

11209
64
29



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MEDICO NACIONAL VERACRUZ

DNA ANEUPLOIDE COMO FACTOR
PRONOSTICO EN LOS TUMORES
DEL APARATO DIGESTIVO

TESIS DE POSTGRADO

QUE PARA OBTENER EL TITULO EN LA
ESPECIALIDAD DE:
CIRUGIA GENERAL

PRESENTA:

Dr. Harry S. Miller Fogel

ASESORES: Dr. Roberto Bautista Vasquez
Dr. Roberto Lagunes Torres



H. VERACRUZ, VER.

FALLA DE ORIGEN

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	pag.
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES CIENTIFICOS	4
OBJETIVOS	12
HIPOTESIS	13
PROGRAMA DE TRABAJO	14
MATERIAL Y METODOS	15
RESULTADOS	18
DISCUSION	25
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFIA	30

INTRODUCCION

Los ácidos nucleicos son macromoléculas constituidas por una cadena de nucleótidos, cuyos componentes más importantes desde el punto de vista genético son sus bases nitrogenadas; ya que como sabemos la información hereditaria está codificada en la secuencia que estas guardan a lo largo de la doble hélice, como se recordará las dos hélices del DNA están unidas por el apareamiento de sus bases nitrogenadas en la forma que se conoce como regla de la complementariedad y que establece que la adenina estará frente a una timina y la citosina frente a una guanina.

Las mutaciones pueden explicar las variaciones que se observan en la evolución de las especies, las anomalías del número de cromosomas constituyen una desviación genética tan importante que causan en el organismo un déficit grave muchas veces la muerte.

En este proceso mitótico puede haber una serie de accidentes. Si todos los cromátidos no se separan, si no que viajan juntos hacia un polo, una de las células hijas resulta tetraploide ($4n$). Si este mismo fenómeno afecta la mitad de los cromosomas, pero la otra mitad se divide adecuadamente, se forma una célula que tiene un complemento triploide ($3n$). Cuando el número de cromosomas es múltiplo de n el fenómeno se llama poliploidía. En el hombre tales graves trastornos del número de cromosomas prácticamente solo se observan en las divisiones anárquicas de células cancerosas.

Cuando un par de cromátidos no se separan normalmente en el momento adecuado, de manera que viajan juntos hacia un polo el fenómeno se llama falta de disyunción. Más frecuentemente, la falta de disyunción o el re-

trazo en la anafase afectan un solo cromosoma, produciendo células que contienen un elemento más o un elemento menos que el complemento diploide básico. Tal trastorno origina un complemento cromosómico que no es múltiplo del número básico de cromosomas, la aneuploidia.

Una de las características de los pares de bases del DNA es que tienen afinidad por cierto tipo de radiación, en especial la luz ultravioleta. Esta propiedad de los ácidos nucleicos de absorber la luz ultravioleta ha permitido desarrollar técnicas para medir el contenido de DNA desnudo, o en el interior de la célula. En algunos tumores del aparato digestivo se ha podido establecer una correlación entre la cantidad de DNA de las células neoplásicas y el pronóstico. (64)

Se ha observado que el Anaranjado de Acridina (AA) es un agente que interactúa en las cadenas de DNA, al ser expuesto a la acción de la luz ultravioleta (uv), presenta una fluorescencia verde al estar unido a los complejos de doble cadena, cuando se une a complejos de una sola cadena presenta fluorescencia roja (35).

El AA se ha utilizado en una serie de estudios para valorar el efecto de medicamentos o sustancias probablemente carcinogénicas sobre la estructura del DNA en células vivas (57), cambios en los patrones de DNA de células gonadales producidos por agentes físicos o para estudiar los cambios de la cromatina durante la espermatogénesis (65,16), estudiar algunos linfomas e inclusive para el diagnóstico diferencial en hasta casi un 90% de las leucemias linfoblásticas de las no linfoblásticas (50,82), e inclusive para estudiar los efectos del AA sobre el DNA (63).

El tratamiento del DNA con ácido clorídrico induce depurinización y subsiguientemente la producción de ácido apurínico (DiStefano 1948 ;

Jordanov 1963; Kesten 1960; Swift 1953; Tam y Chargaff 1953). Cuando se utiliza el procedimiento de tinción de Feulgen, los grupos aminosulfónicos del pararosalino reaccionan con el grupo aldehído expuesto en las terminales de azúcares por el ácidoapurínico. La producción de ácidoapurínico y la ruptura de los pares de bases causados por la hidrólisis ácida, producen la desnaturalización del DNA nuclear y la producción de DNA de una sola cadena. Por lo tanto el AA puede ser utilizado para una medición cuantitativa de la cantidad de DNA de una sola cadena producido por la hidrólisis ácida. Como se mencionó previamente, el fluorocromo unido a la cadena sencilla de DNA emite fluorescencia roja metacromática mientras que el fluorocromo intercalado en los polinucleótidos de doble cadena emite fluorescencia verde ortocromática (Darzynkiewicz et al. 1979).

El significado biológico de los parámetros aun no ha sido bien comprendido (21,50). Esta técnica puede ser una herramienta útil para el estudio de malignidad en citología exfoliativa así como investigación básica de cáncer (Fukuda et al. 1986).

El fenómeno de la aneuploidía se basa en la alteración de la división de los cromosomas y conlleva a modificaciones moleculares del DNA (21), que lo hacen más susceptible a la hidrólisis ácida que el DNA euploide.

ANTECEDENTES CIENTIFICOS

POLIPIDOS.- Estudios recientes han demostrado que los polipos adenomatosos del colon son lesiones precancerosas y que muchos canceres colonicos tienen su origen en polipos adenomatosos (3, 27, 52). Como se ha notado en la neoplasia intraepitelial del cervix, diferentes grados de displasia tambien han sido identificados en los polipos del colon. Esto hace surgir la pregunta de si la severidad de la displasia pueda correlacionar con el desarrollo eventual de malignización. Helwig reporto una alta incidencia de cancer de colon asociado con polipos, mostrando en aproximadamente 20% de los casos invasión temprana.

El grado de displasia de los polipos de colon parece correlacionar bien (22,24,23,45,52,59) con la incidencia de recurrencia y metastasis, especialmente en aquellos casos donde la polipectomía es el unico tratamiento. El tamaño de los polipos (60,81) correlaciona bien con la presencia de malignidad y el tipo de polipos, sugiriendo una continuidad en el proceso polipo - cancer. En animales de experimentación, no se ha documentado la transformación de polipos adenomatosos a cancer de colon aunque ambos, carcinoma y adenoma han sido producidos por el mismo carcinógeno.

