

DETERMINACIÓN DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN PÓLIPOS ADENOMATOSOS DE COLON USANDO DIFERENTES MODELOS DE ANÁLISIS DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR. ESTUDIO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Castillo, Juan Luis^{1,4}, Kawaguchi, Fernando^{2,4,5,6}, Madariaga, Jaime^{1,4}, Castillo, Marcelo¹, Venegas, Oscar^{3,4}, Misael, Ocares⁷, Lynch, Oscar⁸, Ríos, Luis^{5,6}, Sawada, Valeria⁹

(1) Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. (2) Departamento de Medicina Interna, Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. (3) Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. (4) Centro de Diagnóstico Oncoinmunológico Limitada. (5) Unidad de Endosonografía Digestiva, Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción. (6) Centro de estudios e investigaciones biomédicas Bioarrayanes. (7) Unidad de Cirugía, Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción. (8) Unidad de Pensionado, Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción. (9) Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción.

49

Introducción: Lesiones epiteliales adenomatosas planas y pólipoides progresarían a cáncer de colon, según la secuencia adenoma-displasia-carcinoma. La probabilidad de sobrevida, dependerá de una detección precoz, lo avanzado del tumor y de un tratamiento oportuno. El objetivo de este estudio es evaluar la ploidía de ADN y las fases del ciclo celular, en mucosa colónica normal y en pólipos adenomatosos de colon, mediante citometría flujo y usando distintos modelos matemáticos de análisis de fase S.

Materiales y métodos: Se estudian, mediante colonoscopia, 32 pacientes del policlínico de gastroenterología del Hospital Guillermo Grant Benavente, Concepción. Se estableció un grupo de referencia de 15 pacientes. Se estudian 23 muestras de pólipos adenomatosos de colon de 17 pacientes. Usando citometría de flujo, se calculan las fases del ciclo celular usando distintos modelos matemáticos de análisis de fase S.

Resultados: En grupo de referencia el rango de fase S fue de 0.25-6.68% y de 0.33-11.03% para el modelo rectangular y trapezoidal, respectivamente ($p < 0.05$). En el grupo de adenomas, analizados con el modelo rectangular y trapezoidal, se identifica componente tetraploide ($G2M > 6\%$), en 15 y 12 muestras, respectivamente. Se obtienen diferencias estadísticamente significativas para las fases $G0G1$, fase S y fracción proliferativa ($p < 0.05$), al usar distintos modelos.

Discusión: Se definen rangos de referencia, en tejido fresco, en mucosa colónica normal para las fases de ciclo celular. Un aumento de la proliferación celular, y la presencia de un componente tetraploide ($G2M > 6\%$) se traducirá en aumento tamaño del adenoma (micro vascularización incluida), riesgo de malignización y compromiso loco regional. Se concluye que utilizar diferentes modelos matemáticos para analizar la fase S, entrega diferencias estadísticamente significativas para Fase S y fracción proliferativa ($p < 0.05$). (REVLAB 2008; 2: 49-57).

Introduction: Flat and polypoid adenomatous epithelial lesions would progress to colon cancer, according to the sequence adenoma-dysplasia-carcinoma. The probability of survival depends on early detection, tumor progression and early treatment. The aim of this study was to evaluate DNA ploidy and the cell cycle phases in normal colonic mucosa and colon adenomatous polyps using flow cytometry and different mathematical models of S-phase analysis.

Materials and methods: By colonoscopy were studied 32 patients from the gastroenterology clinic of the Guillermo Grant Benavente Hospital, Concepción. A reference group of 15 patients and 23 samples from 17 patients were studied by flow cytometry, calculating the cell cycle phases using different mathematical models for S phase analysis.

Results: In reference group S-phase range were of 0.25-6.68% and 0.33-11.03% for the rectangular and trapezoidal model, respectively ($p < 0.05$). In the group of

adenomas, analyzed using the rectangular and trapezoidal model, a tetraploid component ($G2M > 6\%$) were identified at 15 and 12 samples, respectively. Using different models we obtain differences statistically significant for $G0G1$ phase, S phase and proliferative fraction ($p < 0.05$).

Discussion: in fresh tissue, reference ranges are defined for normal colonic mucosa cell cycle phases. An increase in cell proliferation, and the presence of tetraploid component ($G2M > 6\%$) would result in size increase of adenoma (micro vasculature included), risk of malignancy and local and distance compromise. It is concluded that use different mathematical models to analyze S phase delivery differences statistically significant for S phase fraction and proliferative ($p < 0.05$). (REVLAB 2008; 2: 49-57).

Palabras clave: pólipos adenomatosos colon, cáncer, fase s, $G2M$, citometría de flujo.

Key Words: adenomatous colon polyps, cáncer, S phase, $G2M$, flow cytometry.

Correspondencia a: T.M. MsC Juan L. Castillo N. Departamento de Especialidades Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Concepción. Casilla 160-C, Concepción. Email: jucastillo@udec.cl



Introducción

La Enfermedad Neoplásica del Colon incluye lesiones epiteliales adenomatosas planas y pólipoides, ya que prácticamente todos los cánceres de colon comienzan como lesiones adenomatosas, de acuerdo a la progresión de la secuencia adenoma-displasia-carcinoma, la que ocurre por acumulación de cambios genéticos y ambientales (1). La mayoría de los cánceres de colon son adenocarcinomas, siendo los 2/3 de ubicación rectosigmoidea y 1/3 se ubica en el resto del colon (1).

En un sentido amplio, se denomina pólipo a todo tumor localizado que protruye desde la pared a la luz intestinal, independientemente de su estructura histológica. El término Poliposis o Enfermedad Poliposa del Colon se aplica al estado de aparición de múltiples pólipos en el colon (2).

