

Departamento de Cirugía, Radiología y Medicina Física.  
 Departamento de Biología Celular y Ciencias Morfológicas.  
 Hospital de Cruces (Servicio de Cirugía A).  
 Hospital de Basurto (Servicio de Cirugía B).

## Valor pronóstico del ADN nuclear de 106 tumores colorrectales, medido por microespectrofotometría<sup>(1)</sup>

Díaz Aguirregoitia, F. J.\*; García-Alonso Montoya, I.\*\*; Iturburu Belmonte, I.\*\*; Portugal Porras, V.\*\*\*; Alonso Varona, A.\*\*; Echevarría García-Sanfrechoso, A.\*\*\*\*, y Méndez Martín, J.\*\*\*\*\*

### SUMMARY

**Objective:** The aim of this study was to look for correlations between nuclear DNA content of colo-rectal tumors, and such clinical parameters as age, sex, location, CEA, histological grade and Duke's stages.

**Experimental design:** A prospective study is carried out on surgical patients, subjected to standard criteria of radicality. Nuclear DNA content was quantified in tumoral cells by microcytophotometric techniques.

**Patients:** 106 patients with colo-rectal cancer. Patients with colonic perforation, other concomitant neoplasia, non-curative surgery or receiving adjuvant therapies were excluded from the study. Five patients died during the postoperative period and one was lost.

**Results:** Histological grade: 28% G1, 35% G2 and 37% G3. Dukes': 8% A, 40% B, 32% C and 20% D. DNA quantification has rendered 45% as euploid and 55% as aneuploid.

There was no statistical correlation between ploidy and location, age, sex or CEA. However, there is a clear preponderance of euploid tumors in G1 (23 vs. 5), while the aneuploid tumors double the euploid ones (24 and 25 vs. 12 and 12) in G2 and G3. A similar result was found comparing ploidy and Dukes: euploid tumors reach 77% both in stages A and B, while they drop to 24% and 14% in stages C and D. It has also been found that euploid tumors show a longer period of survival free of recurrence.

**Conclusions:** Evidence has been found supporting a prognostic value for tumoral DNA quantification in colo-rectal cancer. A longer follow-up is required to study absolute survival of the patients.

**KEY WORDS:** Cytometry, DNA, colo-rectal tumors, ploidy.

Díaz Aguirregoitia, F. J.; García-Alonso Montoya, I.; Iturburu Belmonte, I.; Portugal Porras, V.; Alonso Varona, A.; Echevarría García-Sanfrechoso, A., y Méndez Martín, J. The prognostic value of microspectrocytophotometric analysis of DNA content in 106 colo-rectal tumors. Rev Esp Enf Digest, 1993, 83, 421-428.

### RESUMEN

**Objetivo:** Establecer correlaciones entre contenido de ADN de tumores colorrectales y parámetros clínicos: edad, sexo, localización, CEA, grado de diferenciación y estadios de Dukes.

**Diseño experimental:** Estudio prospectivo de pacientes intervenidos quirúrgicamente, según pautas habituales de radicalidad. Cuantificación del ADN nuclear por microespectrofotometría.

**Pacientes:** 106 pacientes con cáncer de colon. Se excluyen pacientes con perforación colónica, sometidos a tratamientos coadyuvantes a la cirugía, afectos de otros tumores y aquéllos con resección incompleta, tras control anatomopatológico. Un paciente perdido y 5 fallecidos en postoperatorio.

**Resultados:** Grado de indiferenciación: 28% G1, 35% G2 37% G3. Estadaje de Dukes: 8% A, 40% B, 32% C y 20%. El 45% de los tumores son euploides, y el 55% aneuploides. No existe correlación estadística entre ploidía y localización, edad, sexo o CEA. Sin embargo, hay claro predominio de tumores euploides en G1 (23 vs. 5), duplicando los aneuploides a los euploides en G2 y G3 (24 y 25 vs. 12 y 12). Algo similar se observa al relacionar ploidía y estadio de Dukes: los tumores euploides alcanzan el 77% en los estadios A y B, mientras que bajan al 24% y 14% en los estadios C y D. Además, los tumores euploides han demostrado una mayor supervivencia libre de enfermedad.

**Conclusiones:** Estos resultados apoyan el valor pronóstico de la cuantificación del DNA en el cáncer colo-rectal. Sin embargo, se requiere un seguimiento más prolongado de los enfermos antes de poder analizar su relación con la supervivencia absoluta de los pacientes.

**PALABRAS CLAVE:** Citometría, ADN, tumores colorrectales, ploidia.

\* Prof. Titular Interino.  
 \*\* Prof. Titular Numerario.  
 \*\*\* Médico Residente.  
 \*\*\*\* Prof. Asociado. Jefe Servicio Cirugía A (Hospital Cruces).  
 \*\*\*\*\* Catedrático. Jefe de Servicio de Cirugía B (Hospital de Basurto).

(1) Este trabajo ha estado subvencionado por la Universidad del País Vasco. Proyecto de Investigación U.P.V. 097.327-E86/90.

