

VALOR PRONOSTICO DE LA CITOMETRIA DE FLUJO DEL DNA EN EL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

Redondo M.*, Cueto A., Guijarro R., Sánchez-Palencia A., Cabrera T.*, Ruiz-Cabello F.*, Garrido F.*
Servicio de Cirugía Torácica y Análisis Clínicos o Inmunología*. Hospital «Virgen de las Nieves». Granada.

Se han estudiado las alteraciones en el contenido de DNA celular en un total de 50 carcinomas broncogénicos, detectándose la presencia de aneuploidia en 26 tumores (52%) los cuales correspondieron en general a los tumores más agresivos. Así, se encontró predominantemente en el carcinoma de células pequeñas (en el 100% de los casos frente a un 42% de los epidermoides), en los tumores pobremente diferenciados (en el 71 % frente a un 33 % en los bien o moderadamente diferenciados) y en los estadios tumorales superiores (un 64 % frente a un 40 % en los que estaban en el estadio I).

INTRODUCCIÓN

El desequilibrio cromosómico (aneuploidia) es una característica bien reconocida del cáncer humano. A pesar de los recientes avances técnicos, sin embargo, el análisis detallado de tumores sólidos humanos permanece difícil y consume tiempo. A causa de esto, hay creciente interés en la aplicación, a las muestras clínicas, de la medida por citometría de flujo del contenido celular del DNA. Esta medida citométrica correlaciona con el contenido cromosómico total y puede ser determinada rápidamente y con precisión en casi todos los casos. Además, un método descrito recientemente permite el análisis sobre muestras archivadas en bloques de parafina⁽¹⁾.

Los tumores aneuploides son tumores que tienen una población de células con un contenido de DNA que es significativamente diferente del contenido de DNA de células normales, no malignas.

El contenido de DNA ha sido intensamente correlacionado con el pronóstico de los pacientes en varios tipos de tumores sólidos. Así, en carcinomas de mama, tiroides, ovario y renal, se ha descrito que pacientes con tumores aneuploides tienen un pronóstico significativamente peor que los pacientes con tumores diploides⁽²⁹⁾.

En este trabajo estudiamos la correlación existente entre algunos parámetros clínicos-patológicos, como grado de diferenciación, tipo histológico y estadio tumoral, y la presencia de aneuploidia en 50 carcinomas de pulmón, con el objetivo de establecer factores pronósticos en este tipo de carcinoma.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

El material se seleccionó de pacientes operados de carcinoma de pulmón en el servicio de cirugía torácica del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. El análisis, por citometría de flujo del contenido celular del DNA, se realizó en 50 muestras de bloques de parafina de pacientes con carcinoma pulmonar histológicamente confirmado.

Ninguno de los pacientes a quienes les fue aplicado el análisis había recibido anterior al estudio radioterapia o quimioterapia.