Proliferación anormal y diferenciación son algunos de los cambios mas tempranos de malignidad. En la poliposis familiar, algunos de los cambios mas tempranos estan relacionados a la expansión de la zona de proliferación del tercio medio y superior de la cripta. Tambien se ha encontrado un patron de proliferación celular anormal en toda la mucosa colonica de pacientes con cancer de colon y adenoma. Varios estudios han sido publicados utilizando tejido archivado en bloques de parafina, para el análisis de DNA aneuploide y el índice de proliferación. Se ha encon-

trado DNA aneuploide en la mayoría de los cánceres coloniales, pero la sensibilidad de este hallazgo es baja, ya que la aneuploidia no es detectable en una fracción significativa de cánceres coloniales. La actividad proliferativa y la aneuploidia de las células malignas correlacionan bien con el comportamiento agresivo del tumor (5), estos parámetros no han sido revizados cuidadosamente en lesiones premalignas. En los polipos de colon la aneuploidia se ha encontrado en un 5% a 37%, pero el significado de este hallazgo aun no se conoce (60). En los polipos vellosos se ha encontrado una mayor frecuencia de aneuploidia (52), aunque en otros estudios no ha encontrado esta correlación (22).

En otras series, no se ha logrado encontrar aneuploidia en los adenomas (15), inclusive, se ha mencionado que el DNA aneuploide es un fenómeno independiente de los cambios displásicos durante la progresión al cáncer (4). Los adenomas que en un momento dado puedan desarrollar malignidad no podran ser valorados por este método cuando estos sean diploides, siendo de utilidad por el momento para pacientes de alto riesgo con DNA de una sola cadena (71).

Los polipos gastricos tienen una menor frecuencia de aneuploidia, inclusive algunos autores no han encontrado este fenómeno a este nivel (54).

ESÓFAGO.- A pesar de avances recientes en el tratamiento quirúrgico y multidisciplinario, el pronóstico para los pacientes con cáncer de esófago sigue siendo malo. Existe variación en el potencial biológico maligno entre los pacientes con carcinoma de esófago. Si los tumores con un potencial maligno más elevado de aquellos con un potencial más bajo, tratamientos apropiados pudieran ser diseñados.

La clasificación histopatológica del carcinoma de células escamosas del esófago puede ayudarnos en elucidar el potencial biológico maligno. El criterio morfológico, de cualquier manera, es subjetivo, semicuantitativo y no siempre puede predecir el comportamiento biológico. Estudios citofotométricos y citofluorométricos muestran una relación cercana entre el contenido de DNA celular y la malignidad biológica del cáncer de esófago (30,31,34,74).

Desde los años 80, el análisis de citometría de flujo del DNA ha sido ampliamente utilizado para determinar malignidad biológica de varios tumores (20). Se ha reportado hasta un 83.3% de recurrencia en pacientes operados de Ca de esófago, quienes tenían aneuploidia en relación a una recurrencia de 16.7% de pacientes operados de Ca de esófago con tumores diploides; también se relaciona la aneuploidia a una mayor frecuencia de ganglios positivos(34). Otros autores han encontrado aneuploidia en el Ca de esófago, pero no han encontrado correlación clínica (12).

El esófago de Barrett se asocia a un mayor riesgo de presentar adenocarcinoma. Se estima que del 10% al 12% de los pacientes con reflujo gastroesofágico desarrollarán esófago de Barrett, de estos pacientes, los cuales están bajo vigilancia médica un 7% a 16% podrán presentar

adenocarcinoma.

Desafortunadamente la mayoría de los adenocarcinomas de Barrett son detectados en etapas avanzadas e incurables. Por lo tanto se requieren de pruebas más sensitivas para detectar a estos pacientes de alto riesgo para desarrollar cancer. Utilizando citometría de flujo para medir el DNA en estos pacientes, se podra que grupos son de mayor riesgo y ofrecer un tratamiento temprano (30,46,62).

Otros autores han encontrado que la hipertermo-quimio-radioterapia en pacientes con carcinomas esofagicos con contenido de DNA aneuploide, presentan una mejor sobrevida a tres años 26.7% en comparación con un 10.7% de los pacientes con aneuploidia que recibieron unicamente quimio y radioterapia. Estos hallazgos sugieren el uso de este tipo de terapia en pacientes con carcinoma de esófago aneuploide (55).

Para finalizar, la aneuploidia quiza sea el signo mas temprano de malignización (40).

ESTOMAGO.- El carcinoma gástrico fué la enfermedad maligna más comun en los Estados Unidos hasta 1940. En las ultimas decadas, se ha presentado una disminucion en la incidencia en los países desarrollados. Aunque la frecuencia de carcinoma gástrico esta declinando, continua siendo la sexta causa más comun de muerte por cancer, con una mortalidad anual cercana a 14000. El carcinoma gástrico representa aproximadamente un 25% de las enfermedades malignas del aparato gastrointestinal y la mayoría de las series reportan una sobrevivida a 5 años menor a un 10%.

La clasificación clínica de estadificación para el carcinoma gástríco esta basado en la extensión de la enfermedad, incorporando el examen clínico, resultados endoscópicos y procedimientos radiológicos. De cualquier manera, en muchos casos, existe poca correlación entre los estudios preoperatorios y el estadio patológico durante el transoperatorio. Por tal motivo, existe una fuerte necesidad de obtener "herramienta" preoperatoria confiable que asista en la decisión terapéutica del clínico.

La citometría de flujo es una herramienta que mide en forma cuantitativa, el contenido de DNA. El contenido anormal de DNA (aneuploidia) ha sido demostrado en la mayoría de los procesos malignos, incluyendo el carcinoma gástrico (7,13,37,67,84). Su prevalencia e importancia pronóstica en otros carcinomas, incluyendo el gástrico, aun no esta bien definido(85).

La relación entre la diferenciación tumoral y la aneuploidia ha recibido mucha atención (10,53,80). Algunos autores han encontrado aumento en la incidencia de aneuploidia en adenocarcinomas poco diferenciados o indiferenciados (80). Otros autores han encontrado que los adenocarcinomas poco o indiferenciados tienden a ser diploides (10). Tambian en los

adenocarcinomas bien diferenciados se observan resultados variables (10). Es importante comentar que algunos autores han observado aneuploidia en las displasias severas de la mucosa gástrica (43,72).

La multiploidia es una forma de aneuploidia la cual se observa en los tumores gástricos, este fenómeno correlaciona con la sobrevida del paciente (56). Los pacientes que presentan invasión vascular, presentan un mayor índice de aneuploidia (85). Así mismo, se ha observado mayor grado de aneuploidia en la unión esofagogastrica en comparación con el antro y el cuerpo (53). La estructura histológica y la morfología celular tienen relación comun en la cinética de los tumores gástricos en el hombre (51).

En los Linfomas gástricos, los de tipo Hodgkin tienden a ser diploides, mientras que en los No Hodgkin la aneuploidia se presenta en un 30%, de estos, las que contienen predominio de células B presentan el fenómeno de la aneuploidia con mayor frecuencia que las T. Los linfomas aneuploides tienen peor pronóstico con cuadro clínico mas agresivo (32).

