

Contenido de DNA nuclear en muestras de carcinoma broncogénico obtenidas mediante fibrobroncoscopia

F. Rodríguez de Castro, T. Molero Labarta*, F. Díaz López, J.A. Caminero Luna, P. Cabrera Navarro y T. Carrillo Díaz

Sección de Neumología y * Servicio de Hematología.
Hospital Universitario Nuestra Señora del Pino.
Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud.
Las Palmas de Gran Canaria.

Por citometría de flujo se han estudiado distintas muestras obtenidas mediante fibrobroncoscopia, que correspondían a 73 neoplasias malignas, cuatro neoplasias benignas y ocho muestras de mucosa bronquial sin infiltración neoplásica en el estudio histológico.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) evaluar la detección de aneuploidias en muestras de tumor obtenidas por fibrobroncoscopia; b) valorar si el contenido de DNA tumoral se relaciona con parámetros clínico-patológicos como el grado de diferenciación tumoral, la estirpe histológica o el estadiaje tumoral; y c) estudiar si puede ayudar a predecir el pronóstico y/o evolución de la neoplasia.

Se ha encontrado una distribución diploide en todos los tumores benignos y en siete de las ocho biopsias no infiltradas. Un 60 % de las muestras de tumores malignos tenían aneuploidias, sin que hayamos podido relacionar ningún tipo concreto de éstas con estirpes histológicas determinadas. Observamos una asociación significativa ($p < 0,01$) entre la existencia de aneuploidias y el grado de diferenciación tisular y el estadio tumoral.

Arch Bronconeumol 1992; 28:161-164

Nuclear DNA content in samples of bronchogenic carcinoma obtained by fiberoptic bronchoscopy

Samples obtained by fiberoptic bronchoscopy in 73 malignant neoplasms, 4 benign neoplasms, and in 8 cases in bronchial mucosa without histologic evidence of neoplastic infiltration, were analyzed under flow cytometry. The objectives of this study were: a) to evaluate the detection of aneuploidies in tumor samples obtained by fiberoptic bronchoscopy; b) to assess whether tumoral DNA content relates with clinicopathological histologic type, or tumoral stage; and c) to verify whether this study can contribute to better predict the prognosis and, or, the course of the neoplasm. We have found a diploid distribution in all benign tumors and in 7 out of 8 noninfiltrative biopsies. The 60 % of malignant tumors showed aneuploidies, but we could not establish a correlation between them and a certain histologic stock. However, we observed a significant ($p < 0.01$) association between the presence of aneuploidies and the degree of tissular differentiation and tumoral stage.

Introducción

Al contrario de lo que ocurre en los tejidos normales, las lesiones neoplásicas tienen, con frecuencia, aberraciones cromosómicas que provocan la aparición de clones no diploides de células dentro de la población tumoral, que podrían estar relacionados con un determinado comportamiento clínico¹. El análisis del contenido de DNA tumoral por citometría de flujo ha visto confirmada su validez como marcador tumoral en estudios recientes y se ha sugerido su utilidad para reconocer tumores sólidos con diferentes niveles de malignidad²⁻⁵. También ha habido algunos grupos que han comunicado una elevada incidencia de aneuploidias en neoplasias pulmonares, en ocasiones con resultados contradictorios y, casi siempre, en estudios retrospectivos de piezas quirúrgicas desparafinadas^{2, 6-8}.

Los objetivos en este trabajo han sido: a) evaluar nuestra experiencia en la detección de aneuploidias en pequeñas muestras de tumores broncogénicos obtenidas mediante fibrobroncoscopia (FB); y b) determinar si la medición del contenido de DNA tumoral por citometría de flujo se relaciona con parámetros clínico-patológicos como el grado de diferenciación tumoral, la estirpe histológica o el estadio del tumor; y si puede ayudar a predecir el pronóstico y/o evolución de la neoplasia.

Material y métodos

Desde enero de 1990 hasta junio de 1991 se han estudiado 85 piezas biópsicas obtenidas por FB, que correspondían a ocho mucosas no infiltradas por neoplasia en el estudio anatómo-patológico; cuatro tumores benignos de distintos tipos y 73 tumores malignos cuya distribución por estirpes histológicas es la que se muestra en las figuras 1 y 2. Las

Recibido el 29-8-91 y aceptado el 12-11-1991.

