

# ESTUDIO CROMOSOMICO Y CITOMETRIA DE FLUJO EN CANCER DE VESICULA BILIAR

*P. Sanz, A. Calvo \*\*, S. Castillo\*, L. Tobella\*, S. Salazar\*, V. Daher\*, G. Smok\*, A. Csendes\*, MR. Bendjerot\*, E. Nielsen\*\*, M. Pruyas\*\*, X. Freites\*\*\*, E. Rodríguez\*\*\*, S. Moyano\*\*\*, E. Olave\*\*\*\*, M. Sperger\*\*\*\*.*

*\*Servicios de Genética, Anatomía Patológica y Cirugía Hospital Clínico Universidad de Chile, \*\*Hospital Sótero del Río, \*\*\*Hospital Barros Luco, \*\*\*\*Hospital San José.*

## RESUMEN

A través de un proyecto Fondecyt (1940567), realizamos el estudio cromosómico y del contenido de DNA (o ploidía) en citómetro de flujo, en 23 muestras de adenocarcinoma de vesícula biliar, provenientes de pacientes operados en estados clínicos avanzados, con el fin de determinar la presencia de aberraciones cromosómicas que sean específicas de este cáncer, que puedan tener algún valor en el pronóstico o diagnóstico de la enfermedad, o bien que puedan ayudar en la búsqueda de un gen responsable de su desarrollo. También buscamos alteraciones del contenido de DNA (ploidía) en las mismas muestras, para determinar su validez en el pronóstico o diagnóstico clínico como se ha establecido para otros tumores malignos (1).

Todos los casos mostraron dos poblaciones celulares, una normal y otra con múltiples aberraciones cromosómicas, tales como deleciones, traslocaciones e inversiones.

## ABSTRACT

This investigation confirms the changes in DNA content in 23 patients with gallbladder carcinoma.

## INTRODUCCION

El cáncer de vesícula biliar es una patología maligna que ha cobrado gran importancia estos últimos años en nuestro medio. Chile es el país con la tasa más alta de mortalidad por cáncer de vesícula biliar, seguido por Japón(2). Representa la principal causa de muerte por tumor maligno en la mujer chilena(3). Tiene una prevalencia de 3.4% en mujeres y de 1.3% en varones colecistectomizados por colelitiasis(4). Generalmente es diagnosticado en etapas avanzadas, ya que no existen métodos de detección precoz y la sobrevida es baja, 3,5% a los 5 años. En 96% de los casos corresponden al tipo histológico de adenocarcinomas(5).

Actualmente existe escasa información sobre estudios citogenéticos en este cáncer. No se han comunicado aberraciones cromosómicas específicas que pudieran servir de ayuda en el diagnóstico o pronóstico de dicho cáncer o bien a través de las cuales se pudieran poner en claro la génesis molecular del proceso de cancerización(6,7).

Nosotros pretendemos a través de nuestros estudios citogenéticos descubrir aberraciones cromosómicas específicas de este cáncer y, tal vez, primarias (o ini-

ciales del tumor) que pudieran ser de utilidad en el diagnóstico y/o pronóstico clínico de esta enfermedad, como es propio de múltiples cánceres (leucemias, linfomas y otros tumores). Por otra parte las regiones cromosómicas comprometidas en las aberraciones estructurales encontradas, podrían orientar los estudios moleculares hacia un número limitado de genes (oncogenes, antioncogenes) que pudiesen estar posiblemente implicados en el desarrollo de este tumor.

## MATERIAL Y METODOS

Se procesaron 28 muestras para estudio citogenético empleando tejido fresco sin fijar. Paralelamente se realizó estudio histológico de estas mismas.

De éstas, 22 correspondían a adenocarcinomas de vesícula biliar y se procesaron para la obtención de cariotipo, con técnicas directas (Dutrillaux modificadas), y de cultivos largos (aproximadamente 4 semanas o más), empleando mediodio HAM F10 con suero fetal, enriquecido con Glutamina e Insulina. Las 6 restantes correspondían a vesículas biliares sin lesión maligna ni premaligna, extirpadas por colelitiasis, que forman parte del grupo control de nuestro estudio. Estas últimas fueron procesadas con técnicas de cultivo largo, obteniéndose un cariograma normal, sin aberraciones cromosómicas. En forma paralela se obtuvieron células desagregadas del tejido fresco, a través de técnicas mecánicas y de digestión enzimática con colagenasa o tripsina, para ser estudiadas en el citómetro de flujo (en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile). En los casos en que no pudo obtenerse una muestra adecuada de células frescas, éstas se obtuvieron posteriormente a partir de tejido fijado en taco de parafina. Se desparafinizó y se desagregaron las células a través de métodos de digestión enzimática (pepsina), se usó propidium iodide como fluorocromo para marcar el DNA de los núcleos celulares y se emplearon kits adecuados para este estudio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