Los pólipos de Colón son masas circunscritas de tejido, nacidas de la mucosa, que se proyectan hacia el lumen intestinal. Las lesiones no protruyentes, planas y deprimidas forman parte de las lesiones superficiales del colon. Así, las lesiones superficiales del colon son aquellas surgidas de la mucosa que se extienden hasta las submucosa.

Macroscópicamente, las lesiones superficiales del colon son elevadas si miden más de 2.5 mm (0-I), no protruidas ni excavadas (0-II), y deprimidas (0-III) si la depresión es mayor a 2.5 mm. Las lesiones elevadas (0-I) con pedículo, se llamarán pediculadas (0-Ip), si no se les denominará sésiles (0-Is) (2).

Los pólipos pueden ser únicos o múltiples y asentar en cualquier parte del colon. Según la superficie de fijación, se dividen en sésiles y pediculados y según su potencial de malignización, se pueden clasificar en neoplásicos y no neoplásicos. Los de tipo Neoplásico, a su vez se dividen en Benignos (Adenomatosos, Intermedios y vellosos) y Malignos (adenomas con carcinoma *in situ*). Por otro lado los pólipos de tipo no neoplásico se pueden clasificar en Mucosos, Hiperplásicos, Inflamatorios y Hamartomatosos (2,3,4).

En relación a los pólipos neoplásicos del tipo adenomatoso, estos son tumores epiteliales esencialmente benignos, pero con potencial de malignización, según la secuencia pólipo-cáncer, lo que sería el origen de los cánceres de colon. Histológicamente se distinguen tres tipos (2,3,4) (i) Tubulares, de pequeño tamaño (> 1 cm) y escasa probabilidad de malignización (5%). (ii) Tubulovellosos o intermedios, menos frecuentemente, pero de tamaño y con una mayor probabilidad de malignización (22%). (iii) Vellosos, que son los más infrecuentes y alcanzan tamaños superiores a los 2 cms, sufriendo malignización en el 40 %.

En occidente, las alteraciones mucosas y celulares son denominadas displasia o adenomas, si surgen de lesión plana o protruida, siendo el grado de las alteraciones graduadas en bajo y alto grado. Estas definiciones han causado las mayores diferencias entre oriente y occidente, por ello el consenso de Viena, propuso

reemplazar los términos adenoma y displasia, por el de neoplasia intraepitelial (NIE), independiente de la altura de la lesión (2).

En el término displasia de alto grado, se incluye los conceptos de las antiguas clasificaciones (carcinoma *in situ*, intramucoso o focal), denominaciones que debieran desaparecer, en favor de NIE de alto grado, para evitar tratamientos excesivos o confusiones, reservando término de carcinoma sólo para la lesiones invasoras (5).

Las NIE de alto grado y los carcinomas invasores (más allá de la *muscularis mucosae*) son el 7 y 3%, respectivamente, siendo su potencial metastático a su a los ganglios regionales mayor a medida que se acercan a la capa muscular propia. Así se ha dividido la submucosa en tres tercios siendo sm1 el más próximo a la muscular de la mucosa y sm3 el más cercano a la muscular propia. Esto es importante porque el riesgo real de metástasis es 1%, 6% y 14% ciento cuando la lesiones comprometen es sm1, sm2 y sm3, respectivamente. El potencial maligno se incrementa a medida que la lesión crece en extensión y profundidad, siendo los mayores de 1 cm las que tienen mayor proporción de componentes vellosos y displasia de alto grado. Se piensa que al crecer la proliferación monoclonal acumula mayor cantidad alteraciones genéticas y cromosómicas, determinando un comportamiento más agresivo (2,5).

En relación a la probabilidad de sobrevida, ésta dependerá de lo avanzado que esté el tumor, y de un tratamiento oportuno. La detección precoz se dirige a lesiones preneoplásicas, a cáncer incipiente (Clasificación Japonesa) y a los avanzados (tipo A de la clasificación Dukes). En las lesiones preneoplásicas o incipientes bastará un tratamiento endoscópico, pero en los cánceres avanzados la cirugía puede ser curativa en el 85 %. En general, el cáncer colorectal es oligosintomático manifestándose tardíamente, lo que plantea una búsqueda en sujetos asintomáticos (estudios de masas o de screening) o con antecedentes de lesiones preneoplásicas (2,5).

Sobre 95% de los tumores colorectales son adenocarcinomas. Pueden presentar distintos grados de diferenciación celular, desde bien diferenciados hasta indiferenciados, con o sin producción de mucina (un elemento de mal pronóstico es la aparición de diferenciación mucinosa y células en anillo de sello). La ploidía de ADN y las fases de ciclo celular se pueden objetivar la citometría de flujo.

La Citometría de Flujo es una tecnología que permite medir los más diversos parámetros celulares como antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membrana y pH entre otros (6,7), con la ventaja de evaluar un gran número de células, en forma individual y en un período muy corto de tiempo. Utilizando flourocromos intercalantes de ácidos nucleicos, capaces de unirse en forma estequiométrica al ADN y ARN de las células (Yoduro de Propidio (PI), Bromuro de Etidio, naranja de acridina,

DAPI, etc.), es posible evaluar el contenido de ADN y las diferentes fases del ciclo celular dentro de una población celular (6,7). La determinación de ploidía de ADN y ciclo celular por citometría de flujo, se ha realizado por más de dos décadas, demostrando que cambios en el contenido de ADN celular se presentan comúnmente en diversos tipos de cáncer (6,7,8,9).

