ANATOMOPATOLOGICO.

#### III.3.1 - Estudio macroscópico.

Los datos correspondientes a peso, tamaño y características del tumor (lobulación, necrosis, quistes...) se obtuvieron de las descripciones realizadas en los informes de Anatomía Patológica.

#### III.3.2 - Estudio histológico.

En todos los casos se revisaron las preparaciones que en su momento sirvieron para el diagnóstico patológico original. Además, en los casos en los que se disponía de bloques de parafina, se escogieron los más representativos para realizar nuevos cortes histológicos de 4 micras. Una de las secciones se tiñó con hematoxilina-eosina y el resto se utilizaron para la realización de técnicas inmunohistoquímicas.

### III.4 - PROTOCOLO DE ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.

#### III.4.1 - Panel de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Dilución	Fuente
Ki-67	1:1000	Novocastra
p53	1:50	DAKO
EGFR	p	Biogenex
bcl-2	1:80	Novocastra
CK 34BE12	1:25	DAKO
Tdt	1:20	DAKO

#### III.4.2 - Técnica empleada.

Tras desparafinización e hidratación de los cortes, se colocaron en una cubeta con tampón citrato sódico a pH 6 M en olla a presión durante minuto y medio. Posteriormente, todas las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron de forma estandarizada utilizando un método automatizado (OPTIMAX<sup>R</sup>-PLUS.BIOGENEX).

### **III.5 - VARIABLES ANALIZADAS Y METODOLOGÍA DE ESTUDIO.**

#### **III.5.1 - Reproducibilidad histológica de la clasificación de Müller-Hermelink.**

Todos los casos fueron revisados independientemente por tres patólogos (sin conocimiento de los datos clínicos, hallazgos quirúrgicos y diagnóstico patológico original), para confirmar el diagnóstico de neoplasia epitelial tímica y clasificar los tumores según los criterios histológicos establecidos por Müller-Hermelink. De esta forma, los timomas fueron clasificados en cortical, organoide, medular, mixto cortical-medular y carcinoma tímico bien diferenciado. Los casos discordantes fueron revisados conjuntamente hasta alcanzar un acuerdo global sobre el tipo histológico.

Los casos fueron también clasificados siguiendo los criterios dados por Rosai y Levine en 1976 en timomas de predominio linfocítico, predominio epitelial, mixto linfoepitelial y de células fusiformes. Se incluyó además dentro de esta clasificación el concepto de timoma atípico de Moran y Suster.

### III.5.2 - Variables analizadas en relación con ambas clasificaciones.

#### III.5.2.1 - Asociación de tipos histológicos con características clínicas.

\* Sexo.

\* Edad. Se establecieron dos grupos: menores de 40 años y mayores de 40 años.

\* Asociación con miastenia gravis.

#### III.5.2.2 - Asociación de tipos histológicos con estadio clínico.

Se realizó el estadiaje de los tumores siguiendo los siguientes criterios dados por Masaoka:

I - Tumor encapsulado.

II - Tumor con invasión microscópica de la cápsula o macroscópica del tejido adiposo o pleura mediastínica.

III - Invasión de órganos adyacentes (pericardio, pulmón o grandes vasos).

IV - Diseminación pleural o pericárdica o linfática o hematógena.

#### III.5.2.3 - Asociación de tipos histológico con evolución.

El seguimiento de los enfermos se obtuvo hasta la muerte o última fecha conocida en que el enfermo seguía vivo. Se registraron las muertes producidas, sus causas y el número de recidivas tumorales en un mismo enfermo.

#### III.5.2.4 - Asociación de tipos histológicos con marcadores

pronósticos.

Para la lectura de los cuatro marcadores pronósticos utilizados se realizó contaje en diez campos de gran aumento y se establecieron proporciones en cuatro categorías de la siguiente forma:

- Negativa
- Leve: Menos de 30 células positivas
- Moderada: De 30 a 70 células.
- Intensa: Más de 70 células.

Para la aplicación de algunos estudios estadísticos los resultados fueron también agrupados en dos categorías:

- 0: negativo o menos de 10 células positivas
- 1: positivo.

### **III.6 - METODO ESTADISTICO.**

Para el procesamiento de los datos se emplearon ordenadores Appel Macintosh con los siguientes programas:

- Base de datos: File Maker Pro.2
- Gráficos: Cricket-Graph 3.1.2.
- Programa estadístico: Statview <sup>TMSE</sup> Graphics +.

#### **III.6.1 - Estadística descriptiva.**

La estadística descriptiva para variables continuas incluye la **media aritmética** como medida de centralización y la **desviación estándar** como medida de dispersión.

#### **III.6.2 - Estadística comparativa.**

- 1 - Para poder comparar las poblaciones se realizaron

primero los test de normalidad.

2 - Una vez establecida la normalidad de la población se utilizaron los test paramétricos:

a) Comparación de medias de dos poblaciones: **T de Student**. En nuestro estudio para datos no pareados.

b) Comparación global de medias de varios grupos: **ANOVA** (Análisis de la varianza).

c) Cuando el ANOVA resultó estadísticamente significativo, la comparación entre cada uno de los grupos se llevó a cabo mediante el test de Scheffé.

d) Para comparar porcentajes en el caso de contrastar poblaciones con variables cualitativas o cuantitativas transformadas en categorías se utilizó el test de Chi cuadrado de Pearson, empleando la corrección de Yates para tablas de 2x2.

### III.7 - BIBLIOGRAFIA.

La búsqueda de la bibliografía se realizó por una doble vía: se revisaron las principales revistas de la especialidad relacionadas con el tema de estudio y, además, la búsqueda se ha ampliado utilizando los sistemas informatizados Medline y Online. En la elaboración del trabajo y sus referencias bibliográficas se han seguido los criterios internacionales recomendados (197).

#### **IV. RESULTADOS.**

#### IV.I.- ESTUDIO CLINICO GENERAL.

De los 55 casos estudiados, 29 eran hombres (53%) y 26 mujeres (43%). La edad media de presentación fué de 51 años (rango:21-79), siendo el 80% de los enfermos mayores de 40 años y sólo en once casos la edad fué inferior. Diecinueve casos se asociaban con miastenia gravis (35%).

El 62% de los enfermos estaba asintomático en el momento del diagnóstico o presentaban síntomas relacionados con la coexistencia de miastenia. En el resto de enfermos las manifestaciones clínicas fueron muy variables: dolor torácico (15%), hemoptisis (7%), dolor pleural o tos (4%) y pérdida de peso (2%).

El estadio clínico se obtuvo en 46 casos: 21 tumores en estadio I (46%), 14 en estadio II (30%), 9 en estadio III (20%) y 2 en estadio IV (4%).

En relación con el procedimiento quirúrgico empleado, en 44 casos se realizó extirpación completa del tumor incluyendo implantes en pleura, pericardio o metástasis en pulmón y, en 11 casos, biopsia diagnóstica por la extensión del tumor o la edad del enfermo en el momento del diagnóstico.

La media de seguimiento fué de 57,08 meses (rango:3-132). Se registraron ocho muertes (tres postoperatorias, dos atribuibles a la presencia del tumor y tres no relacionadas) y tres recidivas a los tres, cuatro y cinco años.

#### **IV.2.- ESTUDIO MACROSCOPICO GENERAL.**

El tamaño medio de los tumores estudiados fue de 6,59 cm (rango:0,5-15) y el peso 163,6 gr (rango 20-550). El 53% presentaba una cápsula completa o incompleta identificable macroscópicamente. Otras características encontradas fueron: superficie multinodular (31%), hemorragias o quistes (7%), necrosis (5%) y calcificaciones (4%).

#### **IV.3.- REPRODUCIBILIDAD HISTOLOGICA DE LA CLASIFICACIÓN DE MÜLLER-HERMELINK.**

De los 55 casos estudiados, en 39 de ellos (71%) hubo acuerdo total entre los tres patólogos que participaron en el estudio para clasificar el tumor en uno de los tipos histológicos de la clasificación de Müller-Hermelink. Si se diferenciaban los tumores en timomas de comportamiento benigno (medular y mixto) y timomas de comportamiento agresivo (cortical, organoide y carcinoma tímico bien diferenciado), el grado de concordancia aumentaba hasta un 87%.

En 16 casos (29%) hubo algún grado de discordancia. Estos casos fueron revisados y discutidos posteriormente, utilizando la expresión inmunohistoquímica de los anticuerpos 34BE12 y Tdt para visualizar claramente la morfología de las células epiteliales y linfoides.

#### **IV.4.- CLASIFICACION HISTOLOGICA DE LOS TUMORES.**

##### **IV.4.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.**

Los 55 casos se clasificaron de la siguiente manera:

- \* Timomas corticales: 22 casos (40%).
- \* Timomas organoides: 9 casos (16%).
- \* Carcinoma tímico bien diferenciado: 5 casos (9%).
- \* Timomas mixtos: 11 casos (20%).
- \* Timomas medulares: 8 casos (15%).

#### IV.4.2 - Clasificación de Rosai y Levine.

Los casos fueron clasificados en:

- \* Timomas de predominio linfocítico: 19 casos (35%).
- \* Timomas de predominio epitelial: 8 casos (15%).
- \* Timomas mixtos linfoepiteliales: 14 casos (25%).
- \* Timomas de células fusiformes: 9 casos (16%).
- \* Timoma atípico: 5 casos (9%).

#### IV.5.- RELACION DE FACTORES CLINICOS CON TIPOS HISTOLOGICOS.

##### IV.5.1 - EDAD.

##### IV.5.1.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.

Se obtuvo significación estadística ( $p=0.02$ ) al relacionar la edad con los tipos histológicos. La edad media de presentación de los distintos tumores fue la siguiente:

- \* T. Corticales: 48 años.
- \* T. Organoides: 41 años.
- \* CTBD: 61 años.
- \* T. Mixto: 53 años.
- \* T. Medular: 61 años.

El 100% de los timomas medulares y carcinomas tímicos

bien diferenciados y el 91% de los timomas mixtos se daban en enfermos mayores de 40 años y, sólo en los timomas organoides, predominaban los menores (56%). Al aplicar el ANOVA se obtuvo significación en el test de Scheffé entre timomas organoides y el resto de los subtipos.

#### IV.5.1.2 - Clasificación de Rosai y Levine.

No se obtuvo relación estadísticamente significativa con los tipos histológicos de esta clasificación ( $p=0.54$ ). En todos predominaban los enfermos mayores de 40 años. La edad media de presentación fué la siguiente:

- \* T. mixto linfoepitelial: 45 años.
- \* T. predominio linfocítico: 45 años.
- \* T. predominio epitelial: 56 años.
- \* T. células fusiformes: 61 años.
- \* T. atípico: 61 años.

#### IV.5.1.3 - Otros factores clínicos.

Aunque no se encontró significación al relacionar la edad con el estadio, ninguno de los enfermos menores de 40 años presentaba un estadio IV. Las muertes registradas y las recidivas ocurrieron todas en enfermos mayores de 40 años con excepción de un caso con recidiva y muerte que se produjo en un enfermo de 23 años.

#### IV.5.2 - SEXO.

##### IV.5.2.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.

No se demostró relación significativa entre el sexo y

los tipos histológicos ( $p=0.45$ ). Sólo en los T. corticales predominan los hombres (68%) frente a las mujeres.

#### IV.5.2.2 - Clasificación de Rosai y Levine:

Se obtuvo una  $p=0.06$  con predominio de las mujeres en todos los tipos salvo en los timomas mixtos linfoepiteliales donde el 86% eran hombres.

#### IV.5.2.3 - Otros factores clínicos.

Aunque no se encontró significación en la relación entre estadio y sexo ( $p=0.09$ ), se observó que el mayor porcentaje de casos en los estadios I y IV correspondían a mujeres y en los estadios II y III a hombres.

#### IV.5.3 - **MIASTENIA GRAVE.**

##### IV.5.3.1 - Clasificación de Müller-Heremlink.

Se encontró relación significativa con tipos histológicos ( $p=0.02$ ). Aunque la enfermedad se observó en todos los tipos, los timomas corticales y organoides predominaban en enfermos con miastenia (79%) y el timoma mixto era el menos frecuente (9%).

##### IV.5.3.2 - Clasificación de Rosai y Levine.

No se encontró relación significativa ( $p=0.09$ ). En todos los tipos predominaban los enfermos sin miastenia salvo en el grupo de los timomas mixtos linfoepiteliales donde el 64% de los casos se asociaban a miastenia.

##### IV.5.3.3 - Otros factores clínicos.

Se encontró relación significativa con la edad ( $p=0.001$ )

siendo la edad media de los enfermos sin miastenia de 55 años y de los enfermos con miastenia de 43 años. El 90% de los enfermos con miastenia tenían una edad comprendida entre 35 y 49 años y el 90% de los enfermos sin miastenia entre 51 y 58 años.

No se demostró relación significativa con estadio, sexo (diez hombres y nueve mujeres) o tamaño del tumor (tamaño medio de 7,8 cm en enfermos sin miastenia y 5,6 cm en enfermos con miastenia).

#### **IV.5.4 - ESTADIO.**

##### **IV.5.4.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.**

El estadiaje se realizó en 46 casos: 17 timomas corticales, 3 organoides, 8 medulares, 10 mixtos y tres carcinomas tímicos bien diferenciados.

Se obtuvo una  $p=0.05$  al relacionarlo con los tipos histológicos. Todos los timomas mixtos, organoides y medulares fueron diagnosticados en estadios I y II salvo un caso de timoma medular en estadio III. Los CTBD se diagnosticaron en estadios II y III y los corticales en todos los estadios constituyendo el 77,7% de los casos en estadio III y el 100% de los casos en estadio IV.

##### **IV.5.4.2 - Clasificación de Rosai y Levine.**

Los 46 casos correspondieron a 13 timomas mixtos, 15 de predominio linfocítico, 7 de predominio epitelial, 8 de células fusiformes y 3 timomas atípicos.

No se obtuvo relación significativa ( $p=0.44$ ). Los timomas de predominio linfocítico predominaban en los estadios I y II (36 y 43%), los timomas mixtos en el estadio III (56%) y sólo dos casos se encontraban en estadio IV (un timoma de predominio epitelial y uno de predominio linfocítico).

#### **IV.5.5 - EVOLUCION.**

##### **IV.5.5.1 - Clasificación de Müller-Hermelink y clasificación de Rosai y Levine.**

El tipo y las características que presentaron los tumores en las muertes y recidivas registradas se exponen conjuntamente especificando los tipos histológicos de ambas clasificaciones.

El seguimiento se obtuvo en 33 casos que correspondían a 14 timomas corticales, 5 timomas organoides, 2 carcinomas tímicos bien diferenciados, 8 timomas mixtos cortico-medulares y 4 timomas medulares en la clasificación de Müller-Hermelink (M-H) y 10 timomas de predominio linfocítico, 7 timomas de predominio epitelial, 10 timomas mixtos linfopiteliales, 4 timomas de células fusiformes y 2 timomas atípicos en la clasificación de Rosai y Levine (R-L).

Las ocho muertes registradas presentaron las siguientes características:

##### **\* Muertes postoperatorias:**

- Timoma cortical (M-H)/ Timoma de predominio linfocítico

(R-L) en hombre de 69 años con tumor en estadio II.

- Carcinoma tímico bien diferenciado (M-H)/ Timoma atípico (R-L) en mujer de 56 años con tumor en estadio desconocido.

- Timoma cortical (M-H)/ Timoma mixto (R-L) en hombre de 42 años con tumor en estadio III.

**\* Muertes no atribuibles al tumor:**

- Timoma medular (M-H)/ Timoma de células fusiformes (R-L) en hombre de 53 años con tumor en estadio I y muerte por hemorragia digestiva.

- Timoma mixto (M-H)/ Timoma de predominio linfocítico (R-L) en mujer de 62 años con aplasia pura de células rojas y muerte por sepsis.