COLON.- El comportamiento clínico del cáncer de colon en el hombre se pre
dica primordialmente por su estadio clínico y clasificación histopatoló-
gica. De cualquier manera una variedad de marcadores tumorales han sido
investigados. El contenido de DNA medido por citometría de flujo, puede
ser utilizado para definir el potencial de crecimiento del tumor y para
predecir su respuesta a los agentes antitumorales (75). Se ha reportado
un 39-82% de alteraciones del DNA y aneuploidia en pacientes con carcin
o de colon (5, 6, 14, 17, 22, 33, 38, 61, 68, 70, 76), también se ha reportado
que el carcinoma de colon de tipo aneuploide tiene peor pronóstico que
los de tipo diploide (1, 11, 25, 26, 28, 36, 44, 73), independiente del grado
histológico y estadio de Dukes (25, 26, 27, 28). De cualquier manera esto no
fue confirmado en otros estudios (5, 48).

La progresión tumoral, es la tendencia de la neoplasia a empeorar
sus características clínicas y biológicas en un periodo de tiempo, debi-
do a cambios genéticos adquiridos dentro del clon neoplásico original y
a la "formación" de subpoblaciones de células tumorales con mayores venta
jas proliferativas y agresividad aumentada. Las lesiones colorectales
proveen uno de los sistemas informativos más importantes para investigar
la progresión tumoral en el hombre, ya que siguen estadios definidos des
de benignos hasta tumores malignos. Así mismo, en estudios recientes,
patrones proliferativos de las células de la mucosa y niveles de DNA ob-
tenidos por biopsia, citología exfoliativa o improntas han logrado refle
jar el riesgo elevado de malignización en pacientes asintomáticos (9, 73).

En los carcinomas sincrónicos del colon la determinación del DNA podrá
ayudarnos en la determinación del origen de estas neoplasias (69), así
como los patrones celulares del tejido circunvecino al tumor (83).

Los pacientes que presentan carcinoma de colon con predominio de células aneuploides, presentan elevaciones del Antígeno Carcinoembrionario hasta cerca de siete veces mayores que en los pacientes que presentan neoplasia de tipo diploide (18,79). Esto sugiere la utilización de este antígeno para valorar el riesgo de recidiva en pacientes con tumores de tipo aneuploide.

CUCI. (Colitis Ulcerativa Crónica Inespecífica).- El primer estudio reportado de las anomalías citogenéticas en la colitis ulcerativa fue en 1974. 10 años más tarde Hammberg et al describen una serie de 51 pacientes en de los cuales 8 tenían DNA aneuploide, posteriormente se reportó un caso de cáncer de colon en un paciente que previamente había presentado aneuploidia en la mucosa colónica. En el CUCI existe una correlación entre el DNA aneuploide y la displasia o carcinoma del colon.

En la mayoría de estos estudios, el contenido del DNA nuclear ha sido determinado de la citometría de flujo (CMF). Después de desintegrar el material celular por procedimientos químicos y mecánicos, la suspensión de núcleos resultante es teñida con tinciones específicas para DNA fluorescentes. Varios miles de núcleos pueden ser analizados rápidamente utilizando CMF. Posteriormente el contenido de DNA de cada núcleo es determinado por la estimulación fluorescente emitida.

Debido a su cercanía con malignidad, la detección del DNA aneuploide es un método prometedor asociado al diagnóstico de displasia, como un método de predicción de transformación maligna de la mucosa colorectal en CUCI de larga evolución (8,19,41,42,49,58,66).

En un caso reportado de Colitis de Crohn se observó la presencia de displasia severa y aneuploidia lo cual motivó a realizar una colectomía subtotal (17).

OBJETIVOS

1. Montar la técnica de Fukuda et al 1986, en el C.M.N.V. del I.M.S.S. con Anarenjado de Acridina y fluorescencia con luz ultravioleta para la medición del contenido de DNA en células humanas.
2. Valorar la utilidad de esta técnica con la citometría de flujo, en virtud de que esta ultima por el momento no es accesible en nues - tro medio.
3. Estandarizer valores normales de referencia en células histológica mente normales del Aparato Digestivo.
4. Para evaluar la frecuencia y distribución del contenido de DNA a - nauploide de pólipos, adenomas y carcinomas del Aparato Digestivo.
5. Correlacionar los resultados del análisis del DNA con el hallazgo histológico de displasia y diferenciación celular en los tumores benignos y malignos respectivamente.
6. Correlación del contenido de DNA con el estadio clínico del pacien - ta.
7. Valorar la utilidad de este procedimiento en pacientes de alto riesgo (adenomas y carcinomas) para modificar criterios de trata - miento médico y quirúrgico.

HIPOTESIS

1. Al hacer mediciones del contenido de DNA en células cancerosas, pólipos y adenomas del Aparato Digestivo, encontrará valores distintos al contenido diploide.
2. Los adenomas y polipos del tubo digestivo con células con DNA aneuploide tendran mayor riesgo de malignizarse que los adenomas y polipos con DNA diploide.
3. Las neoplasias malignas que contengan células con DNA aneuploide infiltrarán los tejidos y daran metástasis en forma más temprana en comparación con las neoplasias malignas con células con DNA diploide.
4. La sobrevivida a 5 años será mayor en los pacientes con tumores diploides en comparación con los pacientes que contengan tumores aneuploides.

PROGRAMA DE TRABAJO

GRUPO DE ESTUDIO:

Se revisaron 16 muestras de tejido obtenidas por biopsia o lapero -
tomía de tumores del Aparato Digestivo (adenomas, polipos y cancer)
así como 3 muestras de tejido normal del Aparato Digestivo. Las mues-
tras normales se utilizaron como control. El estudio se realizó en
el CMV Var., IMSS en coordinación con los siguientes servicios: Ciru-
gía General, Genética, Gastroenterología (Endoscopias), Patología y
Microbiología; en el período comprendido entre enero y diciembre 1990.

CRITERIOS DE INCLUSION:

Se incluyeron las muestras de tejido del Aparato Digestivo de adenó-
mas, polipos y cancer, demostrados por estudio histopatológico con
técnicas de Hematoxilina y Eosina y la clasificación de Broders. En
los casos indicados se utilizaron otras tinciones. Como control se
incluyeron 3 muestras normales, de mucosa gástrica, intestino delgado
y páncreas demostrados por estudio histopatológico previo. En los
casos donde fué posible estadificación clínica y clasificación TNM.

CRITERIOS DE EXCLUSION:

Se excluyeron los pacientes en los cuales existía duda diagnóstica
y/o que no se contara con muestra suficiente de tejido para procesar.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 18 especímenes de pacientes en los que se estableció el diagnóstico histopatológico de algún tipo de tumor del Aparato Digestivo así como tres muestras de tejido normal. Se revisaron las laminillas para determinar el sitio de mayor concentración tumoral y se obtuvieron los tejidos incluidos en parafina correspondientes a esta área.

Con modificaciones a la técnica de Hadley et al. 1983, se cortan 2 secciones de 30 micras cada una, se suspendieron en agua destilada a 37°C por 5 minutos para extender al tejido y se colocan en portaobjeto, se dejan secar y se corta el exceso de parafina de los bordes y se desparafina en xilol a 37°C (dos lavados) por 15 minutos, se levanta el material del portaobjetos con una hoja de bisturí y se coloca en un tubo de centrifugación y se rehidrata con etanol en concentraciones sucesivas del 100%, 95%, 70% y 50% (5ml), 10 minutos en cada paso a temperatura ambiente y se colocan en agua destilada (10ml).

