

Importancia pronóstica de la medición del ADN en tumores sólidos*

I. Introducción

Francisco Durazo-Quiroz,** Ana María Rodríguez***

Resumen

Se sabe que en los tumores sólidos ocurren frecuentemente cambios en el contenido de ADN, que reflejan cambios genéticos a nivel cromosómico, los que juegan un papel importante en el desarrollo y progresión de los mismos

El estudio citogenético de los tumores sólidos ha mostrado un cariotipo complejo, que ha dificultado la identificación de los cambios cromosómicos específicos. Sin embargo la genética molecular ha identificado a algunos genes asociados con la carcinogenesis y sus alteraciones en los tumores⁴

La citometría de flujo se ha utilizado ampliamente en el análisis del contenido y distribución del ADN en tumores, tanto experimentalmente como en clínica, y relacionarlo con el pronóstico y su progresión

Su aplicación en oncología ha sido muy vasta, principalmente en ginecología, urología y gastroenterología, y se ha concentrado en la identificación de tumores en su estadio inicial y en su pronóstico

En este simposio se presentan la metodología empleada y los resultados obtenidos en el cáncer mamario, prostático y vesical principalmente

Palabras clave: Citometría de flujo, ciclo celular, ADN, valor predictivo, tumores sólidos

Summary

It is known that alterations in the DNA content of solid tumors are frequent and reflect genetic changes at the chromosomal level which play an important role in tumor growth and progression

The cytogenetic study of solid tumors has shown a complex karyotype, which has made it difficult to identify specific chromosomal changes. However, molecular genetic studies have identified some genes associated with carcinogenesis and its alterations in tumor⁴

Flow cytometry has been widely used in DNA content and distribution studies, both experimentally and clinically, and has been related with disease prognosis and progression. It now has widespread applications in oncology, especially in gynecology, urology and gastroenterology, and has focused on the early identification of tumors and their prognosis

This symposium will deal with the methodology used and the results obtained mainly in breast, prostate and bladder cancers

Key words: Flow cytometry, cell cycle, DNA, predictive value, solid tumors.

* Simposio presentado en la sesión ordinaria del 14 de Mayo de 1997

** Académico titular Laboratorio clínico, Hospital Español de México.

*** Sección de citometría de flujo, Hospital Español.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Hospital Español, AV. Ejercito Nacional No. 613, Col. Granada, C.P. 11560. México. D.F. Tel 255-97-44

Durante los dos últimos decenios la investigación en oncología ha hecho importantes progresos en la identificación a nivel molecular, de las bases que gobiernan el proceso de división celular.

Las mitosis es el tipo de división celular por medio del cual el cuerpo crece y substituye a las células de deshecho. Pero es obvio que una célula antes de dividirse debe duplicar su contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN), lo que ocurre durante un período específico de la interface: el ciclo celular (Figura 1).

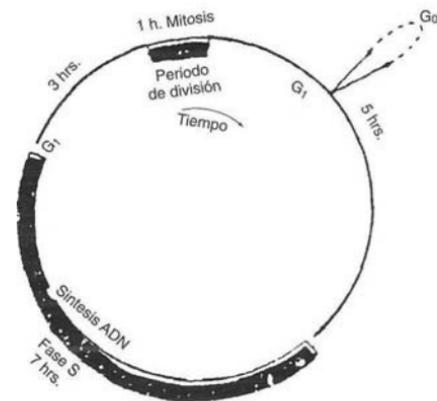


Figura 1

Durante este ciclo el núcleo celular contiene diferentes cantidades de ADN, características de su estado de proliferación. Después de la proliferación mitótica, la nueva célula entra en la fase "G₁", en la cual no se sintetiza ADN y mantiene un contenido diploide (un complemento cromosómico equivalente a 2N). Sigue la fase "S", durante la cual ocurre la síntesis de ADN; las células en esta fase contienen cantidades de ADN intermedias entre "G₁" y "G₂". Esta fase culmina con la duplicación del contenido de ADN definido como fase "G₂", la célula tiene entonces un contenido tetraploide de ADN (un complemento cromosómico equivalente

a 4N). Durante esta fase ocurre una síntesis de ácido ribonucleico (ARN), y proteínas que culmina en la fase de mitosis "M". Una vez que la mitosis ha ocurrido, las dos células hijas resultantes, tienen un contenido diploide de ADN, y/o bien continúan con otro ciclo, o entran en una fase de reposo definida como "G₀", que es indistinguible de la fase "G₁", en base a su contenido de ADN. Estudios en cultivos de células humanas han demostrado que el ciclo completo tiene una duración de 12 a 24 hrs. La regulación de la duración del ciclo tiene lugar por su detección en un punto específico de "G₁", entonces la célula se encuentra en un estado de "G₀", en el cual se considera que se ha retirado del ciclo celular.² Cuando las condiciones cambian y se reanuda el crecimiento, la célula vuelve a entrar a la fase "G₁", en donde se produce el proceso de regulación más importante, o inicia un nuevo ciclo, o se detiene en "G₀" temporal o permanentemente, según las señales de estimulación o inhibición que ponen al reloj del ciclo celular fuera de control, como han puesto de manifiesto los impresionantes avances de los últimos años.^{3,4}

El cáncer es una enfermedad en la cual las células pierden la capacidad de controlar su multiplicación, como consecuencia de la disfunción en los mecanismos que regulan el ciclo celular, entonces las células escapan al control necesario para conservar la estructura y la función normales, indispensables para mantener la homeostasis de los organismos multicelulares, hecho que conduce a una proliferación de las mismas, no controlada y a una invasión de los tejidos vecinos, y subsecuentemente a una diseminación a distancia.⁴

En los tumores sólidos ocurren cambios en el contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN), que son el reflejo de los cambios genéticos que juegan un papel primordial en el desarrollo del tumor y en su progresión, y obedecen a procesos de estimulación e inhibición en las células, que convergen en el núcleo, y al que se le ha llamado: reloj del ciclo celular, el cual se ha demostrado que actúa en todos los tipos de cáncer humano.^{5,6}

La histología es de un valor diagnóstico insustituible, pero su alcance pronóstico es limitado. La estadificación de un tumor se ha basado fundamentalmente en la progresión de la enfermedad; es común observar que la evolución clínica de tumor

res histológicamente idénticos, es diferente. Por lo que se hace indispensable contar con marcadores pronósticos adicionales que puedan predecir la progresión y la respuesta individual de un tumor.

La citometría de flujo ha sido ampliamente utilizada para analizar la distribución del contenido de ADN de los tumores, y relacionarla con los parámetros clínicos y biológicos del tumor. Es una tecnología que permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una célula, así como la intensidad de su fluorescencia. La medida es realizada al analizar un promedio de 500 a 4000 células por segundo, suspendidas en un fluido móvil: sustancias específicas (fluorocromos), se unen al ADN celular estequiométricamente, se obtiene así un patrón característico al medir la fluorescencia del ADN, el que refleja las diferentes fases del ciclo celular.⁴

Procedimiento

Comprende la disolución de los lípidos de la membrana celular con un detergente iónico, la eliminación del citoesqueleto y de las proteínas nucleares con tripsina; la digestión del ácido ribonucleico con ribonucleasas y un estabilizador de la cromatina nuclear con espermina; además se emplea un colorante con afinidad para el ADN, que se une a los núcleos aislados.

Se utilizó un citómetro de flujo de la casa Becton Dickinson (facsort), con módulo de doble discriminación, procesador de pulsos, detección de fluorescencia de tres colores y difracción de luz en dos direcciones; con lámpara de excitación láser de argón en el rango de azul a verde, y emisión a 488 nm, óptima para trabajar con yoduro de propidio.

Obtención de una muestra representativa

El análisis de tumores sólidos por citometría de flujo, requiere de una suspensión de células aisladas, que se obtienen por disociación del tumor fresco, o bien de una sección del mismo incluida en parafina.

Es importante obtener células de áreas específicas para reducir la dilución de las células neoplásicas con elementos inflamatorios y estroma.

Antes de proceder a obtener la muestra, deben removerse las áreas de necrosis y de grasa que ocasionan interferencia.

Obtener muestras de múltiples sitios para minimizar el impacto de una población celular de un tumor heterogéneo.

El material obtenido debe ser procesado lo más pronto posible para evitar autólisis, y la degradación de las proteínas celulares, en caso contrario, se congela suspendido en buffer de citrato (BC)², que permite un almacenamiento prolongado.

Preparación del tejido para análisis del ADN

De entre las diferentes técnicas de disociación la de aspiración con aguja fina, es la que hemos empleado, es versátil y un excelente método mecánico, que propicia la extracción y dispersión de acumulos celulares.

El fragmento seleccionado se fija con alfileres sobre una superficie plana.

Se procede a la aspiración de las células tumorales, con una jeringa de 20 ml., de un pistón y una aguja No. 25.

Se puncionan diferentes áreas del tumor, haciendo vacío simultáneamente, procurando obtener la mayor cantidad de células que sea posible.

El material aspirado (en la aguja, no en la jeringa) se va depositando en un tubo de prolipropileno de 6 ml., que contiene 1 ml. de BC, aspirando y expulsando el contenido con el mismo buffer.

Con dos pequeñas gotas de la suspensión celular se hace un frotis que se colorea con hematoxilina-eosina para constatar que se obtuvo una representación celular homogénea.

Se practica una cuenta celular en cámara de Neubauer para obtener menos 1×10^6 células por ml.

Cuando se manejan suspensiones celulares, se centrifugan 5' a 3000g a temperatura ambiente, se aspira el sobrenadante y el bloque celular se resuspende en 5 ml. de SB se agita en vortex, y se procede a hacer una cuenta celular como se mencionó anteriormente.

² (citrato de sodio, sucrosa y dimetilsulfóxido)

³ Cycle Test™ Plus DNA Reagent Kit

Coloración

Se utilizó el estuche de Becton-Dickinson (BD)³, que contiene un lote de reactivos; para aislar y colorear el núcleo celular de muestras de tejidos sólidos y suspensiones celulares.