## INTRODUCCION

El cáncer colorrectal es una neoplasia de aparato digestivo que, según estimaciones recientes, ha aumentado su incidencia en todo el mundo occidental de modo considerable, sobrepasando en frecuencia al cáncer gástrico (1). Este hecho ha incrementado la atención sobre el mismo, tanto en campos investigacionales como terapéuticos y preventivos.

En su contexto terapéutico se plantean diversos problemas. Unos están relacionados con la oportunidad o eficacia del tratamiento adicional o coadyuvante a la cirugía, según que su aplicación sea pre/postoperatoria, o bien que ésta sea beneficiosa a todos los pacientes o sólo a aquéllos cuyos tumores presenten especiales características. Otras incógnitas están relacionadas con el pronóstico, establecido habitualmente por el sistema de estadios de Dukes y sus modificaciones (2, 3), o por el grado de diferenciación; sistemas no carentes de problemas, lo que provoca intentos de nuevas clasificaciones histologicoclínicas (4). A pesar de haberse confirmado que los estadios de Dukes tienen un claro valor predictivo (5), pacientes con estadios B<sub>2</sub> tienen una supervivencia menor que otros con estadios C<sub>1</sub>. El establecimiento del grado histológico, por otro lado, puede estar influenciado en gran medida por la experiencia del patólogo o la variabilidad histológica tumoral (6), lo que hace que su aplicabilidad pronóstica no sea siempre fácil y universal.

La aplicación de técnicas de cuantificación del ADN nuclear (7) mediante citometría, bien de flujo (CF) o estática (CE), ha permitido, además de investigaciones en el campo biológico, el establecimiento de patrones de anormalidad nuclear en los tumores. Se ha pensado, que estas anomalías nucleares (aneuploidía) podrían estar relacionadas con pronósticos más desfavorables o con respuestas variables a terapias adicionales. Por esta razón, se ha realizado ya un número considerable de trabajos en torno al contenido de ADN en las células del cáncer colorrectal y de tumores de otra localización (8-9). Llama la atención, que los resultados en muchas ocasiones son discordantes.

La mayor parte de los estudios se ha llevado a cabo con técnicas de citometría de flujo (8-10), cuya rapidez de ejecución es indudable. Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes, ya que no permite establecer una diferenciación clara entre las células euploides tumorales, linfocitos, células infectadas y epitelio normal (6, 11); por esta razón, los resultados obtenidos por diferentes autores no siempre son coincidentes.

En este trabajo, el ADN se ha cuantificado mediante microespectroscopía sobre secciones histológicas, según la técnica descrita por Casperson (12), lo que ha permitido seleccionar selectiva y exclusivamente la población celular tumoral.

El objetivo establecido para este estudio preliminar ha sido comprobar las relaciones existentes entre el contenido de ADN y el pronóstico de los pacientes, así como con otros parámetros histológicos, biológicos o bioquímicos. De tal manera que, según los resultados obtenidos, y quizás en fases posteriores de estudio, se pudieran justificar modificaciones en la agresividad de las técnicas quirúrgicas, así como estudios de las relaciones del contenido de ADN con la evolución tumoral, después de tratamientos radio y/o quimioterápicos adicionales a la cirugía. Todo ello, buscando el beneficio del paciente y posiblemente evitando dispendios económicos innecesarios.

## MATERIAL Y METODOS

### Pacientes

Desde abril de 1989 a junio de 1991, se han recogido prospectivamente los datos de 106 pacientes intervenidos por cáncer de colon y recto. Los criterios de operabilidad y reseccabilidad fueron los habitualmente admitidos en la práctica quirúrgica. En ningún caso se aplicaron tratamientos radio y/o quimioterápicos.

Para la recogida de datos referentes a los pacientes se ha utilizado un protocolo diseñado a tal fin. En él se han considerado, los siguientes parámetros: edad, sexo, localización del tumor primario, tamaño, síntomas, complicaciones, antígeno carcinoembrionario (CEA), tipo de intervención quirúrgica, estadios de Dukes (según la modificación de Astler-Coller), y los análisis de sangre habituales en un preoperatorio (hematimetría, estudio de coagulación y perfil hepático). Se utilizó el programa SDI (Horus Hardware/Hewlett