De las 28 muestras procesadas, 22 correspondían a muestras de adenocarcinomas de vesícula biliar o a

metástasis hepáticas, y 6 correspondían a muestras de vesícula biliar operada por colelitiasis y sin lesión maligna ni premaligna a la histología. Estas últimas 6 forman parte del grupo control, en el cual no se encontraron alteraciones cromosómicas como era de esperar en un tejido no malignizado.

De los 22 carcinomas:

-En 7 no se obtuvieron resultados, en 3 casos debido a contaminación de la muestra y en 4 casos a fallas en las técnicas de cultivo.

-En 15 casos se obtuvo el cariotipo del tejido tumoral (ver tabla 3). Estos resultados con un 68% de éxitos y un 32% de fracasos, corresponde a lo que se describe en la literatura, en estudios cromosómicos de tumores sólidos (8), por lo tanto esto demuestra la eficacia de nuestros métodos.

De los 15 carcinomas en los que se obtuvo el cariograma:

-En 3 se encontró una sola población con un complemento cromosómico normal (sólo células normales -ver tabla 3, casos N° 14, 15 y 27). Esto seguramente es debido a que en el cultivo in vitro solamente hubo proliferación de células normales, ya sea por fallas en el cultivo (poco enriquecimiento de medios, falla de la desagregación del tejido cuando éste está muy duro), o bien por que la muestra recibida contenía una zona con poco tejido tumoral o este se encontraba muy necrosado. Hay que recordar que las células tumorales tienen una proliferación celular descontrolada (sin freno), pero con un ciclo celular generalmente más largo, por lo tanto demoran más en crecer (8).

-En los 12 restantes (ver tabla 3) se determinó la presencia de dos poblaciones celulares, una con cariograma normal (células normales) y otra con múltiples anomalías cromosómicas, tanto estructurales como numéricas.

Las alteraciones numéricas encontradas, están representadas por las hiperplodias (aumento en el N° del set de 23 cromosomas), en su mayoría (near) triploidias o (near) tetraploidias. Estas alteraciones numéricas encontradas en el cariograma, fueron corroboradas en el estudio de citometría de flujo en el

---

cual el contenido de DNA expresó las mismas características, una población con contenido de DNA normal que significa un número normal de 46 cromosomas (haploide) y una población con un contenido de DNA mayor, o hiperploide (near triploide, near tetraploide). Esta correlación de los hallazgos citogenéticos y los resultados del estudio de ploidía demuestra que ambos tipos de estudio se apoyan y complementan en forma bastante asertiva. Las hiperploidías habían sido descritas únicamente en estudios anteriores de citometría de flujo (9). A través de ambos estudios, citogenético y citometría de flujo (ploidía o contenido de DNA), se pudo determinar que las alteraciones de la ploidía (hiperploidías), están presentes en adenocarcinomas de vesícula biliar, avanzados y que son signo de etapas tumorales tardías.

Las alteraciones cromosómicas estructurales encontradas más frecuentemente son translocaciones, deleciones, fragmentos cromosómicos adicionales, isocromosomas, cromosomas en anillo y cromosomas marcadores (no identificables).

En los casos en que la misma alteración se repite en casos diferentes como la traslocación entre un cromosoma 6 y un 13 (tabla 3 casos 18 y 23), con los mismos puntos de fractura en (p23, q14), la deleción intersticial del cromosoma 4, prácticamente en la misma región (q32, q33) (tabla 3 casos 20 y 25) y la deleción del fragmento distal del brazo corto del

cromosoma 17 con punto de fractura en p12 (tabla 3, casos 25 y 29), nos permiten pensar que podemos estar en presencia de alteraciones específicas propias de este tumor, lo cual deberá ser verificado con el análisis de un mayor número de casos como está contemplado en las siguientes etapas de nuestro proyecto.

## RESULTADOS

**Tabla 1**

**Muestra el resultado general del total de muestras procesadas.**

Citogenéticos - cariotipos

---

Procesadas 28 muestras:

6 controles = cariotipo normal

22 adenocarcinomas = 7 no resultaron (4 no hubo crecimiento y 3 muestras contaminadas).

