

Citometría de flujo en urología

José Antonio LÓPEZ GARCÍA-ASENJO

Departamento de Anatomía Patológica.
Hospital Universitario San Carlos. Madrid

I. INTRODUCCION

La tecnología de citometría de flujo resulta de la aplicación conjunta de los conocimientos desarrollados en diferentes áreas como son la tecnología del láser, producción de anticuerpos monoclonales, fluorocromos y procesamiento computerizado de datos.

Aunque sus principios básicos son conocidos desde 1930, su aplicación clínica no ha entrado a formar parte de las prácticas rutinarias de laboratorio hasta muy recientemente (1), coincidiendo con la disponibilidad de aparatos relativamente baratos dotados de sistemas informáticos capaces de manejar muy rápidamente gran cantidad de datos.

La primera máquina disponible comercialmente fue ideada por un anatomopatólogo, Herbert Derman, y un ingeniero, John Hoffer, quienes basándose en las observaciones de Casper-sson y colaboradores sobre la fluorescencia de los ácidos nucleicos, pensaron en crear un sistema automático de análisis celular. La construcción del aparato fue encargada a Louis Kamentski, un físico que trabajaba en un centro de investigación de IBM (2) y cuya aportación fundamental fue la de incorporar un sistema de flujo, en lugar del análisis estático que se realizaba previamente, mientras que las propiedades de fluorescencia de los ácidos nucleicos eran potenciadas con fluorocromos.

De forma muy esquemática, se puede afirmar que el objetivo de la citometría de flujo es la rápida cuantificación de uno o más parámetros en cada partícula de una amplia población celular. La cuantificación de ADN, ARN o de una determinada actividad enzimática se puede realizar muy rápidamente de la misma forma que la determinación de poblaciones celulares con marcadores de superficie.

La ventaja fundamental del sistema de citometría de flujo sobre la citofotometría o la citometría de imagen es la velocidad del análisis de los parámetros de cada partícula, lo que permite estudiar poblaciones celulares mayores. Sus resultados son fácilmente reproducibles en diferentes centros, lo cual es fundamental cuando se analizan parámetros pronósticos. Las técnicas estáticas utilizan menos células para el análisis, por lo que son de elección en muestras poco celulares. Además, las mediciones se realizan bajo control microscópico, eligiendo el observador el tipo celular objeto de estudio (2).

.... En el campo de las neoplasias del tracto genitourinario, la cuantificación de ADN mediante Citometría de Flujo ha resultado especialmente valiosa, como desarrollaremos en la parte específica de esta revisión.

II. METOLOGÍA DE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para poder medir unos determinados parámetros, se marcan las partículas con fluorocromos, que son excitados al pasar por delante de una fuente de luz de una determinada longitud de onda. La captación de las características individuales de cada partícula es posible, gracias a la señal lumínica recogida por fotodetectores al paso individual de las mismas, frente a la fuente de excitación en el seno de un flujo laminar a una velocidad determinada.

II.a) Componentes de un citómetro de flujo (Fig. 1)

La suspensión celular se sitúa en el *colector de muestras*, que es un compartimento presurizado desde el que pasa a una *cámara de flujo* en donde ha de disponerse en el seno de un flujo laminar de un líquido acelular. Las partículas se sitúan en el centro del flujo, y pasarán una a una y a una velocidad determinada y constante que suele ser de 100-200 partículas por segundo, a través de la *fuentes de excitación*. Aunque el sistema de lámparas de arco resulta más barato, la mayor parte de los citofluorógrafos actuales están provistos de un LASER de Argón. Habitualmente obtienen un rendimiento de 488 a 520 nm, longitud de onda apropiada para excitar fluorocromos como Fluoresceína, Ioduro de Propidio, Bromuro de Etidio, Naranja de Acridina, Pironina Y, Rodamina etc. El alineamiento del haz de luz con el flujo de partículas es fundamental para la correcta obtención de datos (1-3).

En la interacción de las partículas con el haz luminoso se produce una dispersión de la luz dependiendo del tamaño de las mismas, pero también tiene lugar la excitación de los fluorocromos presentes en la superficie e interior de cada partícula. Unos *filtros ópticos* permiten el paso únicamente a determinadas longitudes de onda, cuyas señales luminosas son recogidas por unos *fotodetectores* colocados en el eje de la luz y en posición ortogonal, para medir el ángulo anterior de dispersión de la luz y la intensidad de fluorescencia a 90; lo que permite obtener datos sobre el tamaño, estructura interna de

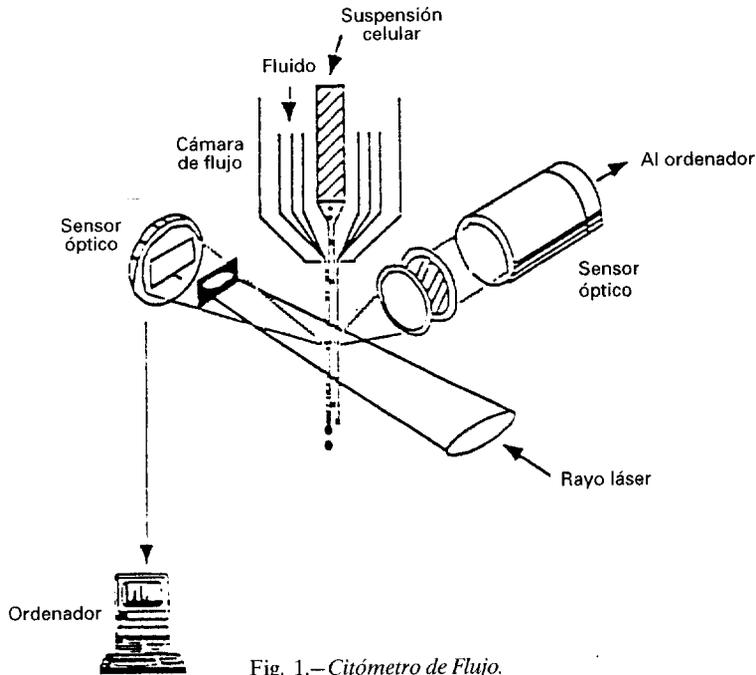


Fig. 1.— Citómetro de Flujo.

la partícula, viabilidad, etc. Estas señales son amplificadas y convertidas en pulsos eléctricos para posteriormente ser transformadas a forma digital en una *computadora* (1-3).

II.b) Preparación de Muestras

Prácticamente cualquier tipo de muestra puede ser utilizada para un análisis de citometría de flujo. El material a analizar puede ser obtenido de piezas quirúrgicas, punción aspiración, líquidos orgánicos como derrames cavitarios u orina.

Existen varias técnicas de preparación del material, pero todas ellas tienen objetivos comunes.

- Preparación de suspensiones celulares.
- Aislamiento de núcleos.
- Tinción del ADN.