Las células marcadas con un fluorocromo, que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos, emiten fluorescencia proporcional al contenido global de ADN. De esta manera se produce un patrón característico que refleja las fases del ciclo celular dentro de la población de células en estudio (6,7,8,9). La fluorescencia medida en las células en fase de reposo (G0) y en fase de presíntesis de ADN (G1), produce un pico con distribución normal (7,10). Las células que se encuentran en G2 (con su ADN duplicado con respecto a las células en G1), también producen un pico distribuido como una normal, pero con el doble de intensidad de fluorescencia (el fluorocromo se une en forma estequiométrica al ADN). Entre estas dos curvas, se encuentra representada, también por una curva (pero de distribución más ancha) las células que están en fase S. Los mismos factores que afectan la amplitud de los picos G0G1 y G2M, también afectan la amplitud de la fase S, por lo que en un histograma de ADN, las células que inician la fase S se superponen con las células G1, como también lo hacen las células al final de la fase S con las células en G2 (7,10,11). El término coeficiente de variación (CV) describe la amplitud o ancho de la curva ($CV = 100 \times SD / \text{media del pico}$) (7,10,11).

Las células normales tienen un ADN diploide, es decir tienen un número $2n$ de cromosomas. Un ADN aneuploide refleja cambios en el contenido total de ADN (no necesariamente un número anormal de cromosomas) y característicos de células tumorales (7). El índice de ADN corresponde a la razón entre el contenido de ADN de la población celular en estudio con respecto a células normales o células control y es la forma de expresar el contenido de ADN de una población celular (7,8). Si bien se han descrito innumerables estudios que relacionan la ploidía de ADN como factor pronóstico en diversas neoplasias (7,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21), El mayor obstáculo para una amplia aplicación clínica de las mediciones del contenido de ADN, ha sido la falta de concordancia entre diversos estudios (7,9,11), existiendo diferencias en la técnica utilizada en la preparación de los diversos tipos de tejidos analizados, la fuente de luz de los citómetros (tipo de láser), el número de núcleos o células a medir, y en los métodos de análisis e interpretación de los histogramas de ADN (7,12,13,21,22), diversos aspectos que ya hemos analizado detalladamente en una revisión anterior (7).

El objetivo de este estudio es evaluar la cantidad de ADN y las fases del ciclo celular tanto en mucosa colónica normal como en pólipos adenomatosos de colon y el impacto del uso de dos modelos matemáticos distintos para estimación de la fase del ciclo celular.

Materiales y métodos

Pacientes: Se estudió un total de 32 pacientes se provenientes del policlínico de gastroenterología del Hospital Guillermo Grant Benavente sometidos a endoscopia digestiva baja. Cada uno de los pacientes, autorizó mediante consentimiento informado la inclusión en este estudio. Se estableció un grupo de referencia correspondiente a 15 pacientes sin alteraciones endoscópicas a los cuales se les tomó una muestra de mucosa colónica normal de 2 x 2 mm, usando una pinza de biopsia de 2 mm. Además se estudiaron 23 muestras correspondientes a pólipos adenomatosos de colon provenientes de 17 pacientes con pólipos de colon, muestras obtenidas mediante procedimiento colonoscópico usando una pinza de biopsia de 2 mm o bien mediante cirugía endoscópica del pólipo usando asa de polipectomía. Una porción de las muestras se destinó a estudio histológico.

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Citometría de Flujo del Centro de Diagnóstico Oncoinmunológico Limitada. El tejido se disgregó en forma mecánica. La suspensión final fue lavada dos veces con buffer fosfato salino (PBS), para luego ser inmersa en un buffer de tinción (RNAsa 1 mg/ml, Triton X-100 al 0.1 % y propidium iodado 50 ug/ml en PBS) por 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, posterior a lo cual se mantuvieron a 4 °C en oscuridad hasta el momento de ser adquiridas en Citómetro de Flujo FACSCalibur (BD) utilizando software CellQuest v3.3, con un mínimo de 20.000 eventos celulares previa calibración del equipo en lo que se refiere a linealidad y resolución usando núcleos de eritrocitos de pollo (CEN) y núcleos de timocitos de carnero (CTN) (DNA-QC, BD), optimizando la señal de FL2-A con células mononucleares de sangre periférica mediante separación en gradiente de densidad. El análisis se efectuó con software ModFit LT 2.0, seleccionándose una región de análisis en función de FL2-A v/s FL2-W para eliminar debris y agregados. Se modela fase S en forma rectangular o trapezoidal con tres compartimentos sin debris ni agregados. Los resultados son expresados como porcentaje de las diferentes fases del ciclo celular, además se calcula índice de ADN. Para el cálculo de la fracción de proliferación celular (FP) se consideró Fase S + G2M. (7) El análisis estadístico se efectuó mediante t student con una significación estadística de $p < 0.05$, utilizando el programa de análisis de Open Office 3.0.

Resultados

En la **Tabla 1** se muestran los resultados de la fase del ciclo celular del grupo de referencia modelando la fase S tanto en forma rectangular como trapezoidal con tres compartimentos, siendo el rango de fase S de 0.25% a 6.68% para modelo rectangular y de 0.33% a 11.03 % para el modelo trapezoidal. Las diferencias en el valor de fase S entre ambos grupos son estadísticamente significativas ($p < 0.05$), lo cual concuerda con los conceptos que ya hemos planteado previamente (7).

El resumen de los resultados de la fase del ciclo celular y ploidía de ADN para las 21 muestras de pólipos adenomatosos de colon se muestran en la **Tabla 2**. De éstas muestras, 10 correspondían a pacientes del sexo femenino con un rango de edad de 45 a 86 años con un promedio de 60.5 años y 13 correspondían a pacientes del sexo masculino con un rango de edad de 36 a 80 años con un promedio de 58.8 años.

