Contenido de ADN y sobrevida en el carcinoma subseroso de la vesícula biliar

Iván Roa E¹, Xabier de Aretxabala U², Patricia Fuentealba A¹,
María Elena Cabrera C³, Juan C Araya O¹, Juan Roa S¹.

DNA content and survival in subserous gallbladder carcinoma

Background: The clinical and morphological characterization of the subserous gallbladder carcinomas is controversial. **Aim:** To study the prognostic importance of DNA content of subserous gallbladder carcinoma. **Material and methods:** We studied 104 females aged 60±12 years old and 16 men aged 70±13 years old. In all of them diagnosis was established after mapping of cholecystectomy sample and had a complete clinical follow up. DNA content was measured by flow cytometry. **Results:** All tumors were adenocarcinoma, and only 16% were well differentiated. Aneuploidy was observed in 29 cases (26%) with DNA index fluctuating between 1.1 and 1.8. Lymphatic vessel tumor involvement was present in 16 of 22 cases with aneuploidy and in 22 of 46 diploid tumors ($p=0.05$). Eighty nine percent of aneuploid tumors were detected macroscopically and 11% were unapparent. Five years survival was non significantly better among patients with diploid tumors than in patients with aneuploid tumors (45 and 28%, respectively, $p=0.2$). The histological differentiation was the only variable significantly associated with survival. **Conclusions:** Aneuploidy is present in 26% of subserous gallbladder carcinoma. It is not related with any of the morphological or clinical variables studied in this series of patients (Rev Méd Chile 2004; 132: 794-800).

(Key Words: Adenocarcinoma; DNA, neoplasm; Gallbladder neoplasms)

Recibido el 22 de octubre, 2003. Aceptado en versión corregida el 23 de enero, 2004.

Trabajo financiado por proyecto de investigación #12.333. Dirección de Investigación Universidad de la Frontera.

¹Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera.

²Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera.

³Sección de Hematología, Servicio Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Hospital El Salvador, Santiago.

Chile presenta una de las mayores frecuencias de cáncer de vesícula biliar (CV) del mundo, en ambos sexos, con una tasa de mortalidad que sobrepasa 14 x 100.000 habitantes¹⁻³. El cáncer vesicular incipiente presenta una sobrevida cerca-

na a 90% a cinco años, en cambio, los que tienen compromiso de la serosa no alcanzan el 20%^{4,5}.

En el CV se distinguen distintos estadios clínicos y patológicos, siendo el carcinoma subseroso (CSS) el de mayor dificultad en su evaluación clínica, histológica y pronóstica^{6,7}. En este estadio, el tumor está confinado a una túnica cuyos límites

Correspondencia a: Dr. Iván Roa. Casilla 54 D. Temuco, Chile. E mail: Iroa@ufro.cl

son imprecisos y no claramente reconocibles en el estudio histológico⁸.

Entre los factores inherentes al tumor y que determinan un comportamiento de mayor o menor agresividad está el contenido de ADN de las células tumorales⁹⁻¹¹. El contenido aneuploide de ADN está relacionado con la existencia de poblaciones celulares cuyo comportamiento biológico puede variar considerablemente^{11,12}. Se ha demostrado que la medición de la ploidia a través de citometría de flujo es una herramienta complementaria en la caracterización de diferentes procesos neoplásicos^{13,14}.

Las poblaciones celulares de tumores como carcinomas son heterogéneas desde el punto de vista morfológico y biológico. Se asume que esta heterogeneidad es el reflejo de la heterogeneidad genética a nivel celular, por lo cual un mismo tumor puede presentar clones con un distinto patrón de ploidia. Ha sido demostrado que cantidades anormales de ADN en las células tumorales son un factor pronóstico en algunas neoplasias^{12,15,16}. Existe escasa información respecto del cáncer de la vesícula biliar y contenido de ADN y, menos aún, en relación al grupo de carcinomas subserosos¹⁷⁻²⁰.

El objetivo de este trabajo es determinar el contenido de ADN en carcinomas subserosos de la vesícula biliar, correlacionar estos hallazgos con variables clínicas y anatomopatológicas e intentar evaluar su importancia como factor pronóstico en esta etapa de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODO

Selección de los casos. De los archivos de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Temuco, se seleccionaron 120 pacientes con carcinomas subserosos de vesícula biliar que tuvieron seguimiento clínico. En todos estos casos, el diagnóstico se hizo mediante el mapeo completo de la pieza quirúrgica.