Además es necesario disponer de un estuche adicional (BD) que contiene: núcleos de eritrocitos de pollo; núcleos de timocitos de borrego; partículas fluorescentes y yoduro de propidio, reactivos necesarios para la calibración del citómetro y obtener información sobre la linealidad y resolución al hacer los ajustes necesarios en el voltaje y la ganancia.

La suspensión celular obtenida se centrifuga 5', a 400 xg a temperatura ambiente; se decanta el sobrenadante sobre papel filtro.

Se agregan 250 ul. de la solución A (Tripsina en BC) a cada tubo, se mezcla suavemente a mano, y se deja reposar 10' temperatura ambiente.

Sin remover la solución A se agregan 200 ul de la solución B (contiene un inhibidor de Tripsina y ribonucleasa en BC) a cada tubo, se mezcla suavemente y se incuba por 10' a temperatura ambiente.

Sin remover las soluciones A y B se agregan 200 ul. de la solución C (yoduro de propidio y tetracloruro de espermina en BC) enfriada entre 2° y 8° C, a cada tubo, se mezcla suavemente y se incuba 10' en la oscuridad sobre hielo o en refrigeración entre 2° y 8° C.

Se filtra la muestra a través de una malla de nylon en un tubo de 12 x 75 mm.

Los tubos se tapan y guardan en la oscuridad entre 2° y 8° C. hasta que se proceda a su análisis en el citómetro de flujo, en un periodo no mayor de 3 hrs.

Previa resuspensión de las células, se procede a su análisis en el citómetro de flujo, previamente alineado y calibrado, según el programa Cell-Fit de BD, que nos permite medir el ADN de los núcleos sometidos a estudio.

La suspensión celular aspirada a través de un capilar hacia la celda de flujo del instrumento, que tiene el diámetro de una célula, las que al pasar en una sola fila, reciben la excitación del rayo laser; cada célula dispersa la luz en dos direcciones: hacia delante y perpendicularmente en un ángulo de 90°; la fluorescencia que emite es medida por detectores

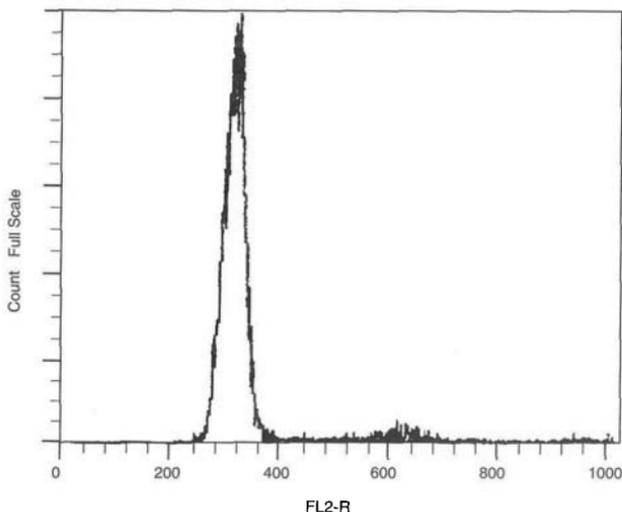


Figura 2.

fotosensibles, de manera que la dispersión de la luz y la intensidad de la fluorescencia emitida caracterizan a las células que son procesadas.

Información

El análisis del tejido procesado, se obtiene en un histograma que expresa la distribución de frecuencias, a partir de la fluorescencia relativa de miles de células individuales detectadas por un fotomultiplicador. Así mismo representa la distribución de las mismas con respecto a su posición en el ciclo celular.

El histograma de un tejido normal se caracteriza por un trazo dominante, que representa la predominancia de células en reposo (G_0), y en presíntesis (G_1), del ciclo celular, y corresponde a la cantidad de ADN en 46 cromosomas ($2c$), (Figura 2). El segundo trazo ($G_2 - M$) representa la fracción de células que tienen el doble de ADN ($4C$). La figura 3 representa un histograma que refleja el contenido de ADN durante las diferentes fases del ciclo celular.

En el análisis de un histograma encontramos una información fundamental para sustentar el criterio pronóstico de diploidismo o aneuploidía de un determinado tumor; en cuanto mayor sea el número de células en las fases "S" y $G_2 + M$, mayor será la capacidad reproductiva, la progresión de un tumor, y la posibilidad de recurrencia, principalmente dentro del primer y segundo años, que siguen al tratamiento primario.⁷

Cuando un tumor maligno se identifica como aneuploide, el análisis citométrico invariablemente demuestra un componente de células con ADN diploide;

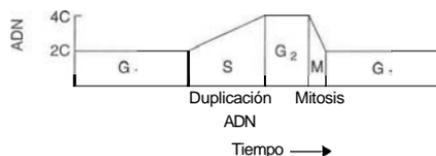


Figura 3.

dichas células están representadas por linfocitos, células endoteliales, fibroblastos y otros elementos del estroma que están siempre presentes en los tejidos en número variable; en este caso el histograma tiene dos ciclos celulares que se superponen.

Conclusiones

La citometría de flujo se ha constituido a través de la medida del ADN en tumores sólidos y en suspensiones celulares, en un procedimiento de apoyo en oncología, como un parámetro de gran valor predictivo, en el momento del diagnóstico y en el seguimiento de los pacientes. La obtención de un ADN aneuploide tiene diferentes connotaciones pronósticas en función de la actividad de síntesis y de mitosis del tejido en estudio.

La citometría de flujo, puede apoyar un diagnóstico de cáncer, demostrando aneuploidía, indicadora de un carcinoma tempranamente invasor.

Referencias

1. Thompson JS, Thompson MW. *Genética Médica Salvata* 2ª. Edición, México 1975.
2. De Robertis EDP, de Robertis EMF. *Fundamentos de Biología Celular y Molecular*. El Ateneo 2. Edición, Argentina 1989.
3. Weinberg RA. How Cancer Arises. *Scientific American* 1996 Sept. :32-40.
4. Darzyn **Klewicz** Z. The Cell Cycle. En *Clinical Flow Cytometry*. Baur KD, Duque RE, Shankey TV (Eds) Williams y Wilkins Ia Edición Baltimore 1993 PP 13 -40.
5. Cornelisse **CJ, Devilee** P, Vincent TH. DNA Content as a genetic marker of cancer cells, En: *Clinical Flow Cytometry*, Baur KD, Duque RE, Shankey TV (Eds) Williams y Wilkins 1ª. Edición Baltimore, 1993 PP 3 -12.
6. Heim S, **Mitelman** F. Chromosomal Abnormalities in Specific Disorders solid tumor. En: *Cancer Cytogenetics*. Heim S, Mitelman F, (Eds). Alan R. Liss Inc. New York. 1987 p 227.
7. Hedley DW. Breast Cancer E: *Clinical Flow Cytometry* Baur KD, Duque RE, Shankey TV, (Eds) Williams y Wilkins I a Edición Baltimore 1993 PP 247 - 260.

II. Citometría de flujo en cáncer urológico

Sergio E. Ureta-Sánchez,* Manuel Dehesa-Dávila,** Raymundo Toledo-Figueroa,*** Ana María Rodríguez-García****

Resumen

La citometría de flujo permite la medición de DNA celular identificando las características de ploidía celular. En este estudio se muestran las características de ploidía celular en varios tipos de cáncer urológico. Se estudiaron por citometría de flujo 29 cánceres urológicos. 14 corresponden a tumores de urotelio (carcinoma de células transicionales), 11 masculinos y 3 femeninos, 7 fueron diploides y 7 aneuploides. De adenocarcinoma de próstata fueron 11 casos, 2 diploides y 9 aneuploides. De cáncer de riñón un caso (carcinoma de células claras) que fue diploide. De tumores de testículo hubo 2 casos, ambos fueron aneuploides. Un caso de tumor de pene (carcinoma epidermoide) que mostró aneuploidía. Se discuten estos hallazgos con relación a pronóstico.

Palabras clave: Citometría de flujo, diploidía, aneuploidía, cáncer urológico, factores pronósticos

Summary

Flow cytometric analysis permits the determination of DNA content and the characteristics of ploidy. We study by cytometric analysis 29 urologic tumors by means of cytometric analysis. Fourteen corresponded to urothelial tumors (transitional cell carcinoma), 11 male and three females were diploid tumors, and seven were aneuploid tumors. Additionally, there were 11 cases of adenocarcinoma of the prostate, 2 diploid and 9 aneuploid and one case of renal cancer that was diploid. There were two cases of testis tumor, both aneuploid, and one case of tumor of the penis that showed aneuploidy. We discuss these findings in relation of prognostic factors.

Key words: Flow cytometry, diploid tumor, aneuploid tumor, urologic cancer, prognostic factors.

Introducción

El cáncer es una enfermedad en la que la célula escapa de los mecanismos de control del crecimiento necesarios para mantener la estructura normal y función de órganos y tejidos en todo organismo multicelular. Esto lleva a una proliferación celular descontrolada y a la invasión de tejidos vecinos o lejanos. Las neoplasias son consideradas como el resultado final de múltiples accidentes genéticos en las células somáticas. La medición del contenido de ácido desoxirribonucleico (DNA)

en el ciclo celular, incluyendo la determinación de ploidía del tumor y la fracción de la fase-S se ha realizado en una amplia variedad de tumores humanos por más de 20 años utilizando la citometría de flujo (CF). El ciclo celular se divide en 4 fases, la primera es la fase G1 donde la célula recibe la información para la inducción de transcripción de ciertos genes (fase de prereplicación), la segunda es la fase S que es la replicación o síntesis de DNA la cual es seguida de la fase G2 de posreplicación premitótica y finalmente la fase M que es la mitosis (Figura 1).

* Urologo Adscrita, Jefe de la Unidad Urodinamia, Hospital Español.