Preparación de suspensiones celulares: Una de las mayores dificultades cuando se trata con tumores sólidos, es la obtención de una buena suspensión celular. Las células que carecen de uniones intercelulares (hematolinfoides) son ideales para este tipo de análisis. Es fácil obtener igualmente el material

de cultivo de tejidos. Sin embargo, es mucho más difícil obtener una buena suspensión celular de tumores sólidos. Las células epiteliales con sus uniones de membrana son las más difíciles de separar. Para ello, se utilizan varios «detergentes» y enzimas como EDTA, pepsina, tripsina, colagenasa etc., asociados a la disgregación mecánica (4).

La aplicación de estas técnicas a tejidos incluidos en **parafina** permite el acceso a estudios retrospectivos, con la ventaja de trabajar con pacientes cuyo curso clínico es ya conocido. Estos métodos requieren la realización de gruesos cortes del material incluido en parafina (30-50 μ) desparafinización, rehidratación y tratamiento enzimático antes de proceder a la tinción con el fluorocromo (5). La correlación de resultados obtenidos de material en fresco e incluido en parafina es buena, en general, aunque en el último caso, los histogramas muestran mayores coeficientes de variación y más detritus celulares (5-7).

Aislamiento nuclear. La primera técnica de aislamiento nuclear estaba basada en la utilización de Buffer Citrato, que a pesar de que produce alteraciones en las membranas citoplásmicas, complejos de unión y citoplasmas celulares, permeabiliza el núcleo a la acción de fluorocromos. Actualmente, el sistema más utilizado es el propuesto por Vindelov (4).

Tinción. El procedimiento de tinción variará según los parámetros que se quieran analizar. Aunque las posibilidades son muy amplias utilizando anticuerpos fluoresceinados, la aplicación más inmediata en tumores sólidos y en laboratorios de diagnóstico es la cuantificación de ADN. Los fluorocromos mayoritariamente utilizados (Ioduro de Propidio, Bromuro de Etidio, DAPI) tienen avidez, tanto por el ARN, como por el ADN, por lo que para alcanzar una correcta cuantificación del ADN, es necesario eliminar de los núcleos, las cadenas de ARN. Esto se consigue incubando la suspensión celular con RNAasa antes de la tinción con el fluorocromo.

En nuestro laboratorio, utilizamos el Ioduro de Propidio que se une estequiométricamente a la cadena de ADN, de forma que la cantidad de fluorocromo unido al ADN, y por tanto, la emisión de fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de ADN contenida en el núcleo.

Algunos colorantes como Naranja de Acridina se une simultáneamente al ARN y al ADN, emitiendo en cada caso fluorescencia de distinta longitud de onda, por lo que puede ser usado para el análisis simultáneo de ambos componentes. Algunas variantes de la técnica básica asocian algún anticuerpo fluoresceinado (doble o triple tinción) para análisis multivariante.

III. CUANTIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

III.a) Obtención y procesamiento de datos

La forma más simple y habitual de demostración de resultados es el «dot plot». Cada punto representa una partícula (célula) que se sitúa, de acuerdo a su tamaño, en unas determinadas coordenadas (Fig. 2).

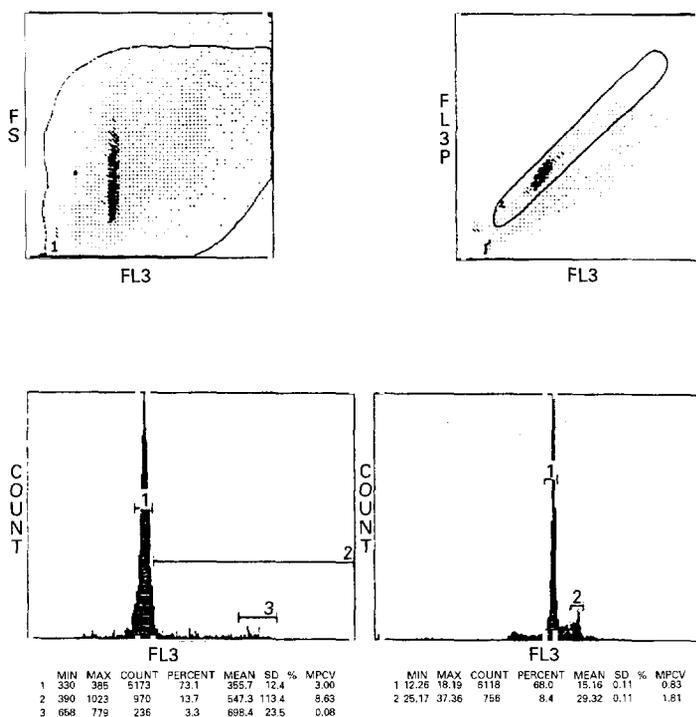


Fig. 2.—Obtención de los resultados. (Explicación en el texto.)

De acuerdo a las características de tamaño y complejidad celular, se acotan las poblaciones que interesan para el estudio por medio de «gates» y «bit maps» (Fig. 2). Las primeras son divisiones rectilíneas y las segundas ovoides, pero ambas tienen el mismo fin, que es delimitar las poblaciones celulares sobre las que se quiere realizar el estudio.

Tras el análisis de las señales fluorescentes, se obtienen unos datos que son expresados mediante histogramas. Estos pueden ser univariados, en los que se analiza nivel de fluorescencia o tamaño de las partículas y el número total de las mismas, o bien bivariados, que son aquellos en los que cada canal recoge las partículas que recogen dos condiciones delimitadas por medio de los «bit maps».

III.b) Cantidad de ADN y cinética celular

Mediante técnicas de citometría estática y autorradiografía, ya se había comprobado que frecuentemente las células tumorales poseían una cantidad anormal de ADN, en comparación con las células normales. La aportación de

la citometría de flujo a este tipo de análisis consiste en la rapidez y facilidad con que se pueden estudiar grandes poblaciones celulares.

La resolución del análisis de ADN mediante citometría de flujo en tumores sólidos depende, en primer lugar, de la conservación y manipulación del tejido, el procedimiento de tinción y de la calidad del citómetro. En un análisis convencional, han de poder discriminarse contenidos de ADN diferentes en un 4% que corresponde aproximadamente a un cromosoma. La resolución del sistema de análisis mediante coeficiente de variación de una población no tumoral en fase G0/G1. En condiciones óptimas, éste ha de ser inferior a 2% (1-3,8).

Como se ha citado anteriormente, para la determinación de la cantidad de ADN presente en el núcleo, se utilizan fluorocromos que se unen estequiométricamente a las cadenas de ácidos nucleicos, y por tanto, la intensidad de fluorescencia será directamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico. De la cuantificación de la emisión de fluorescencia de cada célula, obtenemos simultáneamente datos sobre la ploidía y sobre el ciclo celular.