- Timoma medular (M-H)/ Timoma de células fusiformes en mujer de 58 años con tumor en estadio I y muerte por infarto agudo de miocardio.

**\* Muertes secundarias al tumor:**

- Timoma cortical (M-H)/ Timoma mixto (R-L) en hombre de 41 años con tumor en estadio IV.

- Timoma organoide (M-H)/ Timoma de predominio linfocítico (R-L) en mujer de 23 años con tumor en estadio II que recidivó a los 3 años y muerte por insuficiencia respiratoria.

Las tres **recidivas** registradas correspondieron a:

- Timoma organoide (M-H)/ Timoma de predominio linfocítico (R-L) ya mencionado.

- Timoma cortical (M-H)/ Timoma de predominio linfocítico

(R-L) en mujer de 52 años con tumor en estadio II que recidivó a los 4 años con metástasis pulmonares.

- Timoma medular (M-H)/ Timoma de células fusiformes (R-L) en mujer de 58 años con tumor en estadio II que recidivó a los 5 años con metástasis múltiples.

#### **IV.6.- MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS Y TIPOS HISTOLOGICOS.**

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron en 52 casos: 21 T.Corticales, 9 T.Organoides, 9 T.Mixtos, 8 T.Medulares y 5 CTBD según la clasificación de Müller-Hermelink y 17 T.de predominio linfocítico, 14 T.mixtos linfoepiteliales, 5 T.atípicos, 8 T.de predominio epitelial y 8 T. de células fusiformes según la clasificación de Rosai y Levine.

##### **IV.6.1. EXPRESION DE Ki-67.**

Doce casos fueron negativos (23,07%) y cuarenta positivos (76,9%).

##### **IV.6.1.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.**

Se encontró significación estadística en su relación con tipos histológicos ( $p=0.04$ ). Sólo en los T. Medulares predominaron los casos negativos (63%) frente a los restantes tipos con predominio de casos positivos. Al aplicar el ANOVA se encontró significación del timoma cortical frente al medular y del timoma organoide frente al medular.

En relación con la intensidad de expresión, los timomas corticales predominaron en todas las categorías (leve, mo-

derada e intensa) constituyendo el 50% de los casos con expresión moderada y el 33,3% de los casos con expresión intensa.

#### IV.6.1.2 - Clasificación de Rosai y Levine.

No se encontró relación significativa con los tipos histológicos ( $p=0.37$ ). Sólo en los timomas de células fusiformes predominaron los casos negativos (63%).

#### IV.6.1.3 - Otros parámetros estudiados.

a) Factores clínicos. Al relacionar la expresión de Ki-67 con el estadio se obtuvo una  $p=0.09$  observándose una distribución similar de casos positivos en los estadios I, II y III y sólo un 4% de casos positivos en estadio IV. Entre los casos con ausencia de expresión, el 78% se encontraban en estadio I.

b) Otros marcadores. Se observa relación directa y estadísticamente significativa ( $p=0.0006$ ) entre la expresión de p53 y Ki-67 con un 70% de casos con expresión positiva para ambos anticuerpos y relación inversa aunque no significativa con la expresión de Bcl-2 con un 75% de casos positivos para Ki-67 y negativos para Bcl-2.

#### IV.6.2.- EXPRESION DE P53.

Veintitres casos fueron positivos (44,23%) y veintinueve negativos (55,76%).

#### IV.6.2.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.

No se encontró relación significativa con ninguno de los

tipos histológicos. Se observó predominio de casos positivos en T. corticales, T. organoides y CTBD (57,78 y 60%) y de casos negativos en T. medulares y mixtos (56 y 63%). En relación con la intensidad de expresión el mayor porcentaje de casos con expresión moderada e intensa correspondían a T. corticales.

#### IV.6.2.2 -Clasificación de Rosai y Levine.

La relación no fué significativa ( $p=0.98$ ). Los casos positivos predominaban en los timomas mixtos, de predominio linfocítico y atípicos (57,59 y 60%) y los casos negativos en los timomas de células fusiformes (63%). Los timomas de predominio epitelial presentaban un 50% de casos negativos y un 50% de casos positivos.

#### IV.6.2.3 - Otros parámetros estudiados.

- a) Factores clínicos. No se demostró relación significativa con factores como tamaño del tumor, presencia de miastenia, o estadio. Al considerar el estadio se observó un predominio de los casos negativos en los estadios I y IV frente a los estadios II y III donde predominan los casos positivos.
- b) Otros marcadores. No existía relación entre la expresión de p53 y Bcl-2 ó EGFr.

#### IV.6.3.- EXPRESION DE EGFR.

Veintiocho casos fueron negativos (54%) y veinticuatro positivos (46%).

#### IV.6.3.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.

No se encontró relación significativa ( $p=0.1$ ) con ninguno de los tipos histológicos aunque se observó un mayor porcentaje de casos positivos en CTBD y timomas medulares (80 y 63%) frente a timomas corticales, organoides y medulares donde predominan los casos negativos (52%, 89% y 56% respectivamente). Al considerar la intensidad de expresión existía un predominio de los timomas medulares y carcinomas tímicos bien diferenciados dentro de la categoría 3 (intensa).

#### IV.6.3.2 - Clasificación de Rosai y Levine.

Se demostró relación significativa ( $p=0.04$ ) entre la expresión del EGF-r y los tipos de esta clasificación. El mayor porcentaje de casos con expresión positiva correspondieron a los timomas atípicos, timomas de predominio epitelias y timomas de células fusiformes (80, 75 y 63%). En el ANOVA se encontró significación de timomas mixtos frente a timomas atípicos y de predominio epitelial y de timomas de predominio linfocítico frente a los mismos tipos histológicos.

#### IV.6.3.3 - Otros parámetros estudiados.

a) Factores clínicos. No existía relación significativa con factores como tamaño del tumor o presencia de miastenia. En relación con el estadio se obtuvo una  $p=0.09$  con mayor porcentaje de casos negativos en estadios I y II (65 y 58%) y de casos positivos en estadios III y IV (78 y 67%).

b) Otros marcadores. No se observó ninguna relación entre la expresión de Bcl-2 y EGF-r.

#### **IV.6.4.- EXPRESION DE BCL-2.**

Treinta y nueve casos fueron negativos (75%) y trece positivos (25%).

##### **IV.6.4.1 - Clasificación de Müller-Hermelink.**

No se demostró relación significativa con tipos histológicos ( $p=0.11$ ). Sólo en los timomas organoides se observó un discreto predominio de los casos positivos (56%) frente a los restantes tipos en los que predominaban los casos negativos. En relación con la intensidad de expresión, los CTBD constituyen el mayor número de casos con expresión intensa (50%).

##### **IV.6.4.2 - Clasificación de Rosai y Levine.**

Relación no significativa ( $p=0.18$ ) con predominio de casos negativos en todos los tipos de timomas.

##### **IV.6.4.3 - Otros parámetros estudiados.**

a) Factores clínicos. Relación no significativa con tamaño del tumor, presencia de miastenia o estadio.

## **V. DISCUSSION.**

## V.1.- REPRODUCIBILIDAD HISTOLOGICA DE LA CLASIFICACION DE MÜLLER-HERMELINK.

La reproducibilidad de una clasificación constituye un importante criterio para su aceptación y uso en el diagnóstico general. Los resultados obtenidos en este trabajo con un 71% de acuerdo total entre los tres patólogos que participaron en el estudio, se aproximan a los conseguidos por Close, Kirchner y cols. (106) quienes alcanzan un 78% de concordancia y superan ampliamente los obtenidos por Dawson y cols. (116) con sólo un 35%. Los casos clasificados inicialmente dentro del mismo tipo histológico cumplían claramente los criterios definidos por Marino, Müller-Hermelink, Kirchner y Pescarmona (19,104,105,134). Así, los **timomas medulares** estaban constituidos por células fusiformes con núcleos elongados de cromatina fina y nucléolo poco evidente. En todos los casos salvo en uno en el que las células adoptaban el patrón definido por Quintanilla-Martínez (52) como pseudoglandular o "adenoma-like" (Fig 1), las células se disponían en patrón estoriforme (Fig 2). Los **timomas corticales** se caracterizaban por células epiteliales grandes con núcleos vesiculares y nucléolos prominentes (Fig.3). Presentaban frecuentes espacios perivasculares y quistes y en ninguno de los casos se encontraron corpúsculos de Hassall. Los **timomas mixtos** mostraban los dos componentes epiteliales descritos en proporciones simila-

res. Los timomas organoides se caracterizaban por su semejanza con el timo normal: áreas difusas de diferenciación medular, persistencia de los corpúsculos de Hassall y frecuente patrón en cielo estrellado (Figs.4 y 5). En los carcinomas tímicos bien diferenciados las células epiteliales exhibían atipia citológica y ocasionales mitosis con frecuente queratinización individual (Fig.6).

Al considerar los casos discordantes se encontraron, al igual que en otras series publicadas (52,106,112,113,116), tres problemas principales:

a) Diferenciación entre timoma mixto y timomas medular o cortical (9 casos).

La principal dificultad para diferenciar entre los timomas mixtos y los timomas corticales o medulares radicaba en la variabilidad histológica entre áreas de un mismo tumor. De esta forma, existían tumores con características de timoma cortical en unas áreas histológicas y de timoma medular en otras. Esta variabilidad apoya la recomendación hecha por algunos autores (106,116) sobre la necesidad de un muestreo adecuado en este tipo de tumores y la consideración de que biopsias pequeñas pueden no ser útiles para un diagnóstico correcto. Los casos problemáticos fueron clasificados como corticales o medulares cuando las áreas características de cada tipo histológico constituían más del 75% del tumor. En caso contrario se clasificaron como mixtos.

b) Diferenciación entre timoma organoide y timoma cortical (6 casos).

En este punto los problemas se centraron más en la morfología de la célula epitelial que en los patrones histológicos. Así, tumores constituidos por células epiteliales con morfología cortical (células grandes con núcleos vesiculares y nucléolos prominentes) presentaban características propias de los timomas organoides como áreas de diferenciación medular difusas, abundantes corpúsculos de Hassall y marcada similitud con la histología del timo normal. Estos tumores se clasificaron como timomas organoides. Por otro lado, tumores con células epiteliales de tipo organoide adoptaban patrones de crecimiento difuso con frecuentes espacios perivasculares y se clasificaron como timomas corticales.

c) Diferenciación entre timoma cortical y carcinoma tímico bien diferenciado (1 caso).

La dificultad para diferenciar entre los tres tipos de timomas de origen cortical (cortical convencional, organoide y carcinoma tímico bien diferenciado) y el uso del término "carcinoma" constituyen para muchos autores dos de los inconvenientes principales de esta clasificación (115-118, 120). Estos autores consideran poco objetivos los criterios establecidos para el diagnóstico diferencial de los tres tipos e inadecuada la utilización de este término ya que

podría inducir a confusión con el carcinoma tímico de células escamosas bien diferenciado y debería reservarse sólo para tumores con manifiesto potencial metastásico. La presencia de atipia citológica, invasión local, alto riesgo de recurrencias y bajo, pero probado potencial metastásico, legitima el uso del término carcinoma.

Las críticas sobre la subjetividad de los criterios para el diagnóstico diferencial entre carcinoma tímico bien diferenciado y timoma cortical son inconsistentes si nos atenemos a la definición establecida por Kirchner y cols.(105) de carcinoma tímico bien diferenciado como aquel tumor en el que las áreas de diferenciación epidermoide constituyen más del 50% del mismo. En base a esta definición y considerando las características nucleares propuestas por Tan y col.(113) como propias del carcinoma tímico bien diferenciado (núcleos poligonales con frecuentes pliegues nucleares) frente a las del timoma cortical (núcleos grandes y vesiculares), el caso discordante fué clasificado como carcinoma tímico bien diferenciado.

**V.2.- RELACION ENTRE AMBAS CLASIFICACIONES.**

La relación entre ambas clasificaciones se expone en la siguiente tabla:

	<b>CORTICAL</b>	<b>ORGANOIDE</b>	<b>MEDULAR</b>	<b>MIXTO</b>	<b>CTBD</b>
<b>MIXTO</b>	12			2	
<b>P.LINFOC.</b>	6	9		4	
<b>P.EPIT</b>	4			4	
<b>T.ATIPICO</b>					5
<b>FUSIFORME</b>			8	1	

Al considerar los diferentes tipos histológicos de ambas clasificaciones se observa que todos los timomas medulares, timomas organoides y carcinomas tímicos bien diferenciados de Müller-Hermelink se corresponden respectivamente con los timomas de células fusiformes, timomas de predominio linfocítico y timomas atípicos, de la clasificación de Rosai y Levine. Los timomas corticales y timomas mixtos cortico-medulares de Müller-Hermelink se corresponden con timomas de predominio linfocítico, predominio epitelial y mixto linfoepitelial de Rosai y Levine, encontrándose además un caso de timoma mixto cortico-medular que fué clasificado como timoma de células fusiformes en la clasificación de Rosai y Levine. Esta correlación entre los diferentes tipos histológicos de ambas clasificaciones sólo ha sido examina-

da previamente por Quintanilla-Martínez y cols.(52).

### V.3.- RELACION ENTRE FACTORES CLINICOS Y TIPOS HISTOLOGICOS.

#### V.3.1 - SEXO

Aunque los timomas son neoplasias que no muestran predilección por ningún sexo, en la mayoría de las series publicadas se observa predominio de las mujeres sobre los hombres (50,52,53,59,110,183). Curiosamente, las series en las que predominan los hombres corresponden a estudios realizados en países asiáticos, considerándose en ellos la posibilidad de que existan variaciones en la distribución geográfica por sexos de forma que, en estos países, estos tumores afectarían con más frecuencia a los hombres (101,112,113). En nuestro trabajo, si bien existen más hombres que mujeres, la distribución por sexos fué muy similar (29 hombres y 26 mujeres).

Al considerar las dos clasificaciones estudiadas no se encontraron diferencias entre los tipos histológicos y el sexo del enfermo. Al aplicar la clasificación de Müller-Hermelink, ( $p=0.45$ ) las mujeres predominaron en todos los tipos excepto en los timomas corticales en los que predominaron los hombres (68%). Los timomas organoides descritos en un principio por Pescarmona y cols.(105) como más frecuentes en mujeres presentaban en nuestra serie una distribución similar (45% frente a 55%).

Al utilizar la clasificación de Rosai y Levine ( $p=0.06$ ) se encontró un marcado predominio de los hombres en los timomas de tipo mixto linfoepiteliales (86%) frente a los restantes tipos histológicos en los que predominaban las mujeres.

No se encontraron diferencias entre factores como la edad, la presencia de miastenia o el estadio y el sexo de los enfermos.

La mayoría de los trabajos consultados (50,52,53,59,101,112) realizan un análisis general del sexo de los pacientes sin establecer relaciones entre éste y los tipos histológicos o entre éste y otros factores clínicos. Al analizar los resultados obtenidos en este estudio no se demuestran diferencias significativas entre el sexo y los tipos histológicos de ambas clasificaciones. No obstante, al aplicar la clasificación de Rosai y Levine, el valor obtenido en el análisis estadístico se aproxima a la significación, estableciéndose la posibilidad de que los timomas mixtos linfoepiteliales sean tumores de presentación más frecuente en hombres, posibilidad no confirmada al no encontrar estudios similares en la literatura consultada.

#### **V.3.2 - EDAD.**

Aunque los timomas son neoplasias que pueden afectar a pacientes de cualquier edad, son infrecuentes en niños y la mayoría de los casos se encuentran en enfermos mayores de

40 años con una mayor incidencia en la quinta-sexta década de la vida (26,49-53).

La edad media de presentación en este estudio es de 50 años, dato similar al referido en la bibliografía (49,50, 59,101). De los 55 casos, ninguno se dió en edad infantil y sólo en un caso la edad fué inferior a 30 años confirmándose de esta forma la mayor incidencia de estos tumores en la vida adulta.