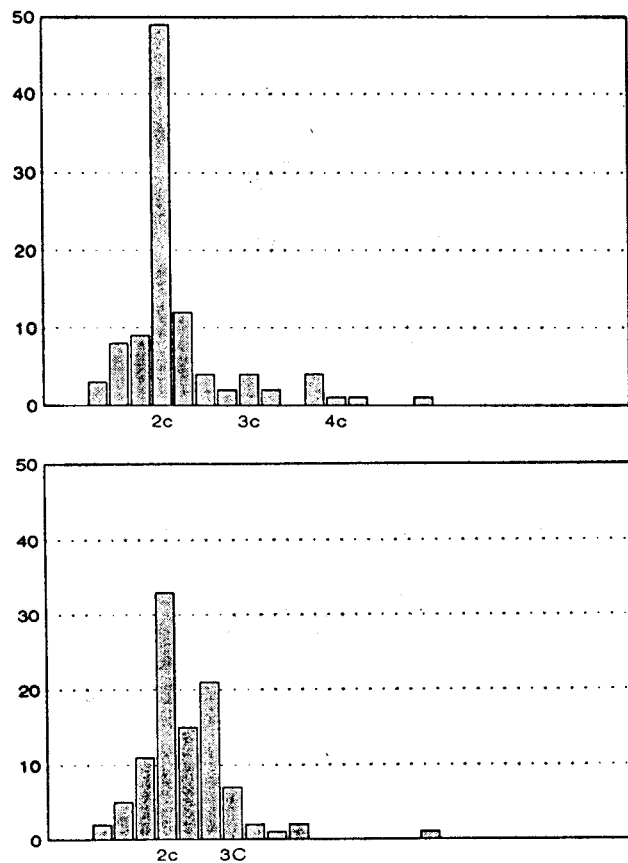


FIG. 1.—Los dos modelos de histogramas de frecuencias correspondientes a los controles (mucosa colónica normal). Se observan algunos controles con población celular 3c relativamente alta.



**TABLA I**  
Tipos de tumores según ploidía

Euploides	Tipo I	27 (26%)
	Tipo II	21 (20%)
Aneuploides	Tipo III	37 (35%)
	Tipo IV	10 (9%)
	Tipo V	11 (10%)

Cuánta y porcentajes de los distintos tipos de tumores descritos, según el aspecto de los histogramas obtenidos con microespectroscopía.

técnicas histológicas habituales. De cada bloque se practicaron tres secciones de 5 micras de espesor para ser teñidas con hematoxilina eosina y proceder a la identificación histológica de las células tumorales. Otras cinco secciones, también de 5 micras, fueron procesadas según el método de Feulgen.

### Cuantificación del contenido de ADN

Se ha llevado a cabo mediante microespectroscopía (citometría estática), aplicada a secciones histológicas teñidas mediante el método de Feulgen. En esta reacción, el colorante (reactivo de Schiff) se une estequiométricamente con las moléculas del ADN, de manera que existe una relación directa entre la cantidad de colorante y el contenido de ADN de la célula. De los distintos métodos citofotométricos existentes hemos utilizado el método de integración de extinciones parciales.

Para la cuantificación del ADN tumoral o de los controles (mucosa colónica normal), se han valorado 100 núcleos por cada sección histológica, estando éstas identificadas exclusivamente por un número de serie, de manera que en el momento de la medición del ADN, el operador desconocía el diagnóstico histopatológico y la evolución clínica del paciente.

Hemos utilizado un microespectroscopio VMS-0.5 (Carl Zeiss, Oberkochen) controlado «on line» por un ordenador Olivetti M-20. Dicho microespectroscopio está dotado de una platina monitorizada de 0,25 micras de resolución y de un monocromador de prisma, igualmente monitorizado, que proporciona una amplitud de banda de 1,5 nm, modulable mediante una rejilla de apertura variable. A partir de las mediciones del ADN nuclear tumoral se elaboran histogramas de frecuencias y, mediante un proceso matemático descrito por Bartels (13), se descompone dicho histograma en curvas gaussianas que agrupan a las diferentes poblaciones celulares en función de su contenido en ADN. A partir de aquí, es posible calcular el área de cada una de las curvas, que guarda proporción directa con el número de células de cada población. La media de los valores incluidos en cada curva corresponde al contenido de ADN nuclear de las respectivas poblaciones celulares expresado en unidades de densidad óptica relativa (UDOR).

### Criterios de euploidía/aneuploidía

De acuerdo con criterios internacionales (14), los valores de referencia para 2c (cantidad de ADN de un núcleo diploide)

**TABLA II**  
Relación entre la ploidía y la localización de los tumores

Localización	Euploide	Aneuploide	Total
Derecho	11	10	21
Izquierdo	36	49	88
TOTAL	47	59	106

Estudio de  $\chi^2=0,56454$  (no significativo).

de) se determinaron estableciendo la media del contenido en ADN de las células diploides de los 10 fragmentos de mucosa normal. De esta manera, la población 2c en los controles ha supuesto un 65% ( $\pm 7,58$ ) del total de las células. Sorprendentemente, en todos ellos se ha encontrado un número importante de células en torno a 3c ( $18,66\% \pm 5,11$ ). (fig. 1). La terminología empleada, en ningún momento hace referencia al número de cromosomas, cuyo conteo no se realiza con estas técnicas, sino que los términos euploide o aneuploide hacen referencia a los tumores con un número de células cuyo contenido en ADN es normal o anormal, respectivamente, estimado por los histogramas de frecuencias.