Obtención de suspensiones nucleares. Se realizaron 3 cortes de 20 micrones para la obtención de núcleos y un corte consecutivo de 4 micrones, teñido con hematoxilina eosina. En esta última preparación se marcaron las áreas representativas

del tumor a microdisecar. De cada uno de los casos y del mismo corte, se seleccionaron áreas de mucosa tumoral y no tumoral, estas últimas fueron utilizadas como control interno. En las preparaciones 20 micrones, se realizó la microdissección de las áreas seleccionadas (micro disector hidráulico Narishige) y del tejido no tumoral.

Digestión enzimática. Se realizó con pepsina al 0,5% a pH 1,5 (Sigma), a 37°C durante 45 min con agitación constante, posteriormente fueron filtradas en malla de nylon de 40 micras y lavadas en NaCl 0,9%. Las suspensiones fueron teñidas con Propidium iodado al 0,05% (Tritón X-100 0,1% v/v en buffer PBS), pH 7,2, y posteriormente analizadas en el citómetro de flujo FacsCalibur (Becton y Dickinson) del Laboratorio de Hematología del Hospital del Salvador, en Santiago. Se realizaron mediciones previa calibración y utilización en cada caso de un control procesado de igual manera. Se registraron a lo menos 10.000 eventos. El archivo fue analizado mediante el programa Modfit LT, para determinar los histogramas correspondientes en forma automática. Los histogramas de los casos fueron comparados con los respectivos controles. El índice de ADN se obtuvo del cociente del número de canal del primer pico (G0/G1) del caso y del control. Para fines de este trabajo se definieron como patrón diploide a un índice de ADN menor o igual de 1,1 y un patrón aneuploide a aquel con un índice mayor de 1,1 (Figura 1).

En 88 casos, los tumores habían sido estudiados dirigidamente y mediante técnicas de histoquímica para la detección de permeaciones tumorales vasculares linfáticas, sanguíneas e infiltración perineural²¹. La información clínica, morfológica y sobrevida de los pacientes fue tabulada. El análisis estadístico y de sobrevida se realizó mediante el programa Winstat (v 3.0).

RESULTADOS

Se estudiaron 120 pacientes con carcinomas subserosos de vesícula biliar. El 87% correspondieron a mujeres con un promedio de edad de 60 años (DS 12,2 años) y los hombres con un promedio de edad de 70,1 años (DS 13,3 años). La totalidad de

FIGURA 1. Histograma diploide (izquierda), con un solo pico en G0/G1 y aneuploide (derecha) con dos picos que representan dos poblaciones celulares, la segunda localizada al doble del número del canal de la primera, es decir, tetraploide (índice de ADN= 2).

los tumores eran adenocarcinomas, sólo 16% de los tumores eran bien diferenciados, los restantes tumores con un menor grado de diferenciación (moderadamente o poco diferenciados).

Contenido de ADN. Se determinó el contenido de ADN mediante citometría de flujo en 112 carcinomas subserosos de la vesícula biliar. En 8 casos, las suspensiones nucleares no permitieron un adecuado análisis, con histogramas con coeficientes de variación mayores de lo recomendado para la interpretación de histogramas con este tipo de material, por lo que fueron eliminados del estudio. Se observó aneuploidia, es decir, un patrón anormal en 29 casos (26%), siendo los restantes 83 casos diploides (Tabla 1). No se observó un tipo especial de aneuploidia, siendo la mayor parte de ellas poliploidias con índices de ADN que fluctuaron entre 1,1 y 1,8. Los tumores tetraploides fueron escasos (2 casos).

Contenido de ADN y compromiso linfático, sanguíneo y perineural. El compromiso tumoral de vasos linfáticos estuvo presente en 16 de los 22 casos (73%) que presentaron aneuploidia, en cambio, sólo se observó en 22 de los 46 (48%) tumores diploides ($p=0,05$). Por su parte, no se observaron diferencias entre el contenido de ADN de las células tumorales y la presencia de permea-

Tabla 1.-Contenido de ADN en el carcinoma subseroso de la vesícula biliar

Contenido de ADN	n	%
Aneuploide	29	25,9
Diploide	83	74,1
Total	112	100,0

ciones tumorales sanguíneas o infiltración perineural. Aun cuando ambas fueron más frecuentemente observadas en los tumores aneuploides, estas diferencias no fueron significativas.