Tabla 1: Resumen de los resultados de las fases del ciclo celular en mucosa colónica normal correspondiente al grupo de referencia. Fase S modelada en forma rectangular con tres compartimentos y en forma trapezoidal contra compartimentos. $p < 0.05$.

n = 15	G0G1 (%)	G2M (%)	Fase S (%)	FP
Modelo Rectangular con trescompartimentos				
Media	90.75	5.42	3.84	9.26
Rango	84.61 - 99.27	0.48 - 9.32	0.25 - 6.68	0.73 - 15.39
DS	3.79	2.00	2.08	3.79
Modelo Trapezoidal con trescompartimentos				
Media	88.81	4.98	6.21	11.19
Rango	82.66 - 99.21	0.45 - 8.72	0.33 - 11.03	0.78 - 17.34
DS	4.53	1.85	3.02	4.53
p	0.2146	0.5391	0.0181 (*)	0.2786
FP (Fase S + G2M), (DS) Desviación estándar, (*)$p < 0.05$				

Si bien de las 23 muestras de pólipos adenomatosos de colon, solamente dos presentaron una leve aneuploidía (hiperploidía), es interesante considerar que al modelar la fase S en forma rectangular con tres compartimentos, en 15 muestras se identifica la presencia de un componente tetraploide definido por un G2M > 6% (23,24), con un rango 6.71% a 14.60% con un promedio de 8.23% (**Figura 1**). De igual modo al modelar la fase S en forma trapezoidal con tres compartimentos, en 12 muestras se identifica la presencia de un componente tetraploide, con un rango de 6.79% a 14.26% con una media de 7.67% (**Figura 1**). Lo anterior tiene directa incidencia en el cálculo de la fracción proliferativa es decir fase S + G2M y en el comportamiento proliferativo del tejido (23,24).

En lo referente a la determinación de la fase S para el grupo de pacientes de con pólipos adenomatosos de colon, destaca un valor medio de fase S, 6.97% y 15.40% para modelo rectangular y trapezoidal respectivamente, lo cual se puede objetivar en la **Tabla 3**, la cual resume los resultados de ciclo celular y ploidía de ADN en los pacientes con pólipos adenomatosos de colon, destacando diferencias estadísticamente significativas entre ambos modelos de análisis para las fases G0G1, fase S y fracción proliferativa ($p < 0.05$).

Al comparar los resultados de las fases del ciclo celular y ploidía de ADN tanto para el grupo de referencia como para el grupo de pacientes con pólipos adenomatosos de colon (**Tabla 4**), usando tanto el modelo rectangular, como el modelo trapezoidal con tres compartimentos, es posible destacar diferencias estadísticamente significativas para las fases G0G1, fase S y fracción proliferativa ($p < 0.05$).

Discusión

En el año 2007, Sergio Araujo, publica un estudio del tipo meta análisis referente a la ploidía de ADN y su pronóstico en el cáncer colorectal, donde después de analizar 49 estudios que involucraban un total de 8.056 pacientes, concluyendo que aquellos pacientes que tuvieron una resección quirúrgica de un cáncer colorectal aneuploide, tuvieron un riesgo elevado de muerte al cabo de cinco años. Además recalcan que la ploidía de ADN más terapia coadyuvante, tendría un impacto en la sobrevida de pacientes con cáncer de colon sin compromiso ganglionar (25). Además destacan la importancia del diagnóstico precoz del cáncer de colon en especial en aquellas lesiones en etapa I, incluyendo lesiones planas y polipoideas. Al respecto Cristi y colaboradores (26) destacan la importancia de la vascularización en el crecimiento tumoral en especial caso de cáncer de colon, proporcionando la evidencia suficiente para establecer que la densidad micro vascular se correlaciona estrechamente con la fase S, ya sea en lesiones tempranas o avanzadas.

Mucho se ha dicho con respecto al modelo de progresión a cáncer colorectal. En las primeras fases de la oncogénesis colorectal que ocurre en la mucosa colónica normal, es característico un desorden en la replicación celular. La gran mayoría de las neoplasias colorectales se desarrollan a partir de un adenoma, fundamentalmente un pólipo adenomatoso que se caracteriza por ser una masa bien demarcada de displasia epitelial con una proliferación celular descontrolada a nivel de las criptas (27).

Considerando lo anterior y los resultados obtenidos en este estudio, la importancia de una detección precoz de adenomas pólipoides, así como sus factores desencadenantes asociados (genética, dieta, enfermedades inflamatorias intestinales, estrés, etc.) toma gran relevancia en base a que la progresión de la secuencia adenoma displasia carcinoma, conduciría a la formación de la gran mayoría de los cánceres de colon. (1,27) al respecto es importante recalcar que la presencia la presencia de un pólipo adenomatoso de colon con un ADN diploide no necesariamente es sinónimo de un crecimiento benigno, por lo que un aumento de la proliferación celular, es decir un aumento en la velocidad de replicación celular, y en especial la presencia de un componente tetraploide (G2M>6%) se traducirá en un incremento del tamaño del adenoma (micro vascularización incluida), con el consiguiente riesgo de malignización y compromiso loco regional (**Figura 1**)(23,24,27).

Nuestros resultados, independiente del modelo matemático utilizado para analizar la fase S, muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes de referencia y el grupo de pacientes con pólipos adenomatosos de colon, tanto para fase S y fracción proliferativa ($p < 0.05$).

Desde que David Hedley (28), publicó, en 1983, el primer estudio de contenido de ADN por citometría de

flujo, son muchas las revisiones y modificaciones efectuadas a la técnica por él propuesta, no siempre dimensionando adecuadamente su impacto sobre los resultados finales (7,10,18,29,30,31), por lo que no es extraño encontrar publicaciones contradictorias en cuanto a resultados y conclusiones, incluso en ciertas ocasiones los resultados son confusos. El evaluar resultados entre diferentes laboratorios se dificulta por la falta de valores de corte para un determinado estado de

una patología, lo que es de gran importancia cuando se considera la heterogeneidad tumoral de muchos tipos de cánceres, es decir la presencia de distintas poblaciones celulares en un mismo tumor (7,9,19,21) y por el uso de diferentes procedimientos de selección, preparación, marcación, adquisición y análisis de tejidos (7,9,10,13,22,32,33).