Cuando se utilizó la clasificación de Müller-Hermelink se encontraron diferencias en la edad de presentación de los distintos tipos histológicos ( $p=0.02$ ). El valor más bajo correspondió a los timomas organoides con una edad media de 41 años y el más alto a los timomas medulares y carcinomas tímicos bien diferenciados, ambos con edades medias de 61 años. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios (53,101,109,112) que encuentran una edad media de presentación en los timomas medulares y carcinomas tímicos bien diferenciados superior a la de los otros tipos histológicos. Coincidimos también con Quintanilla-Martínez y cols.(53) en que los timomas organoides son los que aparecen con mayor frecuencia en enfermos más jóvenes, siendo el único tipo de esta serie en el que predominaron los enfermos menores de 40 años y existiendo incluso significación al aplicar el análisis estadístico mediante el test de ANOVA frente a los otros tipos histológicos.

Utilizando la clasificación de Rosai y Levine no se observaron diferencias en la edad de presentación de los cinco tipos estudiados, predominando en todos ellos los pacientes mayores de 40 años. El valor más bajo correspondió a los timomas mixtos linfoepiteliales y timomas de predominio linfocítico, ambos con edades medias de 45 años y el más alto a los timomas atípicos y timomas de células fusiformes, ambos con valores medios de 61 años. En la literatura revisada no se han encontrado estudios que analicen la relación entre los tipos histológicos de esta clasificación y la edad media de presentación. Pescarmoma y cols.(109) realizan un estudio utilizando la clasificación de Salyer-Eggleston (100), clasificación que incluye los tipos mixto linfoepitelial, predominio linfocítico y predominio epitelial, no encontrando diferencias en la edad de presentación.

Al estudiar la relación entre la edad y otros factores clínicos se encontraron diferencias entre ésta y la presencia o no de miastenia gravis ( $p=0.001$ ). En los pacientes con miastenia la edad media fué inferior (43 años) a la de los pacientes que no presentaban la enfermedad (55 años). La detección de timomas asociados a miastenia en pacientes más jóvenes es referida en otros estudios (26,49,51) que atribuyen este hecho al seguimiento realizado en estos enfermos facilitando el descubrimiento de tumores asintomáti-

cos.

En relación con la evolución de los casos, el único enfermo de este estudio con edad inferior a 30 años presentó recidiva tumoral y muerte secundaria al tumor. Aunque existen autores (49) que consideran la edad inferior a 30 años como factor pronóstico adverso, actualmente se acepta que la edad de presentación de estas neoplasias no tiene relación con el pronóstico de las mismas.

### V.3.3 - MIASTENIA GRAVIS.

El significado pronóstico de la presencia de miastenia ha sido objeto de controversia: existen estudios que consideran su presencia como signo de mal pronóstico (60,100) y otros que le atribuyen significación favorable al permitir el diagnóstico temprano de los tumores (99).

El 37% de los casos estudiados en nuestra serie se asociaban con miastenia. El porcentaje de casos asociados a miastenia varía mucho en los trabajos consultados con series que muestran un porcentaje similar (52,110), superior (49,50,114) o inferior (59,112,113).

Al clasificar nuestros casos según **Müller-Hermelink** se encontraron diferencias ( $p=0.02$ ) entre los cinco tipos histológicos. Aunque la enfermedad se asociaba a todos ellos, fué más frecuente en enfermos con timomas de tipo organoide y cortical, coincidiendo estos resultados con los referidos por otros autores que encuentran una mayor asociación de

los timomas de origen cortical con esta enfermedad (52,201, 110,112,113). Aunque en esta serie sólo uno de los carcinomas tímicos bien diferenciados se asoció con miastenia, este dato puede considerarse no significativo dado el escaso número de timomas de este tipo incluidos en el estudio. Los timomas de tipo mixto cortico-medular fueron los que presentaron una menor asociación con la enfermedad, dato similar al referido por Ricci y cols. (110).

Cuando se utilizó la clasificación de Rosai y Levine no se observaron diferencias entre los tipos histológicos predominando en todos ellos los enfermos sin miastenia, excepto en los timomas de tipo mixto linfoepitelial donde el 64% de los enfermos presentaron miastenia. El tipo histológico que con menor frecuencia se asoció con la enfermedad en esta clasificación fué el timoma de células fusiformes. La asociación de miastenia con los tipos histológicos de esta clasificación varía mucho entre los trabajos consultados. Así, existen estudios que encuentran una mayor asociación con timomas de predominio epitelial (50,59) y otros donde la enfermedad se asocia a los timomas de predominio linfocítico (4,26). El hallazgo en esta serie de una mayor incidencia de la enfermedad en timomas de tipo mixto parece confirmar la falta de relación existente entre los tipos histológicos de esta clasificación y la presencia de la enfermedad.

Al analizar la relación existente entre la enfermedad y otros factores clínicos, se coincide con otros estudios al no encontrar relación con el sexo de los enfermos (52,112, 113). La relación entre la presencia de miastenia y el tamaño y/o estadio del tumor ha sido analizada en múltiples trabajos con el fin de aclarar la repercusión pronóstica de esta enfermedad en este tipo de tumores. De forma general, no se demuestra relación significativa al comparar el tamaño tumoral en enfermos con y sin la enfermedad. Sin embargo es cierto que, al igual que en nuestro estudio, los trabajos que analizan el tamaño tumoral encuentran un tamaño medio inferior en los pacientes que presentan la enfermedad (49,51), hecho que podría explicarse por el seguimiento que se les realiza de su enfermedad clínica. En relación con el estadio, aunque para algunos autores la asociación con la enfermedad favorecería el diagnóstico de estos tumores en estadios iniciales (51,99), no se ha demostrado significativamente la relación entre la presencia de miastenia y el diagnóstico precoz de estos tumores (113, 119,198). Actualmente se acepta que la presencia de la enfermedad no influye en el pronóstico de estos tumores (49, 95,113,117,198).

#### **V.3.4 - ESTADIO.**

La presencia de invasión es el único factor de valor pronóstico aceptado de forma general. Desde que en 1981,

Masaoka (93) propone sus estadios, éstos son aceptados por todos los autores y se reconoce su importancia para predecir el comportamiento de estos tumores. Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas en la supervivencia global entre los estadio I-II y III-IV y la existencia de timomas no invasivos capaces de dar metástasis han puesto en duda su utilidad pronóstica.

De forma global, el porcentaje de casos en los distintos estadios encontrado en nuestro análisis es similar al observado en otros estudios (52,53,112), con el mayor número de casos en estadio I y el menor en estadio IV.

Al relacionar el estadio con los tipos histológicos de la clasificación de **Müller-Hermelink**, se encontraron diferencias entre ellos ( $p=0.05$ ). Todos los timomas mixtos cortico-medulares, organoides y medulares salvo un caso de timoma medular fueron diagnosticados en estadios I y II. La consideración de los timomas medulares como tumores de comportamiento benigno se refiere en múltiples publicaciones que no observan recidivas de este tipo histológico y encuentran los casos diagnosticados en estadios iniciales (53,53,109,110). Sin embargo, otros autores (113,117) han demostrado la existencia de timomas medulares en estadios avanzados o capaces de recidivar y producir la muerte del enfermo. En nuestra serie uno de los timomas medulares fué diagnosticado en estadio III y otro desarrolló múltiples

metástasis a los cinco años. La introducción del concepto de carcinoma tímico bien diferenciado de células fusiformes por Quintanilla-Martínez y cols.(52) y la confirmación posterior por otros autores de la existencia de esta variante (113,193), hace necesario el diagnóstico diferencial entre este tipo de carcinoma tímico bien diferenciado y el timoma medular. Los dos timomas medulares de este estudio con estadio avanzado y recidiva no presentaron ninguna de las características propias de esta variante como atipias, mitosis o queratinización individual, por lo que se consideraron timomas medulares de comportamiento agresivo. Hay que resaltar que el tumor diagnosticado en estadio III presentaba un patrón pseudoglandular, patrón que para algunos autores (4) conlleva un peor pronóstico. Los timomas de tipo mixto son considerados también como tumores de comportamiento benigno y, como en nuestro estudio, suelen ser diagnosticados en estadios I y II (52,53,109).

Se acepta de forma general que los timomas de origen cortical (cortical convencional, organoide y carcinoma tímico bien diferenciado) tienen un comportamiento más agresivo (52,101,110,112,113). Aunque en nuestra serie los timomas organoides presentaron un comportamiento similar a los timomas medulares y mixtos (estadios I y II), otros autores (53,112,113,199) comunican un comportamiento intermedio entre estas dos variantes y el resto de timomas del

grupo cortical y un mayor riesgo de recurrencias para esta variante histológica. Los carcinomas tímicos bien diferenciados y los timomas corticales son los dos tipos histológicos de esta clasificación que para muchos presentan el comportamiento más agresivo con mayor riesgo de invasión, recurrencia y muerte (19,52,112,113,199). Todos nuestros casos de carcinoma tímico bien diferenciados se diagnosticaron en estadios II y III. Ningún caso fué diagnosticado en estadio IV aunque ésto podría ser consecuencia del escaso número de casos estudiados. Aunque los timomas corticales se diagnosticaron en todos los estadios, fueron el tipo predominante de los encontrados en los estadios III y IV.

Cuando se aplicó la clasificación de Rosai y Levine no se encontraron diferencias entre los tipos histológicos y el estadio ( $p=0.44$ ). Los timomas de predominio linfocítico fueron diagnosticados en estadios I, II y III, y los timomas mixtos linfoepiteliales y timomas de predominio epitelial en todos los estadios. Los trabajos consultados (4,26,49,59) sobre esta clasificación consideran de forma general el timoma de células fusiformes como un tumor de comportamiento benigno pero, al estudiar los restantes tipos, las conclusiones varían mucho. Existen estudios que consideran los timomas de predominio linfocítico como los de peor pronóstico (63), estudios en los que este tipo histológico sería el de mejor pronóstico (51) y otros en los que el

tipo histológico de peor comportamiento sería el timoma de predominio epitelial (4,26,49). En nuestro análisis, los timomas diagnosticados en estadios más avanzados fueron los timomas mixtos con un 46% de los casos en estadios III y IV frente a los timomas de predominio epitelial con un 25% de los casos en estadios III y IV y los timomas de predominio linfocítico con sólo un 7% de los casos en estadio III. Si consideramos estos resultados el timoma mixto sería el tumor más invasivo de esta serie, no coincidiendo con ninguno de los trabajos mencionados anteriormente y confirmando la ausencia de relación entre el estadio y los tipos histológicos de esta clasificación.

#### V.3.5 - EVOLUCION.

De los 55 casos estudiados sólo tres recidivaron (5,4%), valor inferior aunque aproximado al referido en otras series (198,199). Los tumores que recidivaron correspondieron a un timoma cortical, un timoma organoide y un timoma medular según la clasificación de Müller-Hermelink y dos timomas de predominio linfocítico y un timoma de células fusiformes según la clasificación de Rosai y Levine.

Al analizar la relación entre las recidivas y el estadio clínico no se encontró significación ya que todos los tumores que recurrieron fueron diagnosticados en estadio II. Coincidiendo con estudios (199) que encuentran un estadio mayor en la recidiva, los tres tumores de esta serie reci-

divararon en un estadio superior (dos en estadio III y uno en estadio IV). No se encontró sin embargo, como afirman esos mismos estudios, progresión histológica hacia tipos de peor pronóstico ya que todos recidivaron con el mismo tipo histológico que presentaban en el diagnóstico inicial.

De todas las muertes registradas sólo dos fueron causadas por el tumor (3,6%) confirmando el bajo índice de mortalidad de estas neoplasias. Las muertes fueron debidas según la clasificación de Müller-Hermelink a un timoma cortical y un timoma organoide reafirmando el mayor comportamiento agresivo de estos tipos. En la clasificación de Rosai y Levine se debieron a un timoma de predominio linfocítico y un timoma mixto linfoepitelial confirmando la variabilidad de esta clasificación en relación con el pronóstico de los diferentes tipos histológicos.

#### **V.4.- RELACION ENTRE MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS Y TIPOS HISTOLOGICOS.**

##### **V.4.1 - EXPRESION DE CITOQUERATINA 34BE12 Y DE TDT.**

En todos los tipos histológicos de la clasificación de Müller-Hermelink se encontró expresión de la citoqueratina 34BE12 (Fig.7). Aunque éste en uno de sus primeros artículos (108) no demostró positividad para esta citoqueratina en los timomas de tipo cortical, estudios posteriores han obtenido resultados muy variables (22,52,138,139,141).

Al estudiar la expresión del marcador linfoide Tdt, se

encontró una mayor expresión en los timomas de origen cortical existiendo incluso relación significativa ( $p=0.04$ ) y coincidiendo con otros estudios realizados que demuestran correlación entre el inmunofenotipo de los linfocitos acompañantes y la clasificación de Müller-Hermelink (52).

En nuestro trabajo, dos de los carcinomas tímicos bien diferenciados se acompañaban de linfocitos Tdt negativos. El primer caso consistía en un tumor de 4 cm., localizado claramente en timo y que presentaba invasión capsular (estadio II). El segundo caso correspondía a un enfermo de 79 años al que sólo se le realizó biopsia por su edad y que presentaba implantes en pericardio en el momento del diagnóstico (estadio III). En ambos casos el tumor fué inicialmente clasificado como carcinoma tímico bien diferenciado por los tres patólogos pero, al encontrar negatividad de los linfocitos acompañantes para Tdt, los casos fueron revisados de nuevo. Aunque en el segundo caso la muestra puede ser considerada como inadecuada por su tamaño, el primer caso continuó considerándose como carcinoma tímico bien diferenciado apoyando de esta forma los trabajos publicados sobre la presencia inconstante de linfocitos inmaduros en este tipo histológico (142,147).

Al considerar la clasificación de Rosai y Levine, no se encontraron diferencias en la expresión de citoqueratina 34BE12 entre los diferentes tipos histológicos. Sin embar-

go, la expresión de Tdt (Fig.8) en los linfocitos acompañantes presenta también relación estadísticamente significativa con los distintos tipos histológicos ( $p=0.02$ ) constituyendo los timomas mixtos linfoepiteliales y los timomas de predominio linfocítico el 70% de los casos con linfocitos Tdt positivos. No se ha encontrado en la literatura revisada ningún estudio que relacione los tipos histológicos de la clasificación de Rosai y Levine con el inmunofenotipo de los linfocitos acompañantes. Si se consideran las equivalencia entre los tipos de ambas clasificaciones expuestas en el apartado anterior, no resulta extraño la presencia de relación significativa ya que los tipos histológicos que para Müller-Hermelink se acompañan de linfocitos inmaduros se corresponden en su mayoría con los timomas mixtos linfoepiteliales y los timomas de predominio linfocítico de la clasificación de Rosai y Levine.

#### V.4.2 - EXPRESION DE KI-67.

Cuando se utilizó la clasificación de Müller-Hermelink se encontraron diferencias en la expresión de Ki-67 entre los tipos histológicos ( $p=0.04$ ). Sólo en los timomas medulares predominaron los casos negativos encontrándose significación al aplicar el test de ANOVA de este tipo frente a los tipos cortical y organoide. Entre los otros tipos histológicos, los timomas de origen cortical (cortical convencional, organoide y carcinoma tímico bien diferenciado)

constituyeron el 75% de los casos con expresión positiva y los timomas mixtos el 17%. El porcentaje de células positivas (moderado-intenso) fué también mayor en el grupo cortical. El mayor porcentaje de expresión encontrado en los tres tipos de este grupo podría utilizarse como un marcador del comportamiento agresivo de estos tumores frente a los timomas de tipo mixto que presentarían un comportamiento intermedio y los timomas medulares con menor expresión de Ki-67 y comportamiento más benigno. El 80% de los carcinomas tímicos bien diferenciados expresaron positividad para Ki-67, expresión que serviría para el diagnóstico diferencial entre la variante fusocelular de este tipo y el timoma medular, hecho ya referido por Yang y cols. (183)

Al aplicar la clasificación de Rosai y Levine no se demostraron diferencias entre los tipos de esta clasificación y la expresión de Ki-67 ( $p=0.37$ ). Aunque sólo en los timomas de células fusiformes predominaron los casos negativos, en los restantes tipos histológicos existía una distribución variable constituyendo los timomas mixtos y timomas de predominio linfocítico el 30 y 35% respectivamente de los casos con expresión positiva. Los timomas de predominio epitelial considerados por Rosai y otros autores (4,26,49) como tumores de peor pronóstico representaron el 15% de los casos positivos.