Preparación de las muestras y medida del contenido de DNA

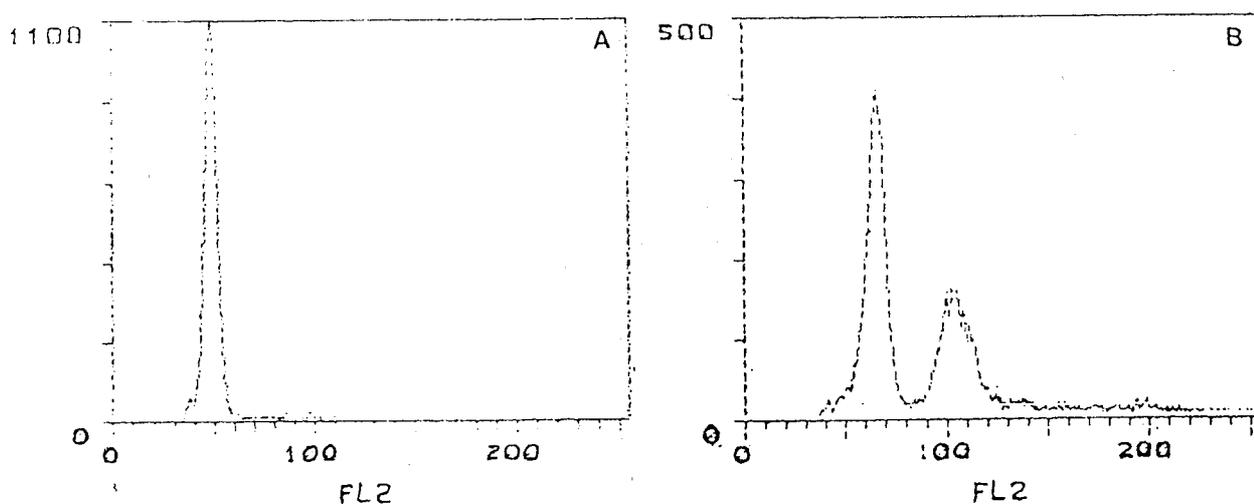
Se obtuvieron de 5 a 7 cortes de 50 pt de cada uno de los tumores incluidos en parafina. El tejido fue desparafinado con xilol y posteriormente rehidratado con concentraciones decrecientes de alcohol. A continuación se realizó la digestión con una solución salina (9% ClNa, ClH pH 1,5) con un 0.5% de pepsina durante una hora a 37° C. Después de la incubación, los especímenes fueron filtrados con filtros de 40 u de poro, centrifugados y lavados en PBS (solución salina tamponada). A continuación, se centrifugaron y aproximadamente 5 x 1000000 células se resuspendieron en 1 ml de PBS, posteriormente se añadieron 250 ul de una solución de 5% triton-x- 100 en PBS, y RNAasa a una concentración final de 250 ug/ml. Por último se realizó el marcaje del DNA añadiendo ioduro de propidio a una concentración final de 50 ug/ml.

La presencia de células cancerígenas en las muestras se confirmó realizando tinciones rutinarias de hematoxilinaeosina, confirmándose que ellas representaban un 20% o más del número total de células nucleadas. Como control interno, se obtuvieron células normales presentes en las muestras.

El análisis del contenido del DNA se realizó en FACSCan (Becton Dickinson), siendo la cantidad de fluorescencia celular directamente proporcional al contenido de DNA. Se recolectaron las señales fluorescentes de 10-50000 células y el resultado se trasladó a un histograma de distribución de frecuencias (Histograma de DNA) (Fig. 1). Los tumores diploides muestran un único pico el cual corresponde a la fase G0/G1 del ciclo celular. Desplazándonos a la derecha de este encontramos una segunda población con un contenido doble de DNA, correspondiendo a la fase G2 /M (mitosis), mientras que entre los picos están las células con un contenido de DNA intermedio, las cuales están en el proceso de replicación del DNA (fase S). La evidencia de un pico adicional G1 indica la presencia de aneuploidia (Fig. 1 B) mientras que un tumor con un único pico G0/G1 es considerado diploide (Fig. 1A).

FIGURA 1

Análisis del ciclo celular del DNA en carcinomas de pulmón



Histogramas representativos del contenido de DNA celular de células procedentes de 2 carcinomas de pulmón. Abscisas: intensidad de fluorescencia proporcional al contenido de DNA celular. Ordenadas: Número de células.

A: Muestra un patrón diploide normal.

B: Pico diploide con un pico adicional aneuploide, indicativo de la existencia de células con una cantidad anormal de DNA.

Histogramas representativos del contenido de DNA celular de células procedentes de 2 carcinomas de pulmón. Abseisas: intensidad de fluorescencia proporcional al contenido de DNA celular. Ordenadas: Número de células. A: Muestra un patrón diploide normal. B: Pico diploide con un pico adicional aneuploide, indicativo de la existencia de células con una cantidad anormal de DNA.