Tabla 2: Resultados de las fases del ciclo celular y ploidía de ADN para las 21 muestras de pólipos adenomatosos de colon. Fase S modelada en forma rectangular con tres compartimentos y en forma trapezoidal contra compartimentos. p<0.05.

Pacientes			Modelo Rectangular				Modelo Trapezoidal					
N°	Edad	Sexo	ID	G0G1	G2M	FS	FP	ID	G0G1	G2M	FS	FP
1	86	F	1.14	97.40	0.41	2.19	2.60	1.14	97.36	0.17	2.47	2.64
2	73	M	0.96	93.09	1.79	5.12	6.91	0.96	18.17	5.22	76.61	81.83
3	73	M	1.04	92.41	0.56	7.03	7.59	1.04	77.28	1.23	21.49	22.72
4	73	M	1.04	81.05	6.78	12.16	18.94	1.04	82.98	0.37	16.65	17.02
5	45	F	1.0	92.61	5.42	1.97	7.39	1.0	95.41	2.83	1.76	4.59
6	82	F	1.0	89.08	5.12	5.80	10.92	1.0	85.98	5.11	8.91	14.02
7	63	M	1.0	82.36	9.69	7.94	17.63	1.0	84.22	2.66	13.13	15.79
8	80	M	0.96	76.67	9.93	13.40	23.33	0.96	74.81	10.04	15.16	25.2
9	80	M	1.02	82.94	9.15	7.91	17.06	1.02	79.77	9.35	10.88	20.23
10	77	F	1.0	85.98	5.06	8.96	14.02	1.0	78.15	5.34	16.51	21.85
11	60	F	1.0	77.20	14.60	8.20	22.80	1.0	71.03	14.26	14.71	11.51
12	48	M	0.96	86.34	6.71	6.95	13.66	0.96	88.49	0.34	11.17	11.51
13	49	F	1.0	84.84	7.98	7.17	15.15	1.0	85.06	6.76	8.18	14.94
14	49	F	1.0	83.35	9.73	6.91	16.64	1.0	81.71	7.93	10.36	18.29
15	52	F	1.02	87.15	8.11	4.74	12.85	1.02	83.44	7.50	9.06	16.56
16	52	F	1.03	87.39	5.83	6.78	12.61	1.03	83.89	5.04	11.07	16.11
17	41	M	1.0	85.01	9.61	5.39	15.0	1.0	83.91	9.65	6.44	16.09
18	41	M	1.0	86.11	8.95	4.95	13.90	1.0	84.21	8.97	6.82	15.79
19	36	M	1.01	79.70	11.17	9.13	20.3	1.01	73.06	10.27	16.67	26.94
20	36	M	1.01	79.93	11.81	8.26	20.07	1.01	73.29	10.90	15.81	26.71
21	67	M	1.06	93.24	1.33	5.42	6.75	1.06	68.28	2.06	29.66	31.72
22	68	F	1.0	83.89	10.01	6.10	16.11	1.0	81.49	7.62	10.89	18.51
23	48	M	1.0	86.03	7.54	6.43	13.97	1.0	83.94	6.79	9.27	16.06

N° de muestra.; ID: índice de ADN; FP = Fase S + G2M

Tabla 3: Resumen de los resultados de las fases del ciclo celular y ploidía de ADN para las 21 muestras de pólipos adenomatosos de colon. Fase S modelada en forma rectangular con tres compartimentos y en forma trapezoidal contra compartimentos. p<0.05.

n = 23	ID	G0G1 (%)	G2M (%)	Fase S (%)	FP
Modelo Rectangular con tres compartimentos					
Media	1.01	85.816	7.27	6.91	14.18
Rango	0.96 - 1.14	76.67 - 97.4	0.41 - 14.6	1.97 - 13.4	2.6 - 23.33
DS	0.037	5.357	3.706	2.607	5.357
Modelo Trapezoidal con tres compartimentos					
Media	1.01	78.95	6.104	14.94	20.29
Rango	0.96 - 1.14	18.17 - 97.36	0.17 - 14.26	1.76 - 76.61	2.64 - 81.83
DS	0.037	14.96	3.87	14.73	14.987
p	1.00	0.0443(*)	0.3013	0.0135(*)	0.0725

ID: Índice de ADN, FP (Fase S + G2M), (DS) Desviación estándar, (*)p<0.05

Tabla 4: Resumen del valor promedio de los resultados de las fases del ciclo celular y ploidía de ADN para ambos grupos de pacientes. Fase S modelada en forma rectangular con tres compartimentos y en forma trapezoidal contra compartimentos. p<0.05.

Grupo	Modelo Rectangular					Modelo Trapezoidal				
	ID	G0G1	G2M	Fase S	FP	ID	G0G1	G2M	Fase S	FP
GR	1.0	90.746	5.416	3.84	9.256	1.0	88.81	4.98	6.21	11.19
GPAC	1.01	85.816	7.27	6.91	14.18	1.01	78.95	6.104	14.94	20.29
p	0.27	0.004(*)	0.085	0.0005(*)	0.0039(*)	0.27	0.0313(*)	0.3013	0.0304(*)	0.0290(*)

GR: Grupo de referencia. GPAC: Grupo de pacientes pólipos adenomatosos colon. ID: Índice de AND; FP: Fase S + G2M (*)p<0.05.