Un hecho interesante fue la relación observada entre el aspecto macroscópico de los tumores y el contenido de ADN. El 36% del total de los carcinomas subserosos no fueron detectados al examen macroscópico, es decir, fueron tumores inaparentes. En el grupo de los tumores aneuploides, 89% fueron evidentes macroscópicamente y sólo 11% fueron tumores inaparentes. En cambio, en el grupo de tumores diploides, más de la mitad (56%) fueron inaparentes, es decir, el contenido anormal de ADN se asoció a tumores evidentes y fácilmente detectables. Este hecho pudiese guardar relación con el carácter avanzado de los carcinomas subserosos y con el bajo grado de diferenciación de estos tumores. Es sabido que los

carcinomas incipientes y bien diferenciados, en su gran mayoría son tumores no detectados a ojo desnudo, es decir, inaparentes.

Sobrevida carcinoma subseroso de vesícula biliar. La sobrevida se muestra en la Figura 2. Se puede observar que la curva presenta áreas claramente identificables, correspondientes a los distintos ángulos de la pendiente del histograma. Las 2 primeras correspondientes al período de menos de 24 meses del postoperatorio, que son las de mayor impacto en la mortalidad. El primer período va desde la colecistectomía hasta los 10 meses del postoperatorio. En este período falleció el 35% del total de pacientes con carcinomas subserosos. Un segundo período de mal pronóstico se observa entre los 11 y los 25 meses, en el que la mortalidad alcanzó a 50% de los pacientes. Finalmente un tercer período, en que la mortalidad disminuyó progresivamente entre los 25 y 50 meses. A este período se agrega el 10% del total de pacientes que fallecieron en este estadio de la enfermedad. Posterior a los 60 meses, la curva de sobrevida se estabilizó en alrededor de 40% de sobrevida a cinco y diez años.

El grupo de tumores diploides tuvo una leve mejor sobrevida que los aneuploides a 5 años (45% *versus* 28%) (Figura 3), sin embargo, esta diferencia no alcanzó a ser significativa. La única

variable que mostró una diferencia significativa respecto de la sobrevida, fue el grado de diferenciación histológica. Así los pacientes con CSS bien diferenciados tuvieron una sobrevida de 65%, en cambio los tumores con menor diferenciación sólo alcanzaron a 37% a cinco años ($p=0,02$).

DISCUSIÓN

El carcinoma subseroso de la vesícula biliar, es el estadio del cáncer vesicular que ha presentado la mayor dificultad, tanto en el diagnóstico como en su manejo terapéutico^{6,22,23}.

La aneuploidia es una condición presente en alrededor de 30% de los carcinomas subserosos. En las metástasis de cáncer vesicular hemos observado aneuploidia en alrededor de 80%²⁴. Estas diferencias demuestran que entre los tumores confinados a la vesícula biliar y las metástasis, existen diferencias atribuibles a la célula tumoral. La selección clonal de las células con mayor potencial maligno y capacidad de dar metástasis son características que se expresan en las localizaciones secundarias del tumor. Los eventos que determinan este cambio en el contenido de ADN de las células tumorales y su importancia, es una pregunta que nuestros resultados no permiten contestar. La falta de asociación de la ploidia con

FIGURA 2. En línea punteada la proyección de la pendiente en la curva de sobrevida en el CSS. El primer grupo (a), se comporta con una proyección equivalente a la observada en los carcinomas serosos o más avanzados. El segundo grupo (b), correspondería al grupo de CSS propiamente tal, con un mal pronóstico, pero con sobrevidas intermedias entre ambos extremos. La búsqueda de elementos que permitan excluir al grupo a y c permitiría aplicar medidas más ajustadas para el tipo y estadio del tumor.

FIGURA 3.

variables clínicas y morfológicas como grado de diferenciación, compromiso tumoral de vasos sanguíneos y nervios, así como, su escasa asociación con la sobrevida de los pacientes, plantea la posibilidad que la alteración en el contenido de ADN en el carcinoma subseroso de la vesícula biliar corresponda más bien a un epifenómeno que a una alteración primaria.

Consideramos que el carcinoma subseroso de la vesícula biliar es una etapa intermedia entre los carcinomas incipientes, grupo claramente definido por su evolución biológica (89% de sobrevida a 5 años), y los carcinomas serosos con un pronóstico significativamente peor (10% de sobrevida a 5 años)^{4,25-27}.