Cuando se analizó la relación entre la expresión de Ki-

67 y los factores clínicos estudiados, los resultados no coincidieron con los conseguidos por Gilhus y cols. (182) quienes encontraban en su serie de 20 casos relación significativa entre el tamaño del tumor y la expresión de este anticuerpo y sí coincidieron con estos mismos autores en la ausencia de relación con la presencia de miastenia y el estadio clínico. En relación con el estadio ( $p=0.09$ ), el mayor número de casos negativos se encontraron en estadio I. Entre los casos positivos la distribución fué muy similar en los estadios I, II y III. Aunque Yang y cols.

(183) encuentran una tendencia al aumento en la expresión de Ki-67 desde estadios iniciales a estadios avanzados, en esta serie, el porcentaje de casos positivos disminuía progresivamente desde el estadio I al estadio III (37,34 y 23% para los estadios I, II, III respectivamente). Los casos en estadio IV representaron sólo un 5% de los casos positivos, valor no representativo al considerar el escaso número de tumores en este estadio.

Cuando se estudió la expresión de Ki-67 en los tumores que recidivaron o produjeron la muerte de los pacientes se observó que todos los timomas corticales u organoides en la clasificación de Müller-Hermelink ó timomas mixtos linfopiteliales o de predominio linfocítico en la clasificación de Rosai y Levine que recidivaron o fueron causa de muerte presentaban positividad para Ki-67 con expresión moderada-

intensa. Sin embargo, el timoma medular/timoma de células fusiformes que recidivó no expresaba este anticuerpo. Si consideramos además que el único timoma medular/timoma de células fusiformes encontrado en estadio III no presentaba tampoco positividad para Ki-67, la presencia de positividad para Ki-67 podría utilizarse como un marcador del comportamiento agresivo de los timomas del grupo cortical de Müller-Hermelink y de los timomas de tipo mixto y de predominio linfocítico de la clasificación de Rosai pero, no sería de utilidad para predecir el comportamiento de los timomas de tipo medular/timomas de células fusiformes.

#### V.4.3 - EXPRESION DE P53.

En nuestro estudio, al aplicar la clasificación de Müller-Hermelink, no se encontraron diferencias en la expresión de este anticuerpo entre los distintos tipos histológicos. Existía un mayor porcentaje de casos con expresión positiva en los timomas cortical, organoide y carcinoma tímico bien diferenciado, mientras que en los timomas medulares y mixtos predominaron los casos negativos. Los timomas corticales constituyeron el mayor número de casos con expresión moderada e intensa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras series (8,191,192) en las que se observa una mayor expresión de p53 en los timomas del grupo cortical, expresión que estaría de acuerdo con el comportamiento agresivo de estos tipos frente a los timomas mixto y

medular.

Cuando se utilizó la clasificación de Rosai y Levine no se encontraron tampoco diferencias entre los distintos tipos. Los casos con expresión positiva predominaron en los timomas mixtos, de predominio linfocítico y atípicos, y los casos negativos en los timomas de células fusiformes. Los timomas de predominio epitelial presentaban un 50% de casos negativos y un 50% de casos positivos.

No se encontró relación entre la expresión de p53 y el tamaño tumoral, presencia de miastenia o estadio. En relación con éste último, entre los casos negativos predominaban los tumores en estadios I y II mientras que el mayor porcentaje de casos positivos correspondía a los tumores en estadio I. Si se consideran los estadios de forma independiente, al igual que ocurría con la expresión de Ki-67, el número de casos positivos disminuía progresivamente desde el estadio I al estadio IV. Al revisar los artículos que tratan la expresión de este anticuerpo en timomas se encontraron series en las que se demuestra un aumento en la expresión de p53 en timomas invasivos frente a no invasivos (188,193) y series en las que se observa expresión similar en tumores no invasivos como invasivos (192,194). Los resultados de este trabajo estarían de acuerdo con éstas últimas publicaciones en los que se sugiere que la expresión de p53 podría ocurrir precozmente en el proceso neoplásico.

En las muertes y recidivas registradas encontramos los mismos resultados que al analizar la expresión de Ki-67, expresión positiva para p53 en todos los casos excepto en el timoma medular/timoma de células fusiformes.

#### V.4.4 - EXPRESION DE EGFR.

En la clasificación de **Müller-Hermelink**, el mayor porcentaje de casos positivos y la mayor intensidad de expresión observada correspondieron a los timomas de tipo medular y carcinomas tímicos bien diferenciados. La expresión en dos tipos histológicos de comportamiento tan diferente y la ausencia frecuente de expresión en tumores agresivos como los timomas de tipo cortical hacen de este anticuerpo un marcador poco útil para predecir el comportamiento agresivo de estas neoplasias. Aunque algunos trabajos (182) han demostrado una expresión más débil en los timomas medulares, otros demuestran positividad variable en todos los tipos (7).

Utilizando la clasificación de Rosai y Levine se encontraron diferencias ( $p=0.04$ ) entre los cinco tipos histológicos. Los timomas atípicos, timomas de predominio epitelial y timomas de células fusiformes presentaban un mayor número de casos con expresión positiva (80%, 75% y 63% respectivamente) frente a los timomas mixtos y timomas de predominio linfocítico donde predominaban los casos negativos, demostrándose significación mediante el test de ANOVA de

éstos dos últimos tipos frente a los timomas atípicos y de predominio epitelial. En la búsqueda bibliográfica realizada no se encontró ningún trabajo que relacione la expresión del EGFR con los tipos histológicos de esta clasificación. De nuevo, se encuentra expresión en tipos histológicos de comportamiento muy diferente para que este anticuerpo pueda considerarse como indicativo de un comportamiento más agresivo. Si consideramos sólo la histología, la expresión en estos tumores parece estar más relacionada con el número de células epiteliales presentes que con un pronóstico desfavorable.

En esta serie no se encontró relación entre el tamaño del tumor y la expresión de EGFR como encontraban Gilhus y cols. (182) en su estudio. Si se coincide con ellos en la ausencia de relación con la presencia de miastenia gravis. En relación con el estadio, se encontró predominio de los casos negativos en los estadio I y II frente a los estadios III y IV donde predominaron los casos positivos, reflejando un aumento en la expresión del EGFR a medida que aumenta la capacidad invasora de los tumores, dato ya referido por Hayashi y cols. (188).

#### **V.4.5 - EXPRESION DE BCL-2.**

En este estudio no se encontraron diferencias entre la expresión de bcl-2 y los tipos histológicos de ambas clasificaciones. En la clasificación de Müller-Hermelink, excep-

to en los timomas de tipo organoide donde predominan los casos positivos (Fig.10), en los restantes tipos predominan los casos negativos. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por otros autores (8,192,195,196) que relacionan la expresión positiva de bcl-2 con los timomas de tipo medular y mixto y no con timomas de tipo cortical por lo que no lo consideran útil como marcador de agresividad. En esta serie los tumores con mayor expresión de bcl-2 fueron los timomas organoides (55%) seguidos de los timomas medulares (38%). La diferencia de resultados podría deberse a que en la mayoría de los trabajos mencionados (192,195,196) no se diferencia entre timomas organoides y timomas corticales agrupando los dos tipos como timomas corticales.

Utilizando la clasificación de Rosai y Levine, en todos los tipos predominaron los casos negativos. El mayor porcentaje de casos positivos correspondió a los timomas de predominio linfocítico (54%) seguidos de los timomas de células fusiformes (23%), resultado lógico cuando se analizan las equivalencias entre ambas clasificaciones. No se ha encontrado en la literatura consultada ningún artículo que relacione la expresión de este anticuerpo con los tipos histológicos de esta clasificación.

No se encontró relación entre la expresión de bcl-2 y el tamaño tumoral, estadio o presencia de miastenia, no coincidiendo estos últimos resultados con los obtenidos por

Chen y cols.(192) que encuentran relación significativa entre la expresión de bcl-2 y la presencia de miastenia y el estadio clínico. En este trabajo los casos con ausencia de expresión predominaron en todos los estadios y entre los casos con expresión positiva, el mayor porcentaje correspondió a tumores en estadio I por lo que no se demostró relación con la presencia de invasión. Entre las muertes y recidivas, todos los tumores mostraban expresión de bcl-2 salvo el caso de muerte debida a timoma cortical/timoma mixto linfoepitelial.

#### **V.4.6 - RELACION ENTRE LA EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS.**

Los resultados obtenidos al estudiar la relación existente entre la expresión de los marcadores Ki-67 y p53, demostraron relación directa y significativa ( $p=0.0006$ ) entre ambos anticuerpos. El 70% de los casos que expresaban Ki-67 presentaban también positividad para p53 y el 92% de los casos negativos para Ki-67 no expresaron tampoco p53. Si se analizan los resultados obtenidos de forma independiente por cada anticuerpo, se observa que ambos presentan un comportamiento muy similar no sólo en relación con los diferentes tipos histológicos, sino también en su relación con los estadios, recidivas y muertes. No hemos encontrado en la literatura consultada ningún artículo que analice la relación entre estos dos anticuerpos en timomas.

Se encontró también relación inversa aunque no significativa entre la expresión de los anticuerpos Ki-67 y bcl-2. Esta relación podría explicarse no sólo en base al hecho de que la mayoría de los tumores estudiados presentaba positividad para Ki-67 y negatividad para bcl-2, sino también considerando los timomas medulares y organoides como tumores más diferenciados y, por lo tanto, con mayor expresión de bcl-2, frente a los timomas corticales que, por su comportamiento e histología, serían tumores más indiferenciados.

No se encontró ninguna relación entre la expresión de otros marcadores, no coincidiendo con trabajos que encuentran relación inversa entre la expresión de los anticuerpos Ki-67 y EGFR ó entre los anticuerpos p53 y bcl-2 (8,182).

\*\*\*

## **VI. CONCLUSIONES.**

1ª. La clasificación de Müller-Hermelink es fácilmente reproducible cuando se realiza un muestreo adecuado del tumor y se siguen los criterios establecidos por Marino, Müller-Hermelink, Pescarmona y Kirchner para definir cada tipo histológico.

2ª. Existe relación significativa entre los tipos histológicos de la clasificación de Müller-Hermelink y factores clínicos como la edad de los enfermos, el estadio de los tumores y la presencia de miastenia gravis. No hay relación entre estos factores y los tipos histológicos de la clasificación de Rosai y Levine.

3ª. Existe relación significativa entre la expresión de Ki-67 y el comportamiento agresivo de los tipos histológicos de la clasificación de Müller-Hermelink. Esta relación no existe al utilizar la clasificación de Rosai y Levine.

4ª. No existe relación entre el comportamiento agresivo de los tipos histológicos de ambas clasificaciones y la expresión de p53 y bcl-2.

5ª. Existe relación significativa entre la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico y los tipos histológicos de la clasificación de Rosai y Levine.

6ª. Existe relación significativa entre los tipos histológicos de ambas clasificaciones y el inmunofenotipo de los linfocitos acompañantes.

7<sup>a</sup>. La clasificación de Müller-Hermelink es superior a la de Rosai y Levine al definir entidades biológicas con diferencias clínicas y valor pronóstico.

## **VII. ICONOGRAFIA.**

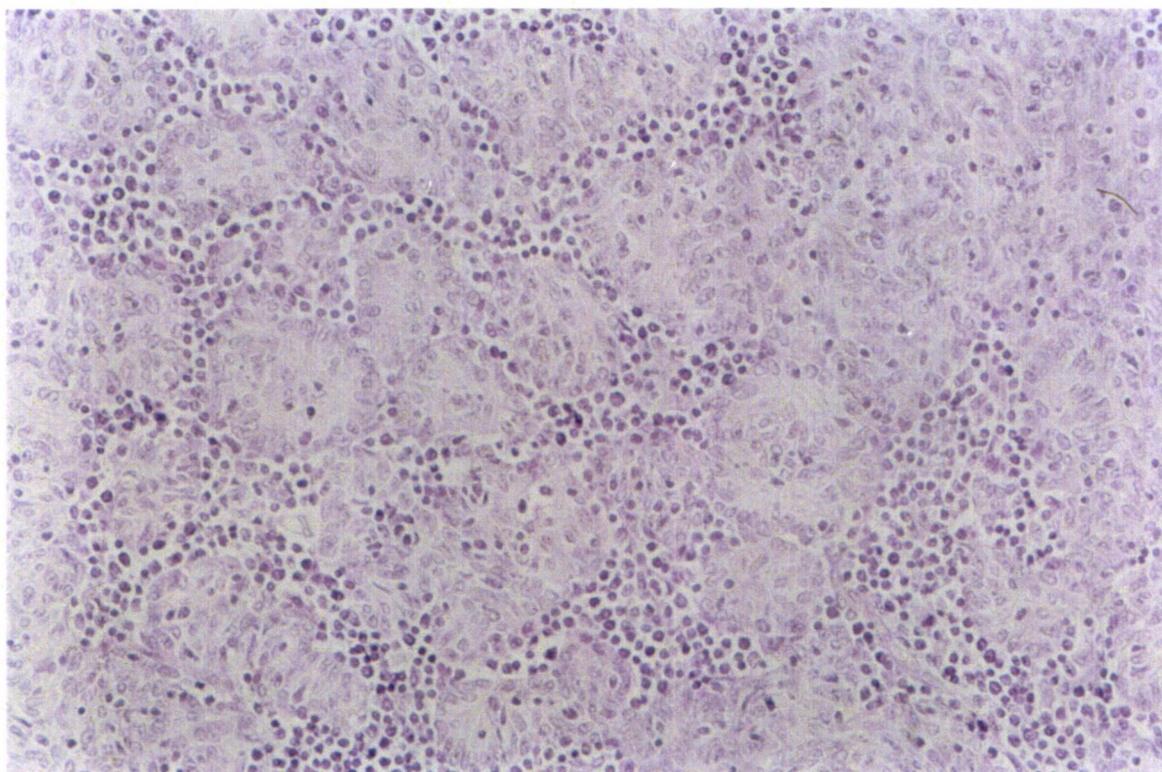


Fig. 1 - Timoma de tipo medular con patrón pseudoglandular.  
(Hematoxilina-eosina;400x) .