Hemos aceptado como tumores euploides (también llamados diploides en la literatura), aquéllos que presentan un histograma de frecuencias con una población celular 2c (correspondientes a fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo celular) superior al 50%. Sin embargo, también hemos aceptado como euploide otro grupo de tumores con una población celular 2c, que supera el 40%, que se acompaña de otra menos acusada 3c, a semejanza de algunos controles y que podrían corresponder a células en síntesis (fig. 2). El índice de ADN en estos tumores euploides es inferior a 1,5, aceptando como índice de ADN la relación entre la media del contenido de ADN de las células tumorales y la de las células de los controles (14). La aneuploidía se establece en aquellos tumores donde se encuentran dos o más poblaciones celulares bien definidas, con un índice de ADN superior a 1,5 (14). Al igual que otros autores (5, 6), aceptamos como aneuploides aquellos tumores cuya columna de histograma correspondiente a 2c sea de inferior cuantía a la predominante (fig. 3), lo que denota varias *stemlines* celulares, siendo la correspondiente a 2c, la que consideramos más cercana a la normalidad no tumoral.

La incidencia de aneuploidía/euploidía parece ser similar en los tumores de colon y en los de recto (8, 15), por lo que, en nuestra serie los consideramos juntos.

Dado el corto período de seguimiento, ha parecido oportuno estudiar la relación entre la ploidía tumoral y número de pacientes libres de recidiva (supervivencia libre de enfermedad). De este estudio se han excluido las muertes postoperatorias (5) y los pacientes perdidos.

### Estudio estadístico

Para evitar dispersión de datos, hemos reunido como euploides los tipos I y II, y como aneuploides los tipos III-IV-V.

Se ha estudiado la posible relación entre los tipos de ploidía (euploides/aneuploides) y la edad, sexo, grado de diferenciación histológica, localización (derecho/izquierdo) y estadios de Dukes (A, B, C, D) unificando, también para evitar dispersión de datos, los estadios B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en B y C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> en C.

La relación entre la ploidía y los datos clínicos recogidos en el protocolo se estableció, bien mediante el test de X<sup>2</sup> (parámetros cualitativos) o bien mediante comparaciones de medias (valores cuantitativos).

Las curvas de supervivencia actuarial (libre de recidiva) se han estudiado mediante la prueba de Kaplan-Meyer y Mantel-Haenszel.

## RESULTADOS

Cincuenta y ocho pacientes eran varones (55,23%) y 47 mujeres (44,79%). La edad media se ha situado en 67 años (rango: 38-87 años). De los 106 tumores estudiados, las localizaciones izquierdas y bajas fueron las más frecuentes, distribuyéndose como sigue: 21 casos de colon derecho frente a 85 de afectación izquierda, de los cuales 32 corresponden a recto, 31 a sigma, 17 a descendente y transversal izq. y 5 a recto/sigma.

El grado de diferenciación histológica se obtuvo con certeza en 101 casos, no siendo posible en 5 ocasiones por falta de concreción en el informe anatomopatológico. Así, 28 casos (27,72%) corresponden a G1 (bien diferenciado); 36 (35,64%) a G2 (moderadamente diferenciado) y 37 (36,63%) a G3 (indiferenciado).

En cuanto al diagnóstico histopatológico, noventa y nueve casos fueron adenocarcinomas, 6 de la variedad coloidal y 1 resultó ser un gran adenoma veloso con degeneración carcinomatosa en su base.

Los pacientes, de acuerdo con la clasificación de Dukes se distribuyeron como sigue: estadio A, 9 (8,49%); estadio B<sub>1</sub>, 14 (13,20%); estadio B<sub>2</sub>, 28 (26,41%); estadio C<sub>1</sub>, 14 (13,20%); estadio C<sub>2</sub>, 20 (18,86%) y estadio D, 21 (19,81%).

Dada la variabilidad tumoral, y según los criterios expuestos en el apartado de Material y Métodos, describimos en los tumores euploides, dos tipos de histogramas con diferentes poblaciones celulares, constituyendo lo que hemos establecido como tumores tipo I y tipo II (fig. 2). Del mismo modo, hemos podido observar tres variantes en los histogramas considerados como aneuploides: tipo III, con un predominio en

3c; tipo IV, con un predominio en 4c; y tipo V con varios picos (2c, 4c, 6c...), sin predominio claro de ninguno (fig. 3). Siguiendo estos planteamientos, ya comentados para el estudio del contenido de ADN nuclear, hemos hallado 48 (45,28%) tumores euploides y 58 (54,71%) aneuploides, distribuidos según se detalla en la tabla I.

Estudiando las posibles relaciones entre el contenido de ADN y parámetros clínicos (edad, sexo, tamaño del tumor y determinación del CEA), no hemos encontrado ninguna relación con significación estadística. Aunque hay un mayor número de tumores de localización izquierda que son de tipo aneuploide, respecto de los del lado derecho, esta diferencia no alcanza significación estadística con la prueba de X<sup>2</sup> (tabla II).

