

# Estudio de Citometría de Flujo en Tumores Óseos

Dra. Joyse Cortéz\*, Dr. Antonio Aguilera\*, Dr. Raúl Torrealba\*

Dra. Joyse Cortéz, Dr. Antonio Aguilera, Dr. Raúl Torrealba. **Estudio de Citometría de Flujo en Tumores Óseos.**  
Revista Venezolana de Cirugía Ortopédica y Traumatología. Vol. 30, Nº 2, Octubre 1998.

## RESUMEN

Se estudiaron 21 pacientes, en edades comprendidas entre 5 y 45 años de edad con tumores óseos, se les realizó biopsia incisional con dos tomas de muestras: una para determinar Índice de ADN y la otra para estudio anatomopatológico. Se estudia la correlación entre la Citometría de flujo (estudio de ADN) y la Anatomía Patológica Convencional (tipo histológico), previa a la quimioterapia neoadyuvante y la cirugía definitiva y durante la quimioterapia adyuvante con cirugía definitiva, todo esto permite establecer el pronóstico y las posibilidades de recurrencia y/o metastasis en Osteosarcomas, también establecer cuál paciente responderá y en qué medida a los protocolos de quimioterapia de una manera individualizada. Se logra planificar la cirugía y el protocolo de quimioterapia con mayores beneficios para cada paciente en particular.

## PALABRAS CLAVE

Citometría de Flujo, Tumores Óseos.

## ABSTRACT

A study is made on 21 patients (age 5-45 years) with lone tumors on whom two incisional biopsies were made. One for ADN index and the other for pathology.

Upon the results obtained the planning of surgery and chemotherapy is better scheduled.

## KEY WORDS

flow Citometry. Bone tumors.

## Introducción

La Histología Convencional nos permite establecer la diferencia entre un Osteosarcoma de variedad Osteoblástica, de variedad Condrolástica o Fibroblástica, hasta ahora era el único método para establecer dicha diferenciación; para ello se basa: en la apariencia celular, y la matriz producida por la lesión existente, comparando ésto con los tejidos circunvecino sanos.

La gran dificultad en el manejo Clínico, Quimioterapéutico y Quirúrgico de los pacientes con Osteosarcoma, radica en establecer cuál lesión y en qué medida responderá, al protocolo de Quimioterapia pre-establecido, cual lesión y en que grado creará resistencia.<sup>3</sup>

Sabemos que pacientes con Osteosarcomas bien estudiados, bien manejados, con específico protocolo

de Quimioterapia, responden de manera distinta a otro paciente con un Osteosarcoma (OS) del mismo estadio, con igual edad, sexo, localización y hallazgos imagenológicos similares. En otras palabras la histología convencional nos permite diferenciar un OS. Osteoblástico, de un OS. Condrolástico y/o de otro tipo histológico, pero no nos permite predecir cuál de ellos responderá y en qué medida al protocolo de Quimioterapia y cuál de ellos creará resistencia.

Actualmente el cáncer es considerado una enfermedad multifactorial, gracias a los estudios de biología molecular se ha podido establecer que las mutaciones genéticas han sido identificadas en algunos pacientes con sarcomas. Hallazgos recientes en estudios de familias con cáncer han demostrado que algunos de sus miembros son portadores de defectos genéticos que los predisponen a padecer de OS. Como ocurre también con el Tumor de Willms, el Linfoma de Burkitt y el Tumor de Ewing.<sup>3</sup>

Es uno de nuestros objetivos iniciales establecer la correlación de:

\* Centro Médico Maracay  
Trabajo presentado en las XXXIII Jornadas de la S.V.C.O.T - Maracaibo, Septiembre 1998.

- 1- Por Citometría de Flujo: estudio del ADN patológico (establecido como un procedimiento de rutina en nuestros pacientes con Tumores benignos y malignos óseos).
- 2- Hallazgos de la anatomía patológica convencional.
- 3- Correlacionamos también la biopsia previa a la quimioterapia neoadyuvante y a posteriori los resultados histopatológicos, y estudios de Citometría de Flujo, cuando se realiza la cirugía definitiva, lo cual nos ha permitido establecer consideraciones con relación al pronóstico y recidiva en los pacientes de una manera individualizada.