La forma más usual de expresar el contenido de ADN es mediante el índice de ADN. Este índice se calcula dividiendo el número de canal medio de fluorescencia de la población problema en fase G0/G1 entre el número del canal medio de la fase G0/G1 de la población normal. De esta forma, por definición, el índice de ADN de una población diploide normal es de 1. Las neoplasias malignas, frecuentemente son ANEUPLOIDES, es decir, tienen un índice distinto de 1. Cuando el índice es 1 se denomina a dicha población HIPERDIPOIDE, cuando es de 2 se denomina TETRAPLOIDE, si es 1 HIPODIPOIDE, y si existen varios picos aneuploides, se conoce como MULTIPLOIDIA. Esta terminología ha sido cuestionada por comités de expertos (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics), que limitan el término de aneuploidía a las alteraciones cromosómicas y propugnan la denominación de «cantidad anormal de ADN» para referirse a las anomalías detectadas con citometría de flujo.

Normalmente, el 90-95% de las células se encuentran en fase G0/G1 con un contenido diploide de ADN. Las células que se encuentran sintetizando activamente ADN, muestran un mayor contenido del mismo reflejado en un aumento de la intensidad de fluorescencia. Las células en mitosis o en fase premitótica (G2/M) contienen una doble cantidad de ADN (4n).

El análisis del ciclo celular se realiza a través de modelos matemáticos basados en el estudio de áreas de una curva de Gauss para la fase G0/G1 y G2/M y de la suma de áreas de rectángulos.

Los modelos citados evitan la superposición de células de los picos 2n y 4n con la meseta de fase S y permiten discriminar el fondo atribuible a detritus, etc., pero para estimar la fase S real y eliminar células fuera de ciclo, el método más correcto es el tratamiento previo de las muestras con análogos de la Timidina (ej: BromoDeoxiUridina), que permite, mediante la aplicación de un anticuerpo frente a BrdU conocer la fracción real de células en fase de síntesis activa de ADN (Fase S). Su aplicación puede realizarse «in vivo» o en cultivo de tejidos.

III.c) Control de calidad

Para garantizar la homogeneidad de resultados en diferentes instituciones, es necesario cumplir una serie de requisitos. Para comprobar el buen funcionamiento del sistema (alineamiento del Láser, voltajes, etc), utilizamos partículas plásticas fluorescentes, que han de ser homogéneas y muy estables. Antes de cada sesión de trabajo, fijamos las condiciones del análisis ajustando los voltajes para obtener el canal de fluorescencia deseado con las partículas de control.

Utilizamos además controles biológicos constituidos por núcleos celulares con una cantidad conocida de ADN. Los hematíes de pollo contienen una cantidad de ADN de 35% respecto a la especie humana y los hematíes de carnero de un 80%. Los picos obtenidos con estas células deben ser muy fácilmente distinguibles de los obtenidos con la muestra control y se mezclan con la misma como control interno (8). Cuando se trabaja con tumores sólidos, y más aún, con material que ha sido incluido en parafina, es imprescindible añadir un nuevo control, que idealmente será una muestra sana del mismo paciente y del mismo órgano, procesada en las mismas condiciones que la muestra problema.

IV. CITOMETRÍA DE FLUJO EN UROLOGÍA

IV.1. Carcinoma de vejiga

El carcinoma de células transicionales de vejiga urinaria ha sido y es uno de los tumores sólidos más ampliamente estudiados mediante citometría de flujo. Tanto las muestras de orina, lavados vesicales o las obtenidas por técnicas endoscópicas poco agresivas, son utilizadas para la cuantificación de ADN.

Se han descrito múltiples niveles de utilidad, que van desde el diagnóstico inicial al establecimiento de parámetros pronósticos, con implicaciones en el seguimiento de los pacientes.

IV.1.a) *Diagnóstico*

En primer lugar, y desde el punto de vista del diagnóstico inicial, se ha comparado su sensibilidad con otras técnicas como la citología convencional en diferentes tipos de muestra (9). La sensibilidad de la citometría de flujo se ha mostrado, al menos, igual que la de la citología. Algunos autores (Badalament, 1987) reconocen incluso una mayor sensibilidad a la citometría de flujo. En el citado trabajo, se obtiene una sensibilidad del 83% en citometría de flujo de lavados vesicales, 61% con citología de lavado vesical y 60 con el examen citológico de tres muestras de orina. Collste y cols (10) demostraron

que utilizando como fluorocromo Naranja de Acridina, se incrementa la sensibilidad de la técnica.

Los criterios del Memorial Sloan-Kettering Center, para considerar una muestra positiva, son la demostración de una población celular aneuploide, incluyendo en esta categoría la demostración de más de un 16% de células con contenido hiperdiploide de ADN (9). Con estos criterios, aunque se logra una buena sensibilidad, se produce una pérdida de especificidad por la aparición de falsos positivos que puede alcanzar tasas de 28-38%. La aparición de un importante componente inflamatorio, fundamentalmente en lesiones ulceradas, contribuye a la aparición de células con contenido anormal de ADN.

Para poder aceptar esta técnica como sistema de rastreo de carcinomas vesicales en población de riesgo, además de cumplir requisitos de sensibilidad y especificidad, debe de poder realizarse en muestras obtenidas de forma no invasiva, económica y rápida. Las muestras de orina serían las óptimas con este propósito. El problema del análisis de muestra de orina es la ausencia de celularidad suficiente (11,12), que hace que en las series citadas sólo se obtengan histogramas valorables en el 47% de los casos. En este punto, conviene recordar que una buena alternativa a la citometría de flujo para cuantificación de ADN en muestras poco celulares, es la citometría estática o de imagen con la que se están obteniendo muy buenos resultados (13).

En cuanto a su capacidad para detectar tumores no visibles macroscópicamente, cabe reseñar el estudio realizado por Norming *et al.* (14). Observaron la presencia de poblaciones celulares con contenido anormal de ADN en mucosa macroscópicamente normal, de pacientes portadores de carcinoma vesical, fundamentalmente en aquellos con tumores aneuploides no tetraploides. Comprobaron igualmente, que este hecho guardaba relación con el grado histológico, de forma que los tumores con grado 2 aneuploides mostraron mucha menor tendencia a presentar aneuploidías en mucosa normal que los tumores aneuploides de grado 3.

La detección de carcinoma *in situ*, cistoscópicamente puede presentar dificultades. Desde el punto de vista histopatológico, se catalogan como neoplasias de alto grado, no infiltrantes. Con citometría de flujo, se han encontrado una alta incidencia de aneuploidías en este tipo de neoplasia. En la revisión de Norming y cols, encuentran un 76% de aneuploidías en carcinoma *in situ*, 41% en zonas de displasia epitelial moderada y 10% en mucosa histológicamente normal adyacente al carcinoma *in situ* (15). En estudios previos (16), se había demostrado una clara relación entre aneuploidías múltiples e incremento de la fracción proliferativa y la progresión del tumor con invasión de la capa muscular.