15 resultaron (con cariotipo)

---

**Tabla 2**

**Muestra el resultado general de los cariogramas.**

Citogenéticos - cariotipos

---

15 casos con cariograma

3 con una población con cariograma normal

12 con dos poblaciones: normal o alterada.

---

**Tabla 3**  
**Muestra resumen de resultados de cariotipo y citometría de flujo.**

Caso	ANOMALIAS CROMOSOMICAS		CELULAS	CITOMETRIA FLUJO	
	ESTRUCTURALES	NUMERICAS	NORMALES	POBLACION	
				normal	hiperploide
14			(+)	(+)	
15			(+)	(+)	(+)
16		(+)	(+)	(+)	(+)
17	del(2)(p13), 4 mar	(+)	(+)	(+)	(+)
18	t(6;13?)(p23;q14?) t(12;?)(p11,?) del(10q), inv(X)	(+)	(+)	(+)	(+)
20	del(4)(q33), del(9q) t(14;21)(q11;q11)	(+)	(+)	(+)	(+)
21	del(2)(q11), t(3;?) t(6,13?), t(14;?)	(+)	(+)	(+)	(+)
23	ad(4), del(5)(q22;q31) del(6)(q22), del(22)(q11) t(6;13)(p23;q14?) t(9;13)(p13;p12), t(11;?)(p15,?) t(12;?)(p11;?), del(12)(p12) del(13)(p11), t(15,?)(p11;?)	(+)	(+)	(+)	(+)
24	t(3;?)(p11;?) d(10p) del(12)(p11), r(?), 2 mar	(+)	(+)		
25	del(4)(q32) <u>del(17)(p12)</u>	(+)	(+)	(+)	(+)
26	iso(17q)	(+)	(+)	(+)	(+)
27			(+)	(+)	
29	ad(1p), ad(Xp) <u>del(17)(p12)</u>	(+)	(+)	(+)	(+)
30	2mar	(+)	(+)		
32	del(5)(p14), del(10)(q26)	(+)	(+)		

t=translocación, del=delección, r=cromosoma en anillo, ad=segmento adicional, mar=cromosoma marcador, iso=isocromosoma, inv=inversión de un segmento de un cromosoma.

---

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Koss L., Czerniak B., Herz F., and Wersto R. Flow cytometric measurements of DNA and other cell components in human tumors: A critical appraisal. *Hum Pathol* 1989, 20, 6:528-548.
- 2.- Endoh K., Nakadaira H., Mano H., Adachi Y, Kodama K., Katagiri M. and Yamamoto M. Epidemiology of biliary tract cancer in Japan: Descriptive Studies. *Acta Med. et Biol* 1993, 41,3, 113-125.
- 3.- Datos del Ministerio de Salud de Chile, Departamento de Epidemiología Unidad de Cáncer y Tabaco. 1990.
- 4.- Csendes A. Becerra M., Smok G., Maluenda F., Morales E. Prevalencia del cáncer de la vesícula biliar en colecistectomías. *Rev. Méd. Chile* 1991: 119: 887-890.
- 5.- Aretxabala X. de, Roa I., Burgos L., Araya J:C., Fonseca L, Wistuba I., & Flores P. Gallbladder cancer in Chile. A report on 54 potentially resectable tumors. *Cancer* 1992. 69(1): 60-65.
- 6.- Johzaki H., Iwasaky H., Nishida T., Isayama T., Kikuchi M. A Human gallbladder adenocarcinoma cell line. *Cancer* 1989. 64(11); 2262-8.
- 7.- Tada M., Yokosuka O., Omata M., Otho M. & Isono K. Analysis of ras gene mutations in billiary tract and pancreatic tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer* 1990: 66(5); 930-933.
- 8.- Sandberg A. Cytogenetics of human neoplasias: advances and perspectives *Cancer Cytogenetics*. 1991, 113-114. Willey Liss, Inc.
- 9.- Roa I., Araya J. C., Shiraishi T., Yatani R: Witsuba I., Villaseca M., Aretxabala de X., Cáncer gástrico y vesicular. Análisis de las fases del ciclo celular mediante la citometría de flujo. *Rev. Méd. Chile* 1993; 121; 881-888.

---

Trabajo financiado por proyectos: O.C.I.C. 1993-1994., DTI M 3619-9433 y Fondecyt 1940567-1994.