## MARCO TEÓRICO

### Citometría de flujo<sup>1</sup>

Dentro de sus múltiples aplicaciones en la práctica clínica, nos va a permitir, el análisis Citométrico del ciclo celular, aplicado al diagnóstico y manejo terapéutico de los tumores sólidos, en este caso en particular de los tumores óseos.

A partir de este análisis citométrico vamos a obtener información de:

1. Inestabilidad Genómica: Aneuploidía del ADN.
2. Expansión clonal: Proliferación Celular (Fase S) y Pool de Apoptosis.
3. Heterogeneidad Tumoral: Subpoblaciones celulares.

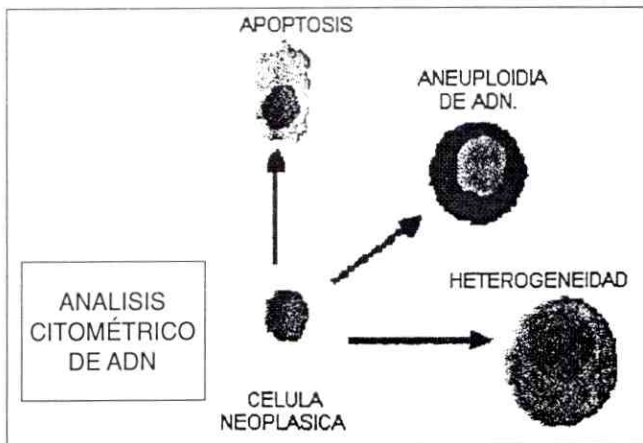


Fig. 1 Información proporcionada por el análisis citométrico del ADN.

### 1- Aneuploidía del ADN

Un contenido aneuploide de ADN refleja anomalías numéricas o estructurales a nivel cromosómico como consecuencia de la desestabilización genómica.

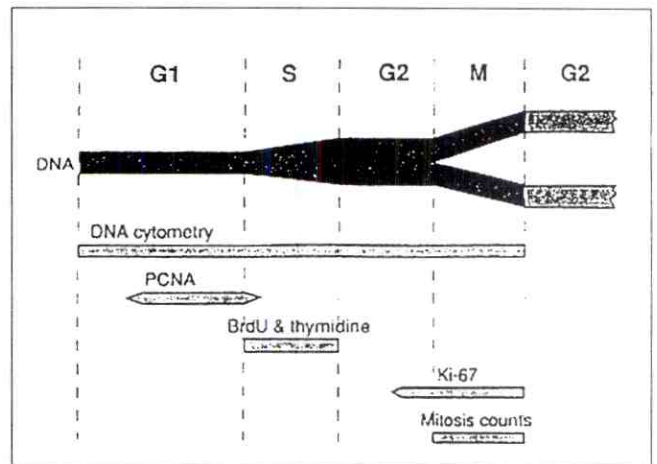
La citometría de flujo aplicada al estudio de ADN en tumores sólidos nos suministra información sobre la existencia de distintos clones celulares presentes. Las medidas del contenido en ADN deben ser referidas a células con contenido normal de ADN y las diferencias entre ambas deben ser expresadas en términos del Índice de ADN.

El Índice de ADN es la relación entre el valor nodal o la media del pico de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de la población anormal, respecto a la medida del pico de G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> de la población de referencia.

El término del ADN aneuploidía es utilizado para describir una población con contenido citométrico de ADN anormal.

### 2-Proliferación celular: fase S.

La cuantificación de la actividad proliferativa y de la cinética celular es útil en el estudio de este proceso biológico para estimar el potencial de crecimiento Tumoral.