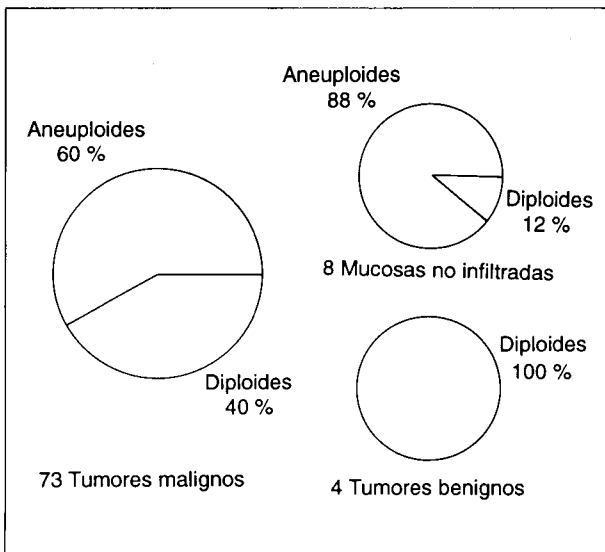
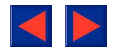


Fig. 1. Porcentaje de aneuploidias de los casos incluidos en la serie: a) 73 tumores malignos (60% de aneuploidias); b) ocho mucosas no infiltradas por tumor (88% aneuploidias); y c) cuatro tumores benignos, todos ellos diploides.

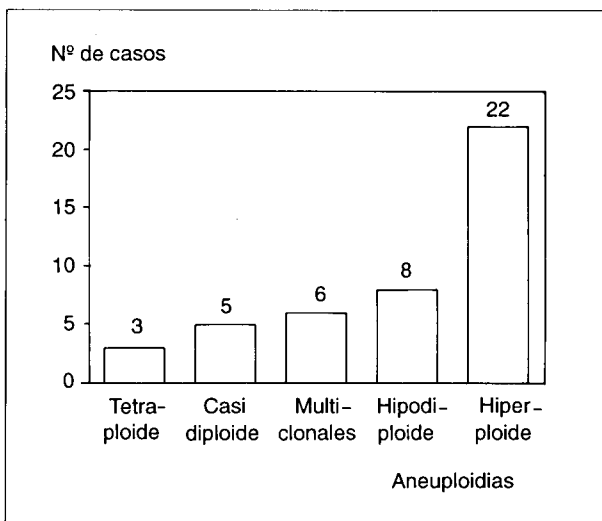


Fig. 2. Contenido de DNA nuclear según las distintas estirpes histológicas.

piezas estudiadas se obtuvieron de la zona macroscópicamente más afectada, utilizando FB (BF PD-20, Olympus Optical Corp. of America, New Hyde Park, NY; o Fujinon BRO-Y-2s; Fujinon Europe GmbH, Düsseldorf, West Germany) y mediante pinzas estándar (FB-15C y FB-19C), enviándose un mínimo de cuatro fragmentos, tanto para estudio histológico como para detección de aneuploidias por citómetro de flujo (Facsan Becton Dickinson®).

La muestra en fresco fue desmenuzada mecánicamente con pinza metálica, lavada en PBS y suplementado con suero fetal. Posteriormente se filtraron a través de poro de 45 micras y se contaron en cámara entre 800.000 y un millón de células por muestra. Se empleó la técnica de Vindelov en núcleos aislados. Para ello se procedió a una digestión enzimática de los citoplasmas con tripsina, se de-

tuvo la reacción con antitripsina y se añadió RNAasa para evitar confundir el RNA de doble cadena con el DNA. Finalmente se añadió yoduro de propidio como fluorocromo. Se analizaron unas 10.000 células por muestra con un coeficiente de variación menor del 8% y se calculó el índice de DNA dividiendo el canal de la moda del pico aneuploide por el del pico diploide. Como control se utilizaron linfocitos de sangre periférica separados con un gradiente de ficoll.

Las variables numéricas se compararon utilizando el test de la *t* de Student. La determinación de la posible asociación entre variables cualitativas se realizó mediante la prueba de χ^2 . El análisis de supervivencia se efectuó por el método de Kaplan y Meier y la comparación estadística de las curvas por la prueba de Mantel y Haenszel. En todos los casos se tomó como nivel aceptado de significación el correspondiente a un valor de *p* menor de 0,05.

Resultados

Las muestras estudiadas correspondían a pacientes con edades comprendidas entre 43 y 78 años ($63,3 \pm 8,9$). Nueve (11%) eran mujeres y setenta y seis (89%) eran varones. Los 73 carcinomas broncogénicos, objetivo final del estudio, se distribuían según el estadio TNM como queda reflejado en la figura 3, destacando el predominio, dado el modo de obtención de las muestras, de los estadios más avanzados, especialmente el IV, lo que sin duda influyó en el estudio de supervivencia.