La significación de la aparición de poblaciones aneuploides en mucosa macro y microscópicamente normales, no esta muy aclarada, pero en cualquier caso parecen necesarios factores coadyuvantes para el cambio de expresión morfológica y progresión de la enfermedad (15,16).

IV.1.b) *Pronóstico*

La heterogeneidad en el curso clínico del carcinoma vesical, ha impulsado la búsqueda de nuevos parámetros pronósticos que añadir al clásico estadiaje clínico y gradación morfológica.

La estrecha correlación entre contenido anormal de ADN y criterios histopatológicos como grado y estadio, ha sido ampliamente recogida en numerosas referencias bibliográficas (12,13,16,17,18,19,20). Como resumen de las mismas podemos concluir, que la inmensa mayoría de tumores de alto grado e invasivos son aneuploides, mientras que los de bajo grado, por el contrario, son diploides. Mayor variabilidad encontramos en los casos de grado intermedio (Tabla I).

TABLA I
Incidencia de aneuploidias en carcinomas de vejiga

Grado	Diploide	% Fase S	Aneuploide	% Fase S	Número
1	8 (89 %)	35+/-1,7	1 (11 %)	—	9
2	28 (67 %)	5,4+/-1,6	14 (33 %)	10,7+/-4,6	42
3	2 (4 %)	5,0	47 (96 %)	19,0+/-5,8	49
Total	38 (38 %)		62 (62 %)		100

FUENTE: Tomado de Tribukait B *et al.*: *Br. J. Urol.*, 1982; 52:130-135.

La buena correlación citada se mantiene también con estadios de infiltración, de forma que sólo un 2,5% de tumores con invasión de la capa muscular, conserva un contenido normal de ADN (18). Lo mismo ocurre con el comportamiento clínico. Tribukait y cols (19). demostraron una estrecha correlación entre aneuploidía, progresión tumoral y muerte por la enfermedad. Sin embargo, no queda claramente establecido su valor como parámetro pronóstico independiente.

En una amplia serie (203 casos de carcinomas de vejiga no tratados) Tachibana y cols. (21), realizan un análisis multivariante entre parámetros clásicos clínico-histopatológicos y los obtenidos por citometría de flujo. Considerados de forma individual los datos con mayor valor en orden decreciente resultaron ser la presencia de hipertetraploidía, grado histológico, tetraploidía y estadio del tumor.

Blomjous y cols.(22) establecieron una asociación estadísticamente significativa entre cantidad de ADN y supervivencia a los 5 años, encontrando que los tumores de grado 2 con contenido normal de ADN tenían una supervivencia mayor que aquellos con contenido anormal de ADN. Estos hallaz-

gos son de especial relevancia al plantear la posible separación de entre los pacientes con tumores de bajo grado o intermedio y bajo estadio, un grupo de alto riesgo cuando se observan poblaciones celulares con contenido anormal de ADN (23, 24).

La predicción de recurrencia es un dato de importancia en el manejo terapéutico del paciente. En el trabajo ya citado de Blomjous (22), se reconoce a la determinación de la ploidía con citometría de flujo como el parámetro de mayor capacidad predictiva de recidivas frente datos como tamaño tumoral, multiplicidad de las lesiones, morfometría nuclear, grado, estadio.

De Vere White y cols.(25) demostraron la utilidad del estudio secuencial de la cantidad de ADN en la monitorización de pacientes con carcinoma urotelial superficial. Todos los tumores de esta serie con contenido anormal de ADN recidivaron y en un alto porcentaje de casos (20 de 28), se produjo un cambio en el patrón de ploidía de ADN. Concluyen estos autores, que de acuerdo al contenido de ADN, se pueden establecer grupos, que probablemente van a sufrir recidiva tumoral, y grupos de riesgo para el desarrollo de carcinomas invasivos, en aquellos con repetición de aneuploidías en sucesivas recidivas.

En la experiencia que estamos desarrollando y como parte de un estudio más amplio, hemos analizado hasta el momento 80 carcinomas uroteliales, utilizando muestras incluídas en parafina. Desde el punto de vista histopatológico, se ha utilizado un sistema de 4 grados (Broders) y el estadiaje de Jewett. Se han podido analizar de forma satisfactoria 75 de los tumores, siguiendo la metodología de Hedley (5). La lectura se ha realizado en un citofluorógrafo Epics Profile II de Coulter.

A pesar de utilizar un sistema de 4 grados, distinto al de la mayor parte de las series publicadas, se mantienen una asociación estadísticamente significativa entre grado y ploidía (Fig 3). La relación entre infiltración y ploidía también se mantiene en nuestra serie (Fig 4). En los tumores, en los que ya tenemos constancia de recidivas, existe asociación entre recidiva y ploidía (Fig 5). Entre los tumores diploides que recidivaron, encontramos dos casos en los que el grado histológico aumenta en la recidiva de I a II y coincide con la aparición de poblaciones aneuploides. Por otra parte, uno de los casos de alto grado (grado III), que mostró un patrón diploide, permanece sin recidivas desde hace 5 años.

En relación con la fracción proliferativa tumoral, referida a porcentaje de células en fase S, no hemos encontrado correlación significativa entre la misma y el grado histológico. Sin embargo, esta correlación sí se produce al comparar las medias de porcentaje de células en fase S entre tumores diploides que no han recidivado y los que sí lo han hecho (Fig. 6).

IV.1.c) *Seguimiento*

En el seguimiento de pacientes tratados con terapia intravesical, uno de los métodos convencionalmente utilizados es el de los lavados vesicales.

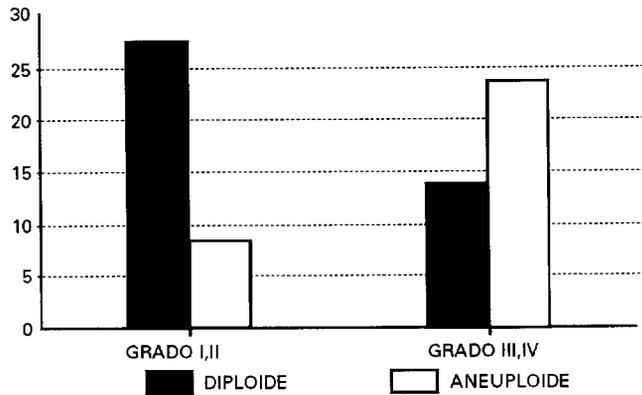


Fig. 3.—Relación entre grado histológico y ploidía en el carcinoma urotelial.