Pool de apoptosis: este término fue definido originalmente para incluir ciertas características morfológicas como daños en la membrana, disminución del tamaño nuclear y citoplasmático y condensación de la cromatina diferentes al proceso de necrosis. Esta definición se usa ampliamente para referirse a todas las características Bioquímicas y Morfológicas de la muerte celular programada; es característico de las células en Apoptosis la ruptura del ADN, estas rupturas o escisiones del ADN pueden ser detectadas por Citometría de Flujo (extracción de ADN de bajo peso molecular previa a la tinción celular o marcaje de las rupturas in situ).

**3-Heterogeneidad Tumoral:** la carcinogenesis es un proceso vinculado a modificaciones genómicas en una célula somática singular cuya generación y expansión produce subclones anormales. Dichos clones anormales en su contenido de ADN son detectados frecuentemente en lesiones malignas y premalignas con el uso de la Citometría de Flujo.

En resumen la Citometría de Flujo nos proporciona una aproximación de los cambios genómicos ocurridos en las células tumorales. El análisis de la ploidía del ADN se ha utilizado para investigar la heterogeneidad tumoral tanto en carcinomas primarios como en metástasis.

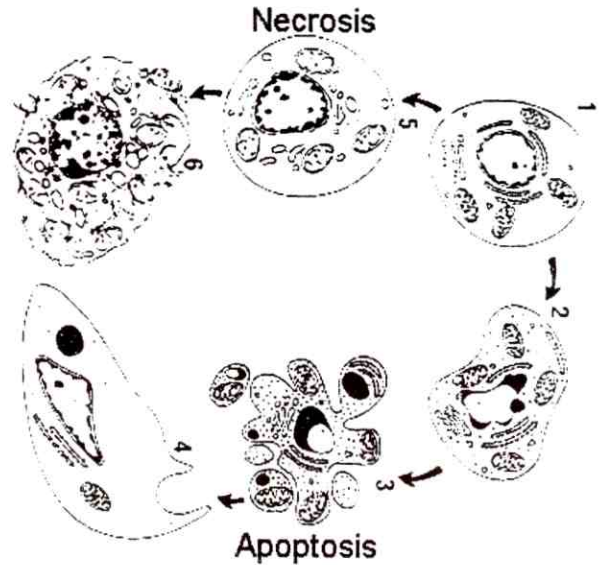
### TECNICAS DE CITOMETRIA<sup>1</sup>

Las Técnicas de Citometría se agrupan en: Citometría de Flujo y Citometría Estática, de todos los métodos cuantimétrico de mayor aplicación práctica son la Ploidía y la Proliferación celular, ya que el pronóstico de muchos tumores se relaciona con la carga de ADN y con la actividad mitótica.

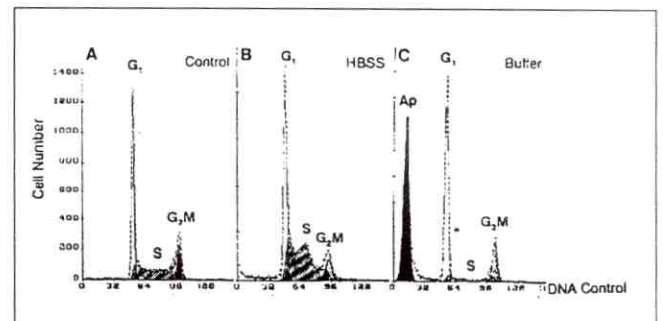
El Material Biológico objeto de estudio puede ser de cultivos celulares, de tejido fresco (el utilizado por nosotros), bloques de parafina tras fijación en formal o de citología.

La ploidía en la Citometría se recoge en histogramas que se comparan con los de poblaciones celulares control. Normalmente cerca del 90% de las células en un tejido están en fase G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> del ciclo celular o lo que es lo mismo en un momento en que no se están dividiendo y su carga cromosómica esta formada por el número de pares de cromosomas propios de la especie (2c). El resto de las células están adquiriendo material de ADN o ya han alcanzado la cantidad doble (4c) y por tanto están preparándose o dispuestas para la mitosis. Son la fase S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. Por ello el histograma representativo de una población celular, está formado por un pico alto y mayor (2c) que corresponde a las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, una fase de meseta que corresponde a células en fase S que están sintetizando ADN y otro pico menor (4c) correspondiente a las células en G<sub>2</sub>/M.

