

LA CITOMETRIA DE IMAGEN AUTOMATIZADA EN EL TUMOR DE VEJIGA (*)

AUTOMATED IMAGE CITOMETRY OF URINARY BLADDER TUMORS

Dr. Heinrich Gerhard Neufeld Siemens(**)

Summary *The present work demonstrates, through the review of the literature and the findings from the eleven cases studied, that the study of DNA content in tumoral cells could be a new and relevant tool to improve both the precision in the diagnostic and the knowledge on the evolution of bladder tumors. It was demonstrated that the procedure for DNA analysis is not so difficult, requiring a relatively simple equipment. Moreover, there is a great advantage in DNA quantitation -in its different modalities- on cell samples obtained from the urine. Such results along with those from biopsy will give a valid prognosis in order to offer the appropriate treatment for bladder tumors.*

Resumen

En este trabajo se demuestra, a través del examen exhaustivo de la bibliografía consultada y de la experiencia recogida en los once casos que constituyen nuestra casuística, que el estudio del ADN de las células tumorales sería un nuevo e importante aporte a la precisión diagnóstica y al conocimiento futuro de la evolución de cada uno de los tumores de vejiga en particular. El procedimiento para el estudio del ADN celular no sería demasiado difícil y sólo es necesario contar con un equipamiento relativamente sencillo. A esto se suma la facilidad de poder determinar el

(*) Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Médicas (U.N.A.), 1993.

(**) Jefe del Departamento de Servicio de Clínica Urológica, Hospital de Clínicas, F.C.M., U.N.A.
Instructor de la Cátedra de urología, F.C.M., U.N.A.
Jefe del Departamento de Quimioterapia Urológica, Cátedra de Urología, F.C.M., U.N.A.

contenido de ADN -en sus diferentes modalidades- en muestras celulares obtenidas por simple micción, que junto con el resultado de la biopsia da un parámetro pronóstico válido para ofrecer un tratamiento más adecuado en los casos particulares de tumores de vejiga.

Introducción

La citometría de imagen automatizada en citopatología ha demostrado ser un método confiable para establecer los valores morfométricos y densitométricos de células cancerosas y para la detección de cadenas de ADN después de la hibridización *in situ*, con el fin de realizar un buen diagnóstico y pronóstico del paciente.

El estudio por citometría permite utilizar material archivado para análisis retrospectivo con especial referencia al curso de la enfermedad y a las características de ploidía del tumor. Hasta hace poco, en todos los materiales incrustados en parafina no controlaban las variaciones en fijación, preparación y teñido como se hace en el material fresco. Es así que, aquellas leves desviaciones de la línea madre del tumor y del valor diploide pueden ser difíciles de detectar. La citometría de imágenes automatizadas hace posible la detección de tales células anormales raras.

La cirugía de vejiga es una de las cirugías más traumáticas ya que las incisiones para el efecto causan profundo daño en los tejidos, en términos de disrupción muscular, e importante dolor post-operatorio.

La toma de decisión para una cirugía de esta envergadura radica en un buen diagnóstico y pronóstico de los pacientes y en la garantía, según el grado de ploidía encontrada en biopsias de tejido, o en la citología de orina espontánea del material fresco.

Antecedentes históricos y revisión bibliográfica

C. J. Cornelisse y H. J. Tanke (10) publicaron en 1991 un interesante resumen del desarrollo histórico de la citometría de flujo y sus aplicaciones en medicina, y de allí destacamos algunos hechos. El desarrollo del equipo de citometría de flujo se inició en los años 40 con la construcción de sistemas destinados a la cuenta de partículas en suspensión, tales como células sanguíneas.

Un paso fundamental en la instrumentación del análisis de citometría de flujo ha sido la introducción de microcomputadores para el manejo de imágenes y los procedimientos de manipulación y control. Los citómetros de flujo han pasado de ser complicados instrumentos de investigación a constituirse en instrumentos laboratoriales de fácil manejo y de uso creciente.

La citometría de flujo se está empleado en aplicaciones laboratoriales de importancia clínica tales como las determinaciones de subpoblaciones linfocitarias o los análisis muestras de citología e histología tumorales por el contenido de ADN.

En 1976, C. Lazar y V. Mares (27) publicaron los resultados de estudios citológicos e histopatológicos practicados en 42 muestras de tumores epiteliales de vejiga. Examinaron la correlación entre el número modal de cromosomas, la frecuencia de estructuras cromosómicas aberrantes y el grado de malignidad histológica (anaplasia celular e invasión de la pared vesical). La tasa proliferativa fue también determinada en los tumores analizados. En todos los tumores epiteliales estudiados se comprobó que cuanto mayor era la malignidad del tumor, mayor era el valor modal del número de cromosomas, y mayor la frecuencia de anomalías cromosómicas. La tasa de proliferación de tumores poliploides fue significativamente mayor cuando esta se comparó con la de los tumores diploides; la presencia de una población mitológica diploide así como la de alteraciones estructurales de los cromosomas en un tumor con bajo grado de malignidad demostrado histológicamente puede tener un significado pronóstico.

H. Gustafson y col. (17), para evaluar el valor pronóstico de los estudios de cuantificación del ADN, publicaron en 1982 los resultados de un estudio realizado en 20 pacientes con carcinoma primario in situ de vejiga, por análisis de ADN por citometría de flujo encontrándose en todos los casos aneuploidia, es decir patrones anormales del contenido de ADN. Como una constante, las poblaciones de células aneuploides correspondían a la región correspondiente a las di-tetraploides, equivalente a un rango de 70 a 92 cromosomas en los núcleos de las células tumorales. En 7 casos más fue encontrada una línea celular aneuplóidica. La totalidad de estos casos mostró progresión de la enfermedad en los dos años subsiguientes. Fue determinada adicionalmente -por análisis de ADN por citometría de flujo- la tasa de proliferación de los tumores y el número relativo de células aneuplóidicas en cada muestra de células tumorales. En los casos de evolución progresiva se encontraron valores elevados para estas dos variables.

En un estudio más amplio, Gustafson y col. (18) publicaron en 1982 los resultados sobre doscientos veintinueve pacientes con tumores de vejiga de grado 1-2, según la clasificación de la OMS, todos pertenecientes a las categorías Ta o T1 (UICC) y quirúrgicamente tratados. Todos los pacientes fueron seguidos clínicamente y por análisis de ADN por citometría de flujo. Los tumores fueron caracterizados según su perfil del contenido ADN; 175 casos mostraban un patrón diploide y 55 mostraron aneuploidía. El tiempo promedio de seguimiento con dicho método fue de 2.6 años, durante el cual en 19 pacientes se vio progresión del tumor y 11 fallecieron. No hubo progresión de los tumores en los 175 pacientes que presentaron patrones diploides.

Se encontró que los tumores progresivos se relacionaron siempre con patrones aneuploides, y que el grado de ploidía determinaba la frecuencia de la progresión: mientras el 50% de los casos con tri e hipotetraploidía mostraron progresión, solamente el 10% de los tumores con tetraploidía fueron progresivos. El grado de ploidía en 33 casos de tumores aneuplóidicos recurrentes fue en general constante, y un considerable grado de consistencia fue encontrado en el número de células en fase S expresando propiedades proliferativas. Esto indica que los tumores superficiales de vejiga pueden ser bien caracterizados por sus perfiles de ADN, esto es, el grado de ploidía y el patrón de proliferación.

Gustafson y col. (18) examinaron en 1982 los resultados del análisis de ADN por citometría de flujo (FCM) de muestras provenientes de veinte pacientes con carcinoma primario in situ de vejiga. Encontraron aneuploidía en todos los casos. Como una constante la aneuploidía fue hallada en la zona de tri y tetraploidía, correspondiendo a 70-92 cromosomas en el núcleo de las células tumorales. En 7 casos se detectó más de una línea de células aneuploídicas, y todos ellos mostraron progresión de la enfermedad tumoral en 2 años. Por FCM fue posible determinar la tasa de proliferación de los tumores, y el número relativo de células aneuploídicas en cada muestra de células tumorales. En los casos progresivos se encontraron valores elevados para estas dos variables.

Como parte de los trabajos del grupo antes referido, Tribukait y col. (32) publicaron en 1982 los resultados del diagnóstico practicado sobre material celular de 100 casos de tumores vesicales de diagnóstico reciente, que fueron estudiados por análisis de ADN por FCM. Se determinó, a partir de histogramas del contenido de ADN, el grado de ploidía y el porcentaje de células en la fase S para caracterizar el perfil de proliferación de los tumores. El resultado fue relacionado con las categorías del tumor y el grado histopatológico de los tumores. Aproximadamente, el 40% de los tumores T1 mostraron perfiles de ADN aneuploídicos, mientras que en otras categorías la aneuploidía fue encontrada en casi todas las células. Con pocas excepciones los tumores de grado 1 fueron encontrados como diploides y tumores de grado 3 como aneuploides. En los tumores de grado 2, 2/3 diploides y 1/3 aneuploides. En el grupo de tumores aneuploídicos, los casos tetraploídicos mostraron las menores características de malignidad, a juzgar por los grados histológicos y las categorías de los tumores. Los tumores aneuploídicos no-tetraploídicos aumentaron en malignidad a medida que se desviaban de la de tetraploidía. Según los autores, esto puede explicarse por observaciones de la existencia de correlación positiva entre el grado de ploidía y el grado de proliferación. La proliferación pasaba de 10% en los tumores tetraploides a 20% en aquellos triploides y pentaploides.

Un avance relevante en esta campo corresponde al grupo liderado por

H.J. Tanke (31), quien en 1983 examinó la posibilidad de realizar análisis automático de preparaciones citológicas de vejiga a fin de mejorar la detección de malignidad. Este mejoramiento estaba dirigido a lograr mayor objetividad, sensibilidad y especificidad en los análisis. Se estudiaron preparaciones realizadas a partir de células evacuadas espontáneamente con la orina, coloreadas cuantitativamente para detectar ADN y proteínas, y analizadas mediante un sistema televisivo controlado por computador (LEYTAS). La clasificación de las láminas se basó en la presencia de células con contenido de ADN aumentado o cromatina oscura. Esas células fueron detectadas automáticamente por el sistema LEYTAS y almacenadas en memoria de imágenes para una evaluación visual posterior. En el proceso de evaluación fueron eliminados automáticamente los artefactos tales como suciedad, superposición de núcleos, etc. Las preparaciones que contenían más de 0.1% de núcleos anormales fueron automáticamente, clasificadas como positivos (interacción no humano). Una segunda clasificación fue realizada después de analizar las imágenes en memoria para eliminar eventualmente artefactos detectados. La primera clasificación completamente automatizada resultó con un 33% de falsos positivos y 2% de falsos negativos, usando como referencia muestras citológicas con teñido convencional clasificadas histológicamente. Sin embargo, después de una eliminación visual rápida de los artefactos de las imágenes de memoria, los falsos positivos se dedujeron a solo 12%. Estos resultados reforzaron el concepto de que el análisis automatizado de muestras de vejiga para detectar malignidad es factible. Más aún, dado que el análisis automatizado resulta en células objetivamente seleccionadas, la investigación de dichas células proporcionaría información de utilidad pronóstica y terapéutica.