En el laboratorio de Genética, los tejidos se lavan 3 veces en 10ml de agua destilada por centrifugación por 10 minutos a 3500 G. Se resuspenden en una solución de Tripsina (No. T-8128 Sigma Chemical Company ST. Louis Mo.) al .5%, se usan 2ml habiendo preparado la solución con NaCl al .9% y pH ajustado con ácido nítrico a 1.5. Se incuba en baño maría a 37°C con agitación intermitente por 30 a 60 minutos.

La suspensión se lava con amortiguador salino de fosfatos (PBS) de Dulbecco (8g NaCl, .2g KCl, 2.16g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y .2g KH_2PO_4 , disueltos en 1000ml de agua destilada), se resuspenden en una mezcla de acetona y etanol (1:1 v/v) 10ml y se fija por 16 hrs., a 4°C.

La suspensión se centrifuga 10 minutos a 3500 G en solución de RNasa (10mg de RNasa tipo I-A, No. R-9009, Sigma Chemical Co. ST Louis Mo.) disuelta en 100ml de amortiguador de Tris (Hidroximetil) aminometano Sol. Buffer (Sigma de México S.A.) a pH 7.0 (para 100ml de amortiguador 0.05M se ponen 0.5057g de Tris en un matraz volumétrico de 100ml, se disuelve en aproximadamente 50 ml de agua destilada, se añade 45 ml de HCl al .1 N y se afora hasta la marca con agua destilada) calentada por 10 minutos a 80°C con agitación (vortex) para destruir la actividad de la DNasa por una hora a 37°C (se usaron 2ml).

Después se lava en 10ml de PBS de Dulbecco por 10 minutos a temperatura ambiente, el botón se resuspende en HCl 2N a 30°C por 8.5 minutos (hidrólisis ácida).

Se tiñen con Naranja de Acridina (Acridina Orange No. A-6014 Lot 69 F 3672 Sigma Chemical Co. St Louis Mo) (30 ug/ml en PBS de Dulbecco) por 15 minutos a temperatura ambiente; se usan 5ml. Se colocan en un lugar oscuro. Se lava en PBS de Dulbecco y se resuspenden en la misma solución amortiguadora.

Los especímenes se observaron en el Laboratorio de Microbiología usando un microscopio de Transfluorescencia (Carl Zeiss con lámpara de Mercurio) con una unidad de excitación de 410 nm' (UXex=405nm) y un filtro optico de vidrio (Y 530). Previamente se observaron las células con luz blanca para localizar a un grupo de núcleos (portaobjetos). Las células en los cuales los núcleos mostraron Fluorescencia Verde-Amarilla se consideraron resistentes a la hidrólisis ácida y por ende diploides, los núcleos que mostraron Fluorescencia Rojo-Naranja se consideraron sensibles a la hidrólisis ácida y por ende aneuploides. Las fotografías se tomaron

utilizando una cámara Canon A-1 con sistema de fuelle para lograr efecto macro, enfocándose sobre el ocular. Se utilizó película Fuji-color esa 1600.

RESULTADOS

Se estudiaron 18 pacientes con tumores del Aparato Digestivo, de estos, 5 casos fueron Carcinoma Epidermoide del Esófago; 5 casos con Adenocarcinoma gástrico y 7 pacientes con tumores Colorrectales de los cuales 3 fueron Polipos y 4 Adenocarcinomas. La edad promedio para toda la serie fué de 59 años (30-73); 13 pacientes masculinos y 5 femeninos.

De los 18 pacientes estudiados (11/18) 61% presentaron tumores ortocromáticos (diploides) y (7/18) 39% presentaron tumores metacromáticos (aneuploides). Tabla I. Se reviso un caso de carcinoma de ampulla de Vater.

El grupo control fué formado por tres muestras de tejido; Intestino Delgado, Esófago y Páncreas (tomados de un caso de autopsia). Estos tres tejidos fueron histológicamente normales.

Los resultados del DNA, se reportan de acuerdo al predominio celular observado.

Cuando analizamos los resultados de acuerdo a cada organo del tubo Digestivo encontramos:

ESOFAGO: Se revisaron 5 pacientes, todos ellos de sexo masculino, la edad promedio fué de 69 años (68-73); los 5 presentaron carcinoma epidermoide de esófago, cuatro de estos tumores de tipo infiltrativo con gánglios +. 2 pacientes fallecieron en postoperatorio mediato. Cuando se comparo el grado de diferenciación celular con la ploidia, 2 pacientes presentaron aneuploidia uno con tumor bien diferenciado y el otro con tumor medianamente diferenciado. De los 3 casos diploides uno fué medianamente diferenciado y los otros dos poco diferenciados. El (2/5) 40% presento aneuploidia. Un paciente con aneuploidia fallecio al 40 dia de postoperatorio y el otro esta bajo tratamiento con buena evolución por el no-

mento. Un paciente con DNA diploide falleció al 100 día del postoperatorio, los dos pacientes con diploidía, uno con buena evolución y el otro con mala evolución. No se encontró correlación entre la aneuploidía y la evolución del paciente. Tabla II.

ESTOMAGO: Se revisaron 5 pacientes, 3 del sexo masculino y 2 del sexo femenino, la edad promedio fué de 61 años (38-71). Los 5 pacientes presentaron adenocarcinoma gástrico uno de ellos de tipo intestinal y otro de tipo mucoprodutor. Cuatro presentaron ganglios positivos y tres de ellos metástasis. Dos pacientes fallecieron, uno de ellos con adenocarcinoma con DNA diploide y el otro con adenocarcinoma de tipo intestinal con DNA aneuploide. El paciente con adenocarcinoma mucoprodutor presentó DNA diploide y poca diferenciación celular. Otro paciente con adenocarcinoma con DNA aneuploide con moderada diferenciación celular y buena evolución. El último caso presentó adenocarcinoma poco diferenciado con DNA diploide, pidió alta voluntaria y no se ha seguido. El (2/5) 40% de los pacientes en este grupo presentaron aneuploidía. Tabla III. El paciente con adenocarcinoma tipo intestinal correlaciona con la aneuploidía, diferenciación celular y la evolución.

COLON (POLIPOS): Se revisaron 3 pacientes, todos ellos del sexo masculino con una edad promedio de 60 años (48-71). Los polipos que se presentaron fueron: hiperplásico, adenomatoso y veloso. Los 2 primeros en colon derecho y el último en recto. El 100% de estos pacientes presentaron tumores diploides y su evolución ha sido buena sin presencia de recidiva.

COLON (CARCINOMAS): Se revisaron 4 pacientes, 2 del sexo masculino y 2 del sexo femenino. La edad promedio fué de 47 años (30-59); los 4

presentaron adenocarcinoma uno de ellos con cambios de tipo "linitis" y otro de tipo mucinoso. 3 casos se presentaron en recto y uno en ciego. El (3/4) 75% presentaron aneuploidia y uno diploide (1/4) el 25%; cuando se compararon con el Dukes, dos fueron Dukes B₂ y uno Dukes C, el unico caso con DNA diploide fué Dukes B₁, este ultimo presenta un tumor medianamente diferenciado. Los dos con Dukes B₂ y aneuploidia presentaron tumores mediana o moderadamente diferenciados; el paciente con Dukes C y aneuploidia presento tumor poco diferenciado. Se obtuvo correlación con el Dukes, diferenciación celular, evolución y la aneuploidia. Tabla IV.