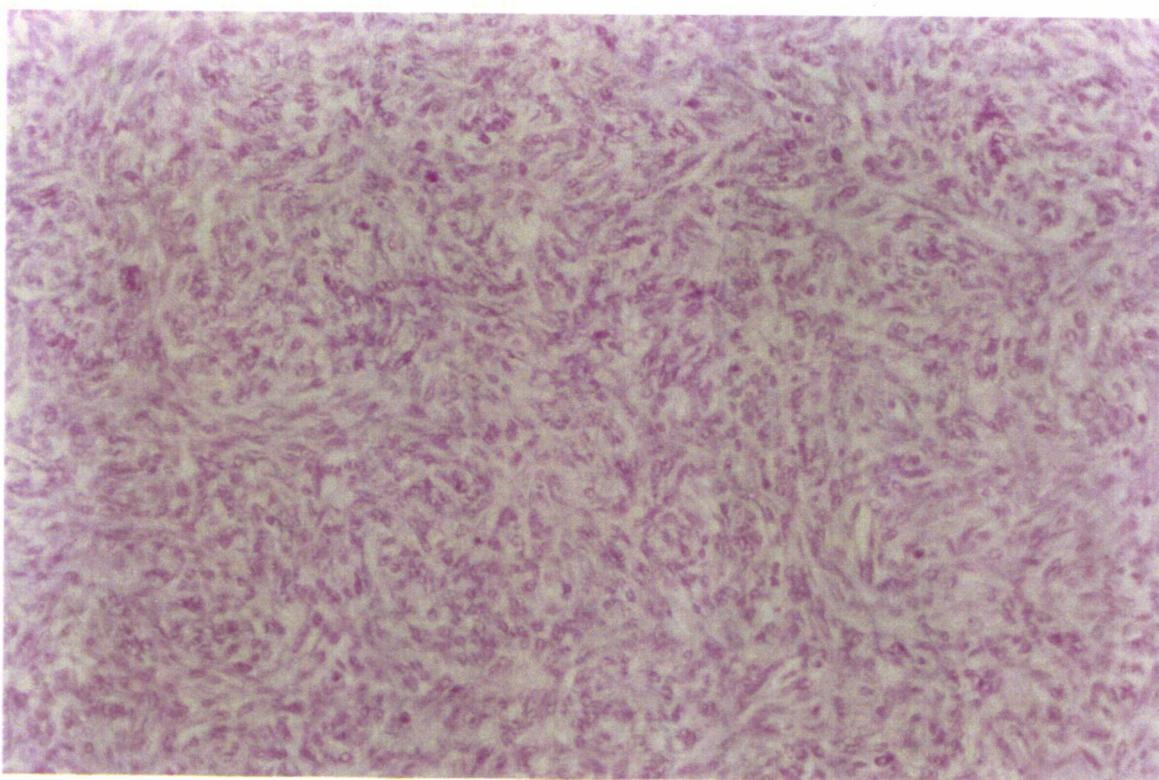


Fig.2 - Timoma de tipo medular con patrón estoriforme.  
(Hematoxilina-eosina;400x) .

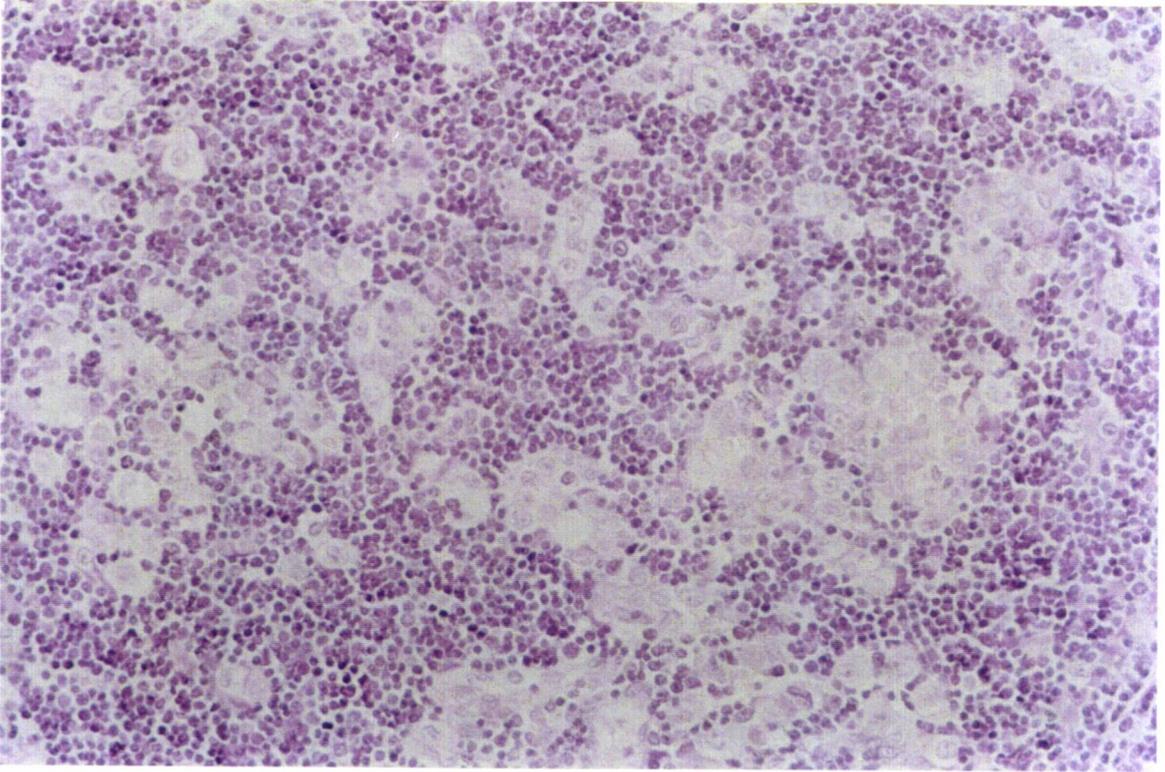


Fig. 3 - Timoma de tipo cortical.  
(Hematoxilina-eosina;400x) .

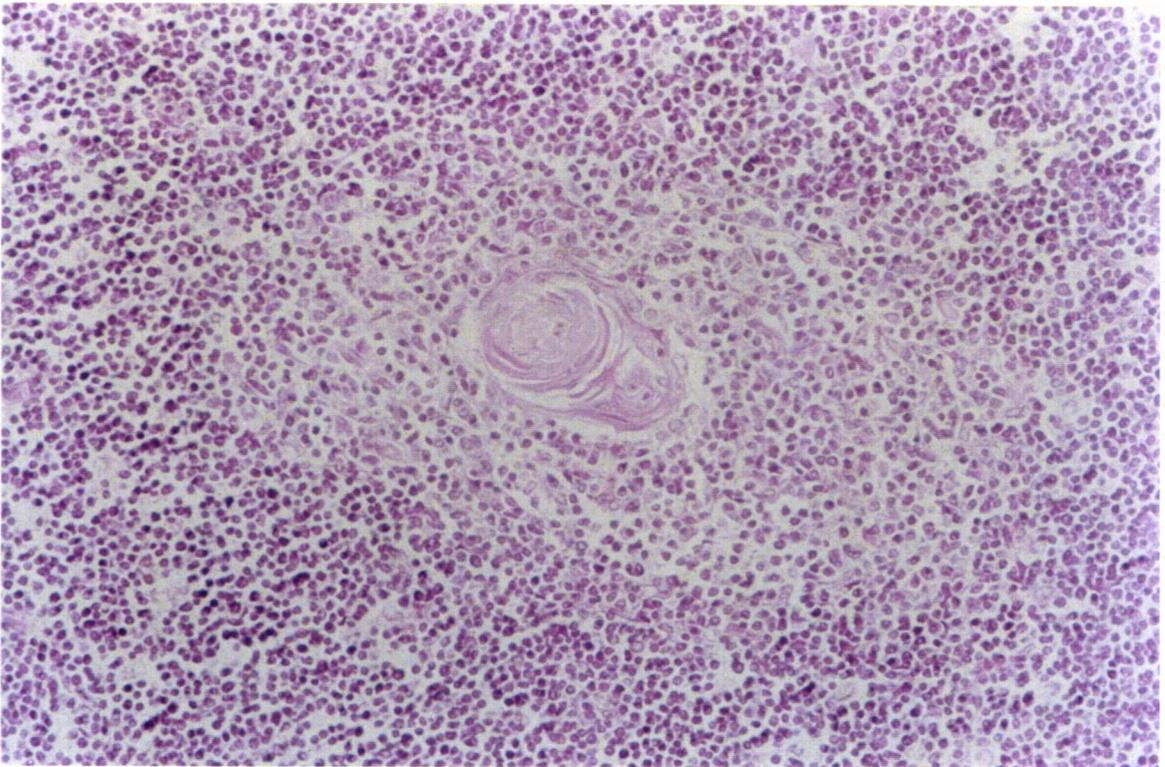


Fig.4 - Zona de diferenciación medular en timoma organoide.  
(Hematoxilina-eosina;400x) .

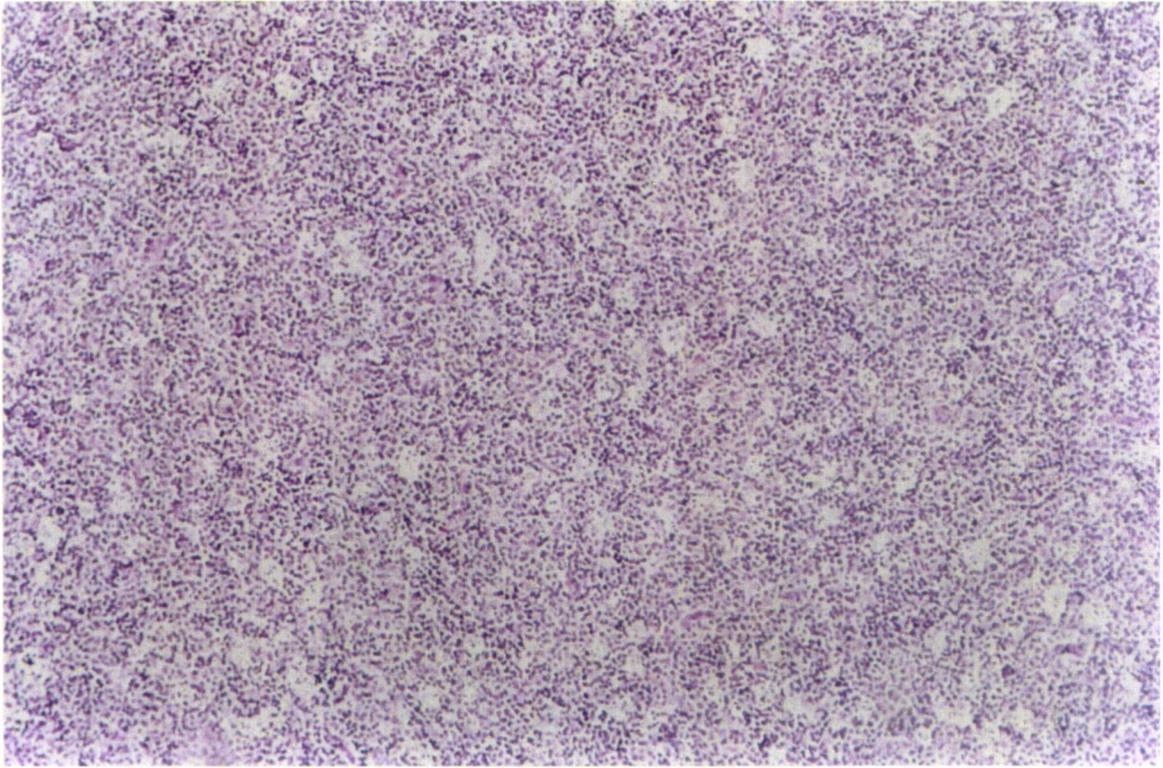


Fig.5 - Patrón en cielo estrellado en timoma organoide.  
(Hematoxilina-eosina;100x)

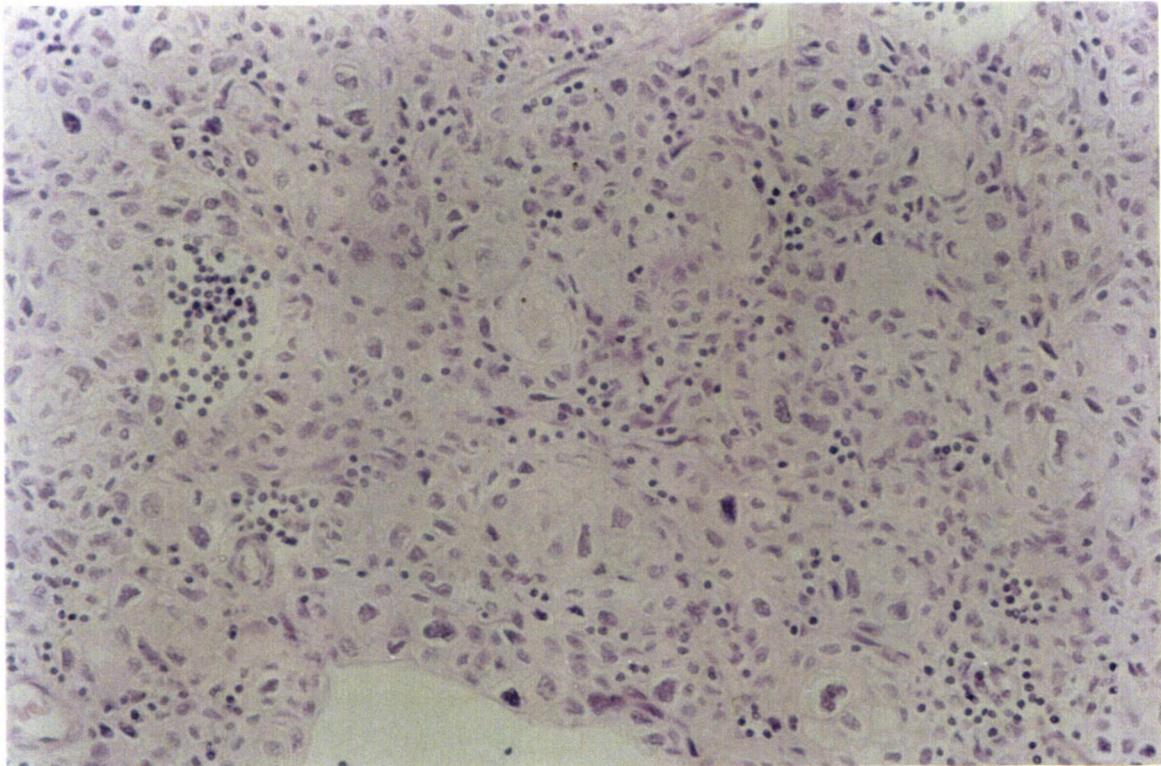


Fig.6 - Carcinoma tímico bien diferenciado.  
(Hematoxilina-eosina;400x).

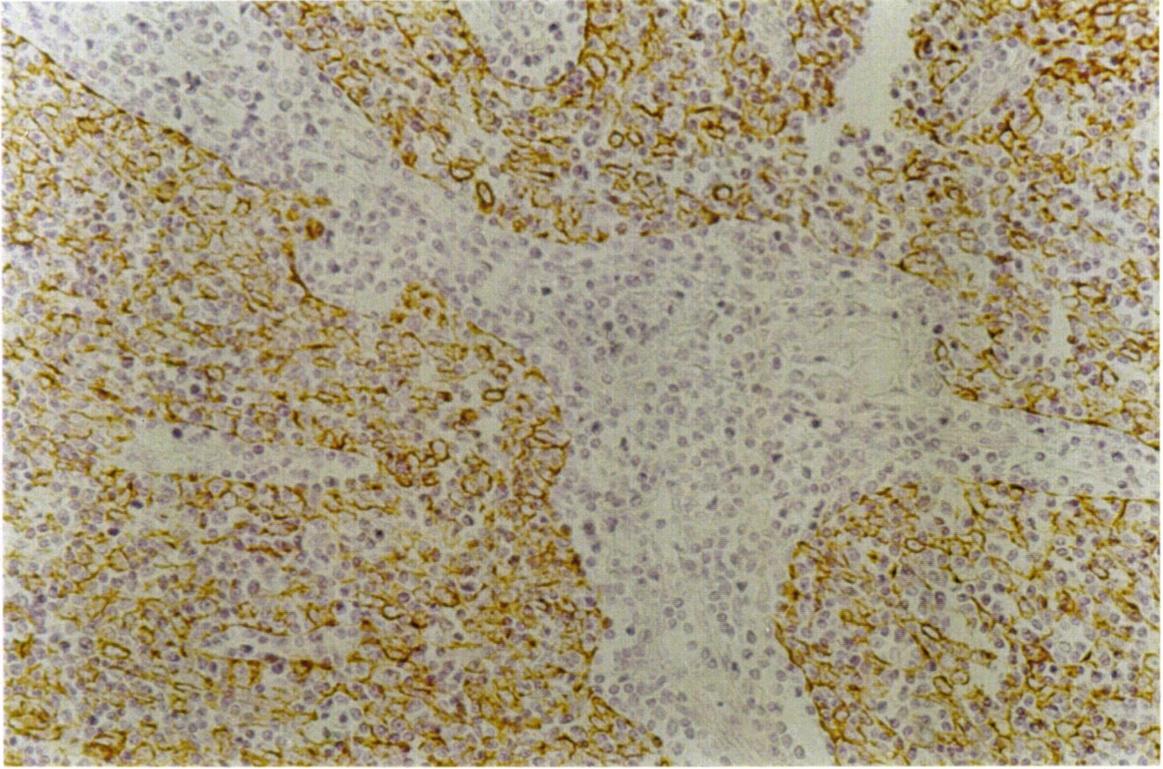


Fig.7 - Expresión de citoqueratina 34BE12 en timoma organoide. (Biotina estreptoavidina;400x) .