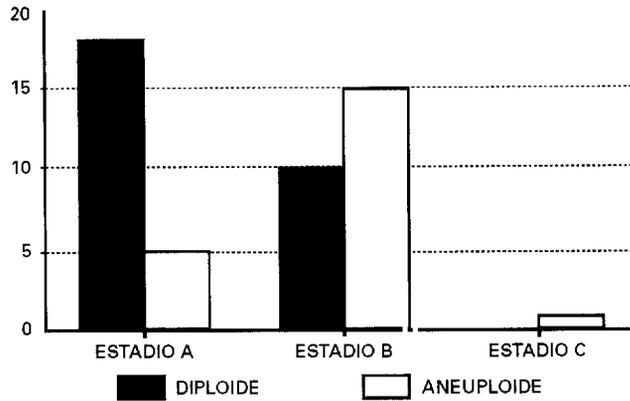


Fig. 4.—Relación entre ploidía y estadio de infiltración.

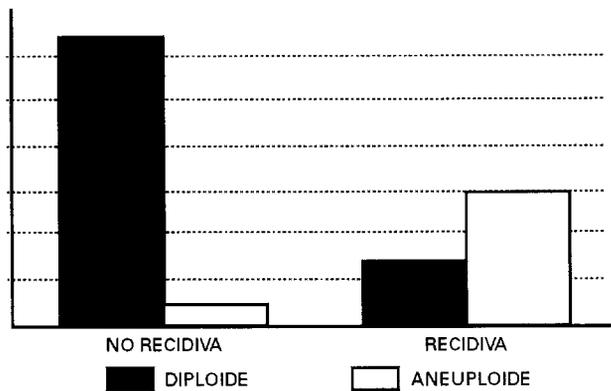


Fig. 5.—Correlación entre ploidía y recidiva en carcinoma urotelial.

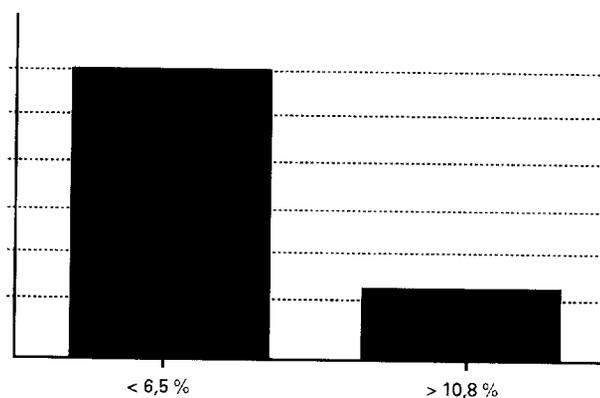


Fig. 6.—Relación entre % de células en fase S y recidiva tumoral.

Además del estudio citológico, estas muestras son susceptibles de procesamiento para análisis de ADN con buenos resultados, como se ha expresado anteriormente. La utilización rutinaria de esta metodología ha sido propuesta por algunos autores (26).

La desaparición de una línea celular aneuploide en un paciente cuyo tumor original la tenía, permite asumir que el tratamiento es efectivo. De especial utilidad se muestra esta tecnología en la monitorización del tratamiento de pacientes con carcinoma in situ, o en tumores de alto grado en fase no invasiva (24,26).

Como resumen, y haciendo referencia a la última reunión de consenso de citometría de ADN en cáncer de vejiga (27), podemos concluir que la citometría no se debe utilizar como método de rastreo en hematurias, ni utilizando muestras de orina espontánea, ni las procedentes de lavados vesicales. Debe reservarse esta técnica para aquellos pacientes con antecedentes de carcinoma vesical o con fuerte sospecha de tenerlo. Hay una buena correlación entre la ploidía de ADN y el grado histológico y estadio, residiendo su mayor utilidad en aquellos casos de grados histológicos intermedios y estadios de infiltración superficial sin afectación muscular. En estos casos, la presencia de poblaciones celulares aneuploides permite estratificar los pacientes según el riesgo de recidiva y pronóstico. La utilidad pronóstica de la determinación de la fracción de células en fase S no es tan clara.

En esta reunión, se ha reconocido la importancia de la ploidía de ADN en el seguimiento de los pacientes. En los casos de carcinoma superficial tratados de forma conservadora, la aparición de un histograma aneuploide no tetraploide en el lavado vesical, indica recidiva. La obtención de un histograma diploide con un histograma tumoral previo aneuploide, significa una buena respuesta al tratamiento intravesical.

IV.2. Carcinoma de Próstata

Clásicamente, se ha considerado que el parámetro pronóstico más valioso es el estadiaje clínico. Desde el punto de vista histopatológico, existe una clara asociación entre tumores de bajo grado y buen pronóstico, y entre neoplasias de alto grado y mayor agresividad clínica. Sin embargo, los tumores localizados y de grados intermedios de malignidad, tienen una respuesta irregular al tratamiento y una evolución muy variable. Por esa razón, se han buscado nuevos parámetros clínicos e histológicos que aporten una mayor información pronóstica. Algunos estudios, han sugerido que la cuantificación de ADN con citometría de flujo aporta dicha información (28,29).

La realización de este tipo de análisis se ha llevado a cabo con material procedente de Punción Aspiración con Aguja Fina (PAAF), muestras en fresco y tejido incluido en parafina (29). Como ocurre en otros tumores sólidos, se ha observado una menor calidad en los histogramas procedentes de bloques de parafina, sin embargo, numerosos autores y nosotros mismos hemos encontrado una buena correlación entre muestras en fresco e incluidas en parafina, por lo que se demuestra, que este tipo de muestra es válido y aporta la ventaja de poder realizar un análisis retrospectivo con especial valor en el carcinoma de próstata, que puede presentar un curso clínico muy prolongado.

Se ha encontrado en las neoplasias prostáticas una buena asociación entre grado y ploidía. Con pocas excepciones, los tumores localizados y de bajo grado son diploides. Los de alto grado son, en un alto porcentaje, aneuploides. En los de grados intermedios, los patrones de ADN son más variables y existen con frecuencia formas tetraploides (4n)(29). Aunque no todos los autores hacen diferencias entre aneuploidía y tetraploidía, en el carcinoma de próstata, esta distinción es útil, ya que la aneuploidía no tetraploide, parece asociada a un mayor grado de agresividad en el comportamiento tumoral (29).

En pacientes con **enfermedad localizada**, la cuantificación de ADN permite estratificar, según algunos autores, en grupos de alto y bajo riesgo, mientras otros no reconocen a ésta mayor valor que el grado histológico. La controversia en los resultados se explica, en parte, por las diferentes modalidades terapéuticas utilizadas y distintas metodologías de análisis (29-31). Entre pacientes tratados con prostatectomía radical y linfadenectomía pélvica, la presencia de aneuploidías no empeora significativamente la supervivencia (32). Montgomery demuestra, sin embargo, una asociación estadísticamente significativa entre progresión de la enfermedad y aneuploidía (30).

La aportación de la citometría de flujo en este tipo de pacientes no es, por tanto, muy clara en cuanto a su valor como factor pronóstico independiente y debemos citar que la mayoría de los autores reconocen la vigencia de la gradación histológica.