En el estudio general de las piezas se encontró una distribución normal diploide en todos los tumores benignos y en siete de las ocho biopsias no infiltradas por tumor. Esta excepción correspondía a una metaplasia escamosa intensa en el estudio histológico. Los 73 tumores malignos, por el contrario, tenían hasta un 60% de aneuploidias (figura 1). Los distintos subgrupos de estas últimas son las que se muestran en la figura 4. Al contrario de lo descrito por algunos autores, no se ha encontrado un mayor predominio de aneuploidias en ninguna estirpe histológica, incluidos los indiferenciados de células pequeñas.

Sin embargo, sí se ha observado una relación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre la existencia de aneuploidias y el grado de diferenciación tisular. También se ha comprobado una asociación significativa ($p < 0,01$) entre el estadio tumoral y la existencia de anomalías en el contenido de DNA, encontrando un porcentaje significativamente más alto de aneuploidias en estadios más avanzados. Cuando analizamos por separado los distintos grados de T, N o M, sólo la existencia o no de metástasis se relaciona de forma estadísticamente significativa con la existencia de aneuploidias.

Al efectuar una curva de supervivencia actuarial de Kaplan y Meier, se comprobó que a los 12 meses no había ningún superviviente entre los pacientes que presentaron aneuploidias en las piezas de biopsia endoscópica. Sin embargo, entre los pacientes con tumores diploides, se encontró un 20% de pacientes vivos en el mismo período de tiempo. Esta diferencia, por la prueba de Mantel y Haenszel, no resulta estadísticamente significativa.

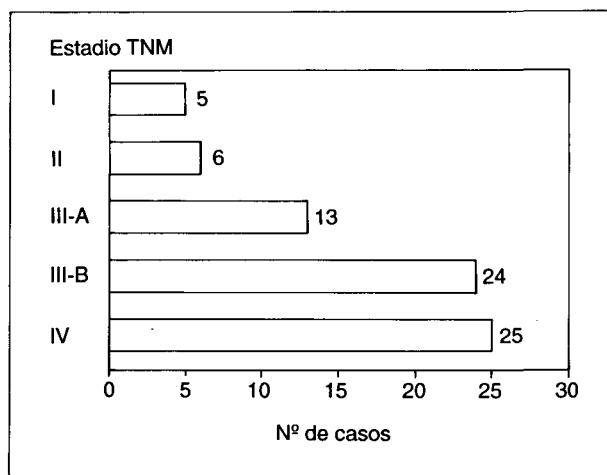


Fig. 3. Distribución de las neoplasias según el estadio TNM.

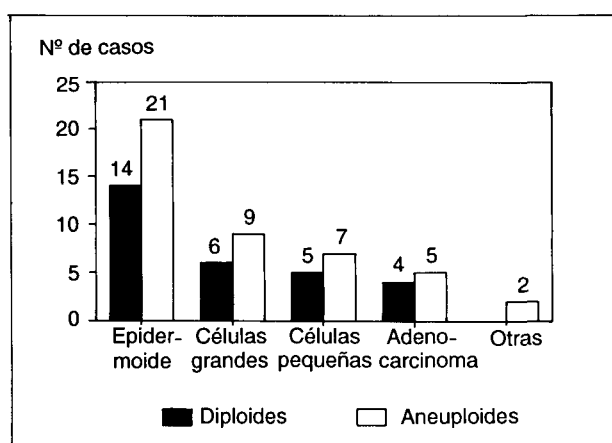


Fig. 4. Distribución de los distintos tipos de aneuploidias en 44 neoplasias malignas no diploides.

Los tumores aneuploides tenían una media del porcentaje de síntesis significativamente más alto que los de contenido diploide ($p < 0,01$).

Discusión

La medición del contenido de DNA nuclear por citómetro de flujo permite analizar rápidamente grandes poblaciones celulares, pero tiene la gran desventaja, respecto a los instrumentos estáticos, de no permitir la corroboración morfológica de la muestra⁹. Recientemente se han utilizado técnicas de desparafinado para el análisis de material almacenado aunque, en muchas circunstancias, el núcleo se desintegra completamente artefactuándose los resultados¹⁰. Asimismo, se ha comprobado en un amplio estudio sobre cáncer de colon, que el componente aneuploide se pierde en algunas de las muestras desparafinadas⁹.