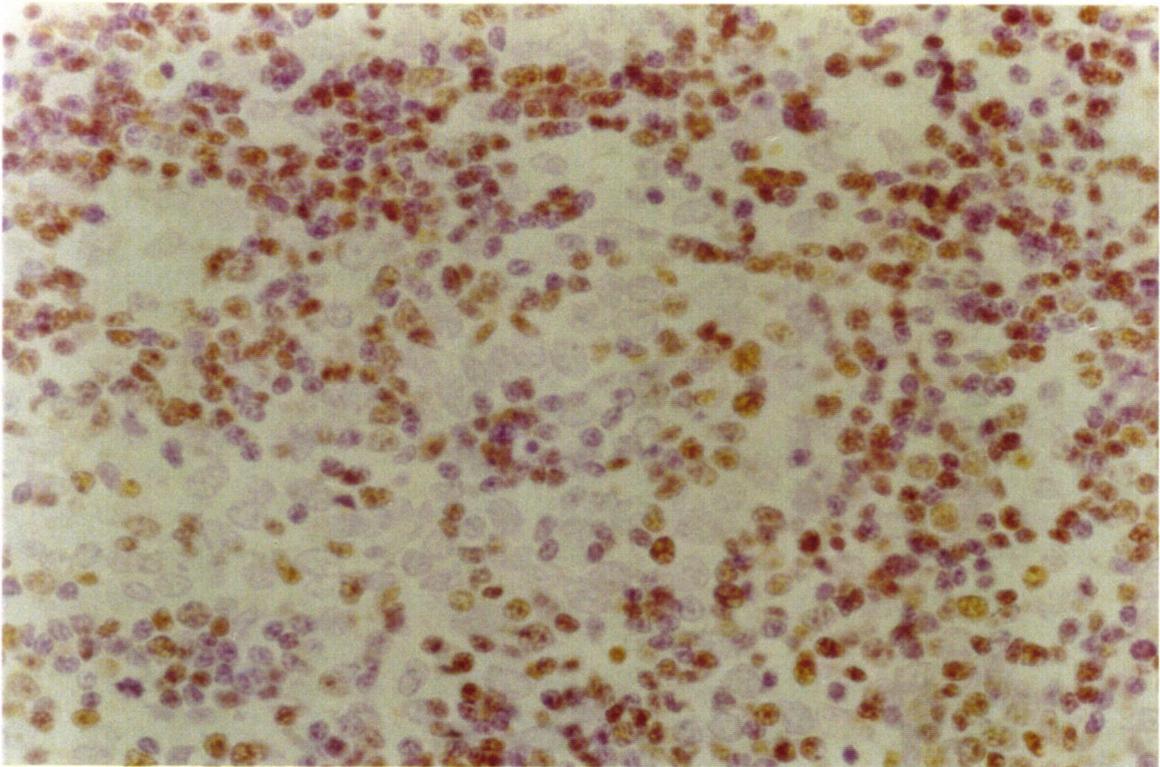


Fig.8 - Expresión de Tdt en timoma organoide. (Biotina estreptoavidina;600x) .

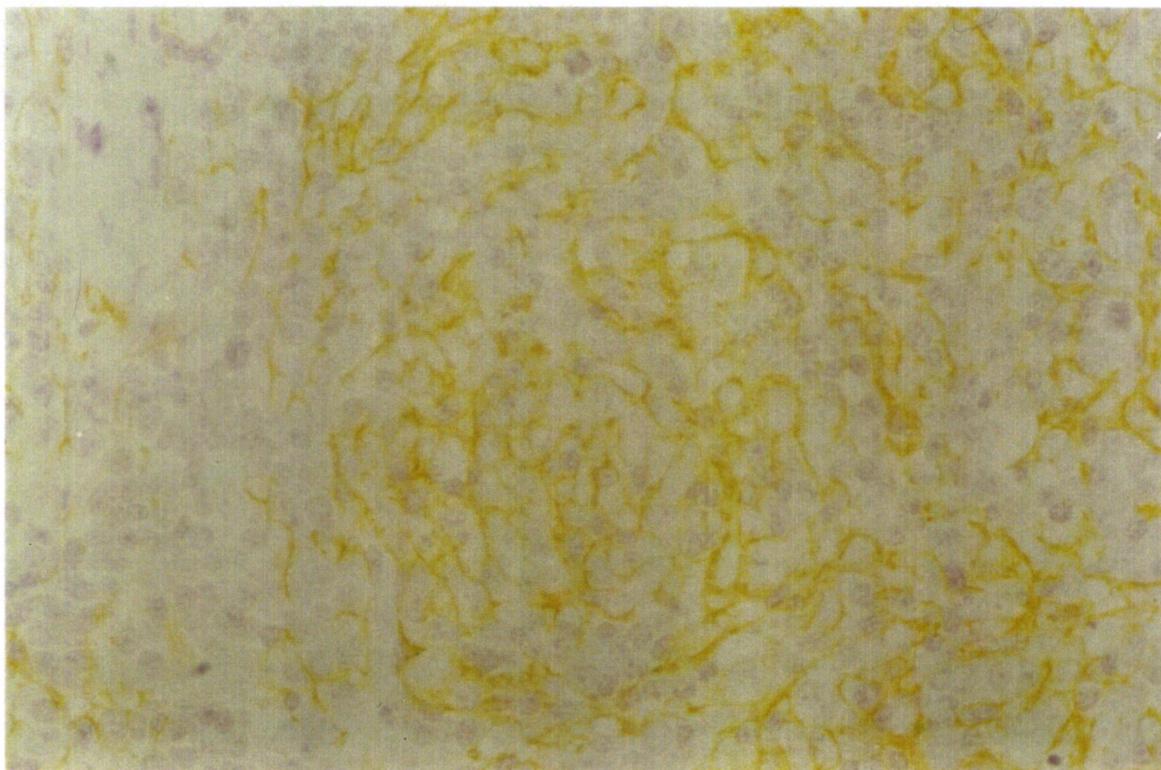


Fig.9 - Expresión de EGFR en timoma cortical.  
(Biotina estreptoavidina;600x).

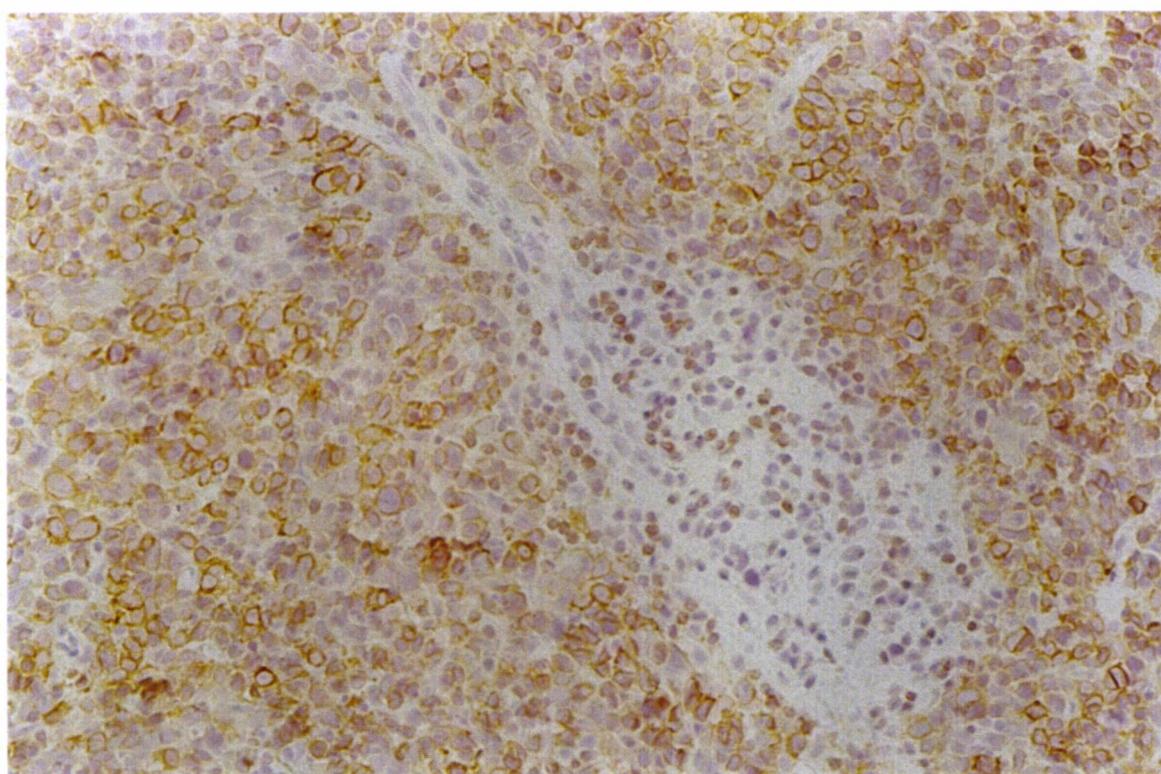


Fig.10 - Expresión de bcl-2 en timoma cortical.  
(Biotina estrptoavidina;400X).

## **VIII. BIBLIOGRAFIA.**

## BIBLIOGRAFIA.

- 1) Suster S, Rosai J, Thymus in: Raven Press, Histology for pathologist, 2nd ed., Sternberg SS, New York, 1992, pp 261-78.
- 2) Suster S, Rosai J. Histology of the normal thymus. Am J Surg Pathol 1990;14:284-303.
- 3) Marchevsky AM, Karedo M. Surgical pathology of the mediastinum. 2nd ed. Raven Press. New York, 1992, pp 27-142.
- 4) Shimosato Y, Mukai K. Tumors of the mediastinum. In: Atlas of tumor pathology, 3rd series, fascicle 21. Washington D.C. Armed Forces Institute of Pathology, 1997.
- 5) Shier KJ. The thymus according to Schambacher. Cancer 1981;48:1183-89.
- 6) Lobach DF, Haynes BF. Ontogeny of the human thymus during fetal development. J Clin Immunol 1987;7:81-97.
- 7) Pescarmona E, Pisacane A, Pignatelli E, Baroni CD. Expression of epidermal and nerve growth factor receptors in human thymus and thymoma. Histopathology 1993;23:39-44.
- 8) Stefanaki K, Rontogianni D, Kouvidou CH, Bolioti S, Delides G. Expression of p53, mdm-2, p21/waf 1 and bcl-2 proteins in thymomas. Histopathology, 1997, 30:549-55.
- 9) Kuo T, Lo SK. Immunohistochemical metallothionein expression in thymoma: correlation with histological types and cellular origin. Histopathology 1997,30:243-48.
- 10) Henry K. The thymus gland, in Symmers WSTC (ed): Systemic Pathology, ed 2, vol 2. Edinburgh. Churchill Livingstone, 1978, pp:894-924.
- 11) Nathaniels EK, Nathaniels AM, Wang CA. Mediastinal parathyroid tumors: a clinical and pathological study of 84 cases. Ann Surg 1970;171:165-70.
- 12) Fushimi H, Tanio Y, Kotoh K. Ectopic thymoma mimicking diffuse pleural mesothelioma: a case report. Hum pathol 1998;29:409-10.

- 13) Asa SL, Dardick I, Van Nostrand AWP, Bailey DJ, Gullane PJ. Primary thyroid thymoma: a distinct clinicopathologic entity. *Hum Pathol* 1988;19:1463-6.
- 14) Moran CA, Suster S, Fishback NF, Koss MN. Primary intrapulmonary thymoma. *Am J Surg Pathol* 1995;19:304-12.
- 15) James CL, Iyer PV, Leong ASY. Intrapulmonary thymoma. *Histopathology* 1992;21:175-7.
- 16) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Patología estructural y funcional*. 5ª ed. Interamericana. Madrid. 1995.
- 17) Kornstein MJ. Pathology of the thymus and mediastinum in *Mayor Problems in Pathology*. WB Saunders Company, 1995.
- 18) Kendall MD, Johnson HRM, Singh J. The weight of the human thymus gland at necropsy. *J Anat* 1980;131:483-92.
- 19) Marino M, Müller-Hermelink HK. Thymoma and thymic carcinoma. Relation of thymoma epithelial cells to the cortical and medullary differentiation of thymus. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1985;407:119-49.
- 20) Lobach DF, Scearse RM, Haynes BF. The human thymic microenvironment. Phenotypic characterization of Hassall's bodies with the use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 1985;134:250-7.
- 21) Henry L, Anderson G. Immunoglobulins in Hassall's corpuscles of the human thymus. *J Anat* 1990;168:185-97.
- 22) Fufai I, Masaoka A, Hashimoto T, Yamakawa Y, Misuno T, Tanamura O. Cytokeratins in normal thymus and thymic epithelial tumors. *Cancer* 1993;71:99-105.
- 23) Sato Y, Watanabe S, Mukai K, Kodama T, Upton MP, Goto M, Shimosato Y. An immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. II Lymphoid component. *Am J Surg Pathol* 1986;10:862-70.
- 24) Mokhtar N, Hsu SM, Lad RP, Haynes BF, Jaffe ES. Thymoma lymphoid and epithelial components of thymoma mirror the phenotype of normal thymus. *Hum Pathol* 1984;15:378-84.
- 25) Eimoto T, Teshima K, Shirakusa T, Takeshita M, Okamura H, Naito H et al. Heterogeneity of epithelial cells and reactive components in thymoma: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Ultrastructural Pathol* 1986;10:157-73.

- 26) Rosai J, Levine GD. Tumors of the thymus. In: Atlas of tumor pathology, 2nd series, fascicle 13. Washington. Armed Forces Institute of Pathology. 1976.
- 27) Kendall MD. The morphology of perivascular spaces in thymus. *Thymus* 1989;13:157-64.
- 28) Isaacson PG, Norton AJ, Addis BJ. The human thymus contain a novel population of B lymphocyte. *Lancet* 1987;2:1488-91.
- 29) Hofmann WJ, Momburg F, Möller P. Thymic medullary cells expressing B lymphocyte antigens. *Hum Pathol* 1988;19:1280-7.
- 30) Hishima T, Fukuyama M, Hayashi Y, Fujii T, Arai K, Funata N, Shiozawa Y, Koike M. Neuroendocrine differentiation in thymic epithelial tumors with special reference to thymic carcinoma and atypical thymoma. *Hum Pathol* 1998;29:330-8.
- 31) Rosai J, Higa E. Mediastinal endocrine neoplasm of probable thymic origin related to carcinoid tumor. Clinicopathologic study of 8 cases. *Cancer* 1972;29:1061-74.
- 32) Wise WS, Sill WJ, Joshi VV. Severe combined immunodeficiency with thymic mast cell hyperplasia. *Arch Pathol Lab Med* 1976;100:283-6.
- 33) Siegal GP, Dehner LP, Rosai J. Histiocytosis X (Langerhans' cell granulomatosis) of the thymus: a clinicopathologic study of four childhood cases. *Am J Surg Pathol* 1985;9:117-24.
- 34) Gilcrease MZ, Rajan B, Ostrowski ML, Ramzy I, Schwartz M. Localized thymic Langerhans' cell histiocytosis and its relation with Myasthenia Gravis. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:134-8.
- 35) Moran CA, Suster S, Koss MN. Plasma cell-rich thymoma. *Am J Clin Pathol* 1991;102:199-202.
- 36) Drenckhahn D, Gaudecker B, Müller-Hermelink HK. Myosin and actin containing cell in the human postnatal thymus. Ultrastructural and immunohistochemical findings in normal thymus and in myasthenia gravis. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1979;32:33-45.
- 37) Dardenne M, Savino W, Bach JF. Thymomatous epithelial cells and skeletal muscle share a common epitope defined by

a monoclonal antibody. Am J Pathol 1987;126:194-8.