En 1986, Devonec y col. (11) examinaron el contenido de ADN en 72 muestras provenientes de tumores de vejiga, y en 20 muestras de vejigas sanas empleando citometría de flujo. La reproductibilidad de las medidas de ADN fue verificada sistemáticamente mediante la comparación con tres controles: timocitos de ternero, hepatocitos de ratón y una mezcla de linfocitos humanos y eritrocitos de trucha. Por cada tumor o vejiga normal se procesó una muestra conteniendo solamente células uroteliales, y una segunda muestra posterior a la adición de eritrocito de trucha. En el primer grupo de pacientes con vejigas sanas el porcentaje de células uroteliales con contenido de ADN mayor que G_0 ($2N$) fue de 7.8% como promedio. En el segundo grupo de 72 tumores, 2 perfiles de ADN fueron notoriamente identificados: en el primer grupo 39/72 (55%) los perfiles de ADN fueron bimodales (asociación de un pico diploide con un pico aneuploide). La comparación de los datos de la citometría de flujo con los datos patológicos, según la clasificación de la OMS, demostraron claramente que la presencia de un pico aneuploide caracteriza un incremento en el

grado del tumor y la infiltración. En los casos de tumores de diferentes grados, 1/16 (6%) de grado 1, 7/75 (28%) de grado 2, y 25/31 (81%) de grado 3 mostraron un pico de aneuploidía, así como 11/44 (25%) de tumores Ta, 9/14 (64%) de T1, 5/6 (83%) de T2 y 8/8 (100%) de los tumores T3. La demostración de la presencia de un pico de aneuploidía por citometría de flujo, particularmente en el grupo de pacientes que no presentaba tumores Ta Infiltrados (11/44 en estas series), podría conducir a un seguimiento más cercano de estos pacientes de alto riesgo o sería útil para la recomendación temprana de un tratamiento más agresivo y no conservativo.

Con el mismo objetivo de evaluar la capacidad pronóstica de los procedimientos diagnósticos, P. Albert y col. (1) publicaron en 1988 los resultados obtenidos a partir de una serie de 41 casos en los que el pronóstico reservado del estado T1 (A) de los tumores de vejiga era enfatizado mediante los hallazgos siguientes: 95% de tumores presentaron recurrencia, 1/3 de ellos presentó problemas terapéuticos a causa de su naturaleza difusa (15%) o por la progresión del tumor (15%). Los autores manifestaban que el riesgo de permitir que un tumor limitado progrese hacia un carcinoma extensivamente infiltrado justifica la búsqueda de un factor pronóstico que permita el reconocimiento temprano de lesiones más agresivas. En ese momento ningún elemento pronóstico podría -en opinión de los autores- indicar con certeza el curso futuro de un tumor T1. Todos los datos resultantes de exámenes histológicos detallados de las masas tumorales y de los endotelios adyacentes, obtenidos en la etapa temprana, permitirían hacer una mejor evaluación del pronóstico. La búsqueda de antígenos de superficie ABO, el análisis cromosómico y la cuantificación del ADN por citometría de flujo, se proponían en esta publicación como herramientas para la evaluación pronóstica.

En 1989, J. Assailly y col. (2) publicaron acerca de los procesadores de imágenes y los programas informáticos de aplicaciones específicas que colocaban a la citometría de barrido al nivel de otras técnicas convencionales empleadas en el examen laboratorial rutinario, particularmente en citometría urinaria y cuantificación de ADN (ploidía). La utilidad de estas aplicaciones fue ilustrada mediante el estudio de extendidos convencionales de sedimento urinario de 52 pacientes con tumor de vejiga. Los hallazgos en los extendidos fueron digitalizados, procesados y analizados estadísticamente por el analizador de imágenes Samba, que involucra el análisis y clasificación automáticos de los extendidos, de acuerdo con la ploidía. Con fines de comparación los resultados fueron comparados con seis diagnósticos citológicos convencionales para cada extendido. El Programa Samba clasifica las células en dos categorías, negativas y positivas. El 100% de las células fueron correctamente clasificadas con respecto al diagnósti-

co convencional realizado por un citólogo. El grado de malignidad de los extendidos positivos (clase positiva) asignado por el programa coincidió con aquel dado por el citólogo. Para los extendidos de la clase III, la comparación con el diagnóstico de los citólogos permitió validar la clasificación diferencial (negativo-positivo) empleando citología cuantitativa. Se demostró que la interpretación de los histogramas de los dos parámetros relacionados con el ADN, grado de ploidía e índice de proliferación, proveen excelente pronóstico en aquellos pacientes que podrían desarrollar recrudescimiento tumoral, como se observó en los seguimientos.

El ácido desoxirribonucleico como parámetro clínico para la búsqueda de la malignidad celular

Hay dos tecnologías complementarias que pueden aplicarse a la determinación del contenido total de ADN en células aisladas; el análisis de imágenes y la citometría de flujo. El objetivo de esta tesis es demostrar como éstos procedimientos, cuando se efectúan sobre una muestra representativa de una población de células tumorales, pueden ser aplicados al manejo de una enfermedad neoplásica.

Las células normales del organismo tienen una alta estabilidad genética, y dependiendo de su localización tisular específica también poseen niveles predecibles de proliferación. En la mayoría de los tejidos el número de células en estado de proliferación es normalmente inferior al 10% del total de células. Las células normales tienen una disposición consistente de sus cromosomas o cariotipo, y en Genética se refiere a ellas como células euploides. Las células somáticas humanas que no se encuentran en estado proliferativo poseen dos conjuntos de 23 cromosomas individuales. Esto corresponde a una cantidad total fija de ADN de aproximadamente 7 pg. por célula. Hay una gran variedad de terminología para tales células. Con relación al ciclo celular, ellas son células G0 en reposo. Ellas también se denominan diploides, 2C, 2N, o $DI=1$ sobre la base de su contenido de ADN.

Las células normales pueden proliferar y replicar su ADN hasta que todos sus genes se hayan replicado. Cuando esta replicación se ha completado el contenido de ADN celular es de aproximadamente 14 pg., y las células están en la fase G2 del ciclo celular. Estas células se denominan tetraploides, 4C, 4N o $DI=2$. Durante la replicación o síntesis de ADN, denominada fase S, tienen valores entre la diploidía y la tetraploidía, entre 7 pg y 14 pg., 2C y 4C, 2N y 4N, $DI=1$ y $DI=2$. Las células G2 progresan hacia la mitosis o fase M donde la célula «madre» se divide originando dos células «hijas» que son réplicas exactas una de la otra y de la célula original. Para las células normales éste es un proceso genético altamente estable. El

contenido de ADN y la disposición de los cromosomas son siempre iguales para las células diploides y las tetraploides.

La oncogénesis se debe principalmente a cambios en el genoma celular. Estos cambios pueden ser pequeños o grandes, dependiendo del grado o nivel de la anormalidad inducida. Mediante las técnicas citogenéticas se puede identificar una alteración cromosómica, por translocaciones balanceadas o desbalanceadas, delección o adición de copias de cromosomas. Estrictamente definida, una célula aneuploide tiene un número total de cromosomas el cual no es un múltiplo exacto del número de cromosomas presentes en una célula aploide normal. Corrientemente, también se utiliza el término aneuploide para describir células en las que el número proporcional de cada cromosoma es incorrecto, o si los cromosomas son anormales, aún cuando el número de cromosomas presente en la célula sea un múltiplo exacto haploide. En adelante emplearemos esta definición de aneuploidía.

El parámetro que consideramos en esta tesis es el contenido celular total de ADN. La resolución de los modernos equipos de citometría de flujo e imágenes es tal que la diferencia en el contenido total de ADN de una célula anormal (debido a alteraciones genéticas o cromosómicas) debe ser mayor que el 2% del contenido total de ADN de una célula normal para que la célula anormal pueda ser detectada con confiabilidad. Considerando dos posibles anormalidades, una en la cual la célula sufre la delección de un cromosoma y posee una copia extra de otro cromosoma, y otra en la cual una célula tiene sólo una copia adicional de un cromosoma. En el primer caso el cambio en el contenido total de ADN es de aproximadamente 0%, y en el segundo aproximadamente 2 a 3%. Estos cambios están por debajo o en el límite de los niveles actuales de detección, usando análisis de imágenes o citómetros de flujo. Por lo tanto, podemos concluir claramente el nivel confiable de detección de cantidades anormales de ADN celular total corresponde a un genoma significativamente alterado. La células que se detectan como anormales sobre la base de su contenido total de ADN son a menudo referidas como ADN aneuploide.

Es importante notar que aquellas células no detectadas como anormales sobre la base del contenido total de ADN celular todavía pueden ser aneuploides (ellas pueden tener anomalías genéticas o cromosómicas). Tales células considerando solamente el ADN total, aparecen como aploides y se las denomina ADN euploides.

En general, las células tumorales benignas, tienen un contenido de ADN y una estabilidad genética similar a la de las células euploides. Cualquier cambio genético es relativamente pequeño con relación al contenido total de ADN para esas células. Si se mide solamente el contenido de ADN o el

ID por análisis de imágenes o citometría de flujo, las pequeñas variaciones no son detectadas. En este tipo de análisis las células deben ser consideradas como euploides y las células en reposo G0 como células diploides. Hay pocas excepciones en las cuales las células de un tumor benigno muestran claramente desviaciones en el contenido total de ADN. Un ejemplo se en el 15-20% de los adenomas foliculares de tiroides que muestran un claro desvío en la cantidad total de ADN (23), donde las células G0 contienen más o menos un contenido normal de ADN de 7 pg. Estas células G0, que tienen un ID diferente de 1 son claramente ADN aneuploides.