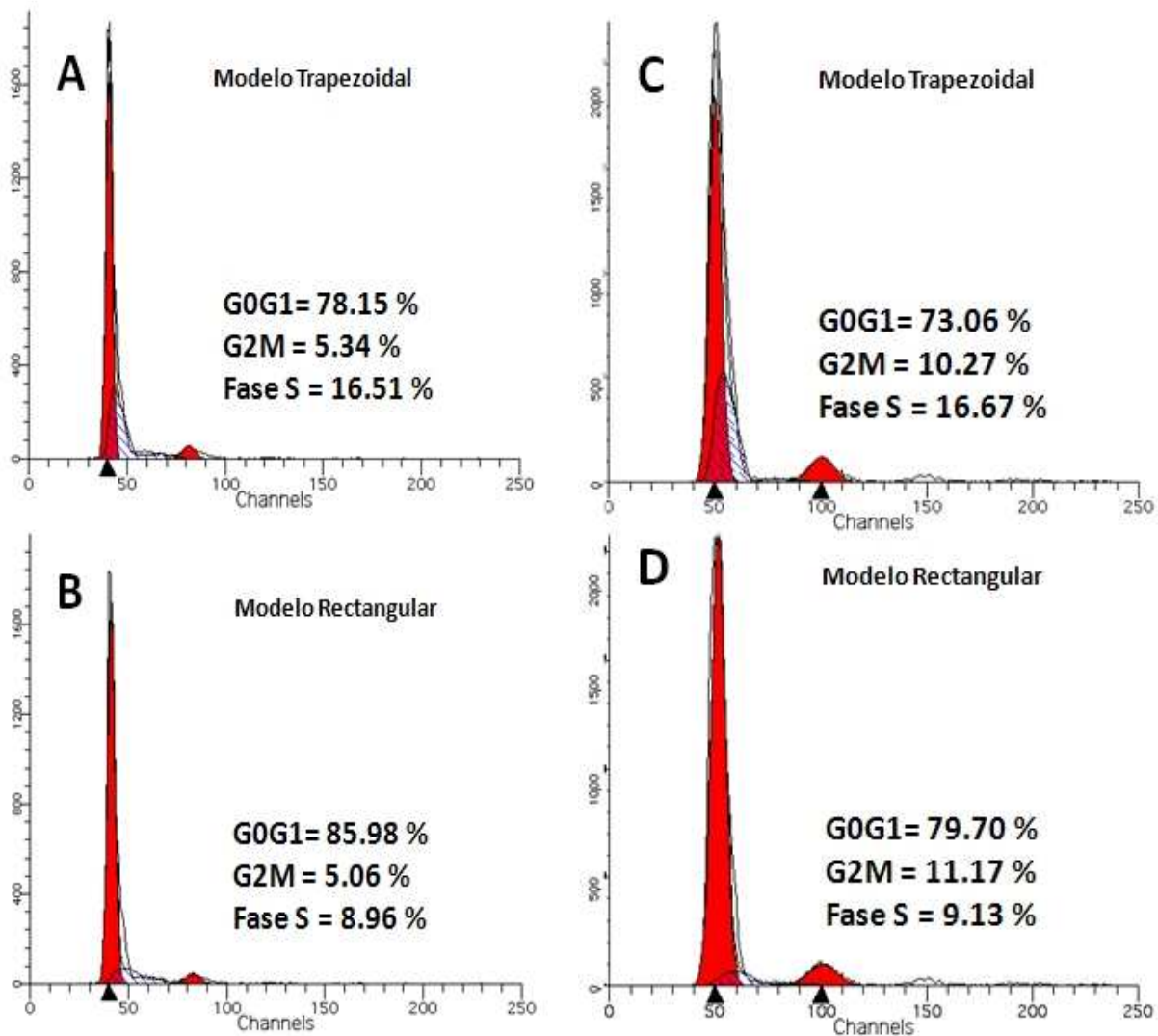


Figura 1: Análisis de histograma de ADN correspondientes a dos pacientes con pólipos adenomatosos de colon, en los cuales se estimó la fase S usando tanto el modelo trapezoidal como el modelo rectangular. Paciente N° 10. En (A) se usó el modelo trapezoidal y en (B) se usó el modelo rectangular. Destaca un aumento considerable de la fase S al usar el modelo trapezoidal. Paciente N° 19. En (C) se usó el modelo trapezoidal y en (D) se usó el modelo rectangular. Destaca por un lado, un aumento considerable de la fase S al usar el modelo trapezoidal y por otro lado, en ambos casos, la presencia de un componente tetraploide (G2M>6%).

El uso de tejido fresco presenta varias ventajas sobre el tejido fijado en incluido en parafina, entre las que se encuentra la obtención de una Fase S más realista producto de una menor cantidad de debris, además de conservarse indemnes estructuras celulares tanto de superficie como citoplasmáticas que permiten realizar estudios inmunofenotípicos (7,29).

Un desafío del análisis de contenido de ADN y Ciclo Celular por Citometría de Flujo, lo constituye la definición de control normal. El consenso Internacional sobre Citometría de ADN (8,9) sugiere que cada laboratorio debe definir sus propios rangos de referencia para los valores de fases del ciclo celular (alto, intermedio y bajo, tanto para ADN diploide como para tumores con ADN aneuploide), basados en sus propios análisis de diferentes tipos de tejidos (o tumores) (8). En condiciones ideales se debe usar como referencia un tejido histológicamente normal, sometido a idénticas condiciones de conservación y procesamiento que el tejido a analizar. Al respecto, creemos en la necesidad de poder controlar células epiteliales usando células epiteliales normales, y siendo aún más rigurosos, controlar células de colon usando células de colon normal, idealmente del mismo paciente (pero una distancia mayor a 1.5 cm de la lesión), criterio aplicable a otros tejidos (7,18,32). Considerando lo anterior, en este estudio se definen rangos de referencia para las fases de ciclo celular en tejido fresco de mucosa colónica normal, utilizando dos modelos diferentes para calcular Fase S, los que difieren significativamente entre ellos ($p < 0.05$).