38) Palestro G, Tridente G, Micca F, Novero D, Valente G, Godio L. Immunohistochemical and enzyme histochemical contributions to the problem concerning the role of the thymus in the pathogenesis of myasthenia gravis. Virchows Arch (B) 1983;44:173-85.

39) van de Velde RL, Friedman NB. Thymic myoid cells and myasthenia gravis. Am J Pathol 1970;59:347-61.

40) Judd R, Welch S. Myoid cell differentiation in true thymic hyperplasia and lymphoid hyperplasia. Arch Pathol Lab Med 1988;112:1140-4.

41) Van Baarlen J, Schurman HJ, Huber J. Acute thymus involution in infancy and childhood: a reliable marker for duration of acute illness. Hum Pathol 1988;19:1155-60.

42) Arliss J, Scholes J, Dickson PR, Messina JJ. Massive thymic hyperplasia in an adolescent. Ann Thorac Surg 1988 45:220-5.

43) Ricci C, Pescarmona E, Rendina EA, Venuta F, Ruco LP, Baroni CD. True thymic hyperplasia: a clinicopathological study. Ann Thorac Surg 1989;47:741-5.

44) O'Shea PA, Pansatiankul B, Farnes P. Giant thymic hyperplasia in infancy: immunologic, histologic and ultrastructural observations. Lab Invest 1978;38:391.

45) Otto HF. Tumors of the thymus and their nomenclature. Virchows Arch A Pathol Anat 1991;419:257-60.

46) Castleman B. Tumors of the thymus gland. Fascicle 19. Atlas of tumor pathology. Washington. Armed Forces Institute of Pathology. 1955.

47) Scarpa A, Chilosi M, Capelli P, Bonetti F, Menestrina F, Zamboni G et al. Expression and gene rearrangement of the T-cell receptor in human thymomas. Virchows Arch (Cell Pathology) 1990;58:235-9.

48) Katzin WE, Fishleder AJ, Linden MD, Tubbs RR. Immunoglobulin and T-cell receptor genes in thymomas: genotypic evidence supporting the non-neoplastic nature of the lymphocytic compartment. Hum Pathol 1988;19:323-8.

49) Lewis JE, Wick MR, Scheithauer BW, Bernatz PE, Taylor WF. Thymoma: a clinicopathologic review. Cancer 1987;6:

2727-43.

50) Verley JM, Hollmann KH. Thymoma: a comparative study of clinical stages, histological features and survival in 200 cases. *Cancer* 1985;55:1074-86.

51) Maggi G, Giaccone G, Donadio M, Ciuffreda L, Dalesio O, Leria G et al. Thymomas: a review of 169 cases, with particular reference to results of surgical treatment. *Cancer* 1986;58:765-76.

52) Quintanilla-Martínez L, Wilkins EW, Ferry JA, Harris NL. Thymoma - Morphologic subclassification correlates with invasiveness and immunohistologic features. *Hum Pathol* 1993 24:958-69.

53) Quintanilla-Martínez L, Wilkins EW Jr, Choi N, Efird J, Hug E, Harris NL. Thymoma: Histologic subclassification is an independent prognostic factor. *Cancer* 1994;74:606-17.

54) Ramón y Cajal S, Suster S. Primary thymic epithelial neoplasms in children. *Am J Surg Pathol* 1991;15:466-74.

55) Talerman A, Amigo A. Thymoma associated with arregenerative and aplastic anemia in a five years old boy. *Cancer* 1968;21:1212-8.

56) Furman WL, Buckley PJ, Green AA, Stokes DC, Chien LT. Thymoma and myasthenia gravis in a 4-year-old child. Case report and review of the literature. *Cancer* 1985;56:2703-6.

57) Pescarmona E, Giardini R, Brisgotti M, Callea F, Piscane A, Baroni CD. Thymoma in childhood: a clinicopathological study of five cases. *Histopathology* 1992;21:65-8.

58) Groisman GM, Ben-Ishak O, Best L-AE. Thymoma with foci of medullary differentiation in a 11-year-old boy. *Arch Pathol Lab Med* 1994;118:653-5.

59) Gray GF, Gutowsky WT. Thymoma. A clinicopathologic study of 54 cases. *Am J Surg Pathol* 1979;3:235-49.

60) Batata MA, Martini N, Huvos AG, Aguilar RI, Beattie EJ Jr. Thymomas: clinicopathologic features, therapy and prognosis. *Cancer* 1974;34:389-96.

61) Wang LS, Huang MH, Lin TS, Huang BS, Chien KY. Malignant thymoma. *Cancer* 1992;70:443-50.

62) Shishido M, Yano K, Ichiki H, Yano M. Pericarditis as

the initial manifestation of malignant thymoma. *Chest* 1994; 106:313-4.

63) Dib HR, Friedman B, Khouli HI, Gerber DR, Weiss SL. Malignant thymoma: a complicated triad of SVC syndrome, cardiac tamponade and DIC. *Chest* 1994;105:941-2.

64) Airon B, Sherma R, Iyer SK et al. Malignant thymoma presenting as intracardiac tumor and superior vena cava obstruction. *Ann Thorac Surg* 1990;50:989-91.

65) Zinger C, Ben Itzhak O, Szyzman P, Green J, Nakhoul F. Minimal-change nephropathy and malignant thymoma. *Am J Nephrol* 1998;18:61-3.

66) Lesser M, Mouli C, Jothikumar T. Hypertrophic osteoarthropathy associated with a malignant thymoma. *Mt Sinai J Med* 1980;47:24-30.

67) Byrne DJ, Gunn A, Davidson DL, Paterson CR. Parathyroid hyperplasia associated with thymoma. *Postgrad Med J* 1989; 65:310-1.

68) Uhlin SR, Maiocco KJ, Bhatia SG. Pemphigus erythematosus and thymoma. *Cutis* 1980;25:177-80.

69) Colburn KK, Cao JD. Thymoma associated with rheumatoid arthritis in a patient taking methotrexate. *J Rheumatol* 1986;13:437-9.

70) Gibson LE, Muller SA. Dermatologic disorders in patients with thymoma. *Acta Derm Venereol* 1987;67:351-6.

71) Kornacki S, Christian Hansen III F, Lazenby A. Graft-versus-host-like colitis associated with malignant thymoma. *Am J Surg Pathol* 1995;19:224-8.

72) Lauritzen M, Smith T, Fisher-Hansen B, Sparup J, Olesen J. Eaton-Lambert syndrome and malignant thymoma. *Neurology* 1980;30:634-8.

73) Stoll DB, Lublin F, Brodovsky H, Laucius JF, Patchefsky A, Cooper H. Association of subacute motor neuropathy with thymoma. *Cancer* 1984;54:770-2.

74) Ben-Shahar M, Rosenblatt E, Green J, Cohen I. Malignant thymoma associated with progressive systemic sclerosis. *Am J Med Sci* 1987;294:262-7.

75) Cunningham JD, Burt MA. Limbic encephalitis secondary

to malignant thymoma. *Ann Thorac Surg* 1994;58:250-1.

76) Smith GP, Perkins SL, Segal GH, Kjeldsberg CR. T lymphocytosis associated with invasive thymoma. *Am J Clin Pathol* 1994;102:447-53.

77) Friedman HD, Inman DA, Hutchinson RE, Poiesz BJ. Concurrent invasive thymoma and T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1994;101:432-7.

78) Lishner M, Ravid M, Shapira J, Radnay J, Leytin V, Shapiro C, Klein A. Delta T-lymphocytosis in a patient with thymoma. *Cancer* 1994;74:2924-9.

79) Ackland SP, Bur ME, Adler SS, Robertson M, Baron JM. White blood cell aplasia associated with thymoma. *Am J Clin Pathol* 1988;89:260-3.

80) Lyinnais J. Thymoma and pancytopenia. *Am J Hematol* 1988 28:195-6.

81) Marks P, Marks C. Thymoma and arregenerative anemia: *South Med J* 1988;81:1182-4.

82) Skinnider LF, Alexander S, Horsman D. Concurrent thymoma and lymphoma: a report of two cases. *Hum Pathol* 1982;13:163-6.

83) Gould TS, Tanguay PR, DeLellis RA. Thymoma and primary lymphoma of the small intestine. *Cancer* 1977;40:1955-8.

84) Vessey MD, Doll R. Thymectomy and cancer-a follow up study. *Br J Cancer* 1972;26:53-8.

85) Rogers BH, Manaligod JR, Blazek WW. Thymoma associated with pancytopenia and hypogammaglobulinaemia. Report of a case and review of the literature. *Am J Med* 1988;44:154-64.

86) Fox MA, Lynch DA, Make BJ. Thymoma with hypogammaglobulinaemia (Good's syndrome): an unusual case with bronchiectasis. *Am J Roentgenol* 1992;158:1229-30.

87) Jeandel C, Gastin I, Blain H, Jovannay P, Laurain MC, Penin F, Saunier M. Thymoma with immunodeficiency (Good's syndrome) associated with selective cobalamine malabsorption and benign Ig M-kappa gammopathy. *J Inter Med* 1994; 235:179-83.

88) Hatama S, Kugamai H, Iwato K, Fujiwana M, Fujishima M. Thrombotic thrombocytopenia purpura accompanied by tran-

- sient pure red cell aplasia and thymoma. *clin Nephrol* 1998; 49:193-7.
- 89) Krantz SB. Pure red cell aplasia. *N Engl J Med* 1974; 291:345-50.
- 90) Gómez-Aldaraví L, Oltra A, Aparicio J, Llorca c, Casanova B, Pastor M. Un caso de timoma maligno asociado con miastenia grave y aplasia pura de células rojas. *Neoplasia* 1995;12:106-8.
- 91) Rosenow EC III, Hurley T. Disorders of the thymus. A review. *Arch Intern Med* 1984;144:763-70.
- 92) Masaoka A, Monden Y, Nakahara K, Tanioka T. Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 1981;48:2485-92.
- 93) Masaoka A, Hashimoto T, Shibata K, Yamakawa Y, Nakamae K, Iizuka M. Thymoma associated with pure red cell aplasia. Histologic and follow-up study. *Cancer* 1989;64:1872-8.
- 94) Bailey RO, Dunn HG, Rubin AM, Ritaccio AL. Myasthenia gravis with thymoma and pure red cell aplasia. *Am J Clin Pathol* 1988;89:6587-93.
- 95) Ohmi H, Ohuchi M. Recurrent thymoma in patients with myasthenia gravis. *Ann Thorac Surg* 1990;50:243-7.
- 96) Kirchner T, Tzartos S, Hoppe F, Schalke B, Wekerle H, Müller-Hermelink HK. Pathogenesis of myasthenia gravis. *Am J Surg Pathol* 1988;130:268-80.
- 97) Marx A, Wilisch A, Schultz A, Gattenlöhner S, Nanninger R, Müller-Hermelink HK. Pathogenesis of miasthenia gravis. *Virchows Arch* 1997;430:355-64.
- 98) Kirchner T, Tzartos S, Hoppe F, Schalke B, Wekerle H, Müller-Hermelink HK. Pathogenesis of myasthenia gravis. Acetylcholine receptor-related antigenic determinants in tumor-free thymuses and thymic epithelial tumors. *Am J Pat-hol* 1988;136:268-80.
- 99) Monden Y, Uyame T, Taniki T, Hashimoto J, Fujii Y, Nakahara K, Kawashima Y, Masaoka A. The characteristic of thymoma with myasthenia gravis: a 28-year experience. *J Surg Oncol* 1988;38:151-4.
- 100) Salyer WR, Eggleston JR. Thymoma: a clinical and pathological study of 65 cases. *Cancer* 1976;37:229-49.

- 101) Pan CC, Wu HP, Yang CF, Cheng WY, Chiang H. The clinicopathological correlation of epithelial subtyping in thymoma. *Hum Pathol* 1994;25:893-9.
- 102) Levine GD, Rosai J. Thymic hyperplasia and neoplasia. A review of current concepts. *Hum Pathol* 1978;9:494-515.
- 103) Müller-Hermelink HK, Marino M, Palestro G, Schumacher U, Kirchner T. Immunohistological evidence of cortical and medullary differentiation in thymoma. *Virchows Arch (B)* 1985;408:143-61.
- 104) Pescarmona E, Pisacane A, Rendina EA, Ricci C, Ruco LP, Baroni CD. Organoid thymoma: a well-differentiated variant with distinct clinicopathological features. *Histopathology* 1991;18:161-4.
- 105) Kirchner T, Schalke B, Buchwald J, Ritter M, Marx A, Müller-Hermelink. Well-differentiated thymic carcinoma: an organotypical low-grade carcinoma with relationship to cortical thymoma. *Am J Surg Pathol* 1992;16:1153-69.
- 106) Close PM, Kirchner T, Uys CJ, Müller-Hermelink HK. Reproducibility of a histogenetic classification of thymic epithelial tumours. *Histopathology* 1994;25:21-9.
- 107) Kuo TT, Lo S. Thymoma: a study of the pathologic classification of 71 cases of the Müller-Hermelink system. *Hum Pathol* 1993;24:766-71.
- 108) Pescarmona E, Rendina EA, Venuta F, Ricci C, Ruco LP, Baroni CD. The prognostic implication of thymoma histologic subtyping: a study of 80 consecutive cases. *Am J Clin Pathol* 1990;93:140-95.
- 109) Pescarmona E, Rendina EA, Venuta F, D'Arcangelo E, Pagani M, Ricci C, Ruco LP, Baroni CD. Analysis of prognostic features and clinico-pathological study of thymoma. *Ann Thorac Surg* 1990;50:534-8.
- 110) Ricci C, Rendina EA, Pescarmona E, Venuta F, Di Tolla R, Ruco LP, Baroni CD. Correlations between histological type, clinical behaviour and prognostic in thymoma. *Thorax* 1989;44:455-60.
- 111) Nomiri H, Ishihara T, Torikata C. Malignant grading of cortical and medullary differentiated thymoma by morphometric analysis. *Cancer* 1989;64:1694-9.
- 112) Ho FC, Fu KH, Lam SY, Chiu SW, Chan AC, Müller-Herme-

- link HK. Evaluation of a histogenetic classification for thymic epithelial tumours. *Histopathology* 1994;25:21-9.
- 113) Tan PH, Sng ITY. Thymoma. A study of 60 cases in Singapore. *Histopathology* 1995;26:509-15.
- 114) Kornstein MJ, Curran WJ, Turrissi III AT, Brooks JJ. Cortical versus medullary thymoma: a useful morphologic distinction?. *Hum Pathol* 1988;19:1335-9.
- 115) Hadour Lemarc F. Cortical versus medullary thymoma. *Hum Pathol* 1989;20:715-6.
- 116) Dawson A, Ibrahim NBN, Gibbs AR. Observer variation in the histopathological classification of thymoma: correlation with prognostic. *J Clin Pathol* 1994;47:519-23.
- 117) Regnard JF, Magdeleinat P, Dromer C, Dulmet E, De Montpreville V, Levi JF, Levasseur P. Prognostic factors and long-term results after thymoma resection: a serie of 307 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996;112:376-84.
- 118) Kornstein M. Controversies regarding the pathology of thymoma. *Pathol Ann* 1992;1-15.
- 119) Suster S, Rosai J. Cystic thymomas. *Cancer* 1992;69:92-7.
- 120) Suster S, Moran CA. Primary thymic epithelial neoplasms showing combined features of thymoma and thymic carcinoma. A clinicopathologic study of 27 cases. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1469-80.
- 121) Snover DC, Levine GD, Rosai J. Thymic carcinoma: five distinct histological variants. *Am J Surg Pathol* 1982;6:451-70.
- 122) Kuo TT, Chang JP, Lin FJ, Wu Wc, Chang CH. Thymic carcinoma: histopathological varieties and immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 1990;14:24-34.
- 123) Truong LD, Mody DR, Cagle PT, Jackson-York GL, Schwartz MR, Wheeler TM. Thymic carcinoma. A clinicopathologic study of 13 cases. *Am J Surg Pathol* 1990;14:151-66.
- 124) Suster S, Rosai J. Thymic carcinoma. A clinicopathologic study of 60 cases. *Cancer* 1991;67:1025-32.
- 125) Morinaga S, Sato Y, Shimosato Y, Sinkai T, Tsuchiya R. Multiple thymic squamous cell carcinomas associated with

mixed type thymoma. Am J Surg Pathol 1987;11:982-8.