Las células tumorales malignas pueden ser ADN euploides (contenido aparentemente normal de ADN) o ADN aneuploides. En forma general podemos establecer que los tumores ADN euploides tienen mejor pronóstico que los tumores ADN aneuploides. Por ejemplo los carcinomas papilares en la glándula tiroides (8), que son casi todos ADN euploides, tienen buen pronóstico, frente a los carcinomas pulmonares de células pequeñas (34) que son casi todas ADN aneuploides y tienen mal pronóstico. La aneuploidía de ADN detecta por imagen y citometría de flujo indica claramente un desorden genético muy desviado. Las células aneuploides carecen de la estabilidad genéticas de las células euploides. Una vez establecida la aneuploidía la composición genética de la célula puede alterarse varias veces.

El comportamiento clínico de las células malignas parece relacionarse fuertemente con su nivel de ploidía (3). La aneuploidía de ADN, cuando se detecta, es un claro indicador de un incremento de malignidad potencial. Aún cuando es detectada en tejidos no neoplásicos se la interpreta como evidencia de un cambio pre-maligno. En un intento por entender este fenómeno, se estableció un sistema de experimentación animal en el Hospital Karolinska de Estocolmo, Suecia. SE indujo aneuploidía de ADN en perros Beagle por inyección de 20-metilcolantreno, que induce la aparición de carcinoma de células escamosas. En todos los casos la aneuploidía de ADN se manifestó antes de la invasividad. Todos los perros que tuvieron invasión mostraron previamente aneuploidía de ADN (24). Si la promoción de la aneuploidía de ADN era detenida interrumpiendo las inyecciones, los perros que no tenían invasión revertían la aneuploidía de ADN en algunos casos (4). En dichos perros no ocurría invasión en el futuro.

Podemos concluir claramente de lo antedicho que la aneuploidía de ADN no indica necesariamente la condición de malignidad. Sin embargo, es una clara indicación de una perturbación genética anormal, y esto es un indicador cierto de un mayor riesgo a desarrollar una enfermedad neoplásica.

La aneuploidía puede ser observada cuando el cambio sobre el ADN celular está tan perturbado que puede ser detectado por análisis cuantitativo de ADN. Esta indicación de anomalía genética provee información adicional de valor diagnóstico y pronóstico cuando se combina con un análisis histológico de buena calidad. Por ejemplo, en el pronóstico del cáncer de mama, la ploidía de ADN cuando se considera junto con el estado de los nódulos linfáticos en el pos-operatorio y el tamaño del tumor, ofrece una posibilidad única de defender con precisión a pacientes con pronósticos buenos o malos (14, 15). En el análisis de una muestra de estupo, un citólogo puede utilizar la información sobre el contenido de ADN como un parámetro diagnóstico adicional. Las células sospechosas de pertenecer a un carcinoma pulmonar de células pequeñas pueden ser confirmadas como tales si presentan un contenido de ADN aneuploide. El análisis de aneuploidía de ADN puede ser de utilidad en situaciones en que la patología da indicios claros, o bien cuando se está ante un diagnóstico dudoso y en los que obviamente el estudio sobre el contenido de ADN debe ser analizado dentro del contexto de la patología del órgano en cuestión. Es importante entonces señalar la información que puede proporcionar el análisis del contenido de ADN en búsqueda de malignidad, diagnóstico y pronóstico de los tumores de vejiga.

Como se mencionó anteriormente, la aneuploidía de ADN es un indicio de inestabilidad genética, lo que constituye una información importantísima en la búsqueda de pacientes con lesiones premalignas en diferentes situaciones clínicas.

El análisis de ADN da información adicional en el caso de búsqueda de casos de cáncer de vejiga por causas ocupacionales en obreros expuestos a agentes carcinógenos como el naftaleno. Las dolencias de vías urinarias de carácter maligno que se desarrollan progresivamente en la pared vesical son en su gran mayoría (95%) de carácter aneuploide. Es particularmente interesante destacar que las alteraciones de aneuploidía del ADN a nivel celular anteceden al desarrollo de las lesiones vesicales malignas.

Por lo tanto, el análisis de ADN de material citológico, proveniente de lavados vesicales o de orina emitida, es un parámetro muy útil para la detección de alteraciones pre-malignas. Este análisis también permite diferenciar un proceso celular reactivo de otro pre-maligno.

Epidemiología de los tumores vesicales

El tumor de vejiga ocupa el segundo lugar entre los tumores del sistema urogenital y el primero de las vías urinarias. Causa 3,5% de las muertes por cáncer y la mortalidad general en la población es de 10 x 100.000 habi-

tantes. En el hombre de más de 70 años de edad es de 120 x 100.000 y la relación ente hombre y mujer es de 3:1 (29). En los países industrializados existe una marcada tendencia al aumento en el sexo femenino.

Los tumores de vejiga generalmente son locoregionales y multicéntricos con gran tendencia a la recidiva. El compromiso ganglionar aparece más tarde pero nunca hay que esperar para detectar ganglios invadidos, sino proceder a la extirpación locoregional del tumor según los principios de Halstãdt, porque sabemos que al existir una invasión ganglionar empeora el pronóstico final, sea cual fuere el tratamiento empleado. A pesar de todo esto el verdadero pronóstico va a estar dado en gran parte por las características celulares de la malignidad de cada uno de los tumores. Histopatologicamente el tumor de vejiga puede clasificarse en:

1. Carcinoma urotelial (o de células transicionales).
2. Carcinoma de células escamosas (células planas).
3. Adenocarcinoma (uracus) y otros carcinomas indiferenciados.
4. Tumores mesenquimales.
5. Tumores secundarios:
 - A. Infiltración por tumores extraurinarios (próstata e intestino grueso, útero, ovarios, etc).
 - B. Metástasis (estómago, mama, bronquios).

La localización más frecuente del tumor de células epiteliales es el trigono, paredes laterales y paredes posteriores, 30% cerca del meato uretral, y pueden ser solitarios o multifocales.

Clasificación de los tumores de vejiga

Según Hohenfellner y Zingg (20) los tumores vesicales se agrupan así:

UROTELIALES	95%
G1	44.2% bien diferenciados
G2-G3	30.2% medianamente diferenciados
G4	20.6% mal o no diferenciados
CELULAS PLANAS	1.7%
ADENOCARCINOMA	0.3%
NO EPITELIALES	3.0%

Grado de diferenciación de los tumores de vejiga

Según su grado de diferenciación los tumores se clasifican (29):

1. Papiloma de células transicionales. No presenta ninguna atipia celular ni mitosis. No hay más de 6 capas celulares las cuales descansan sobre tejido conectivo.
2. Carcinoma de células transaccionales (uroteliales). El grado de diferenciación resulta de la atipia celular, número de mitosis y la estructura del crecimiento papilomatoso.
 - G1: Tumor de células transicionales con simple base pediculada y crecimiento exofítico, 25% células tumorales poco diferenciadas, con poca atipia celular u mitosis.
 - G2: Es frecuentemente sésil y de base ancha, presenta más de 6 capas celulares del estroma. Más del 50% de las células son tumorales. Las atipias celulares son superiores a los del G1.
 - G3 y G4: Generalmente ulcerado y sésil con abundantes células atípicas, mitosis en un 75% y no diferenciadas con criterio citológico de gran malignidad. No hay más estructuras papilomatosas ni células gigantes y hay necrosis en el tejido tumoral. Presenta siempre infiltración de la lámina propia.
3. Carcinomas *in situ* que pueden presentar las características de cualquier grupo (G1, G2, G3 y G4) (29).

Etiología

Ludwig Rehn, en 1895 citó la relación entre tumores de células transicionales de vejiga y la exposición al colorante anilina, de ahí quedó abierta la discusión de carcinógenos de origen endógeno y exógeno. (20)

Probables carcinógenos exógenos:

1. **Industriales:** Aminas aromáticas como 2-naftilamina, bendicina, β -naftilamina, 4-amino.bifenilo, 4-nitrobifenilo, utilizadas en las industrias textiles, de cueros y latex, las cuales pueden provocar del 5 al 10% de los tumores vesicales. La proporción del riesgo varía según el tiempo de exposición, dosis ingerida, capacidad metabólica del urotelio, susceptibilidad y resistencia a la transformación neoplásica (13, 19). Según Hohenfellner (29), el tiempo de exposición a estos agentes para que se produzca la transformación maligna varía de 2 a 45 años.
2. **Tabaco:** La primera observación del mayor riesgo a presentar cáncer de vejiga en los fumadores fue reportada en el año 1950 por Lilienfeld, y estudios más recientes han confirmado esta observación (9). En los fumadores se presentan de 2 a 5 veces más frecuentes.

3. **Derivados de la fenacetina:** Esta familia de compuestos empleados como analgésicos y antipiréticos desde 1887, se asoció a cáncer de pelvis renal cuando eran consumidos en altas dosis, de 5 a 15 Kg. en 10 años (9).
4. **Edulcorantes artificiales:** Aunque los estudios realizados en animales demostraron que la sacarina y el ciclamato podían inducir la aparición de tumores vesicales, no se ha demostrado riesgo en la población general (21).
5. **Citostáticos:** Aunque se ha citado a ciertas drogas citostáticas como ciclofosfamida y clorpromacina como potenciales causantes de tumores vesicales, esta asociación no es demostrable, ya que se vio que los pacientes que recibieron ciclofosfamida y presentaron la patología tumoral había sido previamente tratados con otros quimioterápicos o radioterapia (19). La ciclofosfamida al ser administrada produce en 24 horas una neurosis seguida de rápida generación e hiperplasia lo que podría explicar la aparición de tumores por exposición reiterada (16, 26).
6. **Café:** Aunque se estableció una asociación entre el consumo de café y el cáncer vesical, ésta no es concluyente por la dificultad en discernir el riesgo actual dado el consumo frecuente de café o porque el riesgo es tan bajo que no permite ser detectado epidemiológicamente (28).