AMPULA DE VATER: Paciente femenina de 52 años de edad con adenocarcinoma de ampula de Vater, medianamente diferenciado con microinfiltración al páncreas. Presento DNA diploide y su evolución ha sido buena.

TABLA I.

Loc. Tumor	No. Pacientes	Edad (años)	Sexo M/F	DNA aneuploide	%
Esófago	5	69 (68-73)	5/0	2	11%
Estomago	5	61 (38-71)	3/2	2	11%
Colon (Polipos)	3	60 (48-71)	3/0	-	-
Colon Cancer	4	62 (30-59)	2/2	3	17%
Amp. Vater	1	52	0/1	-	-
TOTAL	18	59 (30-73)	13/5	7	39%

Total del grupo en estudio; No. de pacientes, edad sexo y presencia de aneuploidía.

TABLA II.

No. Paciente	Edad	Sexo M/F	Dx. Histopato.	Dif. Célular	Aneuploidia
1	68	M	Ca Epidermoide	bien diferen.	+
2	67	M	Ca Epidermoide	Med. diferen.	-
3	67	M	Ca Epidermoide	poco diferen.	-
4	73	M	Ca Epidermoide	poco diferen.	-
5	71	M	Ca Epidermoide	med. diferen.	+

5 casos de carcinoma Epidermoide de esófago, distribuidos por edad, sexo, diagnóstico histopatológico, diferenciación celular y aneuploidía.

TABLA III.

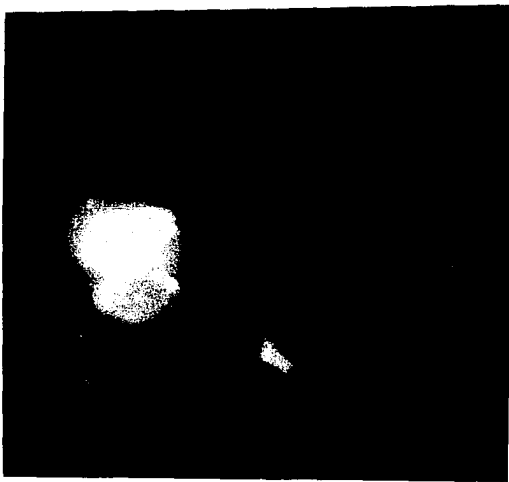
No. Paciente	Edad	Sexo M/F	Dx. Histopatolo.	Dif. Célular	Aneuploidia
1	61	M	Infiltrante	med. diferen.	+
2	65	F	Mucoproducor	poco diferen.	-
3	68	M	Infiltrante	poco diferen.	-
4	38	F	Adeno.	poco diferen.	-
5	71	M	Intestinal	poco diferen.	+

5 casos de adenocarcinoma gástrico, sus subtipos, distribución por edad, sexo, diagnóstico histopatológico, diferenciación celular y aneuploidia.

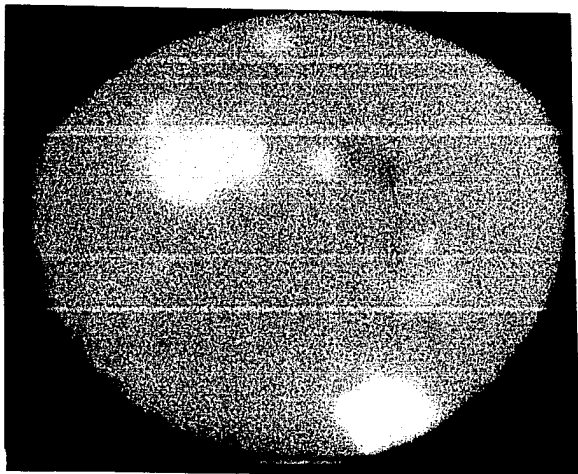
TABLA IV.

Caract. Tumoral	Total	Edad	Sexo M/F	Dif. Célular	Aneuploidia
Dukes A	-	-	-	-	-
B ₁	1	46	M	med. diferen.	-
B ₂	2	52/59	F/M	med. diferen.	50 %
C	1	30	F	poco diferen.	25 %
TOTAL	4	Pro 62	2/2	-	75 %

4 casos de adenocarcinoma de colon y recto, distribuidos por clasificación de Dukes, edad, sexo, diferenciación celular y aneuploidia. El 75% (3/4) de los casos presentaron aneuploidia.



Microfotografía a seco fuerte, bajo los efectos de la luz ultravioleta, donde podemos observar dos núcleos uno amarillo y el otro verde con fluorescencia ortocromática (diploide).
Fotografía con Fuji-color ese 1600.



Microfotografía a seco fuerte, bajo los efectos de la luz ultravioleta, donde podemos observar predominio de núcleos rojo-naranja con fluorescencia metacromática (aneuploide).
Fotografía con Fuji-color asa 1600.

DISCUSION

Por los datos obtenidos en nuestro estudio, el análisis del contenido de DNA de los tumores del Aparato Digestivo, pueden agregar información pronóstica a los ya obtenidos por clasificación histopatológica y estadificación quirúrgica. Esto va en relación con otros estudios reportados (30,65,80,86).

En nuestro estudio, evaluamos la medición de DNA con técnica de AA (21), de tumores de esófago, estómago, colon y recto y uno de Ampula de Vater extraídos de bloques de parafina. Con este método la aplicación de la técnica de Fukuda (21) podría extenderse, aunque en su artículo no recomienda este método de obtención de células. Aunque actualmente un número importante de estudios de CMF obtienen sus células por este método, (Metodo de Hedley et al. 1983 para desparafinado de células incluidas en bloques de parafina). Los datos obtenidos retrospectivamente de pacientes que ya estan bajo estudios clínicos en quienes la sobrevida y progresión de la enfermedad estaran ya disponibles y por ende de gran utilidad. La unica desventaja teórica de esta técnica es que la calidad del DNA medido, obtenido de tejido embebido en parafina es menor que los obtenidos de tejido fresco.

En nuestro estudio, el porcentaje global de aneuploidia fué de 39%, el grupo que presento el porcentaje más elevado fué el del carcinoma de colon y recto con un 75% lo cual va en relación con otros estudios (5,6, 14). Los tumores de esófago y estómago presentaron cada uno de ellos un 40% de aneuploidia lo cual correlaciona con Yonemura et al. 1990. Aunque este porcentaje es menor en relación con otros autores para el carcinoma

de esófago en donde Stephens et al. encontraron valores cercanos al 100% de aneuploidia y Kaketani et al. 1989 encontraron un 74.2% de aneuploidia. Ambos estudios realizados en muestras de tejido embebido en parafina. En relación al carcinoma gástrico, Sasaki et al. 1989 encontraron un 61% de aneuploidia obtenida de muestras de tejido fresco.