En cambio, sí existe relación entre el grado de diferenciación histológica y el contenido de ADN tumoral (X<sup>2</sup>=19,74; p<0,001). En primer lugar, llama la atención que la mayor parte de los tumores bien diferenciados histológicamente son euploides, siendo muy raros los aneuploides (10,4%). En cambio, tanto en los tumores G2 como en los G3 se observa un notable incremento de frecuencia de los tumores aneuploides, que vienen a ser un 66% del total de cada grupo (tabla III).

La relación que se aprecia entre los estadios de Dukes y el contenido en ADN de los tumores estudiados es también estadísticamente significativa (tabla IV). Así, se observan un claro predominio de los tumores euploides en los estadios A (77,77%) y B (71,43%), frente a la mayor frecuencia de los aneuploides en los estadios C (76,47%) y D (85,71%). Cuando se estudian separadamente los estadios B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub> o C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>, los resultados no resultan fiables por número insuficiente de pacientes.

Estas dos observaciones parecen apoyar la idea de que las características de la ploidía de los tumores colorrectales, puede tener valor pronóstico. De hecho, estudiando las curvas de supervivencia, a pesar de que el tiempo de control postoperatorio tan sólo alcanza 36 meses en el paciente más antiguo, se adivina un mayor intervalo libre de enfermedad para los enfermos cuyos tumores son euploides (fig. 4).

## DISCUSION

### Aspectos metodológicos

La investigación del ADN tumoral con citometría estática (CE) es poco frecuente, prefiriéndose, las más de las veces, la citometría de flujo. Sin embargo, la CE presenta claras ven-

Grado de diferenciación	Euploides	Aneuploides	Total
G1	23	5	28
G2	12	24	36
G3	12	25	37
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>54</b>	<b>101</b>

Estudio de X<sup>2</sup>=19,74. p<0,001.

Estadios de Dukes	Euploides	Aneuploides	Total
A	7 (78%)	2	9
B	30 (71%)	12	42
C	8	26 (77%)	34
D	3	18 (85%)	21
<b>TOTAL</b>	<b>48</b>	<b>58</b>	<b>106</b>

Estudio de X<sup>2</sup>=30,0599. p<0,001.

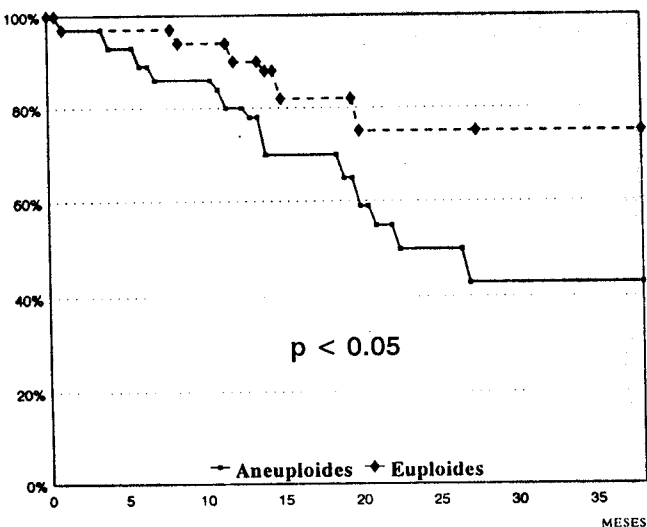


FIG. 4.—Curvas de intervalo libre de enfermedad, de acuerdo con el método de Kaplan-Meier. Según la prueba de Mantel-Haenszel el coeficiente de relación es de 2,0088, con una  $p < 0,05$ .

tajas. Según Doran (11), permite seleccionar las células tumorales, evitando así la contaminación con poblaciones celulares no malignas; además, pueden reconocerse pequeños picos aneuploides, que son irreconocibles con CF; por otra parte, al utilizarse secciones histológicas, la arquitectura del tejido queda preservada; y, por último, se evita el problema de distinguir los «dobletes» (dos núcleos adherentes y registrados como un solo núcleo en CF) de las células en fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. Quizá sean éstas, las razones por las que en los últimos años han aparecido varios trabajos que emplean la CE en el estudio de tumores, y no sólo colorrectales (11, 17-26). Sin embargo, hay que reconocer que la citometría estática es un proceso lento y repetitivo, que exige una atención constante a los oculares del microscopio y consume una media de 60-70 minutos en cada sección histológica medida.

No existen, en la literatura consultada, patrones uniformes que definan los modelos de histogramas correspondientes a tumores colorrectales. Emblad (16) admite tres tipos de histogramas (Aneuploide-Diploide-casi diploides) tomando como modelos, las curvas de ploidía obtenidas con citometría de flujo. Maturri (17) acepta como modelos, los tipos descritos por Haraguchi (23) para el carcinoma gástrico. Albe y cols. (5) describen también tres tipos (Diploide-Diploide con S-alta y Aneuploide) siguiendo los criterios de la *Conference on Analytical Cytology and Cytometry IX* y del *VI International Symposium on Flow Cytometry* (14), también basados en citometría de flujo. Recientemente Bottger (6), con una metodología similar a la nuestra, describe tres modelos (Diploide, Hipotriploide e Hipertriploide), que coinciden, curiosamente, con los mismos patrones morfológicos comunicados por los mismos autores para el cáncer escamoso de esófago (26).