En los pacientes con neoplasia localizada y que son sometidos a radiación, se ha intentado, sin éxito, predecir, de acuerdo a los histogramas obtenidos, la respuesta a la radioterapia (32,33). Se ha constatado en estos casos,

la mayor incidencia de poblaciones aneuploides después de la radiación, sin que se haya ofrecido una explicación a este hecho. En los que han seguido terapia endocrina, el patrón diploide es mucho más frecuente en pacientes con supervivencia superior a 5 años.

En los enfermos en **estadio C**, sí se ha encontrado una clara asociación entre aneuploidía y recidiva y supervivencia. En este grupo, tanto los tumores aneuploides como los tetraploides mostraron peor pronóstico. Los mismos resultados se han obtenido en pacientes con metástasis en **estadio D1** (29).

Tribukait y cols, en su trabajo sobre pacientes inicialmente no tratados, recoge datos similares en las correlaciones estadísticas, pero además, muestra una alta tasa de transformaciones del patrón de ploidía, que sigue, habitualmente, el patrón diploide-tetraploide-aneuploide, y también, habitualmente, con progresión en el grado histológico (19,34).

En resumen, la aportación de la citometría de flujo en el manejo de los pacientes con cáncer de próstata, no se encuentra totalmente aclarada, aunque sí existen datos de buena correlación entre la ploidía, el grado histopatológico y el estadiaje clínico. En la actualidad, creemos que no se puede considerar el análisis de ADN como un factor pronóstico independiente.

IV.3. Carcinoma de células renales

El primer hallazgo relevante en la cuantificación del ADN con citometría de flujo es la gran heterogeneidad en diferentes áreas del tumor, lo que obliga a un amplio muestreo del mismo (35).

La incidencia de tumores aneuploides en las diferentes series oscila entre el 45% y el 74% (35,36,37). Según los resultados publicados en la literatura, no está claro que exista una correlación entre citometría de flujo y parámetros clásicos como grado de Furhman, estadio de Robson y clasificación TNM (38,39). Sin embargo, sí existe correlación estadísticamente significativa entre ploidía y supervivencia (40).

Ljunberg y cols. (36), realizaron un análisis de tumores con metástasis, estudiando muestras del tumor original y de las metástasis. El 53% de los tumores primarios mostraron alguna población celular aneuploide. En las metástasis observaron un 69% de aneuploidías. Entre los tumores primarios que resultaron diploides, se encontraron un 60% de aneuploidías en las metástasis. Por el contrario, en los tumores aneuploides, el 23% de sus metástasis, mostraron un patrón diploide. Estos datos, además de confirmar la gran heterogeneidad que muestra el carcinoma de células renales, permite hacer algunas observaciones en relación con el pronóstico. En el estudio estadístico llevado a cabo en este trabajo, se comprueba que el parámetro con mayor valor es la ploidía de la lesión metastásica. Los pacientes con histogramas diploides en las metástasis, lograron una supervivencia de 31 meses, mientras aquellos con aneuploidías sólo alcanzaban una supervivencia media de 11,5 meses.

Las conclusiones anteriormente citadas no son compartidas por otros autores (37), que no reconocen asociación entre la ploidía y supervivencia. Recientemente, se ha publicado un estudio (41) en el que se realizaba un análisis bivariante, considerando cantidad de ADN y capacidad de incorporación de bromodeoxiuridina (BrDU). La BrDU es un análogo de la timidina, y por tanto, es captada por aquellas células que se encuentran en fase de síntesis activa de ADN. La cuantificación de estas células informa sobre la verdadera capacidad proliferativa de la neoplasia. Los resultados del citado estudio, muestran una mejor correlación de los niveles de BrDU con los parámetros pronósticos clásicos que el estudio aislado de la ploidía. Curiosamente, no se encontraron diferencias significativas entre tumores diploides y aneuploides en la incorporación de BrDU. El corto período de seguimiento de los pacientes de este estudio, no permite asegurar si el modelo de análisis bivariante propuesto aporta efectivamente una información pronóstica adecuada.

Un tema controvertido en la patología renal neoplásica es la existencia o no de los adenomas. Convencionalmente, se considera adenoma a aquel tumor de células renales menor de 3 cms., basándose en el hecho de que los tumores de este tamaño, excepcionalmente, metastatizan. Con el desarrollo de las técnicas de imagen, cada vez más sofisticadas, se descubren frecuentemente tumores de esta categoría, en los que es deseable conocer su posible comportamiento biológico.

Ellis y cols. (42), han publicado recientemente un estudio realizado sobre 26 tumores de menos de 3 cms procedentes de extirpaciones quirúrgicas, constituyendo la serie más amplia recogida en la bibliografía. En sus resultados, aparece una incidencia de aneuploidías de 32% muy próxima a la descrita en los tumores de más de 3 cms. La fase S de los tumores aneuploides también se encuentra anormalmente elevada y muy próxima a la de los considerados carcinomas. Estos autores concluyen que se ha de abandonar el término de adenoma y considerar a estos tumores potencialmente malignos. No se hace referencia en el citado trabajo al comportamiento biológico de los tumores sujetos de estudio, que fueron sometidos a un seguimiento corto, con lo que, no parece posible, en el momento actual, adoptar actitudes terapéuticas diferentes en los tumores de menos de 3 cms de diámetro basándose en el patrón de ploidía.

En los oncocitomas considerados tradicionalmente benignos, los estudios publicados no aclaran tampoco el valor de la citometría de flujo como parámetro predictivo de evolución, habiéndose encontrado un 10% de aneuploidías en tumores con seguimiento largo y que se han comportado de forma benigna (43).

En resumen, se puede concluir que en el carcinoma de células renales, el estadiaje en el momento del diagnóstico, sigue siendo el dato más valioso, desde el punto de vista pronóstico. Sin embargo, se puede afirmar que la ploidía del tumor primario se correlaciona con el desarrollo de enfermedad metastásica y la ploidía de las metástasis se correlacionan con la supervivencia.

IV.4. Tumores testiculares

Existen pocos estudios de tumores testiculares con citometría de flujo. En los tumores de células germinales, los resultados publicados coinciden en una incidencia muy elevada de aneuploidías, que oscila entre el 70% y el 95%. (44-46). Esta proporción de tumores, con cantidad anormal de ADN, hace que no pueda ser considerado este parámetro como de interés pronóstico (45). Algunos autores consideran la fracción proliferativa (porcentaje de células en fase S) como dato discriminatorio, ya que aquellos pacientes con fase S elevada mostraron una supervivencia significativamente menor.