En nuestro estudio, se analizaron 5 casos de carcinoma de esófago y 5 casos de carcinoma gástrico; quizá las series son pequeñas y en ningún caso se utilizaron células obtenidas de tejidos frescos.

En el carcinoma colorectal encontramos una correlación importante con la diferenciación celular (70), así como con los estudios de Duke's (61), otros autores (25,26,27,28) no han encontrado esta correlación y consideran la aneuploidia como un factor pronóstico independiente. En el carcinoma de esófago no logramos establecer correlación con el grado de diferenciación celular y el estadio clínico, aunque algunos autores han encontrado relación cercana entre el contenido de DNA y la malignidad biológica del cancer de esófago (30,31,34,74). En el carcinoma gástrico un caso logra correlación entre la aneuploidia y la diferenciación celular y el estadio clínico, algunos autores han encontrado correlación importante (80) y otros no (10).

Cuando examinamos los pólipos, todos ellos con DNA diploide, con buena evolución clínica. Se reporta la presencia de aneuploidia en un 5-47% de los pólipos, elevándose esta cifra cuando presentan displasia severa (39).

Se reviso un caso de adenocarcinoma de ampulla de Vater con microinfiltración celular pancreas, este presento DNA diploide y el tumor medianamente diferenciado; cursa actualmente con buena evolución clínica, des

pués de haberle efectuado una operación de Whipple. No se encontraron en la literatura información en relación a la ploidia de estos tumores.

La literatura menciona la utilidad de este método para el estudio de otros organos fuera del tracto gastrointestinal (29,77,78) con valores similares a las grandes series realizadas en tracto gastrointestinal.

El cancer en los ultimos años ha prestado una atención muy importante, ya en 1986 se han logrado establecer alteraciones del cromosóma 1 en varios tumores del ser humano (2).

Para finalizar, en nuestra serie, todos los pacientes tienen una evolución menor a un año, por lo que no es posible por el momento valorar en forma real la sobrevivida a 5 años. Será importante seguir a estos pacientes para obtener datos mas concluyentes.

CONCLUSIONES

1. Al hacer mediciones del contenido de DNA en células cancerosas de 7 pacientes con tumores del Aparato Digestivo, se encontraron valores distintos al contenido Diploide.
2. No presentaron alteraciones en el contenido del DNA 3 pacientes con polipos, su evolución por el momento ha sido satisfactoria.
3. Las neoplasias malignas de colon y recto presentaron células con DNA ANEUPLOIDE, presentando mayor infiltración tisular y por ende mayor riesgo de metástasis en comparación con el paciente con DNA Diploide. Esto no se observó del todo en los tumores de esófago, estómago y ampulla de Vater.
4. No se logró valorar una supervivencia a 5 años en los pacientes con tumores del Aparato Digestivo, ya que su evolución por el momento es relativamente corta.
5. Esta técnica de preparación de células con tinción, con Anaranjado de Acridina, para valorar el contenido de DNA, es útil para la investigación básica del cancer y sus resultados pueden ser comparados con la citometría de flujo cuando se realizó hidrólisis ácida por 8.5 minutos.
6. Esta técnica puede utilizarse en todo tipo de tumores, para su ma

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

por entendimiento, así como para valorar potenciales malignos.

7. Será conveniente valorar esta técnica, utilizando células de tejido fresco y compararlas con células embebidas en parafina, correlacionando los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Araki Y.
Flow cytometric DNA analysis in rectal carcinomas.
Nippon Geka Gakkai Zasshi. Journal of the Japanese Surgical Society,
1989 Dec, 90(12):1965-75.
- 2.- Atkin Niels B.
Chromosome 1 aberrations in Cancer
Cancer Genet Cytogenet, 1986, 21:279-285.
- 3.- Banner BF; Chacho MS et al.
Multiparameter flow cytometric analysis of colon polyps.
American Journal of Clinical Pathology , 1987 Mar , 87(3):313-8
- 4.- Buvon F; Laquerriere A et al.
Flow cytometry of polypoid neoplasm of the colon resected by endoscopy.
Gastroenterologie Clinique et Biologique, 1989 Aug-Sep, 13(8-9):671-5.
- 5.- Bauer KD; Lincoln ST et al.
Prognostic implications of proliferative activity and DNA aneuploidy
in colonic adenocarcinomas.
Laboratory Investigation , 1987 Sep , 57(3):329-35.
- 6.- Bocquillon PG; Daver A et al.
Flow cytometric analysis of DNA abnormalities in colorectal carcinomas
Bulletin du Cancer , 1989, 76(3):291-300
- 7.- Bronzo R; Hait P et al.
Implications of flow cytometry in malignant conditions of the stomach.
American Journal of Gastroenterology, 1989 Sep , 84(9):1065-8.
- 8.- Burmer GC; Levine DS et al.
c-Ki-ras mutations in chronic ulcerative colitis and sporadic colon
carcinoma.
Gastroenterology , 1990 Aug , 99(2):416-20.

- 9.- Claud RD 3d; Weinstein RS et al.
Comparison of image analysis of imprints with flow cytometry for DNA analysis of solid tumors.
Modern Pathology , 1989 Sep ,2(5):463-7
- 10.- Czerniak B; Herz F et al.
DNA distribution patterns in early gastric carcinomas. A Feulgen cyto metric study of gastric brush smears.
Cancer , 1987 Jan 1, 59(1):113-17.
- 11.- Didolkar Mukund S.
Editorial Comment
The American Journal of Surgery , 1990 Feb , 159(2):202-203
- 12.- Edwards JM; Jones DJ et al.
Ploidy as a prognostic indicator in oesophageal squamous carcinoma and its relationship to various histological criteria.
Journal of Pathology , 1989 Sep , 159(1):35-41.
- 13.- el-Naggar AK; Ro JY et al.
Gastrointestinal stromal tumors: DNA flow cytometric study of 58 pa- tients with at least five years follow-up.
Modern Pathology , 1989 Sep, 2(5):511-5.
- 14.- Enblad P; Glimelius B et al.
The prognostic significance of DNA content in carcinoma of the rectum and rectosigmoid.
Acta Chirurgica Scandinavica , 1987 Jul-Aug , 153(7-8):453-8.
- 15.- Enblan P; Glimelius B.
The DNA content in rectal adenomas.
Anticancer Research , 1989 May-Jun , 9(3):749-52.
- 16.- Evenson D; Darzynkiewicz Z.
Acridine orange-induced precipitation of mouse testicular sperm cell DNA reveals new patterns of chromatin structure.
Experimental Cell Research , 1990 Apr , 187(2):328-34

- 17.- Finan PJ; Quirke P et al.
Is DNA aneuploidy a good prognostic indicator in patients with advanced colorectal cancer ?
Br J. Cancer , 1986 Aug , 54(2):327-30
- 18.- Fischbach W; Mossner J et al.
Tissue carcinoembryonic antigen and DNA aneuploidy in precancerous and cancerous colorectal lesions.
Cancer , 1990 Apr 15, 65(8):1820-4.
- 19.- Fozard JB; Quirke P et al.
DNA aneuploidy in ulcerative colitis.
Gut , 1986 Dec , 27(12):1414-8.
- 20.- Frankfurt OS; Arbuck SG et al.
Prognostic applications of DNA flow cytometry for human solid tumors.
Annals of the New York Academy of Sciences , 1986 , 468: 276-90.
- 21.- Fukuda H; Miyoshi N et al.
Different instability to nuclear DNA at acid hydrolysis in cancerous and noncancerous cells as revealed by fluorescent staining with acridine orange.
Histochemistry , 1986 , 84(4-6):556-60.
- 22.- Giaretti W; Santi L.
Tumor progression by DNA flow cytometry in human colorectal cancer.
International Journal of Cancer, 1990 Apr , 15, 45(4):597-603.
- 23.- Giaretti W; Sciallero S et al.
DNA flow cytometry of endoscopically examined colorectal adenomas and adenocarcinomas.
Cytometry , 1988 May , 9(3):238-44.
- 24.- Goh HS; Jass JR.
DNA content and the adenoma-carcinoma sequence in the colorectum
Journal of Clinical Pathology , 1986 Apr , 39(4):387-92.