Probables carcinógenos endógenos:

1. **Irritación crónicas e infección:** Se ha observado la aparición de cáncer de células transicionales y pavimentoso en pacientes con vejiga neurogénica, sondas permanentes o con infecciones crónicas (6, 25)
2. **Esquistosomiasis:** Se observa una alta prevalencia de cáncer de vejiga en regiones donde es frecuente la infección por *Schistosoma*. El 70% de dichos casos son a células escamosas y el resto es del tipo a células transicionales. Se cree que puede llevar a la hiperplasia y metaplasia anormal generando el foco carcinogénico inicial (5).
3. **Metabolismo del triptófano:** Se observó una tasa inusual de excreción de metabolitos del triptófano en pacientes con cáncer vesical (12), pero se considera que los metabolitos del triptófano en su conjunto podrían ser carcinógenos incompletos que requieren la influencia coordinada de uno o varios factores para causar el cáncer vesical (7).

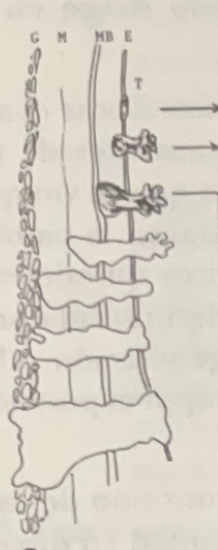
Patología y tratamiento

Los conocimientos actuales sobre la clasificación y tratamiento de los

tumores vesicales superficiales se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro N° 1

Esquema de clasificación y tratamiento de los tumores superficiales



Estadio	Clasificación	Estadio Tumoral	Tratamiento	
			Tumor primario	Tumor recidivante
T ₀	Sin catificación	-	-	-
T ₀	No hay tumor primario	-	-	-
T ₀	Carcinoma <i>in situ</i>	T ₀	RTU + quimioterapia local o BCG + control citológico	Ver T ₁
T ₁	Carcinoma no infiltrado	T, G ₁	RTU + control	a. <1 recidiva/año RTU + control b. >1 recidiva/año RTU o BCG
		T, G _{2,3}	RTU + quimioterapia + láser	RTU + quimioterapia y BCG
T ₁	Infiltran lámina propia o tejido sub-epitelial	T, G _{2,3} único	RTU + láser + quimioterapia	Quimioterapia. Si persiste citología patológica luego de 2 meses, cambiar quimioterapia
		múltiple	Láser + quimioterapia + citología exfoliativa cada 4 semanas	Recidiva temprana, citología positiva, pa. más <50 años, cirugía radical

G: grasa perivesical
M: músculo vesical
MB: membrana basal vesical
E: epitelio
T: tumor

Materiales y Métodos

Casuística

Para este trabajo de Tesis fueron seleccionados once pacientes del sexo masculino quienes habían sido sometidos a cistoprostatovesicolectomía con derivación de la orina, por un tumor superficial polifocal del tipo T1 NO MO, en el período comprendido entre los años 1982 y 1988 en el departamento de urología de la Clínica Evangelisches Johannes Krankenhaus, Bielefeld, República Federal de Alemania.

Los tumores presentaban grados de diferenciación G2 y G3, determinados a partir de preparados provenientes de fragmentos de la vejiga extirpada. Todos los pacientes fueron sometidos previamente a biopsia transuretral del tumor, así como a todos los métodos de estadificación posible como la tomografía axial computarizada (TAC), centellografía ósea, radiografía de tórax, ecografía, y exploración con extirpación ganglionar durante el acto quirúrgico.

En todos los casos se trataba de un tumor polifocal muy extenso que abarcaba todos los cuadrantes de la vejiga, pero sin comprometer la lámina propia en ninguno de los casos. Tampoco se detectaron metástasis en ganglios linfáticos a distancia.

Los tumores fueron clasificados de acuerdo con los criterios de la Unión Internationale Contre le Cáncer (UICC) según el sistema TNM (33), resultando ser del tipo T1 que significa tumor superficial transicional de la vejiga sin infiltración de la lámina propia. La estadificación N fue determinada después de extirpar los ganglios de la pelvis, la cadena obturatoria y las cadenas ilíacas externa e interna, y en caso de sospecha clínica, también los pre-aórticos. En el Cuadro 2 se consignan la identificación de los casos por número de lámina y código de bloque en forma correlativa.

Cuadro N° 2
Identificación de bloques y láminas estudiadas

<u>Código de bloque/año</u>	<u>Número de lámina</u>
20960/85	1
3446/87	2
7069/88	3
1682/85	4
103407/87	5
6446/88	6
12689/89	7
17937/86	8
18889/83	9
11270/88	10
18037/88	11

Métodos

1. Análisis citológico

El procedimiento que a continuación se menciona fue el ya descrito por Tanke y Van Ingen en 1980 (30).

2. Selección del material

A partir de bloques de material tumoral fijados en formol e incluidos en parafina se localizaron por el patólogo las porciones más ricas en células tumorales del alto grado de diferenciación y máxima infiltración. De cada bloque se cortaron secciones gruesas (50 µm de espesor), una vez confirmada

la presencia del tumor en las últimas secciones. Los cortes se conservaron en frascos de vidrio tapados, para su posterior análisis citológico.

3. Preparación del material para estudio citológico

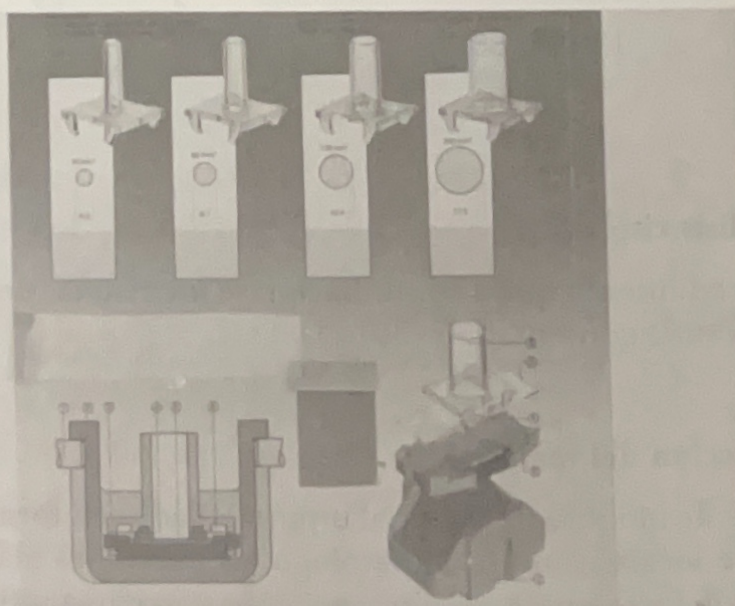
Cada sección de 50 μm de espesor se desparafinó con xilol y se rehidrató por pasaje en soluciones de etanol de riqueza decreciente, desde 100% hasta solución salina tamponada de fosfatos (PBS).

Cada sección rehidratada se trató con una solución de pronasa al 0.05% durante 30 minutos. La suspensión resultante se pasó a través de una jeringa y la reacción se detuvo por lavado con PBS y se adicionó polietilenglicol para obtener una suspensión final de células, medida su concentración en un densitómetro y diluída hasta alcanzar 20.000 células epiteliales por mililitro, posteriormente se depositaron en láminas de vidrio mediante una técnica de centrifugación especial tipo «bucket».

Las láminas secadas al aire pueden ser guardadas en refrigerador hasta el momento de la coloración. Las láminas deben ser fijadas en etanol antes de su coloración.

4. Centrifugación

Una vez que se dispone del material celular en suspensión, y a concentración adecuada -determinada por turbidimetría- se lo sedimenta mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos. Para tal fin se empleó una centrífuga de mesa provista de un cabezal especial con citocámara (Foto 1), portaobjetos y anillo sellador.



Esquema de la citocámara

5. Coloración para estudio citométrico

Para el estudio citométrico se realizó la coloración de Feulgen. Luego de fijadas la secciones, éstas fueron hidrolizadas con ácido hidroclicórico 5N a 28 grados centígrados y por períodos que variaban entre 0 a 64 minutos.

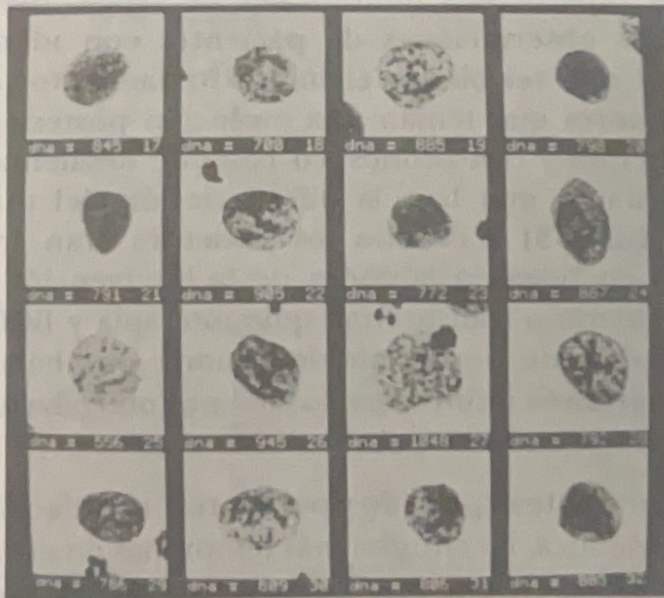
La hidrólisis fue detenida con PBS por 5 minutos seguidos por un enjuague de agua destilada. Luego las muestras fueron coloreadas con para-rosanilina-SO₂ usando una solución de acriflavina-SO₂ 4mM adquirida de Chroma y ácido clorhídrico 0.15N y 45 mM, por 15 minutos, las láminas fueron enjugadas con agua destilada por 10 minutos, con PBS por 5 minutos y dos veces con agua destilada por 5 minutos cada vez, finalmente se realizó la deshidratación con etanol al 96%, etanol al 100% (dos veces) y con xileno por dos veces, 5 minutos cada uno.

6. Selección de las células y medición del ADN:

La selección de células sobre portaobjetos de microscopio y la medición posterior del ADN de células seleccionadas se lleva a cabo con el Leyden Televisión Analysis System (LEYTAS II).

Este consiste en un microscopio automatizado, desarrollado recientemente (Autoplan, Leitz), una Modular Image Analysis Computer (MIAC, Leitz) y un procesador de coloraciones grises de 8-bit para el almacenado de objetos. Con este sistema puede ser variada la selección celular automatizada basada en intensidad y tamaño de los núcleos.

Esto quiere decir que, además de un histograma de ADN basado en una selección de células al azar (Foto 2), puede obtenerse un segundo histograma, en el cual sólo están representados los núcleos de intensidad y tamaño más elevado, unidos a un contenido más elevado de ADN. La selección de tales células se logra examinando la imagen con una combinación de coloraciones grises y por tamaños, llamada transformación «top hat».