De la observación reiterada de los histogramas obtenidos en este trabajo, hemos podido establecer varios tipos, que se acercan a los descritos por Albe y cols. (5). Como este autor, también hemos encontrado dos tipos de euploides (tipo I y tipo II). En cambio, hemos hallado una gran diversidad de

morfología en los aneuploides, que hemos agrupado en tres tipos cuyo aspecto es muy similar al que Yonemura (19) describe para los tumores gástricos. No obstante, aunque hay claros ejemplos del tipo V entre nuestros tumores, es probable que se traten de formas intermedias entre los tipos III y IV. Esta gran diversidad observada puede deberse a las variaciones y aberraciones cromosómicas de los tumores (7, 27) y a la heterogeneidad de las poblaciones celulares generadas en el tumor (15, 28). Hiddeman (29) considera que estas células aneuploides, con una relación cercana al 2/1 en su contenido de ADN, están próximas a dar lugar a una segunda estirpe celular, doblando su propio ADN (endomitosis).

Hemos observado, que algunos controles tienen poblaciones celulares 3c sorprendentemente numerosas, sin que se deba a la existencia de displasia tisular. Por esta razón, algunos de los tumores que hemos etiquetado como euploides con 3c alta (tipo II) podrían haber sido etiquetados como aneuploides si no hubiéramos elegido como controles las células del epitelio sano, origen de los tumores de estudio. Es posible, que la explicación a este hecho radique en que la mucosa intestinal es un epitelio muy activo, habiendo sido observado este mismo fenómeno por Staiano-Coico y cols. (30). Aunque podrían usarse como controles los linfocitos (11) y eritrocitos de pollo o de peces, la célula ideal es la célula euploide del mismo tejido, a ser posible del mismo individuo (14).

#### Relaciones ploidía/parámetros de estudio

La proporción de tumores aneuploides en nuestra serie entra dentro de la amplia variabilidad de resultados de la mayoría de los autores, cuyos porcentajes oscilan entre el 35% (31) y el 76% (32), con una media del 58%, usando citometría de flujo. Con citometría estática, Maturri (17) y Emblad (16) obtienen un 76% y 75%, respectivamente, mientras que Albe (5) sólo encuentra un 58%.

Algunos estudios muestran una tendencia a presentar un mayor número de aneuploides en estadios de Dukes avanzados (33-39), como también lo objetivamos en este trabajo. En cambio, otros estudios no hallan esta relación (28, 31, 40-43). Sin embargo, un análisis combinado (9) de varios estudios, manifiesta una ligera tendencia a encontrar una mayor frecuencia de tumores aneuploides en estadios avanzados. Kokal y cols. (36) muestran que el nivel de ploidía tiene una mayor significación que los estadios de Dukes, y proponen convertirlo en un indicador pronóstico independiente del estadiaje. Tales discrepancias en los resultados radican en la disparidad de las técnicas empleadas, y en que no todos los autores incluyen el estadio D en sus series; o bien, como nosotros, reúnen en un solo grupo los tumores en C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> y en otro grupo, los tumores en B<sub>1</sub>-B<sub>2</sub> por razones de muestreo estadístico.

Las curvas de intervalo libre de enfermedad, muestran, en la mayoría de los estudios, un hecho claro: los euploides presentan una ventaja sustancial sobre los aneuploides, incluso en períodos tan cortos como 2 ó 3 años (35, 36), ventaja que se mantiene durante 15 años (44) al hacer estudios retrospectivos.

Jones (45) afirma, que la ploidía indica una respuesta a la radioterapia, siendo un factor de predicción importante en la posterior recurrencia tumoral, mientras que los estadios de Dukes no lo son. No hemos estudiado en esta serie la supervivencia según estadiaje de Dukes y ploidía, ya que nos parece que ha transcurrido poco tiempo de evolución para la mayor parte de pacientes; y, además, porque se produciría una dispersión de casos que afectaría a la validez estadística. Sin embargo, hemos observado que la ausencia de recidivas de todos los tumores en relación con su ploidía es mayor en los euploides que en los aneuploides, aunque esta afirmación la realizamos con toda la reserva inherente al poco tiempo transcurrido.

Si la aneuploidía de los tumores colorrectales demuestra una menor probabilidad de supervivencia y el grado de diferenciación histológica también indica un peor pronóstico (9), puede pensarse, que ambos parámetros están relacionados. Sin embargo, no está del todo probado que tal relación exista. Aunque otras series (17, 36), además de la nuestra, hallan una relación estadísticamente significativa, otros muchos autores (28, 33, 40-42, 44, 46) no encuentran tal significación. Observamos, que hay diferencias de metodología entre las series que podrían condicionar tal falta de coincidencia. Tales discordancias las hemos encontrado en el número escaso de casos, y sobre todo, en la consideración de la diferenciación en dos, tres grados o cuatro grados, según los distintos criterios de los laboratorios anatomopatológicos, que no se atienen a una clasificación única, como podría ser la sugerida por el American Joint Committee on Cáncer (47).