- 25.- Goh HS.
Flow cytometry and colorectal neoplasia.
Annals of the Academy of Medicine, Singapore, 1987 Jul, 16(3):535-8.
- 26.- Goh HS; Jass JR et al.
Value of flow cytometric determination of ploidy as a guide to prognosis in the operable rectal cancer: a multivariate analysis.
Int J Color Dis , 1987 Feb, 2(1):17-21.
- 27.- Hamada S; Itoh R et al.
DNA distribution pattern of the so-called severe dysplasia and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression.
Cancer, 1988 Apr 15, 61(8):1555-62.
- 28.- Heimann TM; Miller F et al.
Significance of DNA content abnormalities in small rectal cancers.
American Journal of Surgery, 1990 Feb, 159(2):199-203.
- 29.- Hermansen DK; Melamed MR et al.
Ethanol fixation of bladder irrigation specimens for flow cytometric analysis. A multiinstitutional study from the bladder cancer flow cytometry network.
Cancer, 1989 May 1, 63(9):1780-3.
- 30.- James PD; Atkinson M.
Value of DNA image cytometry in the prediction of malignant change in Barrett's esophagus.
Gut, 1989 Jul, 30(7):899-905.
- 31.- Jin-Ming Yu; Yang LH et al.
Flow cytometric analysis DNA content in esophageal carcinoma. Correlation with histologic and clinical features.
Cancer, 1989 Jul 1, 64(1):80-2.

- 32.- Joensuu H; Soderstrom KO et al
Nuclear DNA content and its prognostic value in lymphoma of the stomach
Cancer, 1987 Dec 15, 60(12):3042-8.
- 33.- Jones DJ; Moore M et al.
Refining the prognostic significance of DNA ploidy status in colorectal
cancer: a prospective flow cytometric study.
International Journal of Cancer, 1988 Feb, 15, 41(2):206-10.
- 34.- Kaketani K; Saito T et al.
Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in esophageal cancer.
Aneuploidy as an index for highly malignant potential.
Cancer, 1989 Aug 15, 64(4):887-91.
- 35.- Kapuscinski J; Darzynkiewicz Z.
Denaturation of nucleic acids induced by intercalating agents. Bio-
chemical and biophysical properties of acridine orange-DNA complexes.
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 1984, 1 485-99.
- 36.- Kokal W; Sheiban K et al.
Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma.
Jama, 1986 Jun 13, 255(22):3123-7.
- 37.- Korenaga D; Okamura T et al.
DNA ploidy is closely linked to tumor invasion, lymph node metastasis
and prognosis in clinical gastric cancer.
Cancer, 1988 Jul 15, 62(2):309-13.
- 38.- Kunika JE; Darzynkiewicz Z et al.
DNA in situ sensitivity to denaturation: a new parameter for flow cy-
tometry of normal human colonic epithelium and colon carcinoma.
Cancer Research, 1987 Aug 1, 47(15):3942-7.
- 39.- Laurent-Puig P; Remvikos Y et al.
Dysplasia states of the digestive tract and flow cytometry.
Gastroenterologie Clinique et Biologique, 1989, 13(2):179-81.

- 40.- Liu FS; Rubio CA.
DNA analysis of early esophageal cancer and epithelium adjacent to the cancer.
Chung-Hua Chung Liu Tsa Chih chinese Journal of Oncology, 1988 Jan, 10(1):26-8
- 41.- Lofberg R; Tribukait B et al.
Flow cytometric DNA analysis in longstanding ulcerative colitis: a method of prediction of dysplasia and carcinoma development?
Gut, 1987 Sep, 28(9):1100-6.
- 42.- Lofberg R.
Studies in longstanding ulcerative colitis with special reference to malignant transformation of the colorectal mucosa.
Acta Chirurgica Scandinavica. Supplementum, 1989, 552:1-45.
- 43.- Macartney JC; Camplejohn RS.
DNA flow cytometry of histological material from dysplastic lesions of human gastric mucosa.
Journal of Pathology, 1986 Oct, 150(2):113-8.
- 44.- Seymour I. Schwartz and Harold Ellis.
Maingot's Abdominal Operations
Ninth Edition Vol II. 1989. Ed. Appleton & Lange.
- 45.- Matthews J; Sausa S et al.
Proliferation patterns and aneuploidy in adenomatous polyps of the colon.
British Journal of Surgery, 1988 Sep, 75(9):906-9.
- 46.- McKinley MJ; Budman DR et al.
DNA content in Barrett's esophagus and esophageal malignancy.
American Journal of Gastroenterology, 1987 Oct, 82(10):1012-5.
- 47.- McKinley MJ; Budman DR; Kahn E.
High grade dysplasia in Crohn's colitis characterized by flow cytometry.
Journal of Clinical Gastroenterology, 1987 Aug, 9(4):452-5.

- 48.- Melamed MR; Enker WE et al.
Flow cytometry of colorectal carcinomas with three-year follow-up.
Diseases of the Colon and Rectum, 1986 Mar, 29(3):184-6.
- 49.- Melville DM; Jass JR et al
Dysplasia and deoxyribonucleic acid aneuploidy in the assesment of precancerous changes in chronic ulcerative colitis. Observer variation and correlations.
Gastroenterology, 1988 Sep, 95(3):668-75.
- 50.- Moriki T; Hiroi M et al.
Effects of methylnitrosourea on visualization of acridine orange binding to DNA in mouse lymphoma L-1210 cells.
Pathology, Research and Practice, 1986 May, 18(2)206-12.
- 51.- Morotomi H; Kamachi M et al.
Cell kinetics and histological types of gastric cancer as studied by DNA-RNA cytofluorometry after acridine orange fluorescence staining.
Gan No Rinsho. Japanese Journal of Cancer Clinics, 1986 Oct, 32(12): 1540-8.
- 52.- Mured T; Bauer K et al.
Histopathologic and flow cytometric analysis of adenomatous colonic polyps.
Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 1989 Sep, 113(9):1003-8.
- 53.- Nenus DM; Kelsen DP et al.
Flow cytometry as a predictive indicator in patients with operable gastric cancer.
Journal of Clinical Oncology, 1989 Aug, 7(8):105-12.
- 54.- Oddegard S; Hostmark J et al.
Flow cytometric DNA studies in human gastric cancer and polyps.
Scandinavian Journal of Gastroenterology, 1987 Dec, 22(10):1270-6.
- 55.- Ohno S; Korenaga D et al.
DNA aneuploidy assesment of the effectiveness of hyperthermo-chemo-radiotherapy for esophageal carcinoma.