Imágenes del monitor mostrando las células seleccionadas al azar

La aplicación de este algoritmo da por resultado la eliminación de la mayor parte de los núcleos con un contenido normal de ADN. Los objetos que pasan la transformación «top hat» son sujetos a diferentes procedimientos de rechazo de artefactos basados en el contraste y forma (esqueletonización) y por último a rasgos derivados de parámetros de energía plegada.

Los objetos no eliminados son archivados en la memoria de coloraciones grises de 8-bit. Esta opción permite la eliminación interactiva de artefactos (núcleos no sencillos), que han sido seleccionados a pesar de las rutinas de rechazo de artefactos aplicadas. Una rutina de rechazo se realiza mediante el contorneado automático de los núcleos. Si en este proceso se percibe una irregularidad la célula es eliminada de la cuenta.

Debida al almacenaje de las coordenadas de los objetos seleccionados durante el screening, puede hacerse una verificación adicional sin el microscopio, después de la reubicación. Esto asegura que el historama del ADN consista exclusivamente de células sencillas y no está contaminado con artefactos tales como dobletes, tripletes, suciedad, etc. Las absorciones, que son medidas de las imágenes archivadas, son convertidas en unidades C sobre la base de valores obtenidos de células normales presentes en el tejido.

Cada histograma representa alrededor de 300 células. La duración de medición celular de cada histograma por la computadora osciló entre 30 y 35 minutos. Para cada medición se usaron células epiteliales normales como referencia.

Estudios retrospectivos de preparados histológicos, incluidos en parafina de tumores superficiales multifocales de vejiga, fueron estudiados partiendo de las observaciones de pacientes con idéntico grado de diferenciación y que recibieron el mismo tratamiento. Estos pacientes presentaron tumores que tenían una evolución posterior a la intervención, muy diferentes y con pronóstico bastante desalentadores. Además sabiendo que cuanto más baja la diferenciación del tumor (grado de diferenciación G2, G3) y cuando los pacientes eran tratados con los procedimientos en boga en la época de la intervención (recesión de l tumor por vía abierta o transuretral, quimioterapia y BCG intracavitaria, etc.) estos arrojaban un porcentaje de tumores que hacía recidivas más frecuentes y progresivos infiltrantes, lo cual nos obligaba a realizar la cirugía redical con un pronóstico pobre.

Por lo anteriormente expresado y por las recomendaciones en los foros de discusión académica, las cirugías más tempranas en estos casos podrían mejorar el pronóstico en este tipo de tumores superficiales, con la intención de llevar a la curación total del paciente.

Ante la necesidad de buscar nuevos factores pronósticos se decidió realizar estudios retrospectivos de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) en 11 pacientes. A pesar de que la muestra estudiada podría ser considerada muy limitada, el exhaustivo tratamiento a que fueron sometidas las piezas de tejido tumoral, por los patólogos, inclusive hasta un centenar de cortes, ha garantizado el análisis de los diagramas que a continuación serán presentados y cuyo resultado de obtención y conversión a nivel citológico fue del 100% para los 11 casos.

Resultados

Para realizar el análisis de los histogramas es necesario puntualizar que un histograma normal presenta una concentración máxima en la curva en la región diploide designada como 2C.

Todas las células contadas que caigan a la derecha del histograma, a partir de la concentración 2C, son consideradas anormales (3C, 4C, 5C y más). Una célula aneuploide 5C es considerada muy anormal para tumores superficiales de vejiga, no por ello puede inferirse, que la malignidad del tumor vaya asociada al aumento progresivo de la ploidía.

Cuadro N° 3

Cómputo de células aneuploides en cada histograma realizado

Muestra	ADN > 5C	Grado de malignidad*
1	276	1
2	104	2
3	35	9
4	95	3
5	23	10
6	68	7
7	59	8
8	10	11
9	77	6
10	84	5
11	94	4

*1: relativamente alto, 11: relativamente bajo.

Citometría

A continuación se muestran los histogramas de los diferentes bloques de parafina estudiados para cada paciente. La computadora mide el número de células que presentan diferentes contenidos de ADN, por lo que puede observarse la concentración de los mismos en el histograma, el cual muestra en la abscisa el contenido de ADN y en la ordenada el porcentaje de células observadas. Además, se muestran los datos referentes a los artefactos observados así como el número de células seleccionadas por la computadora. El número de campos observados siempre parte de 400, mientras que el tiempo de lectura puede oscilar entre 30 y 35 minutos por bloque. Los tumores fueron clasificados por la frecuencia de células con contenido de ADN mayor que 5C, corregido por el número total de campos analizados.

Caso 1. En este caso se midieron 420 células, de las cuales fueron medidas 369 células con precisión, y 51 fueron rechazadas como artefactos. La mayor concentración de ADN fue del tipo tetraploide, con un número de 276 células con contenido de ADN relativamente alto, más de 5c, que ubica al tejido en un grado de malignidad de 1 con respecto a los 11 casos estudiados (Ver figura 1).

Caso 2. Doscientos ochenta y cinco células fueron medidas en esta oportunidad, de las cuales se midieron con precisión 259 y rechazadas como artefactos un total de 26. El histograma muestra una concentración de ADN del tipo tetraploide, con un número de 104 células con más de 5c, que lo ubica en un grado 2 de malignidad (Ver figura 2).

Caso 3. En este bloque se observaron un total de 271 células, midiendo 259 con precisión y descartando unas 12. El histograma muestra dos picos de concentración de contenido de ADN, de los tipos tetraploides y con un contenido mayor de 5c, que lo ubica con el grado 9 de malignidad entre todos los pacientes estudiados, con un número de 35 células (Ver figura 3).

Caso 4. En este caso fueron observadas 353 objetos de las cuales se consideran 300 células medidas con precisión y con 53 rechazos. La concentración de contenido de ADN se presenta del tipo tetraploide. La cantidad de células mayores de 5c alcanzaron un total de 95, lo cual lo ubica en el grado de malignidad de 3 en la escala de los casos estudiados (Ver figura 4).

Caso 5. Se procesaron en este caso un total de 328 células, seleccionándose con precisión 302 y rechazándose 26. El histograma presenta una concentración de contenido de ADN para el tipo tetraploide, mientras que el número de células que mayores de 5c correspondieron a 23, ubicando al tejido en un grado de malignidad de 10 en la escala de once pacientes (Ver figura 5).

Caso 6. La selección de células para este bloque contó 389 células, de las cuales 332 fueron seleccionadas y 57 rechazadas. Existe una concentración de contenido de ADN en la zona tetraploide, seguida de una concentración de células normales. En la zona referida a células mayores de 5c, se midieron sólo 68 células, lo cual ubica al bloque en un grado de malignidad 7 (Ver figura 6).

Caso 7. En un total de 384 objetos ubicados por la computadora, 337 correspondieron a células medidas con precisión y 47 fueron rechazados por artefactos. En el histograma pueden observarse tres picos de concentración de ADN bien definidos. La mayor concentración es observada en la zona tetraploide, siendo medidas en la zona de células mayor de 5c un total de 59 células, con un grado de malignidad según el esquema planteado de 8. (ver figura 7)

Caso 8. Trescientas veinticinco células fueron contadas en este bloque, medidas con precisión se consideraron 293 y 32 rechazos. El histograma presenta un elevado pico en la zona de tetraploides, seguidos en cantidad por pico en la zona de células sanas. Sólo 10 células fueron medidas en la zona mayor de 5c, lo que ubica al tejido con un grado de malignidad en la escala 11 (Ver figura 8).

Caso 9. En este caso el número de células contadas por la computadora alcanzó 363, de las cuales fueron precisamente medidas, 317, con 46 rechazos por artefactos en la muestra. El histograma presenta un franco pico de concentración de contenido de ADN en la zona tetraploide, con un número de 77 células que presentaron concentraciones mayores a 5c. El grado de malignidad del caso estudiado correspondió a 6 (Ver figura 9).

Caso 10. Trescientos cuatro células fueron contadas en este bloque, midiendo con precisión para el estudio un total de 169, sólo 35 casos de rechazo fueron observados. El histograma que presentó el bloque medido, se presenta con una concentración de contenido de ADN en la zona tetraploide, escaso número de células normas y 84 células que lo ubica en el lugar 5 de malignidad (Ver figura 10).

Caso 11. En esta caso fueron contadas 167 células, 310 medidas en forma precisa y un rechazo por presentar artefactos de 57 células. El histograma se encuentra francamente concentrado en la zona tetraploide, con una predominancia de alrededor del 20% de células sanas, no obstante, 94 células presentaron una concentración de esta pieza en el cuarto lugar (Ver figura 11).