** Asociado, Unidad de Urodinamia, Hospital Español.

*** Asociado, Unidad de Urodinamia, Hospital Español.

**** Departamento de Citometría de Flujo, Laboratorio de Análisis Clínicos, Hospital Español.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Ejército Nacional 617-802, Col. Granada. México 11550 DF. Email: sureta@data.net.mx

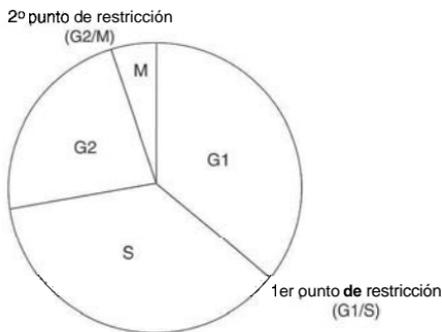


Figura 1. Ciclo celular

La medición del DNA también puede ser determinada por otras técnicas tales como citometría de imagen y técnicas de hibridación con fluorescencia in situ (FISH). Durante los últimos años muchas publicaciones han discutido la utilidad clínica de la medición del contenido de DNA.^{1,2} La ploidía se refiere al contenido de DNA en los cromosomas de la célula. Los gametos tienen 23 cromosomas y se les denomina haploides, las células normales contienen 46 cromosomas o 23 pares de estos denominados diploides (*haploids*, único y *diploids*, doble). En las células cancerosas, frecuentemente es encontrada una alteración de los cromosomas normales diploides ($n=46$). En principio, estos cambios citogenéticos conciernen a la ploidía (número) o a la morfología (estructura) de los cromosomas y/o a una combinación de ambas. La pérdida o ganancia de cromosomas (monosomías, trisomías y polisomías) pertenece a la primera categoría, en tanto las modificaciones dentro de un cromosoma (deleciones, duplicaciones, inversiones) o las modificaciones entre dos o más cromosomas (translocaciones) pertenecen a la segunda. En breve, el método de la CF consiste en que una suspensión lineal de células aisladas fluye a través de una fuente de luz láser en un aparato.¹ Las propiedades de las células deflektan la luz en varios ángulos y esta luz es reconocida por detectores de luz los cuales registran los impulsos de luz como "eventos". Estos eventos son digitalizados y almacena-

dos por la computadora del aparato la cual va a generar un histograma. En el análisis del cáncer urológico, es el contenido del DNA el que tiene mayor interés el cual es detectado realizando una tinción adecuada para DNA. Actualmente la CF es ampliamente utilizada para analizar el contenido y la distribución del DNA en diversas variedades de tumores con el fin de conocer el comportamiento biológico de estos tumores y relacionarlos con parámetros clínicos y fisiopatológicos. Además nos brinda información sobre el tamaño relativo de la célula, su granularidad, complejidad interna y su intensidad al marcaje con distintos fluorocromos. En resumen podemos decir que la CF nos permite estudiar tres componentes principales: masa, estructura y función. Del primero se destaca la medición de DNA, RNA y proteínas. De la segunda, es su volumen, tamaño, granularidad, área de superficie y la relación núcleo-citoplasma. De la tercera, se puede estudiar la función de antígenos específicos, actividad enzimática, viabilidad celular de cultivos de células, estudios de pegado de lecitinas y de hormonas.^{2,3} El propósito de este trabajo es mostrar los hallazgos de la CF en varios tipos de cáncer urológico y discutir la aplicación de este método con relación a factores pronósticos.

Material y Métodos

Se realizó un estudio prospectivo analizando todos los casos con sospecha clínica y/o confirmada por biopsia de neoplasias urogenitales. Las muestras procesadas provenían en su totalidad de tejido fresco. La muestra y selección del material a estudiar fue tomada por alguno de los autores sin utilizar ningún tipo de fijador. Las muestras fueron procesadas en un equipo FACSCalibur (Becton Dickinson, USA) empleando como marcaje propidio yodado para lectura a 580 nm conforme a los parámetros de Shankey y col.⁴ Se registraron lecturas de 1000 a 10,000 células por evento con el programa Modfit LT (Becton Dickinson, USA). El análisis de los histogramas se efectuó con el programa CellFit (Becton Dickinson, USA). En la figura 2a se muestra un histograma de tejido normal. El primer pico del histograma muestra una población de células diploides en la fase G0-G1, el segundo

pico corresponde a una población de células en la fase G2-M. Se definió aneuploidía (Figura 2b) cuando se registró un "hombro" o pico posterior a la fase G0/G1 y se identificó plenamente el pico de la fase G2. Se anota la edad, sexo, antígeno específico de próstata, el diagnóstico histopatológico con grado de diferenciación, tratamiento quirúrgico si se realizó, estadio del tumor y tipo de ploidía. En la estadificación del tumor se utilizó estudios de gammagrafía ósea y tomografía axial computada de abdomen y pelvis. No se analizó el índice de DNA ni la fase-S.

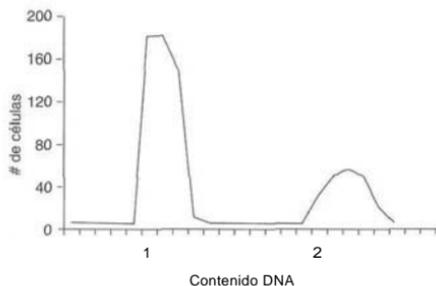


Figura 2a. Diagrama ecnométrico de un análisis de citometría de flujo de un tumor diploide. Se observa un contorno en el pico de contenido de DNA y un segundo pico en 2 que corresponde a la fase S G2 M

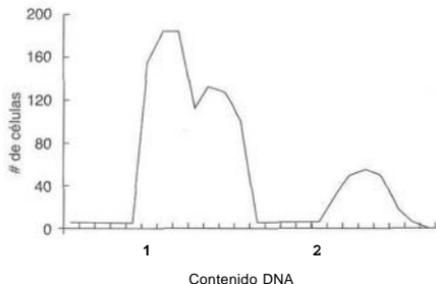


Figura 2b. Diagrama ecnométrico de un análisis de citometría de flujo de un tumor aneuploide. Se observa un contorno en el pico de contenido de DNA y un segundo pico en 2 que corresponde a la fase S G2 M, indicando una población de células aneuploides

Resultados

Se estudiaron 29 pacientes, 25 hombres y 4 mujeres con edad promedio de 65 y 83 años respectivamente. Con cáncer de vejiga (CV) fueron 14 casos en donde predominó el sexo masculino 3:1 respecto al femenino con una edad promedio de 72 años, en todos los casos se realizó resección transuretral de vejiga (RTUV) salvo un caso en donde quedó pendiente de tratamiento por la localización del tumor en pelvis renal, su diagnóstico se realizó con toma de lavado vesical, citología exfoliativa, urografía excretora y TAC. En todos los casos el diagnóstico histopatológico reportó carcinoma de células transicionales (Cuadro I y II). Con cáncer de próstata (CP) fueron 11 casos con una edad promedio de 73 años (Cuadro III y IV). Los resultados de cáncer de riñón (CR) 1 caso, cáncer de testículo (CT) 2 casos y cáncer de pene (CP) 1 caso se muestran simultáneamente (Cuadro V y VI). El estadio de los diferentes tumores están anotados en los respectivos cuadros.

Cuadro I				
Caso	Edad	Sexo	Tratamiento Quirúrgico	Estadio
1	83	F	RTU Vejiga	pT2N0M0
2	72	M	RTU Vejiga	pT3aN0M0
3	64	M	RTU Vejiga	pT3aN0M0
4	82	F	RTU Vejiga	pT1N0M0
5	87	F	RTU Vejiga	pT4N3M3
6	57	M	RTU Vejiga	pT2N0M0
7	54	M	RTU Vejiga	pT3aN0M0
8	81	M	RTU Vejiga	pT2N0M0
9	73	M	RTU Vejiga	pT3bN1M0
10	70	M	RTU Vejiga	pT2N0M0
11	65	M	RTU Vejiga	pT2N0M0
12	92	M	RTU Vejiga	pT1N0M0
13	47	M	RTU Vejiga	pT1N0M0
14	80	M	Pendiente	pT2N0M0

RTU = resección transuretral, p = patología

Cuadro II		
Caso	Patología	Asch Ploidia
1	Carcinoma de células transicionales	2 Aneuploide
2	Carcinoma de células transicionales	2 Diploide
3	Carcinoma de células transicionales	3 Aneuploide
4	Carcinoma de células transicionales	1 Diploide
5	Carcinoma de células transicionales	3 Aneuploide
6	Carcinoma de células transicionales	3 Diploide
7	Carcinoma de células transicionales	2 Aneuploide
8	Carcinoma de células transicionales	3 Aneuploide
9	Carcinoma de células transicionales	3 Aneuploide
10	Carcinoma de células transicionales	2 Diploide
11	Carcinoma de células transicionales	1 Diploide
12	Carcinoma de células transicionales	3 Aneuploide
13	Carcinoma de células transicionales	2 Diploide
14	Carcinoma de células transicionales	2 Diploide

Cuadro III

Caso	Edad	AEP	Tratamiento Quirúrgico	Estado
1	95	11	RTU Próstata	pT1aN0M0
2	65	889	RTU Próstata	pT4N1M0
3	67	7	Prostatectomiaradical	pT2bN0M0
4	83	8	Biopsia por punción	pT1bN0M0
5	62	47	Biopsia por punción	Tx NxMx
6	84	9	RTU Próstata	pT1bN0M0
7	71	150	Prostatectomiaradical	pT2aN0M0
8	70	15	Prostatectomiaradical	pT2aN0M0
9	78	8	RTU Próstata	pT2bN0M0
10	70	9	Prostatectomiaradical	pT2aN0M0
11	63	357	Biopsia por punción	Tx NxMx

AEP= antígeno específico de próstata, Tx, Nx, Mx = estado no determinado, RTU = resección transuretral, p = patología