Al considerar el análisis de un histograma de ADN, existen variaciones debido al uso de distintos programas computacionales y distintos modelos matemáticos para estimar las fases del ciclo celular. A consecuencia de esto, el valor estimado de Fase S, varía considerablemente, (7,13,22,32), lo que ocurre tanto con el grupo de pacientes de referencia como con el grupo de pacientes con pólipos adenomatosos ($p < 0.05$). La elección de un determinado modelo matemático es difícil, ya que estos son complejos y hay decisiones que deben tomarse por parte de quien realiza el análisis (7). En el caso del modelo rectangular, de elección para tumores sólido fijados e incluidos en parafina, es el modelo más conservador para Fase S, es decir, pequeñas perturbaciones en la forma de la Fase S, tendrán un impacto relativamente pequeño sobre el área de estimación de ésta (7,33). Además permite dividir el componente Fase S en más de un compartimiento (4,7,34), produciéndose un aumento de los valores de Fase S (7,22,32,34). Se recomienda el uso de tres compartimientos, ya que la Fase S es convenientemente dividida en compartimientos inicial, central y terminal (7,33). A su vez, el modelo trapezoidal, tiene un grado de libertad adicional respecto del modelo rectangular, entregando valores de fase S mayores (7,22,34), lo que se puede apreciar tanto en el grupo de pacientes de referencia (Fase S = 6.35 %, $p < 0.05$) como en el grupo de pacientes con pólipos adenomatosos de

colon (Fase S = 15.40 %, $p < 0.05$). El modelo trapezoidal simple (un compartimiento) trabaja bien para tumores sólidos y es el método de estimación de fase S más popular, no obstante, la discusión sobre el número óptimo de compartimientos del modelo rectangular, también es aplicable al modelo trapezoidal para la estimación de fase S (7,22,34). Además existe disponible el modelo polinomial, el cual tiene un grado de libertad adicional con respecto al modelo trapezoidal, y trabaja bien para histogramas derivados de poblaciones celulares constantes (cultivos celulares). En tejidos sólidos entrega valores de fase S aberrantes e ilógicos (7,33), razón por la cual se excluyó de este estudio.

Si bien también existen modelos destinados a compensar la presencia de debris y agregados en el histograma y su efecto sobre el modelo de análisis completo, y los resultados del ciclo celular, estos no fueron aplicados ya que el criterio de análisis usado, ya que se consideró una ventana de análisis en función de FL2-A v/s FL2-W, la que permitió eliminar la mayor parte del debris y agregados (7,34,35).

Al comparar ambos grupos de pacientes, se aprecian diferencias significativas para los valores de fase G0G1, Fase S y Fracción Proliferativa (Fase S + G2M), independiente del modelo matemático usado. La disminución lógica de la Fase G0G1 producto del aumento paralelo de la Fase S, al igual que el aumento de la Fracción proliferativa (aún con una fase G2M sin alteración significativa, $p > 0.05$) demuestran que el parámetro de Fase S es el más sensible frente a perturbaciones del histograma y a su vez es el que tiene mayor impacto sobre el resto de los parámetros de ciclo celular (Figura 1).

Con los resultados obtenidos, se puede plantear la conveniencia de evaluar para cada tipo de tejido y/o tumor (diploide o aneuploide), la capacidad proliferativa del tejido, en especial la Fase S y la presencia de un componente tetraploide (G2M >6%), junto con complementar con estudios histológicos, inmunohistoquímicos, genéticos y de biología molecular. Es posible concluir que la utilización de diferentes modelos matemáticos para la estimación de las fases del ciclo celular, tanto para el grupo de pacientes de referencia como para el grupo de pacientes con pólipos adenomatosos de colon, entrega diferencias estadísticamente significativas para los parámetros de Fase S y fracción proliferativa. De acuerdo a esto, y con lo ya planteado con anterioridad, uno de los aspectos fundamentales del estudio de ciclo celular, es la correcta elección del modelo de análisis que más se acomode a la serie en estudio, usando dicho modelo para comparar muestras del mismo tipo de tejido que la serie original (7). Más aún, si se considera la secuencia adenoma displasia carcinoma, se hace pertinente el seguimiento a largo plazo de pacientes con pólipos adenomatosos de colon, a fin de lograr una detección precoz de progresión displásica o de un carcinoma, especialmente en pacientes con adenomas con una

Fase S elevada y presencia de un componente tetraploide (G2M >6%).

Agradecimientos:

Los autores agradecen a los médicos Dr. Claudio Benavides y Dr. Claudio Zuñiga por su revisión crítica.

Referencias:

- Bono M R , Simon V. Citometría de Flujo: Principios Básicos y Aplicaciones. En *Funadamentos de Inmunología*. Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. Ed. Universidad de Talca, 1998, pp6 47-665.
- Hedley D, Shankey T. DNA Cytometry Consensus Conference. *Cytometry*, 1993;14:471.
- Shankey TV, Rabinovitch P, Bagwell B, Bauer K, Duque R, Hedley D, et al: Guidelines for Implementation of Clinical DNA Cytometry. *Cytometry* 1993;14:472-477.
- Rabinovitch P: Practical Considerations for DNA Content and Cell Cycle Analysis. In: *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*. Bauer Ketal(eds), W&W., Baltimore, 1993, pp 117-142.
- Wersto RP, Liblil RL, Deitch D, Koss LG. Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 1991; 67:106-115.
- Bergers E. Comparison of Five Cell Cycle Analysis Models Applied to 1414 Flow Cytometry DNA of Frozen Breast Cancer. *Cytometry(CCC)* 1997;30:54-60.
- Lofberg R, Caspersson T, Tribukait B, Ost A. Comparative DNA analyses in longstanding ulcerative colitis with aneuploidy. *Gut* 1989; 30:1731-1736.
- Xiang JH, Spanier SS, Benson Na, Braylan RC. Flow Cytometric analysis of DNA in bone and soft-tissue tumors using nuclear suspensions. *Cancer* 1987; 59:1951-1958.
- Lynch O, Kawaguchi F, Madariaga J, Cao C, , Zilic M, Fernández M, et al. Estudio de ploidía del ADN e índice de proliferación celular en el cáncer gástrico avanzado. Validación de su capacidad pronóstica. *Cuadernos Chilenos de Cirugía*. N°40, 1996, pp 166-174.
- Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and Prognosis. DNA Flow Cytometry of solid tumors. *Cancer* 1990; 65 :1194-1205.
- Kawaguchi F, Kuniyasu S, Tsuneko Y, Kiyoshi Y. Variación del patrón diploide en tejidos usados como controles normales de tumores sólidos: Ventajas y desventajas del análisis fluocitométrico en tejidos incluidos en parafina. *Rev. Méd. Chile* 1993; 121:738-745.
- Fujimaki E, Sasaki K, Nakano O, Chiba S, Tazawa H, Yamashiki H, Orii S, Tazawa H. DNA Ploidy Heterogeneity in Early and Advanced Gastric Cancers. *Cytometry(CCC)* 1996; 26:131-136.
- Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ: DNA Index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990; 66:331-340.
- Schvimer M, Lash H, Katzin W. Intratumoral Heterogeneity of DNA Ploidy in Breast Carcinomas: A Flow Cytometric Assessment of Sampling Techniques. *Cytometry(CCC)* 1995; 22:292-296.
- Baldetorp B, Stal O, Ahrens O, Cornelisse C, Corver W, Falkmer U, Different Calculation Methods for Flow Cytometric S-Phase Fraction: Prognostic Implications in Breast Cancer?. *Cytometry* 1998;33:385-393.
- Stal O, Baldetorp B. S-Phase Fraction Assessed by a Variant of the Rectangular Model Adapted to the Flow Cytometric DNA Histogram Profile. *Cytometry* 1998; 33:487-491.
- Castillo JL, Kawaguchi F, Madariaga J, Venegas O, Lecannelier E, Ocampo S, Castillo M. Aspectos que Afectan el Análisis de Contenido de ADN por Citometría de Flujo. *Rev. Méd. Chile*, Aceptado para publicación.
- Bagwell C: Theoretical Aspects of Flow Cytometry Data Analysis. In: *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*. Bauer Ketal (eds), W&W., Baltimore, 1993, p41-61.
- Verity Software House, Inc. *ModFir LT™ User Guide*. Rev. Date 8 August, 1996.
- Schofield P, Jones D. Colorectal neoplasia. I. Benign colonic tumours. *British Med. J.* 304;1992:1498-1500.
- Schofield P, Jones D. Colorectal neoplasia. II. Large Bowel cancer. *British Med. J.* 304;1992: 1561-63.
- Motwani B, Shafir M, Merrick M, Tepper J, Bruckner H. Adenocarcinoma of the Colon and Rectum. In *Cancer Medicine*. Fourth Edition. Holland J, Frei III E, Bast R, Kufe D, Morton D, Weichselbaum R editores. Williams & Wilkins, 1997. Chapter 121, pp 2029-2072.
- Hedley DW, et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31:1333-5.
- Hitchcock C. Technical Considerations for Dissociation of Fresh and Archival Tumors. In: *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*. Bauer K et al(eds), W&W., Baltimore, 1993 , pp 93-109.
- Hedley D. Flow Cytometry Using Paraffin-Embedded Tissue: Five years On. *Cytometry* 1989; 10:229-241.
- Leers M, Schutte B, Theunissen P, Ramaekers F, Nap M. Heat Pretreatment Increases Resolution in DNA Flow Cytometry of Paraffin-Embedded Tumor Tissue. *Cytometry* 1999, 35:260-266.
- Kawaguchi F, Shimokawa K, Ikeda T, Inada K. Correlation Between Intestinal Metaplasia and Histological Types in Early Gastric Carcinoma. *ACTA SCHOLAE MED. UNIVERSITATIN IN GIFU. Vol. 40 N°5, 1992.*
- Brockhoff G, Hofstaedter F, Knuechel R. Flow Cytometric Detection and Quantitation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Comparison to Scatchard Analysis in Human Bladder Carcinoma Cell Lines. *Cytometry*, 1994;17:75-83.
- Shapiro HM. 2003. *Practical Flow Cytometry*. Fourth Edition. John Wiley, INC., Publication.

30. Tanaka T. Colorectal carcinogénesis: Review of human and experimental studies. *Journal of Carcinogenesis* 2009, 8:5.
31. Cristi E., Perrone G., Toscano G., Verzi A., Nori a., Santini D., Vetrani A., Fabiano A., Rabitti C. Tumour proliferation, angiogenesis, and ploidy status in human colon cancer. *J Clin Pathol* 2005; 58: 1170-1174.
32. Araujo S., Bernardo W., Habr-Gama A., Kiss D., Ceconello I. DNA ploidy status and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis of published data. *Dis Colon Rectum* 2007;50:1800-1810.
33. Maiza E. Lesiones superficiales del colon, incluyendo los pólipos colónicos. . En diagnóstico y tratamiento de las enfermedades digestivas. Editores: Weitz, Berger, Sabah y Silva. Sociedad chilena de gastroenterología octubre 2008.
34. Jensen C. Cáncer de colon y recto. En diagnóstico y tratamiento de las enfermedades digestivas. Editores: Weitz, Berger, Sabah y Silva. Sociedad chilena de gastroenterología octubre 2008.
35. Barrett M., Sánchez C., Prevo L., Wong D., Galipeau P., Paulson T., Rabinovitch P., Reid B. Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat Genet.* 1999 May; 22(1): 106–109.
36. Loeb L., Harris C. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer Res.* 2008 September 1; 68(17): 6863–6872.