En el carcinoma subseroso sería importante separar distintos grupos de pacientes, los que se insinúan en el análisis de la curva de sobrevida en los primeros 50 meses, grupos que tendrían una marcada diferencia respecto de su sobrevida. Así, un primer grupo se comporta como carcinoma seroso, sin sobrevida a los 36 meses, tal como ocurre en los pacientes con cáncer vesicular con compromiso de órganos adyacentes y de la serosa peritoneal. Para este grupo, las expectativas terapéuticas continuarían siendo escasas. En el extremo opuesto, se observa un grupo de pacientes que alcanza una sobrevida libre de

enfermedad de alrededor de 40% a 5 años y que disminuye a 38% a 10 años, sin otro tratamiento que la colecistectomía. Es posible deducir, que este grupo de pacientes fue curado con la colecistectomía simple y por lo tanto se han comportando como un carcinoma incipiente. La identificación de este grupo permitiría evitar las terapias complementarias a las cuales están siendo sometidos estos pacientes en la actualidad. Este grupo probablemente esté constituido por pacientes con tumores bien diferenciados, de bajo volumen tumoral y en los que el compromiso de la subserosa está representado por microfocos tumorales aislados, los que son eliminados en la colecistectomía.

Entre ambos extremos, existe un grupo intermedio de corta sobrevida y que representan alrededor de 15% del total de los pacientes con tumores subserosos. Este grupo de pacientes en la proyección de la pendiente en la curva de sobrevida, lograrían alcanzar sobrevidas de hasta 75 meses. A nuestro entender, este grupo de pacientes serían el grupo con carcinomas subserosos propiamente tales y se comportarían como un estadio de mal pronóstico, pero intermedio entre ambos extremos. Este grupo podría beneficiarse significativamente con las terapias complementarias de cirugía y quimio-radiación.

Desde nuestro punto de vista, un elemento importante sería realizar la reevaluación de las piezas quirúrgicas de estos casos. La aplicación de otras variables, tales como, cuantificar la microinvasión de la subserosa^{8,28}, determinación del tamaño y volumen tumoral con sencillos métodos

de morfometría²⁹, determinación de la exacta localización topográfica del tumor, cuantificar el compromiso de senos de Rokitansky-Aschoff³⁰⁻³², podrían contribuir a diferenciar grupos de pacientes con tumores de distinto significado biológico, terapéutico y pronóstico.

REFERENCIAS

- MEDINA E, KAEMPFER AM. Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Rev Méd Chile* 2001; 129: 1195-202.
- MEDINA E, KAEMPFER AM. Mortalidad del adulto en Chile. *Rev Méd Chil* 2000; 128: 1144-9.
- SERRA I. ¿Ha disminuido la mortalidad por cáncer vesicular en Chile? *Rev Méd Chil* 2001; 129: 1079-84.
- ROA I, DE ARETXABALA X, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA J, GILDA IT ET AL. Elementos morfológicos pronósticos en el cáncer de la vesícula biliar. *Rev Méd Chil* 2002; 130: 387-95.
- ROA I, DE ARETXABALA X, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA J, GUZMÁN P. Carcinoma incipiente de la vesícula biliar. Estudio clínico patológico y pronóstico de 196 casos. *Rev Méd Chil* 2001; 129: 1113-20.
- CHUIJIWA K, NAKANO K, UEDA J, NOSHIRO H, NAGAI E, YAMAGUCHI K ET AL. Surgical treatment of patients with T2 gallbladder carcinoma invading the subserosal layer. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 600-7.
- MORROW CE, SUTHERLAND DE, FLORACK G, EISENBERG MM, GRACE TB. Primary gallbladder carcinoma: significance of subserosal lesions and results of aggressive surgical treatment and adjuvant chemotherapy. *Surgery* 1983; 94: 709-14.
- ROA I, ARAYA JC, WISTUBA I, DE ARETXABALA X. Cáncer de la vesícula biliar: consideraciones anatómicas y anatomopatológicas. *Rev Méd Chil* 1990; 118: 572-9.
- VALVERDE JJ, MARTIN M, GARCÍA-ASENJO JA, CASADO A, VIDART JA, DÍAZ-RUBIO E. Prognostic value of DNA quantification in early epithelial ovarian carcinoma. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 409-16.
- BUT I, GORISEK B. DNA-ploidy as an independent prognostic factor in patients with serous ovarian carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 71: 259-62.
- CHOMA D, DAURES JP, QUANTIN X, PUJOL JL. Aneuploidy and prognosis of non small cell lung cancer: a meta-analysis of published data. *Br J Cancer* 2001; 85: 14-22.
- ABAD M, CIUDAD J, RINCON MR, SILVA I, PAZ-BOUZA JJ, LÓPEZ A ET AL. DNA aneuploidy by flow cytometry is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Anal Cell Pathol* 1998; 16: 223-31.
- PIETRA N, SARLI L, SANSEBASTIANO G, JOTTI GS, PERACCHIA A. Prognostic value of ploidy, cell proliferation kinetics, and conventional clinicopathologic criteria in patients with colorectal carcinoma: a prospective study. *Dis Colon Rectum* 1996; 39: 494-503.
- KURATSU S, TOMITA Y, MYOUI A, UCHIDA A, ONO K, AOZASA K. DNA ploidy pattern and cell cycle stage of tumor cells in soft tissue sarcomas: clinical implications. *Oncology* 1995; 52: 363-70.
- ABOU-REBYEH H, AL-ABADI H, JONAS S, ROTTER I, BECHSTEIN WO, NEUHAUS P. DNA analysis of cholangiocarcinoma cells: prognostic and clinical importance. *Cancer Detect Prev* 2002; 26: 313-9.
- DREINHOFFER KE, BALDETORP B, AKERMAN M, FERNO M, RYDHOLM A, GUSTAFSON P. DNA ploidy in soft tissue sarcoma: comparison of flow and image cytometry with clinical follow up in 93 patients. *Cytometry* 2002; 50: 19-24.
- YOSHIDA T, NAKAMURA S, SUGAI T. DNA ploidy and S phase fraction of neoplastic and non neoplastic lesions of the human gallbladder. *J Surg Oncol* 1996; 63: 9-16.
- SATO Y, TANAKA J, KOYAMA K, VAN GULIK TM, LYGIADAKIS NJ, VAN DER HEYDE MN. Tumor DNA content in gallbladder carcinoma. *Hepatology* 1993; 40: 375-9.
- SATO Y, TANAKA J, YOSHIOKA H, KOYAMA K. Evaluation of the malignancy in gallbladder cancer assessed by nuclear DNA contents and mitotic indices with special reference to the prognosis of the patients with cancer involvement to the subserosal layer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1991; 92: 46-51.