RESULTADOS

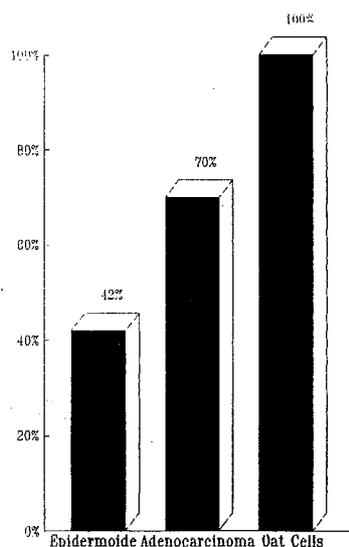


Figura 2: Aneuploidia tipo histológico

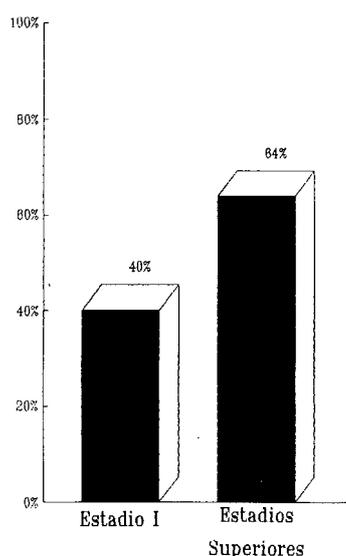


Figura 3: Aneuploidia grado de diferenciación

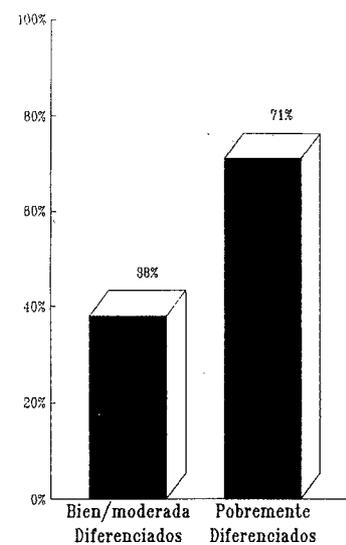


Figura 4: Aneuploidia estado tumoral

Se han estudiado un total de 50 casos de carcinomas de pulmón intentando correlacionar el tipo histológico, grado de diferenciación y estadio tumoral con la presencia de aneuploidia en los mismos por medio de citometría de flujo del DNA. El perfil de DNA en la población tumoral total se obtuvo tras digerir con pepsina, tratar con detergentes y teñir los núcleos con yoduro de propidio.

De las 50 muestras estudiadas en 26 de ellas se detectó un pico aneuploide (52%). Considerando el tipo histológico, la aneuploidia predominó en el carcinoma de células pequeñas (100%, los dos casos estudiados presentaron aneuploidia), siguiéndole en frecuencia el tipo histológico de adenocarcinoma (el 70% de ellos la presentaron) y por último el tipo epidermoide (42%) (Fig. 1 y 2).

En cuanto al grado de diferenciación se encontró aneuploidia en un 38% de los tumores bien o moderadamente diferenciados frente a un 71% en los pobremente diferenciados (Fig. 3).

Por último hemos correlacionado la aneuploidia con el estadio tumoral, según la clasificación de la UICC, detectándose la presencia de aneuploidia en un 40% de los tumores en estadio 1 y en un 64% de los que estaban en estadios superiores (Fig. 4).

DISCUSION

El contenido de DNA tumoral puede jugar un importante papel en la selección de pacientes para protocolo terapéutico. Los pacientes con tumores con un patrón diploide (contenido de DNA «normal») tienen en principio un buen pronóstico, como lo demuestra el hecho de que la mayoría de nuestros casos con patrón diploide corresponden al tipo histológico epidermoide, diferenciación buena o moderada y estadio I. En contraste, tumores con patrón aneuploide correlacionan con tipos histológicos más agresivos (existe aneuploidia en el 70% de los adenocarcinomas y en el 100% de los carcinomas de células pequeñas), pobre grado de diferenciación y estadios tumorales avanzados. Resultados similares, correlacionando la aneuploidia con el grado de diferenciación, se han encontrado en otros tumores, como mama⁽¹⁰⁾, ovario⁽¹¹⁾ y hueso⁽¹²⁻¹³⁻¹⁴⁾; así como, con el estadio tumoral en el cáncer de mama⁽¹⁰⁾ y carcinoma colorectal⁽¹⁵⁾. Sin embargo, otros autores estudiando tumores gástricos⁽¹⁶⁾ y colorectales⁽¹⁵⁾ no han encontrado ninguna correlación entre la presencia de aneuploidia y el grado de diferenciación. Se ha relacionado, también, en gran cantidad de tumores el efecto que las alteraciones del contenido del DNA tienen en la supervivencia^(10,11,15,17). Desafortunadamente, debido al corto seguimiento de nuestros pacientes, no se ha podido establecer ninguna correlación entre la supervivencia de los mismos y el grado de aneuploidia.