El histograma se considera diploide si el pico primero y más alto, coincide con una desviación, en general, no muy superior al 10% con el de una población control que habitualmente está formada por hematíes de diversas especies o por células no tumorales del individuo en que estaba el tumor.



Cuando la distribución de las células en el problema coincide con el control se dice que el Índice de ADN (ID) es de 1, y nuestro caso sería Diploide. Todos los ID distintos de 1 se denominan Aneuploides, un ID de 2 se denomina tetraploide y multiploide.



La aneuploidía es frecuente en los tumores malignos y en general es un parámetro que señala peor pronóstico, aunque en algunos tumores debido a la mayor sensibilidad a los tratamientos, como ocurre en cervix y linfomas, indica lo contrario. Por estudios de cancerogénesis en animales se ha visto que antes de la transformación a carcinoma los epitelios presentan aneuploidía.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 21 pacientes, durante dos años, en edades comprendidas entre 5 y 45 años, de ambos

sexos, realizándoseles exámenes de Laboratorio de rutina, estudios imagenológicos de Radiología Convencional, Tomografía Axial Computarizada, Resonancia Magnética y TAC Helicoidal 3D, con características de benignidad y malignidad, a todos se les realizó biopsia incisional, por el mismo equipo de cirujanos, manteniendo todos los criterios establecidos por las normas internacionales en la práctica y/o realización de biopsias<sup>2</sup>

Las muestras obtenidas (todas dirigidas por amplificador de imágenes, con imágenes congeladas y dinámicas) fueron procesadas de la siguiente manera:

- 1- Tejido en Fresco transportado en tubos de ensayo con solución fisiológica y conservados en recipientes con hielo, cuya finalidad es determinar y/o estudiar el Índice de ADN y la fase S del ciclo celular (Proliferación celular).
- 2- Tejido en fresco transportado en recipientes con formol unos y otros en solución fisiológica, para el estudio Histopatológico, lógicamente con la finalidad de determinar el Grado Histológico de la lesión de acuerdo a la clasificación histológica de Broders, (analizadas por el mismo equipo de anatomopatólogos).

Con los resultados definitivos de lo anteriormente descrito, se estableció tentativamente:

- A- Procedimiento quirúrgico a realizar.
- B- Protocolo de quimioterapia neoadyuvante y adyuvante en los casos necesarios, hasta realizar en estos últimos la cirugía definitiva.

A las piezas resecadas en la cirugía definitiva, se les tomaron muestras, para los procedimientos anteriormente descritos, así como también se les realizó a todas mapeo histológico, para determinar el porcentaje de necrosis tumoral de acuerdo a los criterios de Rossen.

El estado, conservación, transporte y almacenaje de las muestras son factores determinantes para garantizar resultados óptimos.

## RESULTADOS

Los nueve (9) pacientes con diagnóstico histopatológico de benignidad (Ver cuadro) presentaron un Índice de ADN = DIPLOIDE (igual a uno), con Fase S de proliferación celular sin anomalía, cuya cirugía definitiva fue satisfactoria sin ninguna recidiva de la lesión, sin distinción de sexo y/o edad.

De los doce pacientes con resultados histopatológicos de malignidad se evidenció: (anexos 1 y 2).