Cuadro IV

Caso	Patología	Gleason	Ploidía
1	Adenocarcinoma	1+1=2	Aneuploide
2	Adenocarcinoma	4+4=8	Aneuploide
3	Adenocarcinoma	4+3=7	Aneuploide
4	Adenocarcinoma	2+2=4	Aneuploide
5	Adenocarcinoma	?	Aneuploide
6	Adenocarcinoma	1+2=3	Diploide
7	Adenocarcinoma	4+3=7	Aneuploide
8	Adenocarcinoma	2+2=4	Aneuploide
9	Adenocarcinoma	1+1=2	Diploide
10	Adenocarcinoma	3+3=6	Aneuploide
11	Adenocarcinoma	?	Aneuploide

Cuadro V

Caso	Edad	Sexo	Tratamiento Quirúrgico	Estado
Riñón				
1	86	F	Heminefrectomíabilateral Testículo	pT2N0M0
1	36	M	Orquiectomiaradical	pT1N0M0
2	23	M	Ninguno Pene	pT3N4M2
1	82	M	Resección tumoral	TxNxMx

Tx, Nx, Mx = estado no determinado, p = patología

Cuadro VI

Caso	Patología	Ploidía
Riñón		
1	Carcinoma de células claras Testículo	Diploide
1	Seminoma puro tipo clásico	Aneuploide
2	Corioepiteliomay carcinoma embrionario Pene	Aneuploide
1	Carcinoma epidermoide	Aneuploide

Discusión

Las alteraciones cromosómicas pueden resultar en mutaciones en los genes de los protooncogenes y activar los oncogenes o bien de la inactivación de los genes supresores de tumor. La función de estos genes también puede resultar alterada por mutaciones puntuales las cuales se pueden estudiar en fragmentos de DNA amplificadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por anticuerpos.⁵ Los cambios que activan los protooncogenes celulares para convertirse en verdaderos oncogenes resultan de un incremento no regulado de las proteínas o del producto de los genes o de la expresión de una proteína no programada o de mutaciones o deleciones en los dominios reguladores del gen."

La muestra de tejido es muy importante para relacionarla con los hallazgos de la CF. La limitante del tejido fresco es que se puede tomar una porción de tejido sano y su resultado sería diploide. En cambio, la muestra obtenida de tejido embebido en parafina permite que esta muestra de tejido ya se haya analizado por el patólogo y se confirme el diagnóstico histopatológico de neoplasia pudiendo seleccionarla muestra a analizar.

Para el CV, predominó el sexo masculino 3 a 1 respecto al femenino, la edad promedio fue de 72 años. Sobre el grado de diferenciación de Ash y de ploidía, 2 casos fueron de grado 1, ambos diploides, cinco casos de grado 2, tres fueron diploides y dos aneuploide y 6 casos con grado 3, solo uno fue diploide y cinco aneuploides. En el CV, la CF puede subdividirlas neoplasias vesicales en tumores de DNA diploide y DNA aneuploide basado en la presencia y localización de subpoblaciones en el histograma de DNA. Es un consenso que la CF no debe ser utilizada para muestreo poblacional de tumores de vejiga ni para investigar la hematuria microscópica sino exclusivamente en pacientes con tumores identificados. La CF tiene una mayor sensibilidad que la citología exfoliativa en muestras obtenidas de lavado vesical (80 a 85% vs 50%) sin embargo su especificidad es muy baja mas esta puede mejorar en ausencia de procesos inflamatorios como son los cálculos o terapia previa con BCG.⁷⁻¹⁰ La ploidía de tumores de vejiga correlaciona bien con el grado y estado tumoral^{1, 9, 11, 12} siendo su máxima utilidad actual en la estratificación del

grado 2 superficial (Ta, T1, Tis). Con algunas excepciones, la mayoría de tumores grado 1 serán diploides, en tanto la mayoría de grado 3 son aneuploides,¹² nuestros datos muestran resultados similares. La CF también apoya la evaluación de la respuesta al tratamiento. El grupo del Memorial Sloan Kettering Cancer Center demostró en pacientes con grado bajo de cáncer vesical que la recuperación de diploidía posterior a la terapia intravesical con BCG era un factor significativo de respuesta favorable al tratamiento.^{13,14}

En México, el cáncer de próstata ha aumentado en los últimos años rebasando a las muertes ocasionadas por el cáncer broncogénico.^{15,16} La investigación básica sobre la próstata se ha centrado sobre la constitución celular como el patrón glandular, grado de anaplasia, procesos reguladores como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (BFGF), cambios moleculares tanto en la hiperplasia como en el cáncer (gen bcl-2 y el gen p-53), utilización de anticuerpos, antígeno específico de próstata en su relación total con la fracción libre y la posibilidad de desarrollar una terapia agénica.^{16,17,18} Varios de estos estudios tienen como propósito identificar no solo elementos que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad sino también identificar factores pronósticos.

Respecto al CP, el grado de diferenciación celular de Gleason¹⁹ mostró con menos de 5 puntos, 5 casos, uno fue diploide y cuatro aneuploides. Con Gleason de más de cinco, fueron cuatro casos y todos fueron aneuploides. Quizá el aspecto más importante desde el punto de vista clínico sea la detección oportuna del cáncer así como poder determinar la evolución de la enfermedad y su respuesta al tratamiento.

Shockley²⁰ y col., muestran su estudio con 100 casos de adenocarcinoma de próstata tratados con linfadenectomía pélvica bilateral y prostatectomía radical que no existe diferencia estadística cuando se compara el diagnóstico histopatológico, grado de diferenciación de Gleason, grado de ploidía y antígeno específico de próstata. En contraste, Lerner²¹ y col., analizando 904 casos de CP a los que se les realizó prostatectomía radical concluye que el grado de diferenciación de Gleason, el antígeno específico de próstata y la ploidía son factores que pueden orientar sobre cual será el comportamiento del cáncer en función de recidiva y tiempo libre de enfermedad. Esto conduce a que

la relación entre DNA y el grado de diferenciación de Gleason no sea muy clara. Las limitaciones tanto de la CF como del Índice de Gleason (que depende de la observación y experiencia del patólogo) indican que estos criterios no pueden ser usados en forma independiente. Aun así, en otros estudios existe una correlación positiva tanto para el grado de diferenciación celular, estadio del tumor y aneuploidía.^{22,23} Nuestros datos no son concluyentes en este sentido. Para el caso de hiperplasia prostática benigna, esta tiene un componente diploide,²⁴ sin embargo se conoce que un 7 a 13% presentará aneuploidía.²⁵ En vista de que no hubo seguimiento de estos casos aun permanece oculto que papel tiene esta aneuploidía en predecir la aparición o confirmar la presencia de CP.^{25,26}

El caso de riñón que presentamos, se trata de un tumor bilateral en donde se encontró diploidía con un estadio de pT2N0M0. En el carcinoma de células renales, el contenido de aneuploidía en el DNA correlacionó con peor pronóstico comparado con los tumores que fueron diploides.²⁷⁻³⁰ Aproximadamente un tercio de pacientes con CR se presentan ya con enfermedad metastásica al momento del diagnóstico. Para estos casos, la CF dará muy poca o nula información de utilidad clínica. Para estadios entre T1 a T3aN0, la medición de DNA probablemente brinde información útil para predecir a los grupos de pacientes con bajo o alto riesgo de progresión de la enfermedad.^{4,31,32} Sin embargo, en la actualidad sería de muy poca justificación realizar una CF preoperatoria puesto que la información obtenida no debería o no debe de cambiar el criterio del urólogo sobre el esquema actual de tratamiento.

Sobre los tumores testiculares, el seminoma es un tumor frecuente. En una revisión de Nativ y col.,³³ sobre 111 casos, encontró diploidía en un 48% y 52 % fueron aneuploides. Ninguno de los tumores diploides tenía un estadio avanzado al momento del diagnóstico. La progresión del tumor después del tratamiento o muerte relacionada con el tumor solo la observó en tumores aneuploides. Por ello la ploidía celular en tumores testiculares tanto seminomatosos como no seminomatosos brinda un factor pronóstico importante y ayuda a la caracterización de estas neoplasias.^{34,35}

El carcinoma de células escamosas de pene es una neoplasia poco frecuente mas sin embargo es

potencialmente fatal por su malignidad, en particular cuando ya están involucrados los ganglios inguinales. La CF que muestra un patrón diploide apoya aun más la decisión de un tratamiento quirúrgico agresivo con linfadenectomía inguinal en estos casos.³⁶

En general, es aceptado que tumores aneuploides tienen un comportamiento más agresivo dado el grado de diferenciación celular a diferencia de los tumores diploides.³⁷ La determinación de la agresividad potencial de un tumor es un objetivo primordial en la investigación de los marcadores biológicos. Claramente sería de un gran beneficio para la selección del tratamiento si se pudiera distinguir a los tumores que van a responder a una terapéutica determinada de los que no van a responder. De igual manera conocer prematuramente cuales tumores tienen mayor probabilidad de metastatizar de los puramente locales antes de iniciar un tratamiento.³⁸ La genética molecular se ha convertido en la tecnología de vanguardia para la caracterización de los tumores en el humano. Sus avances han sido muy rápidos mostrando su valor en la comprensión de los mecanismos de transformación maligna. Sin duda, en los meses y años próximos su utilidad tendrá un fuerte impacto en la clínica.