La citometría de flujo se muestra potencialmente eficaz en la detección de carcinoma «in situ» de células germinales. Nagler y cols. (47) en una serie de 25 pacientes, a los que se realiza biopsia por aspiración del testículo para estudio de infertilidad mediante cuantificación de ADN, detectan un caso de carcinoma «in situ» por la presencia de picos anómalos en el histograma. Anteriormente, se había intentado la detección precoz de carcinoma «in situ» en pacientes de alto riesgo (esterilidad, tumor contralateral, etc) aplicando la citometría de flujo al análisis de semen (48). Demostraron aneuploidía en 50% de los pacientes con carcinoma «in situ». La posibilidad de falsos negativos con esta técnica, hace que no sea un buen sistema de rastreo de carcinoma «in situ» de células germinales, si bien se trata de una serie muy corta, cuyos resultados deberían ser comprobados.

IV.5. Tumores suprarrenales

Como en otros órganos endocrinos, la clasificación de los tumores de la corteza suprarrenal en benignos y malignos, puede ser difícil basándose únicamente en criterios de atipia citológica. Por ello, se ha intentado la catalogación de los mismos utilizando la citometría de flujo, tanto para el diagnóstico, como para intentar predecir el comportamiento biológico.

Como en el carcinoma de células renales, se ha demostrado una gran heterogeneidad en la carga de ADN en poblaciones celulares tumorales. Prácticamente, todos los carcinomas mostraron una o más poblaciones aneuploides. En los adenomas se describen poblaciones tetraploides, sin evidencia de aneuploides no tetraploides, por lo que algunos autores reconocen un valor diagnóstico a la citometría de flujo (49). Estas conclusiones no son completamente compartidas por otros autores, que demuestran hasta un 15% de aneuploidías en adenomas (50). Los carcinomas con poblaciones aneuploides mostraron en diferentes estudios un comportamiento más agresivo (49-51).

Recientemente, se ha publicado una serie muy amplia de feocromocitomas estudiados con citometría de flujo. En 184 casos de esta neoplasia, y analizando material incluido en parafina, los autores concluyen que los tumores aneuploides (incluyendo en esta categoría, los tetraploides) son más frecuentes en los casos familiares o asociados a otras neoplasias endocrinas. El 32%

de estos pacientes mostraron progresión de la enfermedad o muerte por el tumor. Todos los tumores con recurrencia o que ocasionaron la muerte del paciente eran aneuploides. Por el contrario, los tumores diploides, siguieron un curso clínico excelente tras la cirugía. Basándose en estos resultados, se propone incorporar la cuantificación de ADN por citometría de flujo al estudio rutinario de estos pacientes (52).

BIBLIOGRAFIA

1. Riley, R. S.; Mahin, E. J.: «Flow cytometry. Clinical applications. Seattle, Washington». *ASCP Workshop Pt9072*. 1989.
2. Koss, L. G.; Czerniak, B.; Herz, F.; Wersto, R.: «Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal». *Hum. Pathol.*, 1989; 20:528-548.
3. Wheelless, L. L. Jr.: «Flow instrumentation and data analysis». In *Diagnostic Flow Cytometry*. Coon, J. S.; Weinstein, R. S.; Williams & Wilkins. Baltimore 1991. pp 17-34.
4. Vindelov L. L.: «Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and staining of nuclei». *Virchows Arch. B Cell Path.*, 1977; 24:227-242.
5. Hedley, D. W.; Friedlander, M. L.; Taylor, I. W. *et al.* «Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry». *J. Histochem. Cytochem.*, 1983; 31:1333-1335.
6. Coon, J. S.; Landay, A. L.; Weinstein, R. S.: «Flow cytometric analysis of paraffin-embedded tumors: Implications for diagnostic Pathology». *Hum. Pathol.*, 1986; 17: 435-437.
7. Frierson, H. F.: «Flow cytometric analysis of ploidy in solid neoplasms: Comparison of fresh tissues with formalin-fixed paraffin-embedded specimens». *Hum. Pathol.*, 1988; 19:290-294.
8. McCarthy, R. C.; Fetterhorf, T. J.: «Issues for quality assurance in clinical flow cytometry». *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1989; 113:658-666
9. Badalament, R. A.; Hermansen, D. K.; Kimmel, M. *et al.*: «The Sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology and voided cytology in the detection of bladder carcinoma». *Cancer*, 1987; 60:1423-1427.
10. Collste, L.; Darzynkiewicz, Z.; Traganos, F. *et al.*: Flow cytometry in cancer bladder detection and evaluation using acridine orange metachromatic nucleic acid staining of irrigation cytology specimens». *J. Urol.*, 1980; 123:478-485.
11. Giella, J. G.; Ring, K.; Olsson, C. A.; Karp, F. S.; Benson, M. C.: «The predictive value of flow cytometry and urinary cytology in the followup of patients with transitional cell carcinoma of the bladder». *J. Urol.*, 1992; 148:293-296.
12. Walther, P. J.: «The role of flow cytometry in the management of bladder cancer». *Hematology/Oncology Clinics of North America.*, 1992; 6:81-99.

13. Amberson, J. B.; Laino, J. P.: «Image cytometric deoxyribonucleic acid analysis of urine specimens as an adjunct to visual cytology in the detection of urothelial cell carcinoma». *J. Urol.*, 1993; 149:42-45.
14. Norming, U.; Nyman, C. R.; Tribukait, B.: «Comparative histopathology and deoxyribonucleic acid flow cytometry of random mucosal biopsies in untreated bladder carcinoma». *J. Urol.*, 1991; 145:1164-1168.
15. Norming, U.; Tribukait, B.; Gustafson, H.; Nyman, C. R.; Wang, N.; Wijkstrom, H.: «Deoxyribonucleic acid profile and tumor progression in primary carcinoma in situ of the bladder: A study of 63 patients with grade 3 lesions». *J. Urol.*, 1992; 147:11-15.
16. Gustafson, H.; Tribukait, B.; Esposti, P. L.: «The prognostic value of DNA analysis in primary carcinoma in situ of the urinary bladder». *Scand. J. Uro. Nephrol.*, 1982; 16:141-146.
17. De Vere White, R. W.: «The predictive value of flow cytometric information in the clinical management of stage O (ta) bladder cancer». *J. Urol.*, 1988; 139:279-282.1988.
18. Tribukait, B.; Gustafson, H.; Esposti, P. L.: «The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumours: A study of 100 untreated cases». *Br. J. Urol.*, 1982; 54:130-135.
19. Tribukait, B.: «Flow cytometry in assessing the clinical aggressiveness of genitourinary neoplasms». *World J. Urol.*, 1987; 5:108-122.
20. Farsund, T.; Hoestmark, J. G.; Laerum, O. D.: «Relatio between flow cytometric DNA distribution and pathology in human bladder cancer». *Cancer.*, 1984; 54:1771-1777.
21. Tachibana, M.; Deguchi, N.; Baba, S.; Jitsukawa, S.; Hata, M.; Tazaki, H.: «Multivariate analysis of flow cytometric deoxyribonucleic acid parameters and histological features for prognosis of bladder cancer patients». *J. Urol.*, 1991; 146:1530-1534.
22. Blomjous, E. C.; Schiper, N. W.; Baak, J. P. *et al.*: «The value of morphometry and DNA flow cytometry in addition to classic prognosticators in superficial bladder carcinoma». *Am. J. Clin. Pathol.*, 1989; 91:243-248.
23. Di Silverio, F.; Von Heland, M.; De Bernardinis, E. *et al.*: «Prognostic role of flow cytometry in superficial bladder cancer». *Eur. Urol.*, 1992; 21(Suppl): 22-25.
24. Fradet, Y.: «Markers of prognosis in superficial bladder cancer». *Sem. Urol.*, 1992; 10:28-38.
25. De Vere White, R. W.: «Flow cytometry: Role in monitoring transitional cell carcinoma of bladder». *Urology*, 1986; 28:15-20.
26. Klein, F. A.: «Flow Cytometry deoxyribonucleic acid determinations and cytology of bladder washings: practical experience». *J. Urol.*, 1988; 139:275-288.
27. Wheelless, L. L.; Badalament, R. A.; De Vere White, R. W.; Fradet, Y.; Tribukait, B.: «Consensus review of the clinical utility of DNA cytometry in bladder cancer». *Cytometry*, 1993; 14:4787-479.