20. BARETTON G, BLASENBREU S, VOGT T, LOHRS U, RAU H, SCHMIDT M. DNA ploidy in carcinoma of the gallbladder. Prognostic significance and comparison of flow and image cytometry on archival tumor material. *Pathol Res Pract* 1994; 190: 584-92.
21. ROA I, GUZMÁN P, ARAYA JC, VILLASECA M, ROA JC, IBACACHE G ET AL. Invasión tumoral en el cáncer vesicular. Importancia del diagnóstico de la infiltración vascular. *Rev Méd Chil* 1998; 126: 42-8.
22. DE ARETXABALA X, ROA I, BURGOS L. Gallbladder cancer, management of early tumors. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 1547-51.
23. CHIIJIWA K, YAMAGUCHI K, TANAKA M. Clinicopathologic differences between long term and short term postoperative survivors with advanced gallbladder carcinoma. *World J Surg* 1997; 21: 98-102.
24. ROA I, ARAYA JC, SHIRAISHI T, YATANI R, WISTUBA I, VILLASECA M ET AL. DNA content in gallbladder carcinoma: a flow cytometric study of 96 cases. *Histopathology* 1993; 23: 459-64.
25. ROA I, DE ARETXABALA X, ROA J, ARAYA JC, VILLASECA M, GUZMÁN P ET AL. ¿Es el cáncer de la vesícula biliar una enfermedad de mal pronóstico? *Rev Méd Chil* 2002; 130: 1295-302.
26. BEHARI A, SIKORA SS, WAGHOLIKAR GD, KUMAR A, SAXENA R, KAPOOR VK. Longterm survival after extended resections in patients with gallbladder cancer. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 82-8.
27. FRENA A, CATALANO P, LA GUARDIA G, MARTIN F. Radical surgery for gallbladder carcinoma. *Chir Ital* 2001; 53: 801-7.
28. UCHIMURA M, MUTO Y, WAKI S. Controversy on early carcinoma of the gallbladder based on the results of surgical treatment. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1985; 86: 1085-8.
29. ELPEK GO, GELEN T, GULEC F, SEDELE M, KARPUZOGLU T, SULEYMANLAR I. Stereologic estimation of mean nuclear volume in well differentiated adenocarcinoma and carcinoma in situ of the gallbladder. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21: 445-8.
30. SHIRAI Y. Histological differentiation of Rokitansky-Aschoff sinus involvement from stromal invasion of carcinoma of the gallbladder. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1987; 88: 970-81.
31. YAMAGUCHI A, HACHISUKA K, ISOGAI M, TSUBONE M. Carcinoma *in situ* of the gallbladder with superficial extension into the Rokitansky-Aschoff sinuses and mucous glands. *Gastroenterol Jpn* 1992; 27: 765-72.
32. KAWARADA Y, SANDA M, MIZUMOTO R, YATANI R. Early carcinoma of the gallbladder, noninvasive carcinoma originating in the Rokitansky-Aschoff sinus: a case report. *Am J Gastroenterol* 1986; 81: 61-6.