Referencias

- Yokogi H, Wada Y, Moriyama-Gonda N, Igawa M, Ishibe T. Genomic heterogeneity in bladder cancer as detected by fluorescence in situ hybridization. *Br J Urol* 1996;78(5):699-703.
- Herman CJ. Cytometric DNA analysis in the management of cancer: clinical and laboratory considerations. *Cancer* 1992;69:1553-1556.
- Ulbright TM. An introduction to newer methods in pathology for the study of urologic tumors. *AUA Update Series, Lesson 22, 1997*:XVI:170-175.
- Shankey TV, Rabonovitch PS, Bagwell B, Bauer KD, Duque RE, Hedley DW, Mayall BH, Wheeless L. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-477.
- Fradet Y. Biological markers of prognosis in invasive bladder cancer. *Semin Oncol* 1990;17(5):533-543.
- Hunter T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991;64:249-270.
- Badalament RA, Fair WR, Whitmore WF Jr. The relative value of cytometry and cytology in the management of bladder cancer. The Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Semin Urol* 1988;6:22-30.
- Konchuba AM, Schellhammer PF, Alexander JP, Wright GL Jr. Flow cytometric study comparing paired bladder washing and voided urine for bladder cancer detection. *Urology* 1989;33:89-96.
- Wheeless LL, Badalament RA, De Vere White RW, Fradet Y, Trukait B. Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer. *Cytometry* 1993;14:478-481.
- Griffiths TR, Mellon JK, Pyle GA, Shenton BK, Neal DE. P53 and ploidy assessed by flow cytometry in bladder washings. *J Urol* 1995;76(5):575-579.
- Gregoire M, Fradet Y, Meyer F, Tetu B, Bois R, Bedard G, Charrois R, Naud A. Diagnostic accuracy of urinary cytology, and deoxyribonucleic acid flow cytometry and cytology on bladder washings during followup for bladder tumors. *J Urol* 1997;157(5):1660-1664.
- Lee SE, Park MS. Prognostic factors for survival in patients with transitional cell carcinoma of the bladder: evaluation by histopathologic grade, pathologic stage and flow-cytometric analysis. *Eur Urol* 1996;29(2):193-198.
- Klein FA, Herr HW, Whitmore WF, Pinsky CM, Oettgen H, Melamed MR. Automated flow cytometry to monitor intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. *Urology* 1961;17:310-314.
- Staino-Coico L, Huffman J, Wolf R, Pinsky CM, Herr HW, Whitmore WF, Oettgen HF, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Monitoring intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment of bladder carcinoma with flow cytometry. *J Urol* 1985;133:786-788.
- Pienta K, Goodson JA, Esper P. Epidemiology of prostate cancer. Molecular and environmental factors. *Urology* 1996;48(5):676-681.
- Figuerola GR, Alpuche ME. Factores pronósticos en cáncer de próstata. *Bol Col Mex Urologia* 1997; XIV:73-80.
- Kleinstrom M, Wester K, Haggman M, Brandstedt S, Busch C. DNA ploidy patterns in androgen-deprived localized prostate cancer. *Urology* 1996;29(4):420-424.
- Solé-Balcells F. Envejecimiento celular y apoptosis. Su relación con la privación androgénica en el cáncer de próstata. *Urol Panamer* 1996;8(2):3-9.
- Gleason DF and the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Histologic grading and clinical and clinical staging of prostatic carcinoma. En Tannenbaum, M. Ed: *Urologic Pathology: The Prostate*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977. p.171.
- Shockley KF, Maatman TJ, Carothers GC, Warzynski MJ. Comparative analysis of prognostic factors in men undergoing radical prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate, including DNA ploidy, surgical tumor stage, prostatic specific antigen. Gleason grade, and age. *Prostate* 1996;29(1):~. 50.
- Lerner SE, Blute ML, Zincke H. Risk factors for progression in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *Semin Urol Oncol* 1996;156:1511
- Esposito PL. Cytological malignancy grading of prostatic carcinoma by transrectal aspiration biopsy. A 5-year

- followup study of 469 hormone treated patients. *Scand J Urol Nephrol* 1971;5:199-209.
23. **Forsslund G, Zetterburg A.** Ploidy level determination in high-grade and low grade malignant variants of prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1990;50:4281-4285.
 24. Lieber MM. DNA ploidy in prostate cancer: potential measurements as a surrogate endpoint biomarker. *J Cell Biochem (Suppl)*; 1994;19:246.
 25. Deitch AD, Strand MA, DeVere WRW. Deoxyribonucleic acid flow cytometry of benign prostatic disease. *J Urol* 1989;142:759-762.
 26. McIntire TL, Murphy WM, Coon JS. The prognostic value of DNA ploidy combined with histologic substaging for incidental carcinoma of the prostate gland. *Am J Clin Pathol* 1988;89:370-374.
 27. Rainwater LM, Hosaka Y, Farrow GM, Lieber MM. Well differentiated clear cell carcinoma: significance of nuclear deoxyribonucleic acid patterns studied by flow cytometry. *J Urol* 1987;137:15-20.
 28. Grignon DJ, Ayala AG, El-Naggar A, Wishnow KI, Ro JY, Swanson DA, McLemore D, Giacco GG, Guinee VF. Renal cell carcinoma. A clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis of 103 cases. *Cancer* 1989;64:2133-2140.
 29. Aizawa S, Susuki M, Kishi T. Chromophobe renal cell carcinoma: report of 41 cases with immunohistochemical, DNA flow cytometric and cytogenetic analysis. *Mod Pathol* 1996;9:69A (abstract).
 30. Ljungberg B, Mehle C, Stenling R, Roos G. Heterogeneity in renal cell carcinoma and its impact on prognosis: a flow cytometric study. *Br J Cancer* 1996;74(1):123-127.
 31. Yokogi H. Flow cytometric quantitation of the proliferation-associated nuclear antigen p105 and DNA content in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 1996;78(4):819-826.
 32. Ruiz-Cerda JL, Hernández M, Gomis F, Vera CD, Kimler BF, O'Connor JE, Jiménez-Cruz F. Value of deoxyribonucleic acid ploidy and nuclear morphometry for prediction of disease progression in renal cell carcinoma. *J Urol* 1996;155(2):459-465.
 33. Nativ O, Winkler HZ, Reiman HR Jr, Earle JD, Lieber MM. Primary testicular seminoma: prognostic significance of nuclear DNA ploidy pattern. *Eur Urol* 1997;31(4):401-404.
 34. Mor Y, Leibovich I, Raviv G, Nass D, Medalia O, Goldwasser B, Nativ O. Testicular seminoma: clinical significance of nuclear deoxyribonucleic acid ploidy pattern as studied by flow cytometry. *J Urol* 1995;154(3):1041-1043.
 35. Susuki M, Hosaka Y, Matsushima H, Mizutani Y, Kawabe K. Nuclear deoxyribonucleic acid ploidy of testicular tumors: peculiar features and clinical significance. *Urol Int* 1996;57(4):203-208.
 36. Hoofnagle RF Jr, Kandzari S, Lamm DL. Deoxyribonucleic acid flow cytometry of squamous cell carcinoma of the penis. *W V Med J* 1996;92(5):271-273.
 37. Adolfsson J. Prognostic value of desoxiribonucleic acid content in prostate cancer: a review of current results. *Int J Cancer* 1994;58:211.
 38. Fradet Y. Molecular and immunologic approaches in the management of bladder cancer. *Uro. Clin North Am* 1991;18(3):551-524.

III. Importancia pronóstica de la medición de ADN en tumores sólidos en ginecología

Sergio Pedraza,* Efraín Vázquez**

Resumen

En el momento actual parece que el contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células tumorales es un indicador significativo del pronóstico de recaída y de la mortalidad debida a varios tipos de cáncer. En el Departamento de Ginecología y Obstetricia y en el Laboratorio clínico del Hospital Español de México se estudiaron en forma prospectiva simple, entre julio de 1995 y abril de 1997, veintitres pacientes con cáncer invasor de la mama y seis pacientes con cáncer ginecológico pélvico, aplicándose la citometría de flujo para la medición en células tumorales del ADN en la fase S y en la estimación de la ploidía de los tumores, según los histogramas correspondientes.

En las pacientes con cáncer de la mama se obtuvo una fase S elevada mayor del 10% y un histograma de aneuploidía en un 47.8%. Se encontró una correlación con el estadio clínico IIA en adelante, con tumores mayores de 3 cm, receptores hormonales para estrógenos y progesterona, siendo ambos positivos en cuatro e irregulares en los demás. En tumores medianamente diferenciados y con ganglios axilares positivos, los demás elementos pronósticos fueron concordantes.

En las pacientes con cáncer ginecológico pélvico, el corto número y la variedad de tumores no permitieron ninguna correlación en nuestro material.

Palabras clave: Cáncer mamario, Pronóstico, Ácido desoxirribonucleico (ADN), Aneuploidía

Summary

The contents of deoxyribonucleic acid (DNA) in tumor cells is currently considered to be a prognostic indicator of either tumor recurrence or mortality due to different types of cancer. In order to obtain some data on this assumption, we studied 23 patients with invasive carcinoma of the breast and six patients with gynecologic cancer of the pelvis. The study was carried out at the Department of Gynecology and Obstetrics and the Clinical Pathology Laboratory of the Hospital Español de México as a simple prospective protocol, from July 1995 through April 1997, samples from the excised tumors were obtained by fine needle aspiration and DNA was measured by flow cytometry, calculating the fractions corresponding to S-phase and to cell ploidy from the corresponding histograms. Our results show that S-phase DNA was above 10% with a histogram of aneuploidy in 47.8% of cases thus studied. Correlation was positive with the size of tumor (over 3 cm) and with its clinical stage (IIA or above), whereas estrogen and progesterone receptors were present unevenly. A good correlation existed between DNA measurements, degree of differentiation and positivity of axillary nodes. The small number of pelvic cancers did show some increase in S-phase DNA, but the small number of cases precludes any conclusion at present.

Key words: Breast cancer, prognosis, deoxyribonucleic acid (DNA), aneuploidy

**Agregado, sección de Oncología, Servicio de Ginecología, Hospital Español de México.

*Jefe del Departamento de Ginecología y Obstetricia Hospital Español México D.F.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Av. Ejército Nacional 613, Col. Granada México 5, D.F. 11520.