1- El 50% presentaron un Índice de ADN = DIPLOIDE, de los cuales son OS de bajo Grado, con Fase S de proliferación celular aumentada al doble de la célula de tejido óseo sano y un OS de bajo Grado, del que Fase S aumentó seis veces el porcentaje de proliferación celular en comparación con la célula de tejido óseo sano, respondieron satisfactoriamente al protocolo de quimioterapia, con un porcentaje de necrosis tumoral del 90% y la cirugía definitiva con aloinjerto fue satisfactoria

2- El 33% presentaron Índice de ADN = ANEUPLOIDE (mayor de uno) todos los pacientes resultaron con OS de Alto Grado de Malignidad, con Fase S aumentada, uno de los pacientes no respondió al protocolo de Quimioterapia, con MT a distancia no se logró realizar cirugía definitiva, los tres pacientes restantes respondieron con poca efectividad a la quimioterapia, con un porcentaje de necrosis tumoral, entre 65% y 75% se les realizó cirugía definitiva, pero se evidenció recidiva local en un año posterior a la cirugía definitiva, dos de ellos con MT a distancia y muerte.

3- El 17% presentaron Índice de ADN = NEAR DIPLOIDE (entre uno y uno punto dos) de los cuales, un paciente con OS de Bajo Grado de malignidad y fase S sin alteración y otro paciente con OS de Alto grado con fase S duplicada con respecto a tejido óseo sano.

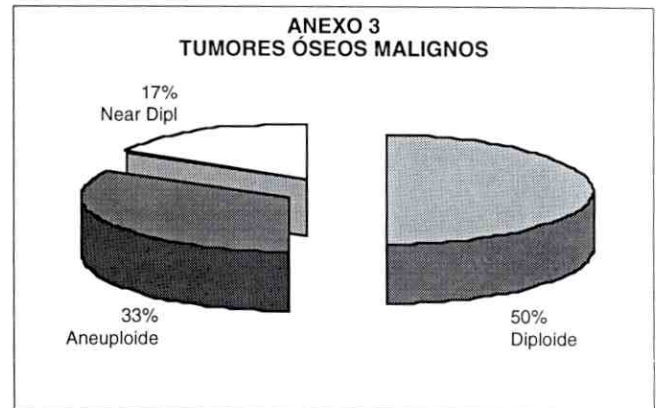
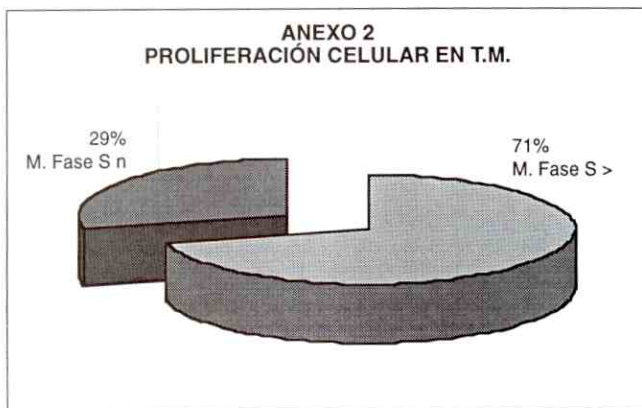
## CONCLUSIONES

Este estudio muestra claramente que la Citometría de flujo del ADN puede ser aplicada a la mayoría de los tumores primarios de hueso a pesar del sustancial contenido de tejido duro, además los resultados indican que las determinaciones de ADN como un complemento al estudio histológico convencional, puede proveernos de una información clínica objetiva con relación al pronóstico de respuesta a la quimioterapia, recidiva local y/o metástasis a distancia.

Todos los pacientes con tumores óseos histopatológicamente benignos presentan Índice de ADN diploides, con Fase S normal, por lo tanto no presentarán alteraciones del ciclo celular y el 90% de sus células se encontrarán en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y sólo el 10% está en fase G<sub>2</sub>/M, el resultado quirúrgico definitivo es siempre exitoso. (Anexos 1 y 3).