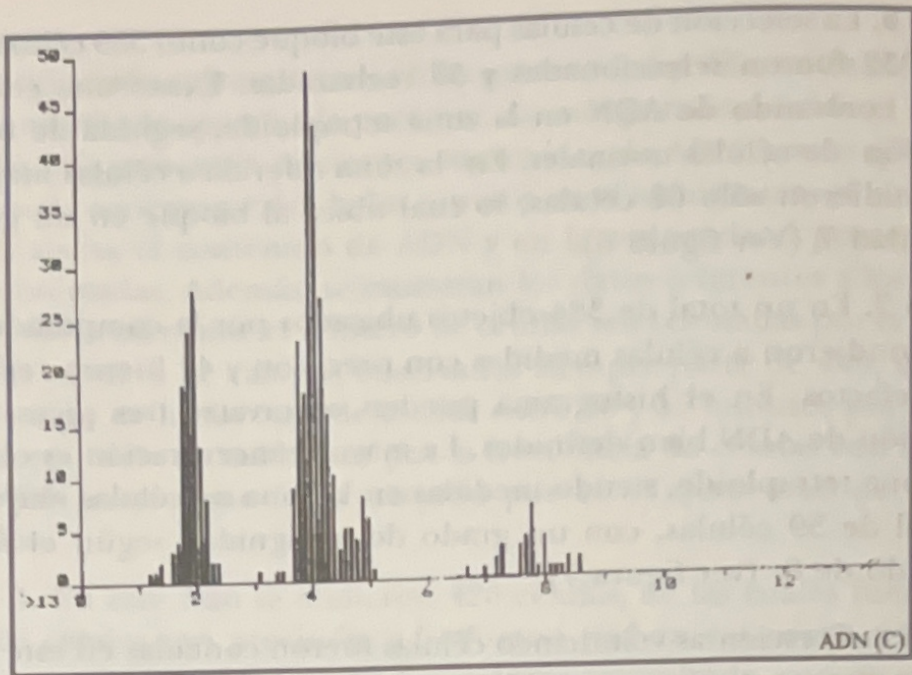


Fig. 1: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 1

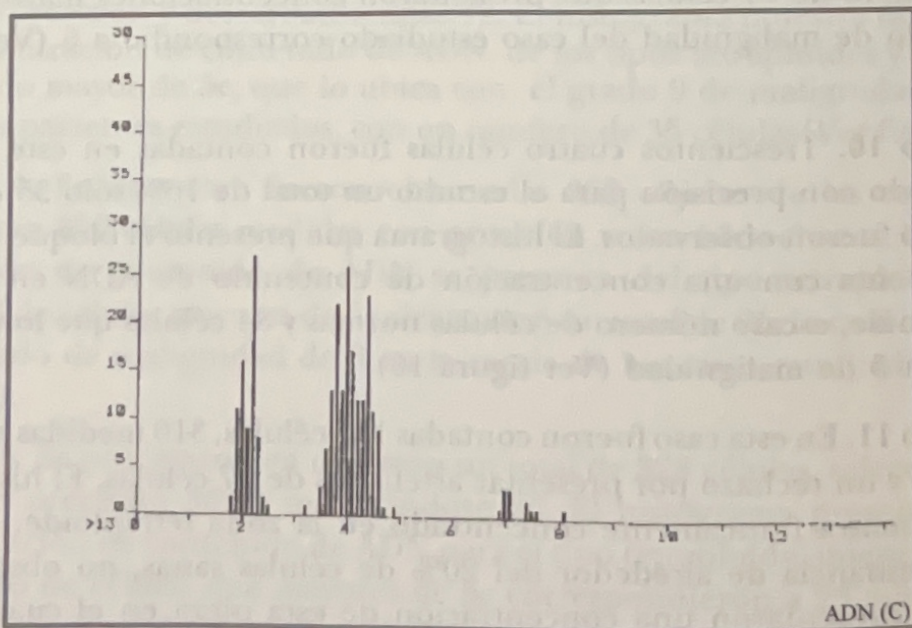


Fig. 2: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 2

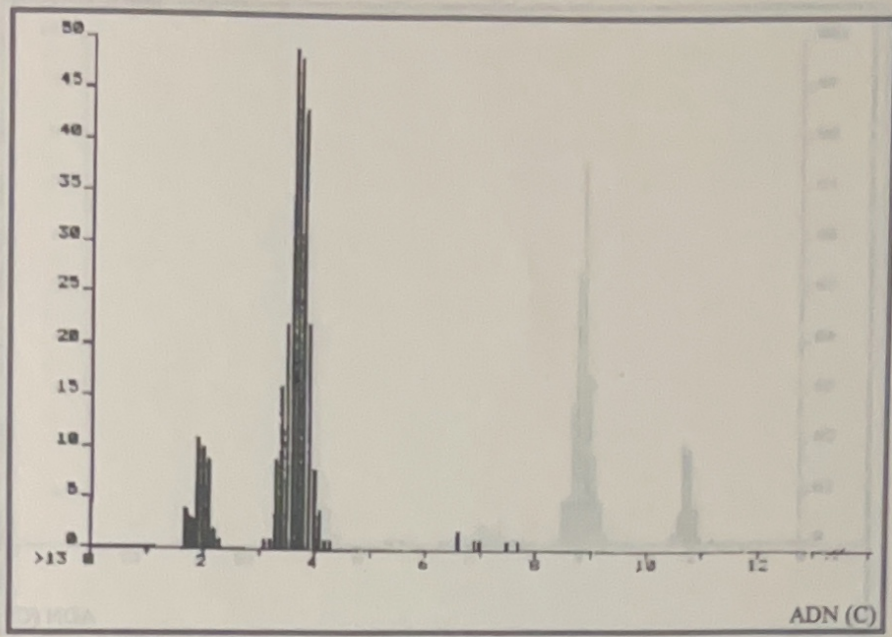


Fig. 3: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 3

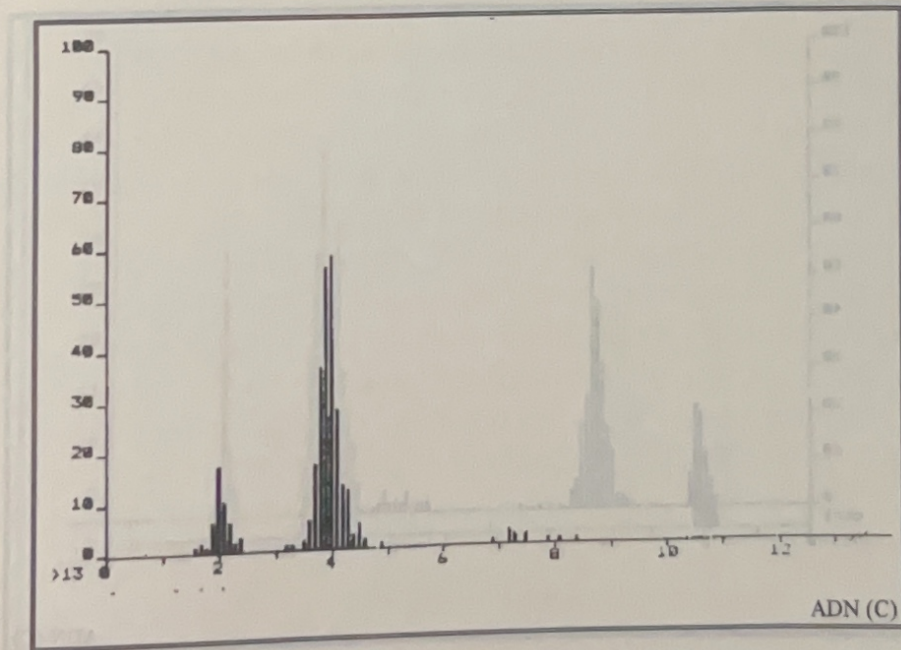


Fig. 4: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 4

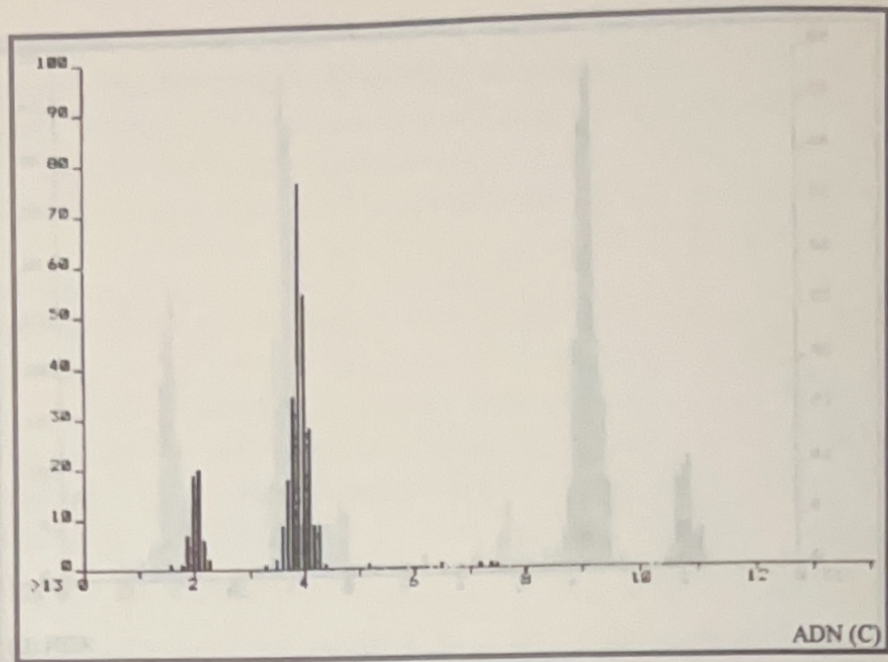


Fig. 5: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 5

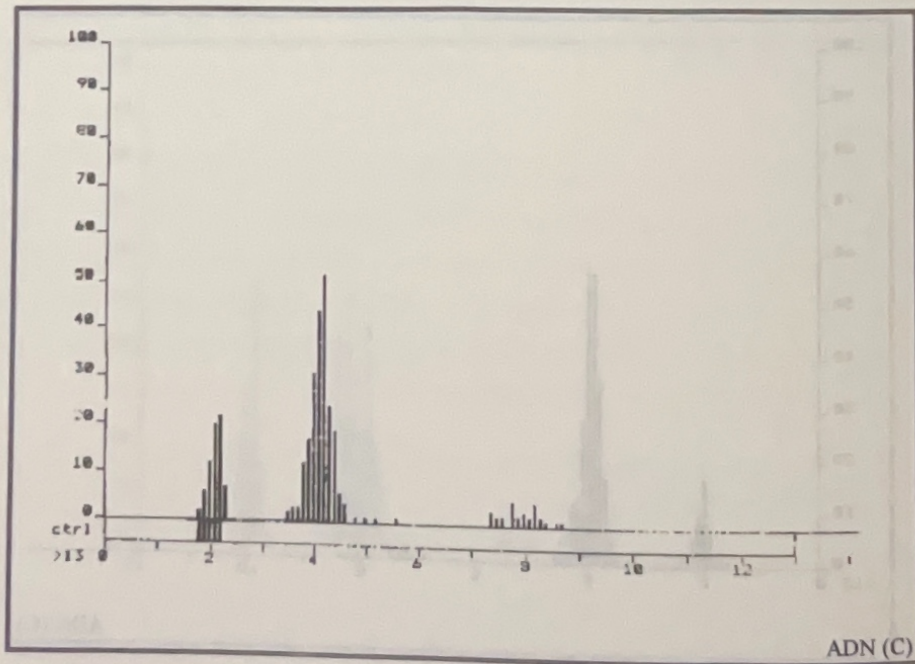


Fig. 6: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 6

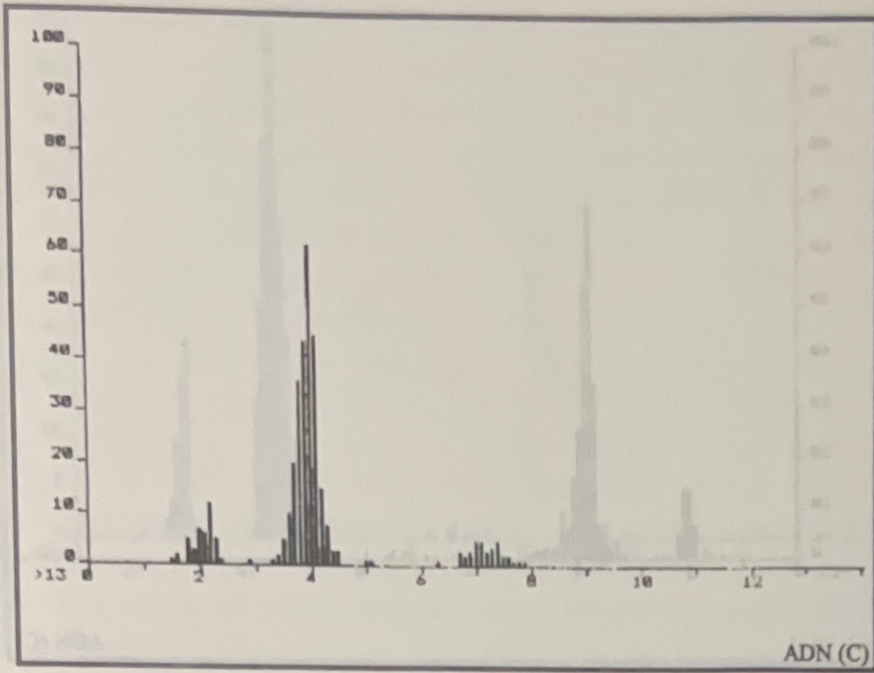


Fig. 7: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 7

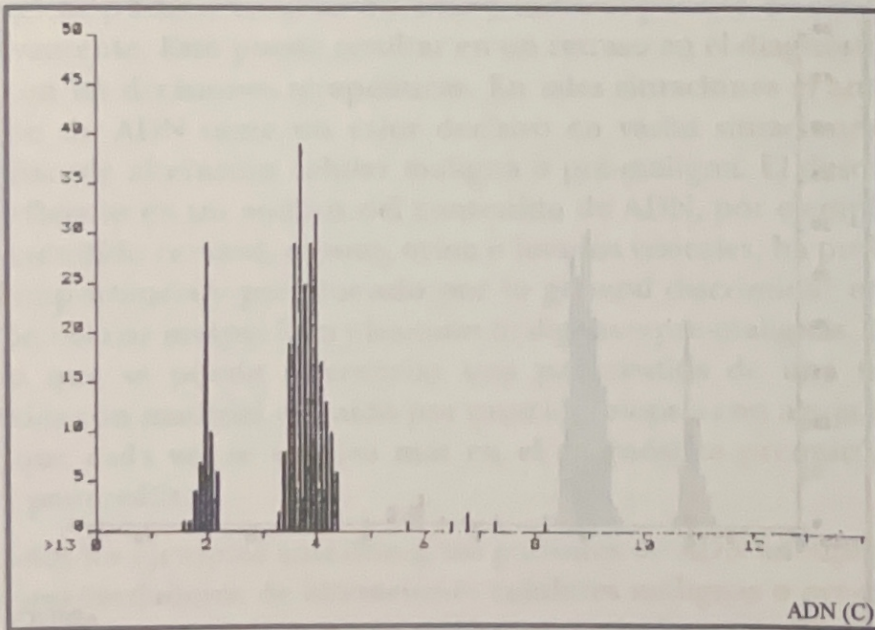


Fig. 8: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 8



Fig. 9: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 9

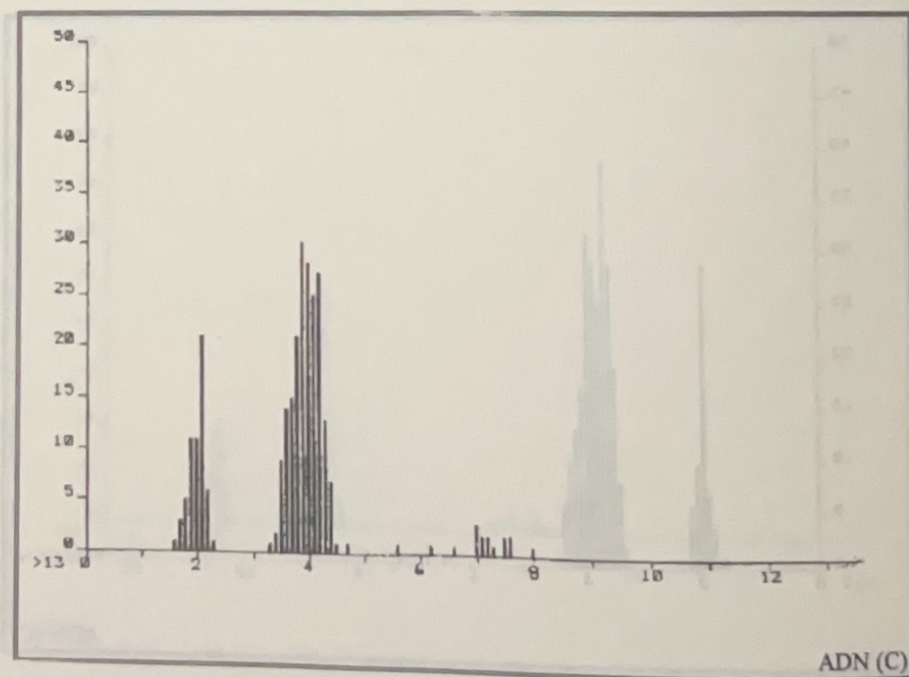


Fig. 10: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 10

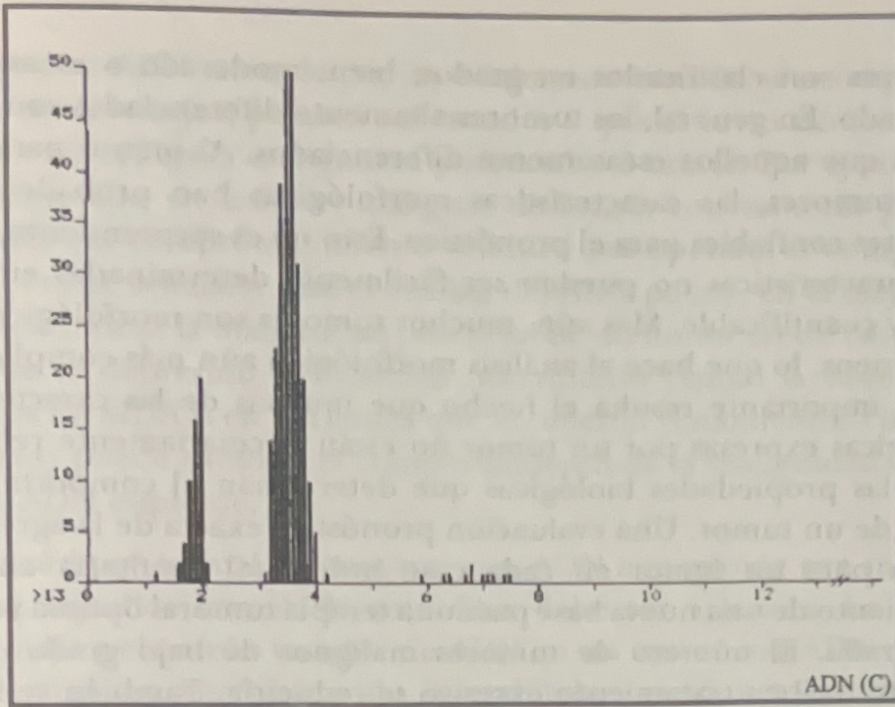


Fig. 11: Histograma de distribución del ADN en las células del caso 11

Discusión

Los parámetros morfológicos son en general suficientes con vistas a obtener información diagnóstica confiable con relación a lesiones preneoplásticas o neoplásticas. Sin embargo, algunas imágenes citológica e histopatológicas pueden resultar difíciles y hasta imposible de ser juzgadas conclusivamente. Esto puede resultar en un retraso en el diagnóstico y por lo tanto en las decisiones terapéuticas. En tales situaciones el análisis del contenido de ADN tiene un valor decisivo en varias situaciones que se acompañan de alteración celular maligna o pre-maligna. El desorden genético reflejado en un análisis del contenido de ADN, por ejemplo en casos de extendido cervical, esputo, orina o levados vesicales, ha probado ser de vital importancia y permitiendo por lo general discriminar entre una alteración celular inespecífica y lesiones malignas o pre-malignas. También es cierto que se puede diferenciar una pancreatitis de una neoplasia pancreática con material extraído por punción biopsia con aguja fina, una técnica que cada vez se emplea más en el diagnóstico prequirúrgico de lesiones pancreáticas.