Aunque algunos autores han observado una mayor frecuencia de tumores aneuploides en tumores de localizaciones distales (no sólo del recto) (5, 34), en nuestros pacientes, a pesar de existir una clara diferencia entre ambas localizaciones, ésta no parece alcanzar una significación estadística.

Nos parece que, en general, todas estas discrepancias de resultados existentes entre los distintos investigadores estriban más en la diversidad de metodología, que en el genio biológico de los propios tumores. Si bien es también posible que, como ocurre en los tumores gástricos (20), existan en el mismo tumor regiones con diferente ploidía y que al medir el contenido de sólo una de esas regiones, cambien totalmente los resultados de una a otra investigación.

## CONCLUSIONES

De nuestro trabajo podemos afirmar:

1. La aneuploidía se incrementa en estadios avanzados de la enfermedad (Dukes C y D).
2. La aneuploidía, en los tumores estudiados, se presenta con mayor frecuencia en los más indiferenciados.
3. En nuestra serie no hay relación entre la ploidía y la edad, sexo, tamaño del tumor y el CEA.
4. A pesar del corto seguimiento clínico, hemos observado una tendencia en los euploides a expresar un mayor intervalo libre de enfermedad.
5. Quedan aún puntos oscuros respecto del valor pronóstico que pueda tener el estudio del ADN nuclear en los tu-

moreos colorrectales. Para ser aclarados, se precisan nuevas investigaciones que contemplen protocolos unificados de medición del ADN (n.º de células medidas, áreas de tumor investigadas, etc.), bien se empleen técnicas de CF o de CE, así como criterios coincidentes de interpretación de los histogramas.

### Correspondencia:

Fco. Javier Díaz Aguirregoitia  
C/ Itxas-ondo, 1 - 1.º izqda.  
48990 Algorta-Getxo

## BIBLIOGRAFIA

1. Comisión de Las Sociedades Oncológicas para la Planificación Oncológica en España. Aproximación a la epidemiología del CA en España. En *Libro Blanco de la Oncología en España*, Ed. Jims, Barcelona, 1988; 43.
2. Astler VB y Coller FA. The pronostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954; 139: 846-851.
3. Gundersson LL y Sosin H. Areas of failure found at reoperation (second symptomatic look) following «curative surgery» for adenocarcinoma of the rectum. Clinical pathological correlation and implications for adjuvant therapy. *Cancer* 1974; 34: 1278-1292.
4. Jaas IR, Love SB y Northover JMA. A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* 1987; june 6 (i): 1303-1306.
5. Albe X, Vassilakos P, Helfer-Guarnori K et al. Independent prognostic value of ploidy in colorectal cancer. A prospective study using image cytometry. *Cancer* 1990; 66: 1168-1175.
6. Böttger TC, Gabbert HE, Stöckle M et al. DNA image cytometry: a prognostic tool in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 436-443.
7. Caspersson T, Auer G, Fallenius A et al. Cytochemical changes in the nucleus during tumour development. *Histochemical Journal* 1983; 15: 337-362.
8. Ellis CN, Burnette JJ, Sedlak R et al. Prognostic applications of DNA analysis in solid malignant lesions in humans. *Surg Gynec Obstet* 1991; 173: 329-342.
9. Dean PHA y Vernava AM. Flow cytometric analysis of DNA content in colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 95-102.
10. Gomez Alonso A, García J y Orfao De Matos A. El análisis del ADN mediante citometría de flujo en la patología colorrectal maligna. *Cir Esp* 1991; 50: 132-136.
11. Dorman A, Graham D, Curran B et al. Ploidy of smooth muscle tumours: retrospective analysis study of formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 1990; 43: 465-468.
12. Caspersson T. Über den chemischen Aufbau der Strukturen des zellkerne. *Skand Arch Physiol* 1936; 73 (Suppl 8): 36.
13. Bartels PH. Numerical evaluation of the cythology data. I. Description of profiles. *Analytical Quantitative Cytology* 1979; 4: 20-28.
14. Hiddemann W, Schumann J, Andreef M et al. Convention on Nomenclature for DNA Cytometry. *Cytometry* 1984; 5: 445-446.