Todo paciente con Tumor óseo histopatológicamente OS de bajo grado de malignidad, Índice ADN = Diploides y fase S aumentada, responderán satisfactoriamente a

ANEXO 1				
NOMBRE	ANATOMÍA PATOLÓGICA	INDICE DE ADN	FASE S	TIPO DE TUMOR
G.M. 16 <sup>a</sup>	O.S. Bajo grado	DIPLOIDE	12%	MALIGNO
F.R. 5 <sup>a</sup>	Quiste Aneurismático	DIPLOIDE	4,3%	BENIGNO
C.H. 16 <sup>a</sup>	Condrolastoma	DIPLOIDE	2%	BENIGNO
V.B. 45 <sup>a</sup>	Fibrosis Reactiva	NEAR DIPLOIDE	4,8%	BENIGNO
T.L. 17 <sup>a</sup>	Displasia Fibrosa	DIPLOIDE	3,4%	BENIGNO
D.A. 28 <sup>a</sup>	Osteocondroma	DIPLOIDE	7,7%	BENIGNO
E.L. 14 <sup>a</sup>	Osteosarcoma	DIPLOIDE	10%	MALIGNO
B.L. 29 <sup>a</sup>	TU, Cel. Gigantes I	DIPLOIDE	5%	BENIGNO
H.G. 20 <sup>a</sup>	O.S. Alto Grado	NEAR DIPLOIDE	10,8%	MALIGNO
B.R. 24 <sup>a</sup>	O.S. Bajo Grado	NEAR DIPLOIDE	9,7%	MALIGNO
L.A. 15 <sup>a</sup>	O.S. Alto Grado	ANEUPLOIDE	15%	MALIGNO
J.T. 12 <sup>a</sup>	Displasia Fibrosa	DIPLOIDE	5%	BENIGNO
E.P. 43 <sup>a</sup>	Osteomielitis	DIPLOIDE	5%	BENIGNO
J.L. 42 <sup>a</sup>	O.S. Bajo Grado	DIPLOIDE	33%	MALIGNO
N.S. 38 <sup>a</sup>	Schwannoma	DIPLOIDE	2,6%	BENIGNO
A.C. 15 <sup>a</sup>	O.s. Bajo Grado	DIPLOIDE	15%	MALIGNO
*J.C. 6 <sup>a</sup>	O.S. Alto Grado	ANEUPLOIDE	30%	MALIGNO
D.B. 26 <sup>a</sup> +	O.S. Alto Grado	ANEUPLOIDE	32%	MALIGNO
A.G. 17 <sup>a</sup>	O.S. Bajo Grado	DIPLOIDE	12%	MALIGNO
H.A. 22 <sup>a</sup>	O.S. Alto Grado	ANEUPLOIDE	18%	MALIGNO
A.M. 19 <sup>a</sup>	O.S. Bajo Grado	DIPLOIDE	7,5%	MALIGNO



los protocolos de Quimioterapia Neoadyuvante (porcentaje de necrosis del 90%) y adyuvante, se les debe realizar cirugía definitiva, y sus posibilidades de recurrencia y/o metástasis no son observadas.

Pacientes con tumores óseos histopatológicamente OS de alto grado de malignidad, Índice de ADN = Aneuploides y fase S aumentada, responderán deficientemente o escasamente a los protocolos de Quimioterapia.

pia Neoadyuvante (porcentaje de necrosis entre 65% y 75%) y adyuvante, el porcentaje de recidiva local y metástasis posterior a cirugía definitiva es alto.

La Fase S del ciclo celular fue mayor en tumores óseos de alto grado de malignidad y es un buen estimador de recurrencia y metástasis (MT), a mayor fase S mayor recurrencia y MT.(Anexo 3).

Asociando los parámetros clínicos-patológicos y el perfil cinético, podemos formular medidas pronósticas que pueden ser aplicadas para clasificar pacientes con alto riesgo de recidivas y MT de manera individualizada.

Los estudios de proliferación de fase S se relaciona con la supervivencia al tumor, la capacidad de recu-

rrencia y la sensibilidad a los tratamientos con quimioterapia.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fariña Joao: Técnicas y Bases Teóricas en Citometría de flujo. Boletín Iberoamericano de Citometría, 1996.
2. García filho, Reynaldo Jesús: Cartilha de Tumores Ósseos. Brasil-Sao Paulo 1ª Edicao, 1991.
3. Manqui, HJ, Et. Als: Journal Joint Surgery, 67-(3): 404-413, 1985.