En todos los ejemplos anteriores, los patrones de ADN aneuploides son indicadores verdaderos de alteraciones celulares malignas o pre-malignas. El pronóstico que se asigna a los pacientes con lesiones malignas está generalmente basado en criterios clínicos y morfológicos. Morfológicamente

los tumores son clasificados en grados; bien, moderado o escasamente diferenciado. En general, los tumores altamente diferenciados son menos malignos que aquellos escasamente diferenciados. Al menos para cierto tipo de tumores, las características morfológicas han probado no ser indicadores confiables para el pronóstico. Esto no es sorprendente, ya que dichas características no pueden ser fácilmente determinadas en forma objetiva y cuantificable. Más aún, muchos tumores son morfológicamente heterogéneos, lo que hace al análisis morfológico aún más complicado. Y aún más importante resulta el hecho que muchas de las características morfológicas expresas por un tumor no están necesariamente relacionadas con las propiedades biológicas que determinan el comportamiento maligno de un tumor. Una evaluación pronóstica exacta de la agresividad esperada para un tumor en cada caso individual resultaría en el establecimiento de una nueva base para una terapia tumoral óptima y más individualizada. El número de tumores malignos de bajo grado que actualmente reciben tratamiento excesivo se reduciría. También sería posible seleccionar pacientes para nuevos esquemas terapéuticos, es decir para aquellos en los que los procedimientos actuales resultan insuficientes o ineficaces. Por lo tanto, es obvio que la determinación del grado de malignidad de un tumor es un problema importante de diagnóstico.