Ante la falta de un conocimiento cabal de las causas directas y de las coadyuvantes del cáncer y de su biología, el manejo y control del mismo, así como su pronóstico, han descansado sobre la base de un diagnóstico temprano y un tratamiento radicalmente proporcional al tumor y a la tolerancia del huésped. Recientemente la biología molecular aplicada a la Medicina ha aportado datos de mucha importancia, en los cuales se funda la posibilidad de un rápido avance en estos caminos.

Se han identificado mutaciones que modifican o suprimen la expresividad de genes antitumorales, como el BrCa 1 y el BRCa 2, localizados en los cromosomas 17 y 13 respectivamente,¹ que por la falta de inhibición ponen en libertad de expresión a los oncogenes que favorecen el desarrollo del cáncer mamario y a veces también del ovárico; la relación biológica parece aceptable, pero estas mutaciones se encuentran sólo en el 5% de las pacientes y tienen una tendencia francamente familiar, por lo que su utilidad se restringe sólo al estudio de parientes cercanos. Semejante parece la situación del gene supresor tumoral p53 que está relacionado con tumores mamarios y de otras localizaciones.

Parecidamente, se han encontrado alteraciones en la expresividad de algunos productos receptores elaborados por algunos genes, como el erb-B2, cuya determinación puede ser útil cuando se le encuentra, pero su frecuencia es baja y su correlación clínica incierta aún. La demostración oportuna de estas mutaciones podría prevenir el posible riesgo de tumor antes de que éste aparezca, pero se considera por algunos autores que las derivaciones de esta información podrían ser perjudiciales para la paciente, ya que al estar informada del

peligro potencial podría angustiarse con mucha anticipación y tomar actitudes negativas antes de aparecer de hecho el tumor que, incluso, puede no aparecer nunca.^{6,7}

Entre los elementos hasta ahora empleados para apreciar el pronóstico del probable comportamiento biológico de los cánceres mamarios y uterinos (Cuadro I), son en su mayoría anatómicos y referentes a su extensión, histológicos en cuanto a su morfología, histoquímicos, inmunológicos, y sólo algunos se refieren a las cuantificaciones en sangre de compuestos más o menos específicos del tumor, pero hasta la fecha todos dejan incertidumbres sobre su sensibilidad y especificidad, si bien parecen adecuados cuando se estudian en grupos de pacientes, son difíciles de juzgar en cada una de ellas en lo individual. Parte de estas dificultades debe a la heterogeneidad intrínseca de los cánceres y parte a la problemática en la tecnología de los procedimientos. Las técnicas que se han basado en la expresión tumoral por medio del antígeno carcinoembrionario, alfa fetoproteína, de la gonadotropina coriónica y sus fracciones, etc., han sido inespecíficas, menos confiables de lo que en un principio se pensó, y su uso ha quedado muy limitado para el clínico que tiene que tomar decisiones.

En el tejido tumoral mamario se hacen determinaciones de los receptores a estrógenos y progesterona, que ayudan en el manejo hormonal de los tumores hormonodependientes pero no son positivos en todos los tumores estudiados. Por las anteriores limitaciones, han renacido las esperanzas de conocer la "historia natural del tumor" y su probable comportamiento futuro al hacerse aplicables técnicas de la biología molecular como la

Cuadro I. Factores pronósticos en el cáncer de la mama	
Favorables	Desfavorables
Edad mayor de 50 años	Edad entre 35 y 50 años
Ganglios linfáticos no afectados	Ganglios linfáticos afectados
Tumor pequeño (<1 cm)	Tumor grande (>5 cm)
No hay adherencias a la piel o pared	Si hay adherencias a la piel o pared
Pocas atipias celulares	Muchas atipias celulares
Receptores hormonales positivos	Receptores hormonales negativos
Histológicamente bien diferenciado	Histológicamente más anaplásico
No se demuestran oncogenes	Si se demuestran oncogenes
Bajo índice de aneuploidia	Alto índice de aneuploidia

replicación en cadena por la polimerasa del ARN que permite identificar virus oncogénicos en forma rápida y tratar oportunamente p. ej. las lesiones del cuello uterino. En otras áreas y en este momento, la medición del contenido de ADN en el tejido tumoral mamario por la técnica de citometría de flujo^{8,9,10} ofrece grandes promesas en cuanto a estimar por medio de ella la ploidia o la magnitud y rapidez de la síntesis de ADN en la fase "S" del ciclo de las células tumorales mamarias, como indicio del crecimiento o agresividad del desarrollo de la neoplasia. Los resultados preliminares de esta metodología aplicada en el Hospital Español a tumores mamarios y genitales se señalan a continuación.

Pacientes y métodos

Hasta el momento se han estudiado en el Departamento de Ginecología y Obstetricia y en el Laboratorio Clínico del Hospital Español de México, de julio de 1995 a abril de 1997, en forma prospectiva simple 23 pacientes con carcinoma mamario invasor de diversos tipos histológicos. La edad de las pacientes fluctuó entre 29 y 86 años, con un promedio de 57 años. El estadio clínico de los tumores fue clasificado de acuerdo con lo establecido por la American Joint Commission of Cancer.

En fragmentos del tumor recién extirpado se hizo la selección de material tumoral mediante aspiración con aguja y se sujetó a estudio por medio de la citometría de flujo^{11,12} midiendo la fracción del ácido ribonucleico (ADN) correspondiente a la fase S del ciclo celular y se obtuvo el histograma del ADN en forma individual. Se compararon las cifras obtenidas para encontrar si existe concordancia de la medición de la ploidia y de la fase S del ciclo celular con otros elementos de juicio entre los que clásicamente permiten apreciar el pronóstico de la evolución del tumor.

Resultados

De las 23 pacientes estudiadas con carcinoma mamario, 12 (52.2 %) tenían un histograma de ploidia y una fase S baja (entre 3.2 y 9.3 % con una media de 4.8 %). En las once pacientes restantes

Cuadro II. Citometría de flujo en el cáncer de mama

Resultados preliminares			
MEDIA	%	No PTS	%
Diploides fase S baja	4.8	12	52.2
Diploides fase-S alta	37.8	5	21.7
Aneuploides	12.8	6	26.1

(47.8 %) los histogramas correspondieron a una fase S mayor de 10 % o fueron aneuploides (Cuadro II).

De las once con aneuploidia o fase S elevada, nueve pacientes estaban en un estadio clínico II A o mayor. El grupo de edad más afectado comprende de los 35 a los 65 años.

En la correlación del tamaño del tumor con los datos de la citometría de flujo se vio que tumores mayores de 3 cm. de diámetro, tenían con mayor frecuencia la fase S elevada o aneuploide, lo cual se observó en siete pacientes (63.3 %)

En cuanto al estudio histopatológico, el cáncer más frecuente fue el ductal infiltrante en 16 pacientes, lobulillar infiltrante en seis y sólo en una fue mucinoso. Por lo que respecta a su diferenciación, en los medianamente diferenciados (GI) el histograma de la citometría reveló una fase S elevada o aneuploidia en ocho pacientes.

En el estudio correlativo de los ganglios axilares, de las 11 pacientes con con fase S elevada o aneuploidia, los ganglios axilares fueron negativos a tumor en cuatro, en tanto que los otros siete casos si tuvieron positividad a malignidad.

Se estudiaron receptores hormonales para estrógenos y para progesterona y se encontró que en cuatro casos eran positivos ambos receptores, en tanto que en los otros siete sólo se encontraba presente uno de éstos o ninguno (Cuadro III) .

Cuadro III. Fase elevada o histograma de aneuploidia

	Frecuencia %
Once de veintitres pacientes	47.8
Estadio clínico II A, en adelante	81.8
Grado de DIF. Nuclear, GIL	72.7
Tumor mayor de 3 cm.	63.6
Ganglios axilares negativos	36.3
Ganglios axilares positivos	63.6

Por otra parte se estudiaron seis pacientes con cáncer ginecológico pélvico, dos de ellas con cistoadenocarcinoma del ovario en estadio clínico III B y IV respectivamente, en las que el histograma reveló diploidia en ambos, con fase S de 58.8 % y 8.8 % en forma correspondiente (Máximo normal 10 %); estas dos pacientes fallecieron en el primer año posterior al tratamiento. En dos pacientes con adenocarcinoma del endometrio en estadio I A G II se encontraron histogramas de diploidia y fase S de 17.9 y 21.2 % en cada uno: En un caso de adenocarcinoma del cuello uterino en estadio clínico I B el histograma reveló diploidia y fase S de 14.2 %. En un caso de melanoma de lavagina en estadio II de la FIGO, el histograma fue de aneuploidia y fase S de 75.4 %.

Discusión

La citometría de flujo del ADN se ha usado para apreciar la fracción de las células que se encuentran en diversas fases del ciclo vital celular, derivando elementos de juicio sobre la ploidia de las células tumorales al medir el contenido de ADN del tumor y sobre la actividad proliferativa de las mismas al medir la fracción de ADN correspondiente a la fase S del ciclo celular. Estos elementos, correspondientes a la diferenciación patológica de los núcleos y a la rapidez de multiplicación de las células parece tener una correlación con el pronóstico en cuanto a probabilidad de recaída del tumor y en cuanto a sobrevida de la paciente afectada por cáncer mamario. En estudios de Bruering, Harbeck^{11,12} estos y otros autores concluyen que la fracción de la fase S elevada y la aneuploidia son predictores significativos de recaída de la enferme-

dady de una elevada mortalidad, sin relación con el hecho anatómico de que los ganglios axilares muestren invasión tumoral o no.

En 345 pacientes con cáncer de la mama estudiadas por Clark,⁹ el 32 % tuvieron tumores diploides, y el 68 % fueron aneuploides, con una sobrevida actuarial a 5 años de 88 % en las primeras y de 74 % en las segundas. En nuestro pequeño grupo de pacientes, aún aceptando que no justifica cálculos porcentuales, el 52 % resultaron diploides y el 48 % tenían una fase S elevada o eran aneuploides.