126) Dimery IW, Lee JS, Blick M, Pearson G, Spitzer G, Hong WK. Association of Epstein-Barr virus with lymphoepithelioma of the thymus. Cancer 1988;61:2475-80.

127) Wu TC, Kuo TT. Study of Epstein-Barr virus early RNA 1(EBER 1) expression in thymic epithelial tumor of chinese patients in Taiwan. Hum Pathol 1993;24:235-8.

128) Moran CA, Suster S. Mucoepidermoid carcinomas of the thymus. A clinicopathologic study of six cases. Am J Surg Pathol 1995;19:826-34.

129) Wick MR, Scheithauer BW. Oat-cell carcinoma of the thymus. Cancer 1982;49:1652-7.

130) Hasserjian RP, Klimstra DS, Rosai J. Carcinoma of the thymus with clear-cell features. Am J Surg Pathol 1995;19:835-41.

131) Stephens M, Khalil J, Gibbs AR. Primary clear cell carcinoma of the thymus gland. Histopathology 1987;11:763-5.

132) Alguacil-García A, Halliday WC. Thymic carcinoma with focal neuroblastoma differentiation. Am J Surg Pathol 1987;11:174-9.

133) Lagrange W, Dahm HH, Karstens J, Feichtinger J, Mittermayer C. Melanocytic neuroendocrine carcinoma of the thymus. Cancer 1987;59:484-8.

134) Pescarmona E, Rosati S, Rendina EA, Venuta F, Baroni CD. Well-differentiated thymic carcinoma: a clinicopathological study. Virchows Arch (A) 1992;420:179-83.

135) Lee D, Wright DH. Immunohistochemical study of 22 cases of thymoma. J Clin Pathol 1988;41:1297-304.

136) Chilosi M, Iannucci AM, Pizzolo G, Menestrina F, Fiori-Donati L, Janossy G. Immunohistochemical analysis of thymoma. Evidence of medullary origin of epithelial cells. Am J Surg Pathol 1984;8:309-18.

137) Savino W, Dardenne M. Immunohistochemical studies on a human thymic epithelial cell subset defined by the anticytokeratin 18 monoclonal antibody. Cell Tissue Res 1988;254:225.

- 138) van der Kwast TH, van Vliet E, Cristen E, van Ewijk W, van der Heul RD. An immunohistologic study of epithelial and lymphoid components of six thymomas. *Hum Pathol* 1985; 16:1001-8.
- 139) Kodama T, Watanabe S, Sato Y, Shimosato Y, Miyazawa N. An immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. I Epithelial component. *Am J Surg Pathol* 1986;10:26-33.
- 140) Hofmann WS, Pallesen G, Möller P, Kunze WP, Kaiser K. Otto HF. Expression of cortical and medullary thymoma epithelial antigens in thymoma. Immunohistological study of 14 cases including a characterization of the lymphocytic compartment. *Histopathology* 1989;14:447-63.
- 141) Walker AN, Mills se, Fechner RE. Thymomas and thymic carcinomas. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1996,7:250-65.
- 142) Hishima T, Fukayama M, Fujisawa M, Hayashi Y, Arai K, Funata N et al. CD5 expression in thymic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994;145:268-75.
- 142) Hishima T, Fukayama M, Fujisawa M, Hayashi Y, Arai K, Funata N, Koike M. CD5 expression in thymic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1994,145:268-75.
- 143) Berezowski K, Grimes M, Gal A, Kornstein M. CD5 immunoreactivity of epithelial cells in thymic carcinoma and CASTLE using parafin-embedded tissue. *Am J Clin Pathol* 1996;106:483-6.
- 144) Dorfman DM, Shahsafaei A, Chan JKC. Thymic carcinoma but not thymomas and carcinomas of other sites show CD5 immunoreactivity. *Am J Surg Pathol* 1997;21:936-40.
- 145) Chilosì M, Castelli P, Martignoni G, Pizzolo G, Mantresor E, Fachetti F et al. Neoplastic epithelial cell in a subset human thymomas express the B-cell associated CD20 antigen. *Am J Surg Pathol* 1992;16:988-97.
- 146) Palestro G, Valente G, Novero D, Stramignoni D, Geuna M, Rosai J. Relationship between structural and T-lymphocyte maturation in human thymomas. Enzyme histochemical and immunohistological studies. *Virchows Arch (Cell Pathology)* 1987;52:389-402.
- 147) Chan J, Tsang W, Seneviratre S, Pau MY. The MIC-2 antibody O13. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1115-23.
- 148) Kornstein MJ, Kay S. B cells in thymoma. *Mod Pathol* 1990;3:61-63.

- 149) Fend F, Kirchner T, Marx A, Müller-Hermelink HK. B cells in thymic epithelial tumours. An immunohistochemical analysis of intra and extraepithelial B cell compartment. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1993;64:241-7.
- 150) Mizuno T, Hashimoto T, Masaoka A. Distribution of fibronectin and laminina in human thymoma. *Cancer* 1990;65:1367-74.
- 151) Ruco LP, Rosali S, Monard F, Pescarmona E, Rendina EA, Baroni CD. Macrophages and interdigitating reticulum cells in normal thymus and thymoma: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1989;14:34-45.
- 152) Kraus VB, Harden EA, Wittles B, Moore JO, Haynes BF. Demonstration of phenotypic abnormalities of thymic epithelium in thymoma including two cases with abundant Langerhans cells. *Am J Pathol* 1988;132:552-63.
- 153) Ruco LP, Pisacane A, Pomponi D, Stoppacciaro A, Pescarmona E, Rendina EA et al. Macrophages and interdigitating reticulum cells in normal human thymus and thymoma: immunoreactivity for interleukin-1-alpha, interleukin-1-beta y tumor necrosis factor alpha. *Histopathology* 1990;17:291-9.
- 154) Lauriola L, Michetti F, Stolfi VM, Tallini G, Cocchia D. Detection by S-100 immunolabelling of interdigitating reticulum cell in human thymoma. *Virchows Arch (B)* 1984;45:187-95.
- 155) Kondo K, Mukai K, Sato Y, Matsuno Y, Shimosato Y, Monden Y. An immunohistochemical study of thymic epithelial tumors. III The distribution of interdigitating reticulum cell and S-100-beta positive small lymphocyte. *Am J Surg Pathol* 1990;14:1139-47.
- 156) Dehner LP, Martin SA, Sumner HW. Thymus related tumors and tumor-like lesions in childhood with rapid clinical progression and death. *Hum Pathol* 1977;8:56-66.
- 157) Goldman AJ, Herrmann C Jr, Keesey J, Mulder DG, Brown WJ. Myasthenia gravis and invasive thymoma: a 20 year experience. *Neurology* 1975;25:1021-5.
- 158) Yamakawa Y, Masaoka A, Hashimoto T, Niwa H, Mizuno T, Fujii Y, Nakahara K. A tentative tumor-node-metastasis classification of thymoma. *Cancer* 1991;68:1984-7.
- 159) Shimosato Y. Controversies surrounding the subclassi-

fication of thymoma. *Cancer* 1994;74:542-4.

160) Yoshida A, Shigematsu T, Mori H, Yoshida H, Fukunishi R. Non-invasive thymoma with widespread blood borne metastasis. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1981;390:121-6.

161) Merkel DE, Dressler LG, Macguire WL. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol* 1987;5:1690-1703.

162) Hedley DW. Flow cytometry using paraffin-embedded tissue. Five years on. *Cytometry* 1989;10:229-41.

163) Davies SE, Macartney JC, Camplejohn RS, Morris RW, Ring NP, Corrin B. DNA flow cytometry of thymomas. *Histopathology* 1989;15:77-83.

164) Pollack A, El-Naggar AK, Cox JD, Ro JY, Sahin A, Komoki R. Thymoma, the prognostic significance of flow cytometric DNA analysis. *Cancer* 1992;69:1702-9.

165) Sauter ER, Sardi A, Hollier LH, Cooper ES, Bolton JS. Prognostic value of DNA flow cytometry in thymomas and thymic carcinoma. *South Med J* 1988;81:664-6.

166) Kuo TT, Lo SK. DNA flow cytometric study of thymic epithelial tumors with evaluation of its usefulness in the pathologic classification. *Hum Pathol* 1993;24:746-9.

167) Nomiru H, Horinouchi H, Kasade S, Ishihara T, Torikato C. Evaluation of the malignant grade of thymoma by morphometric analysis. *Cancer* 1988;61:982-8.

168) Nomori H, Ishihara T, Torikato C. Malignant grading of cortical and medullary differentiated thymoma by morphometric analysis. *Cancer* 1988;64:1694-9.

169) Takasak Y, Denj JS, Tan EM. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation. Its distribution in synchronized cells. *J Exp Med* 1981;154:1899-908.

170) Leong A, Milios J, Tang S. Is immunolocalisation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in paraffin sections a valid index of cell proliferation? *Appl Immunohistochem* 1993;101:703-7.

171) Robbins BA, Vega D, Ogata K, Tan EM, Nakamura RM. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies. *Arch Pathol Lab Med*

1987;111:841-5.

172) Tateyama H, Mizuno T, Tada T, Eimoto T, Hashimoto T, Masaoka A. Thymic epithelial tumors: evaluation of malignant grade by quantification of proliferating cell nuclear antigen and nucleolar organizer regions. *Virchows Arch A Pathol Anat* 1993;422:265-9.

173) Egan MJ, Crocker J. Nucleolar organizer regions in pathology. *Br J Cancer* 1992;65:1-7.

174) Underwood JCE, Giri DD. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J Pathol* 1991;155:95-6.

175) Ghazizadeh M, Sasaki Y, Oguro T, Aihara K. Silver staining of nucleolar organizer regions in prostatic lesions. *Histopathology* 1991;19:369-72.

176) Derenzini M, Pession A, Trerè T. Quantity of nucleolar silver stained proteins is related to proliferative activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990;63:137-40.

177) Rahilly MA, Edwards CW, Crocker J, Murray P. Epithelial cell type, clinical behaviour and AgNOR counts in thymic epithelial tumors. *Anal Cell Pathol* 1991;3:202-13.

178) Pich A, Chiarle R, Chiusa L, Palestro G, Argyrophilic nucleolar organizer region counts predict survival in thymomas. *Cancer* 1994;74:1568-74.

179) Pich A, Chiarle L, Ponti R, Geuna M, Casadio C, Maggi G, Palestro G. Long term survival of thymoma patients by histologic pattern and proliferative activity. *Am J Surg Pathol* 1995;19:918-26.

180) Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated antigen is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991;138:867-73.

181) Brown DC; Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990;17:489-503.

182) Gilhus NE, Jones M, Turley H, Gatter KC, Nagvekar N, Newson-Davis J, Willcox N. Oncogene proteins and proliferation antigens in thymomas: increased expression of epidermal growth factor receptor and Ki-67 antigen. *J Clin Pathol* 1995;48:447-55.

- 183) Yang WW-I, Efird JT, Quintanilla-Martínez L, Choi N, Harris NL. Cell kinetic study of thymic epithelial tumors using PCNA (PC10) and Ki-67 (MIB-1). *Hum Pathol* 1996;27:70-6.
- 184) Ofner D, Maier H, Riedmann B, Bammer T, Rimer A, Winde G et al. Immunohistochemical metallothionein expression in colorectal adenocarcinoma. *Virchows Arch* 1994;425:491-7.
- 185) Pan C-C, Ming-Tak D, Chen WY-K, Chiang H, Fahn H-J, Wang L-S. Expression of E-cadherin and alpha and beta-catenins in thymoma. *Journal of pathology* 1998;184:207-11.
- 186) Yang WY, Yang KM, Hang SW, Kim KD. E-cadherin expression in thymoma. *Yonsei Med J* 1998;39:37-44.
- 187) Perosio PM, Brooks JJ. Expression of growth factors and growth factor receptors in soft tissue tumors. *Lab Invest* 1989;60:245-53.
- 188) Hayashi V, Ishii N, Obayashi C, Jinnai K, Hanioka K, Imai Y, Itoh H. Thymoma: tumor type related to expression of epidermal growth factor (EGF), EGR-receptor, p53, v-erbB and ras p21. *Virchows Arch* 1995;426:43-50.
- 189) Fabier N, Paulin C, Santoro M, Chiappetta G, Batti G, Grieco M et al. The RET proto-oncogene is expressed in predominantly epithelial human thymomas. *Int J of Oncology* 1994;5: 489-93.
- 190) Mukai K, Sato Y, Hirohashi S, Shimosato Y. Expression of ras p21 protein by thymoma. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1990;59:11-6.
- 191) Weirich G, Schneider P, Fellbaum C, Brauch H, Nathrath W, Scholz M et al. p53 alterations in thymic epithelial tumors. *Virchows Arch* 1997;431:1723.
- 192) Chen FF, Yan JJ, Jin YT, Su IJ. Detection of bcl-2 and p53 in thymoma: expression of bcl-2 as a reliable marker of tumor aggressiveness. *Hum Pathol* 1996;27:1089-92.
- 193) Tateyama H, Eimoto T, Tada T, Mizuno T, Inagaki H, Hata A. p53 protein expression and p53 gene mutation in thymic epithelial tumor. *Am J Clin Pathol* 1995;104:375-81.
- 194) Pich A, Chiarle R, Chiusa L, Ponti R, Geuna M, Palestro G. p53 expression and proliferative activity predict survival in non-invasive thymomas. *In J Cancer* 1996;69:180-3.

- 195) Brocheriou I, Carnot F, Briere J. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in thymoma. *Histopathology* 1995; 27:251-5.
- 196) Chen FF, Yan JJ, Chang Kc, Lai WW, Chen RM, Jin YT. Immunohistochemical localization of Mcl-1 and bcl-2 proteins in thymic epithelial tumours. *Histopathology* 1996;29: 541-7.
- 197) International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. *New England Journal of Medicine* 1997,23:309.
- 198) Ruffini E, Mancuso M, Oliaro A, Casadio C, Cavallo A, Cianci R, Filosso PL, Molinatti M et al. Recurrence of thymoma:analysis of clinicopathologic features, treatment and outcome. *J Thorac Cardivasc Surg* 1997;113:55-63.
- 199) Pescarmona E, Rendina EA, Venuta F, Ricci C, Baroni CD. Recurrent thymoma:evidence for histological progression. *Histopathology* 1995;27:445-49.

Inmortalidad Catalina Fernández  
Túneles: entre otros patológicos  
valores morales de las alejandrinas  
de Müller-Hermsdorf, de Rosal-Levine

Apl 9 1908  
9 noviembre 98

Bar

Spill

~~Müller-Hermsdorf~~

Alvarez

W