Con respecto al análisis del histograma, el excesivo número de células normales es un obstáculo para la expresión de picos aneuploides pequeños. En orden a solucionar este problema, nosotros hemos analizado únicamente muestras con al menos un 20% de células cancerosas.

Desde la presente discusión, parece claro que la citometría de flujo del DNA es una poderosa arma en la transición desde la citología descriptiva a la citología cuantitativa, permitiendo medidas cuantitativas de las propiedades genotípicas tumorales.

BIBLIOGRAFIA

1. Hedley DW., Friedlander ML., Taylor IW., Rugg C., Musgrove E.: Method for Analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow-citometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31: 1333-1335.
2. Auer GU., Casperson TO., Wallgen AS.: DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cytol* 1980;2: 161-165.
3. Thornwaite JT., Coulson PB., Wooley TW. et al: Relationship of DNA flow cytometric analysis to prognosis in human primary breast cancer. Read before the Tenth Annual Meeting of the society for Analytic Cytology, Asilomar, Calif, June 3-8, 1984.
4. Hedley DW., Rugg CA., Ng A13P, et al: Influence of cellular DNA content on disease- free survival of stage II breast cancer patients. *Cancer Res* 1984; 44: 5395-5398.
5. Cohn K., Backdal M., Forsslund G. et al: Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thiroid carcinoma. *World J Surg* 1984; 8: 474-480.
6. Backdahl M., Tallroth E., Auer G. et al: Prognostic value of nuclear DNA content in medullary thiroyd carcinoma. *World J Surg* 1985; 9: 980-987.
7. Friedlander ML., Hedley DW., Taylor IW. et al: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res* 1984; 44: 397-400.
8. Volm M., Bruggemann A., Gunther M. et al: Prognostic relevance of ploidy, proliferation, and resistance: predictive tests in ovarian carcinoma. *Cancer Res* 1985; 45: 5180-5185.
9. Barsh H, Otto U, Kloppel G.: Malignancy index based on flow cytometry and histology for renal cell carcinomas and its correlation to prognosis. *Cytometry* 1986; 7: 200-204.
10. Hedley W.D., Rugg AC. and Gelber DR.: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. *Cancer Res.* 1987; 47: 4729-4735.
11. Rodenburg C., Comelisse C., Heintz P., Hermans Jo and Fleuren G.: Tumor ploidy as a major prognostic factor in advanced ovarian cancer. *Cancer* 1987; 59: 317-323.
12. Hiddemann W., Roessner A., Wormann B., Mellin W., Klockenkernperll., Bosing T., Buchner T. and Grundman E.: Tumor heterogeneity in osteosarcoma as identified by flow cytometry. *Cancer* 1987; 59: 324-328.
13. Kreicbergs AV., Silfvers-Warol C., Tribukait B.: Flow DNA analysis of primary bone tumours: relationship between cellular DNA content and histopathologic classification. *Cancer* 1984; 53: 129-136.
14. Helio H., Karakarju E., Nordling S.: Flow cytometric determination of DNA content in malignant and benign bone tumours. *Cytometry* 1985; 6: 165-171.
15. Emdin S., Steling R. and Roos G.: Prognostic value of DNA content in colorectal carcinoma. A flow cytometry study with some methodologic aspect. *Cancer* 1987; 60: 1282-1287.
16. Aretxabala X., Yonemura Y., Sugiyama K., Hirose N., Kumaki T., Fushida S., Miwa K., Miyazaki L: Gastric Cancer Heterogeneity. *Cancer* 1989; 63: 791-798.
17. Kokal WA., Duba RB., Azumi N. et al: Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. *Arch Surg* 1986; 121: 1434-1439.