Wenger y cols.¹³ encontraron en 127 000 pacientes estudiadas con cáncer de la mama una correlación entre una fase S elevada y aneuploidia con el estado de los receptores de estrógenos y progesterona, con el número de ganglios linfáticos positivos, el tamaño del tumor y la edad de la paciente.

Hupperets y cols.¹⁴ determinaron el valor pronóstico de la citometría de flujo en 320 pacientes con cáncer mamario que habían sido tratadas por cirugía, quimioterapia adyuvante y administración o no de acetato de medroxiprogesterona y las siguieron por un período de 7 años. La aneuploidia fue el factor de riesgo de peor pronóstico por cuanto al riesgo de presentar metástasis (RR 3.59) y en cuanto a mortalidad más elevada (RR 2.56). La fracción de la fase S por sí misma no resultó de importancia para el pronóstico. Se ha encontrado, en cambio, que la respuesta del tumor a la quimioterapia neoadyuvante estuvo directamente relacionada con la fracción de la fase S en 50 mujeres postmenopáusicas.

En el pequeño grupo de nuestras pacientes estudiadas por cáncer ginecológico pélvico no se puede establecer ningún juicio por su cortedad y heterogeneidad de los tumores.

Cuadro IV. Citometría de flujo en el cáncer ginecológico

Tipo histológico	No.	Edad	Estadio clínico	Diploide fase 8 %	Aneuploide fase 8 %
Cistoadenocarcinoma de ovario	2	70	IIIB	58.8	
		67	IV	8.8	
Adenocarcinoma de endometrio	2	81	IA GII	17.9	
		61	IA GII	21.2	
Adenocarcinoma de cervix	1	41	B	14.2	
Melanoma de vagina	1	64	I		75.4

Referencias

1. Hill JM y cols. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990;250:1684-9.
2. Krontiris T G. Molecular medicine Oncogenes. *N Engl J Med* 1995;333:303-306.
3. Jacquemier J, Eisinger F, Birnbaum D, Sobol H. Histoprognotic grade in BRCA1- associated breast cancer. *Lancet* 1995;345:1503.
4. Langston AA, Malone KE, Thompson JD, Daling JR, Ostrander. BRCA1 mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med* 1996;334:137-42.
5. Collins F S. BRCA1-Lots of mutations, lots of dilemmas. *N Engl J Med* 1996;334:186-8.
6. Olopade OI. Genetics in clinical cancer care. The future is now. *Lancet* 1996;335:1495-6.
7. Green MH. Genetics of breast cancer. *Mayo Clin Proc* 1997;72:54-65.
8. Strang P, Stendahl U, Tribukait B. Prognostic significance of S-phase fraction as measured by DNA flow cytometry in gynecologic malignancies. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:354-364.
9. Clark GM. Applicability of flow cytometry in breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1993;677:379-383.
10. Witzig T E y cols. DNA Ploidy and the percentage of cells in S-phase as prognostic factors for women with lymph node negative breast cancer. *Cancer* 1994;74:1752-61.
11. Bruerier T, y cols. A comparative study of DNA content and proliferation (S-, S+ Ge/M-Phase ,Ki67) measured by flow cytometry and image analysis in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1996;41:253.
12. Harbeck NM, Dettmar P, Thomsen C. S-phase fraction is a stronger prognostic factor in node negative breast cancer than M1B1(Ki67) proliferation rate. *Breast Cancer Res Treat* 1996;41(s):58.
13. Wenger C R y cols. DNA ploidy, S-phase and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;28:9.
14. Hupperter P y cols. The prognostic and predictive value of flow cytometry (FCM) in node positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1996;41:248.

IV. Importancia pronóstica de la medición del ácido Desoxirribonucleico en neoplasias malignas

Jaime G. de la Garza-Salazar.* Guillermo Flores-Flores.** Paula Juárez-Sánchez***

Introducción

El manejo convencional de los pacientes diagnosticados con cáncer, es multifactorial y depende de varias características entre las que se encuentran el sitio del primario del tumor, los órganos blanco de la diseminación metastásica y la estirpe histológica. La extensión de la enfermedad en el organismo se puede estimar utilizando la clasificación conocida como TNM (T= tumor; N= Ganglios-nodes-; M= Metástasis) recomendada por la UICC, y es de vital importancia para la toma de una decisión terapéutica adecuada. La cirugía, es tradicionalmente utilizada como el mejor método para erradicar la enfermedad cuando esta localizada, y es muy

importante para reducir volumen tumoral en aquellos pacientes con enfermedad localmente avanzada o en aquellos casos en los que es recomendable reducir la masa tumoral y siempre necesaria para obtener tejido a través de la biopsia para proporcionar suficiente material al patólogo, para hacer el diagnóstico histopatológico y definir otros factores de importancia pronóstica (mitosis, ploidia, grado de diferenciación, porcentaje de necrosis, etc.)

La radioterapia, es el método ideal para el manejo de pacientes diagnosticados con cáncer localizado en determinadas regiones anatómicas (Ca Cu), o alternativamente en tumores con gran sensibilidad a este procedimiento (seminoma) proporcionando porcentajes de curación en un buen número de

* Director General, Instituto Nacional de Cancerología-México.

**Jefe Depto. A. Post-Mort., Instituto Nacional de Cancerología-México.

*** Instituto Nacional de Cancerología-México, Av. San Fernando No 22, Tlalpan 14000, México, D.F.

tumores malignos; o también repuestas terapéuticas en situaciones de urgencia como cuando se encuentra comprometido el acceso quirúrgico como el mediastino en pacientes con síndrome de vena cava. Quizá su mayor utilización se relacione con la enfermedad diseminada, con fines paliativos (lesiones óseas y cerebrales) y de manera importante para control del dolor.

Finalmente, el manejo sistémico que conocemos como la quimioterapia, incluye el uso de agentes farmacéuticos con actividad citotóxica o citocida.

La quimioterapia, ocupa un lugar muy importante junto con la cirugía y la radioterapia como tratamiento primario (neoadyuvante) o, como tratamiento adyuvante, como tratamiento único con fines curativos en entidades como coriocarcinoma uterino, disgerminoma, tumores germinales del testículo, leucemias agudas, enfermedad de Hodgkin, etc., etc. La función de la quimioterapia se encuentra fuertemente ligada a funciones celulares como metabolismo y reproducción, debido a que son algunos de los mecanismos que más frecuentemente se pretende bloquear con estas drogas.

En esta revisión, nos vamos a referir a la importancia que tiene la medición del ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células de las neoplasias malignas con fines terapéuticos y además pronósticos. Principalmente como se sabe debido a que el ADN se constituye por un lado en el rector del comportamiento tumoral y como consecuencia en un excelente blanco terapéutico con la finalidad de tratar a las neoplasias malignas con intento curativo.

Hacer una semejanza de lo que ha sido la evolución de la quimioterapia antineoplásica es de gran importancia para entender la importancia de la Citometría de flujo en relación con el conocimiento de las alteraciones cromosómicas y, del ciclo celular sobre todo de la fracción "S" conocida como la fase más importante en la síntesis de proteínas indispensables en la reproducción celular.

La era moderna de la quimioterapia se inicia durante la 2a. Guerra Mundial, en particular con los gases de mostaza con actividad alquilante muy elevada y por lo tanto marcada citotoxicidad tisular; este hecho se acompañó solo de observaciones clínicas tanto de la respuesta en padecimiento hematológicos malignos como en la toxicidad de consecuencias mortales, esto, condujo a programas para el diseño de nuevos agentes alquilantes

con similitud en la efectividad de la Mostaza Nitrogenada pero, con una menor toxicidad y, así aparecen el TEM, la ciclofosfamida, el leuceran, etc. Todavía más relevante, la introducción de la quimioterapia ha facilitado grandemente la introducción de clasificaciones clinicopatológicas de los tumores, debido a que permite identificar en base a la respuesta al tratamiento, a los tumores de "buen pronóstico" y de "mal pronóstico".

Los trabajos de Watson, Crick y Wilkins iniciados en 1951 en Inglaterra que llevaron al conocimiento de la estructura espacial de doble hélice del ADN les hizo acreedores del Premio Nobel en 1962. Este hallazgo, marcó en forma definitiva el camino para conocer en forma precisa los mecanismos de acción de la mayoría de los agentes antineoplásicos y hacer su clasificación de acuerdo al sitio de acción en el ADN y el ciclo celular como: Agentes alcaloides vegetales, Agentes alquilantes, antimetabólitos, antibióticos, enzimas, hormonas, etc.

En la actualidad, es bien conocido el hecho de que la combinación razonada de estos agentes brindan mejores respuestas con un mayor potencial curativo en un número importante de neoplasias malignas y, aún más, estos resultados aumentan cuando se emplean en forma multidisciplinaria con la cirugía y la radioterapia.

Esta acción de los agentes antineoplásicos depende de su capacidad para inducir ya sea en forma directa o, indirecta daño letal al ADN de la célula neoplásica, o incluso alteraciones en cuanto a la función replicadora del mismo.

En la última década, para los biólogos, para los clínicos el interés sobre el cáncer se ha enfocado en el conocimiento a nivel molecular, bioquímico, cromosómico o, celular de las características del ADN, especialmente porque se han desarrollado procedimientos que permiten manipular, identificar y cuantificar esta estructura en las células normales y neoplásicas. En términos de las alteraciones de la homeostasis y del microambiente que acompañan al crecimiento tumoral estas resultan en el crecimiento y división celular descontrolada que conduce a la tan aclamada suposición de inmortalidad celular que caracteriza a la célula maligna. Los avances en esta área son relevantes, emocionantes y con potencial profético; al entender no solo la etiología del cáncer, sino también la participación de estructuras como los oncogenes, los factores

de crecimiento tumoral, la apoptosis y los marcadores cromosómicos de la enfermedad entre otros, que proporciona elementos para entender el desarrollo y comportamiento de las células malignas.