La información pronóstica asequible a través del análisis del ADN nuclear tiene que ser considerada con los antecedentes descritos anteriormente. Basándose en numerosos y cuidadosos estudios realizados con pacientes seguidos durante largos períodos, se ha podido establecer que el análisis del ADN puede suministrar información pronóstica más completa y por encima de la obtenible mediante los parámetros clínicos y morfológicos convencionales en tumores como los de mama, próstata, tiroides, ovarios, útero y esqueleto. Las medidas del ADN permiten clasificar la malignidad tumoral en dos grupos: los tumores de ADN euploide que contienen cantidades euploides (diploide o tetraploide) de ADN indicativas de que no hay o que son mínimas las modificaciones cariotípicas, y los tumores con ADN aneuploide que claramente poseen un contenido anormal de ADN indicativo de un alto grado de anormalidad cariotípica e inestabilidad genómica. El análisis del comportamiento de la malignidad (curso clínico) de estos dos tipos de tumores en largos estudios retrospectivos ha demostrado que los tumores con ADN aneuploide generalmente progresan rápidamente y que la muerte de los pacientes ocurre a los pocos años, mientras que los tumores con ADN euploide progresan más lentamente y con frecuencia transcurren décadas antes del deceso del paciente. También se ha encontrado que los tumores con ADN euploide son más estables en el sentido de que raramente evoluciona hacia tumores de ADN aneuploide. Debe señalarse que aquellos pacientes con enfermedades

malignas con ADN aneuploide, especialmente cuando se acompañan de estados clínicos bajos, pueden ser curados y que el curso clínico de estos pacientes no refleja la malignidad potencial del tumor. Por ejemplo, esto se ha observado en lesiones malignas de mama con tumores pequeños (<10 mm) sin comprometimiento linfático pos-operatorio comprobado. También debe señalarse que el análisis del ADN puede, en el mejor de los casos, determinar la malignidad potencial de un tumor en un caso concreto, y que la depresión del sistema inmunitario (como la observada en enfermos de SIDA o en pacientes que recibieron tratamientos citostáticos ineficaces) puede cambiar el comportamiento de la malignidad en tumores con ADN euploide.

La razón por la cual los tumores con ADN aneuploide son más malignos que aquellos con ADN euploides debe ser aclarada. La marcada aneuploidía y el patrón variable de ADN en un tumor con ADN aneuploide reflejaría un alto grado de inestabilidad genómica en las células componentes de tales tumores. Dicha inestabilidad puede conducir a la generación de nuevos fenotipos que pueden ser el requisito para una rápida progresión de la lesión tumoral. Una inestabilidad genética de este tipo puede ser el resultado de una inestabilidad incrementada a nivel cariotípico. Por ejemplo, las células tumorales podrían haber adquirido la capacidad de ganar o perder cromosomas más rápidamente. Esto podría favorecer el desarrollo de cariotipos específicos (o un desequilibrio específico en el genoma) necesarios para superar los diversos niveles n la progresión de la lesión tumoral. Hipótesis alternativas consideran el incremento de la potencialidad de desarrollar metástasis, la mayor frecuencia de eventos recombinantes, la amplificación de genes y otros rearrreglos del ADN deben ser considerados.

Aunque los antecedentes genéticos de los tumores con ADN euploide o aneuploide no son completamente conocidos actualmente, las medidas del contenido de ADN nuclear nos proveen indudablemente de un método de diagnóstico poderoso para discriminar entre los tumores malignos de bajo grado y los de alto grado.

Bibliografía

1. Albert P.; Lleremboire H; Hernández F; Coullange C; Rampal M. Tumeur de vessie stade T1. A la recherche d'un pronostic. *Ann. Urol. (Paris)* 22: (4) 255-261, 1988.
2. Assailly J; Monet JD; Moustafa Y; Brugal G. Apport de la cytologie quantitative et de la ploïde dans le diagnostic et la surveillance des tumeurs de la vessie. *Etude de 52 cas par l'analyseur Samba. J. Urol. (Paris)*, 95: (1) 3-9, 1989.

3. Atkin, N. B., Kay, R. Prognostic significance of modal DNA value and other factors in malignant tumors, based on 1965 cases. *Br. J. Cáncer.* 40: 210-221, 1979.
 4. Auer, G., Ono, J., Nasiell, M. et al. Reversibility of cronchial cell atypia. *Cáncer Research.* 42: 4241, 1982.
 5. Brandt, KG, Schistosomiasis-cáncer: Etiological consideration: A review. *Acta Trop. (Basel)* 36: 203, 1979.
 6. Broeker, BH; Klein, FA; Hackler, RH. Cáncer or the bladder in spinal cord injury. *J. Urol.* 125: 196, 1081.
 7. Brayn, GT. The pathogenesis of experimental bladder cáncer. *Cáncer Res.* 37: 2813, 1977.
 8. Cohn, K., Backdahl, M., Stenkvis, B. et al. Prognostic value of nuclear DNA content in papillary thyroid carcinoma. *World J. Surgery.* 8: 474-480, 1984.
 9. Cole, P; Monson, RR; Haning, H. et al. Cáncer of the lower urinary tract. *N. Eng. J. Med.* 284: 129, 1071.
 10. Cornelisse, CJ; Tanke, HJ. Flow cytometry. In *Comprehensive cytopathology* (M. Bilbo, ed.) W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1991.
 11. Devonec M; Hijazi A; Muchada E; Bouvier R; Dubernard JM. Etude du contenu en ADN de 72 cas de tuneurs de vessie par cytométrie en flux. Relation avec les données anatomo-cliniques. *J. Urol. (Paris)*, 92: (4) 223-30, 1986.
 12. Echman, B; Strombeck, JP. Demonstration of tumorigenic decomposition products of 2,3-azotoluene. *Acta Physiol. Scand.* 14: 43, 1947.
 13. Faber, E. Chemical carcinogenesis and urinary bladder In *Carcinoma of the bladder*, Connolly, J. G. (editor) Raven Press, New York, 1981.
 14. Fallenius, A., Auer, G., Carstensen, J. Prognostic significance of NDA measurements in 409 consecutive breast cáncer patients. *Cáncer.* 62: 331-341, 1988.
 15. Fallenius, A., Franzén, S., Auer, G. Predictive value of nuclear DNA content in breast cáncer in relation of clinical and morphologic factors. *Cáncer.* 62: 521-530, 1988.
 16. Glodman, RL; Warner, NE. Hemorrhagic cystitis and cytomegalic inclusion in the bladder associated with ciclofosphamide therapy. *Cáncer*, 25: 7, 1970.
 17. Gustafson H; Tribukait B; Esposti P. DNA Profile and tumour progression in patients with superficial bladder tumors. *Urol. Res.*, 10: (1) 13-18 1982.
 18. Gustafson H; Tribukait B; Esposti PL. The profnostic value of DNA analysis primary carcinoma in situ of the urinary bladder. *Scand J. Urol. Nephrol.*, 16: (2) 141-6, 1982.
- Hicks, RM; Wakefield, J; Saint, STJ; Chovaniec, J. Evaluation of the new model to detect bladder carcinogens and co-carcinogens: Results obtained with sacharin, cyclamte and ciclofosphamide. *Chem. Biol. Interact.* 11: 225, 1975.
20. Hohenfellner, R y E.J. Zingg. *Urologie ur Klinik und praxis Band I. Diagnostik, entzündungen tumorem* Georg Thieme Verlag Stuttgart. N.Y., 741 pp, 1982.
 21. Hoover, RM; Strasser, PH. Artificial sweetwnwes and human bladder cáncer, preliminary results. *Lancet.* 1: 837, 1980.
 22. Hultergren, N; Langengren, C; Ljungqvist, A. Carcinoma of the renal pelvis and papillary necrosis. *Acta Clinic Scand.* 130: 314, 1965.
 23. Joensuu, H., Klemi, P., Eerola, E. DNA aneuploidy in follicular adenomas of the thyroid gland. *Am. J. Pathology.* 124: 373-376, 1986.
 24. Konaka, C., Auer, G., Nasiell, M. et al. Sequential cytomorphological and cytochemical changes

- during development of bronchial carcinoma in beagle dogs exposed to 20-methylcholantrene. *Acta Hystochem. Cytochem.* 15: 779, 1982.
25. Kaufman, JM; Fam, B; Jacobs, SC; et al. Bladder cancer and squamous metaplasia in spinal cord injury patients. *J. Urol.* 118: 967, 1977.
 26. Koss, LG. A light and electron microscopic study of the effects of a single dose of cyclophosphamide on various organs of the rat. *Lab. Invest.* 16: 44, 1967.
 27. Lazar C; Mares V. Valore prognostica a constitutiei cromozomiale a tumorilor vezicii urinare. *Rev. Chir. A Chir.*, 25: (3) 227-33 1976.
 28. Marret, LD; Walter, SD; Miags, JB. Coffee-drinking and bladder cancer in Connecticut. *Am. J. Epidemiol.* 117: 113, 1983.
 29. Noltenius Harald. *Tumor-Handbuch. Pathologie und klinik der menschlichen tumoren Tomo 4.* Urban y Schwarzenberg Munich viena, Bellihme, 1465-1865 pp, 1987.
 30. Tanke, H.J. and E. M. Van Ingen. A reliable Feulgen-Acriflavine-S-2 Staining Procedure for quantitative DNA measurements. *J. Histochemistry* 28: 1007-1015, 1980.
 31. Tanke HJ; Ploem JS; Jonas U. Results of automated image analysis of more than 300 urinary specimens (Meeting Abstract). Seventy eighth Annual Meeting of the American Urological Association, Inc., 17-21, 1983, Las Vegas, Nevada. American Urological Association, Inc. 330 pp. 1983.
 32. Tribukait B; Gustafson H; Esposti PL. The significance of ploidy and proliferation in the clinical and biological evaluation of bladder tumors a study of 100 untreated cases. *Br. J. Urol.*, 54: (2) 130-135 1982.
 33. Unión Internationale Contre le Cáncer. *TNM Klassifikation der malignen tumoren.* Springer Verlag. Berlin, 1979.
 34. Yoneyama, K., Erhardt, K., Stenkvis, B. et al. Nuclear DNA content in squamous carcinoma, oat cell carcinoma and alveolar carcinoma carcinoma of the lung. *Am. J. Clin. Oncol.* 10: 330, 1987.