En el presente estudio se ha comprobado que, en las pequeñas piezas tumorales obtenidas mediante FB, se

detecta un porcentaje de aneuploidias similar y en muchos casos superior, al referido en otras series con piezas quirúrgicas y desparafinadas. Al contrario de lo comunicado por otros autores⁶, no se ha podido demostrar que las ploidias de DNA distingan entre diferentes tipos de tumores, es decir, que, en nuestra experiencia y con la metodología descrita, no son más frecuentes en unas estirpes que en otras.

La mayoría de las aneuploidias encontradas eran de contenido hiperploide pero destacaba, sobre todo, un 18 % de hipodiploides, que es un tipo de aneuploidia que tradicionalmente se ha descrito como difícil de detectar por citometría de flujo⁷. No se ha podido establecer ninguna asociación entre los distintos grupos de aneuploidias y las diferentes estirpes histológicas. Tampoco se han encontrado subgrupos de aneuploidias con significación pronóstica como se ha establecido para el carcinoma de mama o colon, en los que la presencia de tetraploidias confiere un mejor pronóstico^{11,12}.

Sin embargo, sí se ha comprobado una relación con el estadio tumoral, la presencia de metástasis y con el grado de diferenciación tisular, lo que nos hace sospechar que las aneuploidias de DNA son un marcador del incremento del potencial maligno de un tumor. La medición del contenido de DNA por citometría de flujo no es suficientemente sensible para detectar los cambios subcromosómicos que, presumiblemente, están implicados en la patogénesis de las neoplasias. La generación de una población aneuploide refleja un aumento de la inestabilidad genética asociada a la transformación maligna pero, en nuestra experiencia, la determinación del contenido de DNA por citometría de flujo en carcinoma broncogénico, tiene un limitado valor clínico en comparación con la evaluación clínica y/o histológica convencional. Probablemente, el gran porcentaje de estadios avanzados en la población estudiada y el escaso tiempo de seguimiento puedan condicionar los resultados de esta serie.

Quizá sean los tumores pequeños y más diferenciados los que presenten un mejor pronóstico del DNA. Por otra parte, puesto que los tejidos normales (con la excepción ya comentada) y los tumores benignos de nuestra serie mostraron siempre un contenido de DNA normal, la presencia de aneuploidias podría ser interpretada como un marcador de algún tipo de transición de una condición benigna a otra maligna, por lo que podría ser utilizado como test, incluso de mayor sensibilidad, en los bordes de resección quirúrgicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sandberg AA. Tumors of the lung. En: Sandberg AA, ed. The chromosomes in human cancer and leukemia. New York: Elsevier, 1981:468-485.
2. Asamura H, Nakajima T, Mukai K, Shimosato Y. Nuclear DNA content by cytofluorometry of stage I adenocarcinoma of the lung in relation to postoperative recurrence. Chest 1989; 96:312-318.



3. Heimann TM, Miller F, Martinelli G et al. Significance of DNA content abnormalities in small rectal cancers. *Am J Surg* 1990; 159:199-202.
4. Salvati F, Teodori L, Gagliardi L, Signora M, Aquilini M, Storniello G. DNA flow cytometric studies of 66 human lung tumors analyzed before treatment. Prognostic implications. *Chest* 1989; 96:1.092-1.098.
5. Silvestri GA, Luthringer DJ, Flynn SD, Hoenig J, Filderman AE. Diagnostic significance of flow cytometric DNA analysis in stage I non-small cell lung cancer. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141 (supl. 1):A54.
6. Redondo M, Cueto A, Guijarro R et al. Valor pronóstico de la citometría de flujo del DNA en el carcinoma broncogénico. *Neumosur* 1990; 2:5-8.
7. Jones DJ, Hasleton PS, Moore M. DNA ploidy in bronchopulmonary carcinoid tumours. *Thorax* 1988; 43:195-199.
8. Bunn PA Jr, Carney DN, Gazdar AF, Whang-Peng J, Matthews MJ. Diagnostic and biological implications of low cytometric DNA content analysis in lung cancer. *Cancer Res* 1983; 43:5.026-5.032.
9. Koss LG, Czerniak B, Herz F, Wersto RP. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol* 1989; 29:528-547.
10. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg C, Musgrove E. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31:1.333-1.335.
11. Baildam AD, Zaloudik J, Howell A, Barnes DM, Moore M, Sellwood RA. DNA analysis by flow cytometry, response to endocrine treatment and prognosis in advanced carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1987; 55:553-559.
12. Quirke P, Dixon MF, Clayden AD et al. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; 151:285-291.