En el campo de la clínica ha surgido el interés en utilizar cada vez con mayor frecuencia la Citometría de flujo como una herramienta clínica para los oncólogos e inmunólogos, el substrato para efectuar esta prueba puede ser la sangre en el caso de las leucemia y tejido tumoral (preparado como una suspensión de células o partículas biológicas) a través de una aguja de diámetro pequeño en un torrente de flujo rápido de diámetro mayor. Esta muestra inyectada, fuerza a formar un haz central (foco hidrodinámico) de un diámetro muy similar al de la célula o, partícula que se analiza, esto, elimina la posibilidad de agrupamientos asegurando que las células o partículas que pasan por el sitio de análisis sean expuestas en forma individual al haz de luz excitador.

En nuestro Instituto Nacional de Cancerología, este método de Citometría de Flujo ha sido utilizado básicamente en dos situaciones: Determinaciones cuantitativas de subpoblaciones de células T (CD4/CD8) en pacientes con SIDA y, en casos de pacientes con leucemia, se lleva al cabo análisis inmunofenotípico con el objeto de determinar e linaje mieloide contra linfoide, en especial cuando los blastos están poco diferenciados y resulta difícil realizar con los criterios habituales una interpretación adecuada (Cuadros I, II, III).

Cuadro I. Cariotipo

Alteración genética		
LAL no linfocítica	-	50-100%
LAL	-	60%

Cuadro II. Valor pronóstico cariotipo hematología

Enfermedad	Alteraciones Cromosómicas	Implicaciones Pronósticas
LAL		
L1	Hiperploidia	Bueno
L2	t (9:22)	Malo
-	t (4:11)	Malo (fem)
-	t (1:13)	Malo
L3	t (8:14)	Malo

Cuadro III. Valor pronóstico cariotipo hematología

Enfermedad	Alteraciones Cromosómicas	Implicaciones Pronósticas
Leucemia Mieloide Aguda		
M1	Alteraciones Múltiples	Malo
M2	t (8:22)	Bueno (RC)
M3	t (15:17)	Sin valor pronóstico
M4	in (16)	Malo (Basofilia)
M5	t (9:11)	Sin valor pronóstico

En tumores sólidos, el método de Citometría de flujo con respecto a la medición del ADN y la fracción S en el ciclo celular no ha sido empleado en forma rutinaria para conocer el comportamiento de determinado tumor y ser un método selectivo para el uso de un esquema de quimioterapia específico ni como factor predictivo, sin embargo, me referiré a lo que se ha publicado.

Las células del organismo pueden clasificarse en función a su contenido de ADN en: Euploides o diploides cuando tienen un contenido normal de ADN; Aneuploides si el contenido de ADN no es el habitual; Tetraploides cuando las células poseen cuatro veces la cantidad normal de ADN (se observan en la fase G2 del ciclo celular); células con contenido intermedio de ADN, corresponden a células en fase S y, las células Haploides cuando poseen la mitad del ADN habitual (típico de las células germinales). Cuadro IV.

Cuadro IV. Contenido ADN celular

Euploides	}	Normal
Diploides		
Aneuploides-Anormal		
Tetraploides	}	Doble cantidad FASE G2
Contenido intermedio ADN.		
Fases haploides: Mitad ADN. (Células germinales)		

Con la Citometría de flujo es posible estudiar el contenido de ADN de las células tumorales, con estas técnicas se ha demostrado que el 60% de los tumores son aneuploides y, que el grado de aneuploidia se relaciona con el de diferenciación celular, así, por ejemplo, en el cáncer de la glándula mamaria con ganglios negativos, el grado de aneuploidia es útil para

predecir la posibilidad de recurrencia. En cáncer de colon, vejiga y de próstata se relaciona con el estadio clínico, a mayor volumen tumoral mayor aneuploidia y mayor agresividad tumoral.

En la clínica, tenemos factores pronóstico que incluyen: síntomas, tiempo de evolución, edad, estado inmunológico, estado sociológico y, el estado general del paciente (Karnofsky), a la histología del tumor también puede ofrecer información por medio de factores pronósticos que incluyen histogenesis, el grado de diferenciación, el número de mitosis por campo, porcentaje de necrosis, presencia de tumor en los espacios vasculares y linfáticos y la capacidad invasiva de la neoplasia, además de los marcadores tumorales de membrana (Cuadros V y VI), receptores hormonales y los marcadores de superficie en la serie mioide y linfoide, y desde luego es muy importante el contenido de ADN. Conocemos de acuerdo a la experiencia, que aquellos tumores bien diferenciados tienen un curso indolente, lo contrario sucede con los tumores poco diferenciados que suelen ser muy agresivos, tienen un incremento en el número de mitosis y, son invasivos, estos factores tienen un valor predictivo en relación a la sobrevida global, intervalo libre de enfermedad, probabilidad de respuesta al tratamiento, posibilidad de complicaciones, respuesta completa inicial a la quimioterapia, etc.

La Citometría de flujo, mide la ploidia y la fracción S del ciclo celular y por consiguiente predice en la mayoría de los casos la recurrencia, metástasis y sobrevida. Por consiguiente, el valor de elaborar

una estrategia dirigida en función a la quimioterapia adyuvante, un aumento en la células que sintetizan ADN reflejan mayor agresividad tumoral así como un mayor potencial metastásico.

Es bien conocido que la aneuploidia y, el aumento de la fracción S del ciclo celular son factores pronósticos graves en pacientes con cáncer de mama, pulmón, ovario, colon, próstata y vejiga.

En pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos en el CTCR de San Antonio Tx en 345 muestras se demostró que la sobrevida a 5 años fue del 88% en tumores diploides y, del 74% en tumores aneuploides. Cuando la diploidia se asocia a un aumento de la fracción S, la sobrevida fue del 70% y aquellas pacientes con tumores diploides y con una disminución de la fracción S, la sobrevida a 5 años aumento al mas del 90%. Además se ha demostrado que las células de tumores con aumento en el ADN y fracción S responden mejor a la quimioterapia, esto es indicativo que pacientes con las características señaladas aún con ganglios negativos deben recibir quimioterapia adyuvante.

En pacientes con cáncer de pulmón, se ha demostrado que es importante conocer el contenido del ADN y la fase S. Estudios en este sentido, sugieren que la ploidia proporciona un pronóstico independiente en pacientes con cáncer del pulmón de células pequeñas ECI que debe ser considerado para planear un tratamiento y reportan el 83% de sobrevida a 5 años en pacientes con tumores con células diploides a diferencia de solo el 39% para los tumores con células aneuploides.

En enfermos con cáncer de pulmón de células no pequeñas, la histología no contribuye en nada respecto a la terapéutica o la sobrevida. La citometría de flujo es útil en pacientes con tumores epidenoides que presentan diploidia, tienen a 5 años un porcentaje del 70% a diferencia de los adenocarcinomas de solo el 32%. En cáncer de cabeza y cuello tratados con cirugía radical y ganglios negativos de gran valor predictivo en recurrencias locales de aquellos tumores con aneuploidia y aumento de la fracción S del ciclo celular.

Conclusiones

La revisión de la literatura reciente, demuestra que existen aun áreas que deben seguir investigándose en relación al valor predictivo que tiene el conocimiento de la ploidia y la fracción S del ciclo celular con la técnica de Citometría de Flujo.

Cuadro V. Factores pronósticos valor, diagnóstico y seguimiento

Tumor	Marcador	Valor	importancia pronóstica
T. Germinales	LDH	++	+
	BHCG	+++	+++
	AFP	+++	+++
Coriocarcinoma	BHCG	+++	+++
Próstata	AEP	+++	+++
Ovario	Ca. 125	+++	++

Cuadro VI. Factores pronósticos valor, diagnóstico y seguimiento

Tumor	Marcador	Valor	Importancia pronóstica
Mama	CEA	+	
	CA 153	++	
	CEA	+++	+
Páncreas	CA 19.9	++	
	CA 19.9	+++	

En pacientes con cáncer de mama y ganglios negativos, cáncer de cabeza y cuello y ganglios negativos, en pacientes con cáncer de pulmón, próstata y vejiga se ha demostrado que sin lugar a dudas el conocimiento de la ploidez y la fracción S del ciclo celular son determinantes para conocer el futuro de la evolución del tumor y, aún más importante implementar una estrategia terapéutica dirigida.

De acuerdo con esto la medición del ADN en oncología contribuye a estimar el comportamiento de los tumores con gran precisión, se consolida como un buen adyuvante clínico y la estimación de la fase del procesamiento celular del mismo permite estimar las posibilidades de éxito terapéutico identificando especialmente la fase S del ciclo celular.

Referencias

1. **Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounsg, Oldaker T, McGuire WL.** Prediction of reapseor survival in patients with node-negative breast cancer by DNA flow cytometry. N. Engl. J. Med. 1989.
2. Sahin AA, Ro JY, et al. Flow cytometric analysis of the DNA content of non-small cell lung cancer. Cancer 1990;65:530-537.
3. Isobe H, **Miyamoto H.** et al. Prognostic and therapeutic significance of the flow cytometric nuclear DNA content in NSCLC. Cancer 1990;65:1391-1395.
4. Alam SM, **Whitford P,** Cushley W, George D, Campbell AM. Aneuploid subpopulations in tumor invaded lymph nodes from breast cancer. Eur J Cancer 1992;28(2/3):357-362.
5. **Gonzalez Barón M, Ordoñez A, García Paredes ML, Felin J, Zamora P.** Oncología Clínica. Interamericana McGraw-Hill 1992.
6. Bogh LD, Duling TA. Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. Cl. Lab. Science. 1993;6(3).
7. Crissman HA, **Hirons GT.** Staining of DNA in live and fixed cells. Methods Cell Biology 1994;41.
8. Zackon IL, Goolby CL. Guía clínica para la citometría de flujo. Contemporary oncology (de. Mex.)1995;1(2):29-40.
9. Weiss GR. Oncología Clínica (libro) Manual Moderno, 1997.