28. Deitch, A.; De Vere White, R. W.: «Flow cytometry as a predictive modality in prostate cancer». *Hum. Pathol.*, 1992; 23:352-359.
29. Ritchie, A. W. S.; Layfeld, L. J.; Hannah, J. *et al.*: «Relationship of DNA content to conventional prognostic factors in clinically localized carcinoma of the prostate». *Br. J. Urol.*, 1988; 62:254-260.
30. Montgomery, B. P.; Nativ, O.; Blute, M. L. *et al.*: «Stage B prostate adenocarcinoma». *Arch. Sug.*, 1990; 125:327-331.
31. Falkner, U. G.: «Metodologic sources of errors in image and flow cytometric DNA assessments of the malignancy potential of prostatic carcinoma». *Hum. Pathol.*, 1992; 23:360-367.
32. Rainwater, L. M.; Zinckle, H.: «Radical prostatectomy after radiation therapy for cancer of the prostate: feasibility and prognosis». *J. Urol.*, 1988; 140:1455-1459.
33. De Vere White, R. W.; Deitch, A.; Myer-Haas, G. *et al.*: «DNA ploidy in irradiated prostate». *AUA abstract 52.*, 1990, 201.
34. Di Silverio, F.; D'Eramo, G.; Caponera, M. *et al.*: «The prognostic value of DNA content in patients with prostatic carcinoma». *Eur. Urol.*, 1992; 21(Suppl 1):92-95.
35. Ljunberg, B.; Stenling, R.; Roos, G.: «DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity». *Cancer*, 1985; 56:503-508.
36. Ljunberg, B.; Stenling, R.; Roos, G.: «Tumor spread and DNA content in human renal cell carcinoma». *Cancer Res.*, 1988; 48:3165-3167.
37. Chin, J.; Pontes, J.; Frankfurt, O.: «Flow Cytometry deoxyribonucleic acid analysis of primary and metastatic human renal cell carcinoma». *J. Urol.*, 1985; 133:582-585.
38. Currin, S. M.; Lee, S. E.; Walther, P. J. *et al.*: «Flow cytometry assessment of deoxyribonucleic acid content in renal adenocarcinoma: Does ploidy status enhance prognostic stratification over stage alone?». *J. Urol.*, 1990; 143:458-463.
39. Lanigan, D.; McLean, P. A.; Murphy, D. M. *et al.*: «Ploidy and prognosis in renal carcinoma». *Br. J. Urol.*, 1993; 71:21-24.
40. Di Silverio, F.; Galluci, M.; Flammia, G. P. *et al.*: «Biological and clinical implication of cellular DNA content in renal cell carcinomas». *Eur. Urol.*, 1992; 21(suppl 1):43-47.
41. Tachibana, M.; Deguchi, N.; BABA, S. *et al.*: «Bromodeoxyuridine and deoxyribonucleic acid bivariate analysis in human renal cell carcinoma. Does flow cytometry determination predict malignant potential or prognostic of patients with renal cell carcinoma». *Am. J. Clin. Pathol.*, 1992; 97 (Suppl 1):S38-S47.
42. Ellis, W. J.; Bauer, K. D.; Oyasu, R. *et al.*: «Flow cytometry analysis of small renal tumors». *J. Urol.*, 1992; 148:1774-1777.
43. Jow, W. W.; Zeid, M. Y.; Cowan, D. *et al.*: «Renal oncocytoma: long-term follow-up and flow cytometric DNA analysis». *J. Surg. Oncol.*, 1991; 46:53-59.
44. Sledge, G. W Jr.; Eble, J. N.; Roth, J. B. *et al.*: «Flow cytometry derived DNA content of the primary lesions of advanced germ cell tumours». *Int. J. Androl.*, 1987; 10:115.

45. Oostehuis, J. W.; Castedo, S. M. M. J.; De Jong, B. *et al.*: «Ploidy of primary germ cell tumours of the testis». *Lab. Invest.*, 1989; 60:14-21.
46. Sledge, G. W. Jr.; Eble, J. N.; Roth, J. B. *et al.*: «Relation proliferative activity to survival in patients with advanced germ cell cancer». *Cancer Res.*, 1988; 48:3864-3868.
47. Nagler, H. M.; Kaufman, D. G.; O'Toole, K. M.; Sawczuk, I. S.: «Carcinoma in situ of the testes : diagnosis by aspiration flow cytometry». *J. Urol.*, 1990; 143:359-361.
48. Giwercman, A.; Claussen, O. P.; Skakkebaek, N. E.: «Carcinoma in situ of the testis: aneuploid cells in semen». *Br. Med. J.*, 1988; 296:1762-1764.
49. Klein, F. A.; Kay, S.; Ratliff, J. *et al.*: «Flow cytometric analysis of ploidy and proliferations patterns of adrenal neoplasms: an adjunct to histological classification». *J. Urol.*, 1985; 134:862-866.
50. Rainwater, L. M.; Young, W. F. Jr.; Farrow, G. M.; Grant, C. S.; Van Heerden, J. A.; Lieber, M. M.: «Flow cytometric analysis of deoxyribonucleic acid ploidy in benign and malignant aldosterone-producing neoplasms of the adrenal gland». *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1989; 168: 491-496.
51. Camuto, P.; Schinella, R.; Gilchrist, K.; Citrin, D.; Fredrickson, G.: «Adrenal cortical carcinoma: Flow cytometric study of 22 cases, an ecog study». *Urology*, 1991; 37:380-384.
52. Nativ, O.; Grant, C. S.; Sheps, S. G.; O'Fallon, J. R.; Farrow, G. M.; Van Heerden, J. A.; Lieber, M. M.: «The clinical significance of nuclear dna ploidy pattern in 184 patients with pheocromocytoma». *Cancer*, 1992; 69:2683-2687.