Cancer, 1989 May 15, 63(10):1951-5.

- 56.- Ohyama S; Yonemura Y et al.
Flow cytometric cell cycle analysis using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine on gastric cancer.
Nippon Geka Gakkai Zaasshi. Journal of the Japanese Surgical Society, 1989 Nov, 90(11):1848-54.
- 57.- Petcharuttana Y; Cutter GR et al.
Fluorescence microscopy of DES-induced morphologic transformation in unfixed, cultured cells.
Journal of Oral Pathology Medicine, 1989 Sep, 18(8):451-6.
- 58.- Petras RE; Farmer RG et al.
Dysplasia in ulcerative colitis: aneuploidy versus morphology (letter).
Gastroenterology, 1989 Jul, 97(1): 243-5.
- 59.- Petrova AS; Subrichina GN et al.
DNA ploidy and proliferation characteristics of bowel polyps analysed by flow cytometry compared with cytology and histology.
Archiv fur Geschwulstforschung, 1986,56(3):179-91.
- 60.- Quirke P; Fozard JB et al.
DNA aneuploidy in colorectal adenomas.
British Journal of Cancer, 1986 Apr, 53(4):477-81.
- 61.- Quirke P; Dixon MF et al.
Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas.
Journal of Pathology, 1987 Apr, 151(4):285-91.
- 62.- Rabinovitch PS; Reid BJ et al.
Progression to cancer in Barrett's esophagus is associated with genomic instability.
Laboratory Investigation, 1989 Jan, 60(1):65-71.

- 63.- Richard AJ. (Medical Result)
A comparison by ultracentrifugation of the effects on DNA of ethidium bromide and of acridine orange at low ionic strength.
Biophysical Chemistry, 1987 Sep, 27(3):191-5.
- 64.- Robbins SL.
Patología Estructural y Funcional
Ed. Interamericana. 1ª Edición, 1975. México.
- 65.- Royere D; Hamamah S et al.
Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange and Feulgen-DNA cytophotometric studies.
Gamete Research, 1988 Sep, 21(1):51-7
- 66.- Rutegard J; Ahagren L et al.
DNA content in ulcerative colitis. Flow cytometric analysis in a patient series from a defined area.
Diseases of the Colon and Rectum, 1989 sep, 31(9):710-5.
- 67.- Sasaki K; Takahashi M et al.
Flow cytometric DNA measurement of gastric cancers. Clinico-pathological implication of DNA ploidy.
Pathology, Research and Practice, 1989 Jun, 184(6):561-6.
- 68.- Schutte B; Reynders MM et al
Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA content and proliferative activity in large bowel carcinoma.
Cancer Research, 1987 Oct. 15, 47(20):5494-6.
- 69.- Schwartz D; Banner BF et al.
Origin of multiple "primary" colon carcinomas. A retrospective flow cytometric study.
Cancer, 1986 Nov 1, 58(9):2082-8.
- 70.- Scivetti P; Donova M et al.
Prognostic significance of DNA content in large bowel carcinoma: a

retrospective flow cytometric study.
Cancer Letters, 1989 Aug, 46(3):213-9.

- 71.- Scott NA; Weiland LH et al.
DNA aneuploidy in solitary colonic adenomas and the future risk of colorectal cancer.
Diseases of the Colon and Rectum, 1988 Jun, 31(6):423-6
- 72.- Shao L; Lei DN.
Evaluation of DNA content in gastric dysplasia and carcinoma by image cytometry.
Chung Hua Ping Li Hsueh Tsa Chih, 1989 Dec, 18(4):254-6.
- 73.- Stalano-Coico L; Wong R et al.
DNA content of rectal scrapings from individuals at low and high risk for the development of colorectal cancer. A feasibility study.
Cancer, 1989 Dec 15, 64(12):2579-84.
- 74.- Stephens JK; Bibbo K et al.
Correlation between automated karyometric measurements of squamous cell carcinoma of the esophagus and histopathologic and clinical features.
Cancer, 1989 Jul 1, 64(1):83-7.
- 75.- Streffer C; van Beunigen D et al.
Predictive assays for the therapy of rectum carcinoma.
Radiotherapy and Oncology, 1986 Apr, 5(4):303-10.
- 76.- Suzuki H; Matsumoto K et al.
DNA ploidy of colorectal carcinoma. Correlation with conventional prognostic variables.
Journal of Clinical Gastroenterology, 1988 Apr, 10(2):176-8.
- 77.- Tetu B; Katz RL et al.
Flow cytometry of transitional cell carcinoma of the urinary bladder: influence of prior local therapy.
Seminars in Diagnostic Pathology, 1987 Aug, 4(3):243-50.

- 78.- Tetu B; Katz RL et al.
Acridine-orange flow cytometry of urinary bladder washings for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder. The influence of prior local therapy.
Cancer, 1987 Oct 15, 60(8): 1815-22.
- 79.- Torleiv O. Rognum et al.
Comparison of Two CEA assays in primary and recurrent large bowel carcinoma with different DNA ploidy pattern.
European Journal of Cancer and Clinical Oncology, 1986 , 22(10):1165-69.
- 80.- Tosi P; Leoncini L et al.
Flow cytometric analysis of DNA ploidy pattern from deparaffinized formalin-fixed gastric cancer tissue.
International Journal of Cancer, 1988 Dec 15, 42(6):666-71.
- 81.- Van den Ingh; Griffioen G et al
DNA aneuploidy in colorectal adenomas (letter)
British Journal of Cancer, 1987 Mar, 55(3):351.
- 82.- Walle AJ; Wong GY.
Binding of acridine orange to DNA in situ of cells from patients with acute leukemia.
Cancer Research, 1988 Jul 1, 49(13):3692-5.
- 83.- Wersto RP; Greenbaum E et al.
Deoxyribonucleic acid ploidy and cell cycle events in benign colonic epithelium peripheral to carcinoma.
Laboratory Investigation, 1988 Feb, 58(2):218-25.
- 84.- Yonemura Y; Doyama S et al.
Retrospective analysis of the prognostic significance of DNA ploidy patterns and S-phase fraction in gastric carcinoma.
Cancer Research, 1990 Feb 1, 50(3):509-14.

85.- Yonemura Y; Sugiyama K et al.

DNA ploidy pattern in diffuse infiltrating carcinomas of the stomach.
Nippon Geka Gakkai Zasshi. Journal of the Japanese Surgical Society,
1989 May, 90(5):681-5.

86.- Zaloudik J; Moore M et al.

The DNA content of colorectal carcinomas: an analysis of the
heterogeneity of aneuploidy and correlation with immunopathological
parameters.

Neoplasma, 1988, 35(4):389-40.