15. Scott NA, Grandje P, Weiland LH et al. Flow cytometry DNA patterns from colorectal cancer. How reproducible are they? *Mayo Clin Proc* 1987; 62: 331-337.
16. Emblad P, Glimelius B, Bengtsson A et al. The prognostic significance of DNA content in carcinoma of the rectum and rectosigmoid. *Acta Chir Scand* 1987; 153: 453-458.
17. Maturri L, Biondo B, Uggeri F et al. Densitometric evaluation of DNA content in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1991; 27: 893-896.
18. Korenaga D; Okamura T; Saito A et al. DNA ploidy is closely linked to tumor invasion, lymph node metastasis, and prognosis in clinical gastric cancer. *Cancer* 1988; 62: 309-313.
19. Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T et al. Correlation of DNA ploidy and clinical outcome in Borrmann Type 4 Gastric carcinoma. *J Sur Oncol* 1989; 42: 1-4.
20. Sugihara H, Hattori T, Fujita S et al. Regional ploidy variations in signet ring cell carcinomas of the stomach. *Cancer* 1990; 65: 122-129.
21. Stöckle M, Störkel S, Mielke R et al. Characterization of conservatively resected renal tumors using automated image analysis DNA cytometry. *Cancer* 1991; 68: 1926-1931.
22. Korenaga D, Saito A, Baba H et al. Cytophotometrically determined DNA content, mitotic activity, and lymph node metastasis in clinical gastric cancer. *Surgery* 1990; 107: 262-267.
23. Haraguchi M, Okamura T, Korenaga D et al. Heterogeneity of DNA ploidy in patients with undifferentiated carcinomas of the stomach. *Cancer* 1987; 59: 922-924.
24. Maturri L, Biondo B y Lavezzi AM. Significato clinico del contenuto nucleare in DNA nei tumori gastrici umani. *Minerva Chir* 1991; 46: 653-660.
25. Tsiolulias G, Muto T, Kubota Y et al. DNA ploidy pattern in rectal carcinoid tumors. *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 31-36.
26. Böttger T, Störkel S, Stöckle M et al. DNA image Cytometry. A prognostic tool in Squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1991; 67: 2290-2294.
27. Friedlander M, Hedley D y Taylor IW. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol* 1984; 37: 961-974.
28. Quirke P, Dyson JED, Dixon MF et al. Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and histopathology. *Br J Cancer* 1985; 51: 99-106.
29. Hiddeman W, Von Bassewitz DB, Kleinemier HJ et al. DNA stemline heterogeneity in colorectal cancer. *Cancer* 1986; 58: 258-263.
30. Staiano-Coico L, Wong R, Ngoi SS et al. DNA content of rectal scrapings from individuals at low and high risk for the development of colorectal cancer. *Cancer* 1989; 64: 2579-2584.
31. Durrant L, Robins RA, Armitage N et al. Association of antigen expression and DNA ploidy in human colorectal tumors. *Cancer Res* 1986; 46: 3543-3549.
32. Remvikos Y, Muleris M, Vieth P et al. DNA content and genetic evolution of human colorectal adenocarcinoma. A study flow cytometry and cytogenetic analysis. *Int J Cancer* 1988; 42: 539-543.
34. Kokal W, Sheibani K, Terz J et al. Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. *JAMA* 1986; 255: 3123-3158.
35. Jones DJ, Moore M y Schofield PF. Prognostic significance of DNA ploidy in colorectal cancer: a prospective flow cytometric study. *Br J Sur* 1988; 75: 28-33.
36. Kokal WA, Gardine RL, Sheibani K et al. Tumor DNA content in resectable, primary colorectal carcinoma. *Ann Surg* 1989; 209: 188-193.
37. Forsslund G, Cedermark B, Ohman U et al. The significance of DNA distribution pattern in rectal carcinoma. A preliminary study. *Dis Colon Rectum* 1984; 27: 579-584.
38. Wiggers T, Arends IW, Schutte B et al. A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1988; 61: 386-395.
39. Jass JR, Mukawa K, Goh HS et al. Clinical importance of DNA content in rectal cancer measured by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1989; 42: 254-259.
40. Armitage NCM, Ballantyne KC, Sheffield JP et al. A prospective evaluation of the effect of tumor cell DNA content on recurrence in colorectal cancer. *Cancer* 1991; 67: 2599-2604.
41. Hood DL, Petras RE, Edinger M et al. Deoxyribonucleic acid ploidy and cell analysis of colorectal carcinoma by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 1990; 93: 615-620.
42. García J, Muñoz de la Espada IB, Orfao de Matos A et al. Correlación clínico-biológica y características del ADN en 74 pacientes con cancer colorrectal (Citometría de flujo de piezas en fresco). *Cir Esp* 1992; 51: 16-20.
43. Temple WJ, Sugarbaker EV, Thornwaite JT et al. Correlation of cell cycle analysis with Duke's staging in colon cancer patients. *J Surg Res* 1980; 28 314-318.
44. Scott NA, Rainwater LM, Wiegand HS et al. The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis in conventional clinicopathological criteria in patients with operable rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum* 1987; 30: 513-520.
45. Jones DJ, Zalondik KJ, James RD et al. Local recurrence after preoperative radiotherapy and surgery in rectal cancer. *Br J Surg* 1989; 76: 1172-1175.
46. Wolley RC, Schreiber K, Koss LG et al. DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 15-22.
47. Bears OH, Henson DE, Hutter RVP y Myers MH. Manual of Staging of cancer. Third edition. J B Lippincott Co. Philadelphia, 1988.