

## Valor pronóstico de la citometría de flujo en el linfoma gástrico

F. Fernández, J. C. Rodríguez-Sanjuán<sup>1</sup>, M. Mayorga, J. Llorca<sup>2</sup>, R. A. García<sup>1</sup>, S. Trugeda<sup>1</sup>, F. de la Torre<sup>1</sup> y M. Gómez-Fleitas<sup>1</sup>

*Departamento de Anatomía Patológica. <sup>1</sup>Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo II. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Universidad de Cantabria. Santander*

### RESUMEN

**Objetivo:** investigar si la citometría de flujo (CF) en el linfoma gástrico primario podría ayudar a definir la estrategia terapéutica.

**Material y método:** estudio retrospectivo de 46 pacientes con linfoma gástrico primario –de acuerdo con los criterios de Dawson– en estadio I<sub>E</sub> y II<sub>E</sub> de Ann Arbor, tratados quirúrgicamente. Se analizó el contenido tumoral de ADN mediante CF, a partir de preparaciones tumorales conservadas en parafina. Además se estudiaron otras características tumorales mediante tinciones de hematoxilina-eosina, giemsa y análisis inmuno-histoquímico. Se

investigó su posible influencia sobre la probabilidad de supervivencia postoperatoria (PSP) mediante análisis estadístico.

**Resultados:** el patrón de ploidía tumoral fue diploide en 40 casos (87%) y aneuploide (hiperdiploide) en 6 (13%). El análisis estadístico demostró valor pronóstico para la clasificación de Ann Arbor –con superior PSP para el estadio I<sub>E</sub> ( $p = 0,009$ )–, así como para los parámetros de CF: los tumores diploides se asociaron a una PSP superior ( $p = 0,009$ ), al igual que los tumores con valores de fase S ( $p = 0,044$ ) o fase G2-M ( $p = 0,023$ ) inferiores a las respectivas medias. No se observó influencia sobre la supervivencia de la invasión tumoral en la pared, presencia de *Helicobacter*

*pylori*, tipo histológico de Isaacson o afectación del borde de resección. Tampoco se apreció relación significativa entre el tipo histológico de Isaacson y el contenido de ADN.

**Conclusión:** la CF podría ser útil para determinar el pronóstico del linfoma gástrico.

**Palabras clave:** Linfoma gástrico. Citometría de flujo.

## INTRODUCCIÓN

El linfoma gástrico primario (LGP) es un tumor poco frecuente, con una incidencia de 0,7-0,8 casos por 100.000 habitantes en Europa occidental (1). Existe una gran controversia en relación con el tratamiento del LGP puesto que se dispone de varias opciones terapéuticas. La extirpación quirúrgica, el tratamiento clásico asociado a buenos resultados, va siendo progresivamente desplazado por la quimioterapia (2,3) que también ha demostrado buenos resultados, si bien aún no se dispone de datos a largo plazo. La patogenia del LGP se ha asociado con la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), por lo que algunos casos han sido tratados exclusivamente con terapia erradicadora del *H. pylori*, con altas tasas de remisión completa (62-91,6%) (4,5). Aunque se ha descrito persistencia de monoclonalidad en casos con remisión histológica completa, este dato no tiene una clara significación pronóstica y la tasa de recidiva a largo plazo es muy baja (5). La definición de los factores con influencia sobre el pronóstico podrían ayudar a clarificar la estrategia terapéutica. Entre estos factores se encuentran el estadio clínico, el tipo histológico de alto grado, la afectación de la serosa o la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA (4-11)). La citometría de flujo (CF) es un método cuantitativo de determinación del contenido de ADN. En la mayoría de las neoplasias malignas se ha hallado un contenido anormal de ADN –aneuploidía– que frecuentemente se ha asociado con un pronóstico desfavorable: tumores de mama, vejiga urinaria, ovario, colon y recto y tumores pulmonares no microcíticos (12). No existe acuerdo en cuanto al valor pronóstico de la CF en linfomas sistémicos no hodgkinianos (13-17) y son asimismo contradictorios los escasos estudios realizados en LGP (11,12,18-20).

El principal objetivo de este estudio es analizar el valor pronóstico de la CF, correlacionándola con la supervivencia postoperatoria. Como objetivo secundario, analizar la relación de la CF con otros factores histológicos convencionales.

## MÉTODOS

Estudio retrospectivo de 46 pacientes diagnosticados de LGP de acuerdo con los criterios de Dawson (21) entre 1974 y 1999. El grupo consta de 23 mujeres y 23 hombres

con un rango de edad de 28-85 (media 64,1). Los primeros catorce pacientes de la serie –periodo 1974-1984– fueron diagnosticados por métodos radiológicos de “tumor gástrico” y después operados; en todos se confirmó el diagnóstico histológico de linfoma en la pieza quirúrgica. Los restantes 32 pacientes fueron diagnosticados mediante gastroscopia y biopsia. Algunos de estos casos forman parte de otra serie recientemente publicada (22). En una paciente se diagnosticó además un sida. Este caso ha sido publicado anteriormente (23). La estadificación preoperatoria se realizó mediante examen físico, estudio de sangre periférica, biopsia de médula ósea, radiografía de tórax y TAC abdomeno-torácico, en los pacientes tratados desde 1984. Los pacientes con afectación de órganos a distancia o de ganglios linfáticos más allá de los ganglios regionales perigástricos fueron descartados para tratamiento quirúrgico, que era el tratamiento de elección en nuestro protocolo en los años del estudio. La estadificación postoperatoria se realizó de acuerdo con la clasificación de Ann Arbor (24). Treinta casos (65,2%) se encontraban en estadio I<sub>E</sub> –tumor limitado a la pared gástrica sin afectación ganglionar– y 16 (34,8%) en estadio II<sub>E</sub> –tumor con ganglios regionales afectados.

Se realizó gastrectomía parcial en 36 pacientes (78,3%) y total en 10 (21,7%), siguiendo el criterio de distancia mayor o menor de 5 cm al cardíaco. Se asoció esplenectomía en 5 casos por proximidad al tumor, aunque sin invasión directa. Se observó afectación microscópica del borde de resección en 10 casos (21,7%). En 5 de ellos se administró quimioterapia o radioterapia adyuvante. Los restantes no las recibieron por diversas razones: 3 porque no se consideraron candidatos debido a enfermedades asociadas o edad avanzada y 2 la rechazaron. Cuatro pacientes (8,7%) fallecieron en el postoperatorio –hasta el alta hospitalaria–. Se produjeron complicaciones no mortales en 5 pacientes (10,9%). En total 18 pacientes recibieron quimioterapia adyuvante, consistente en ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona –CHOP– y radioterapia en 3.

El estudio histológico se realizó a partir de nuevos cortes de bloques conservados en parafina de la pieza quirúrgica. Los análisis se efectuaron mediante tinciones de hematoxilina-eosina, Giemsa y estudios inmunohistoquímicos. Para estos últimos se empleó el complejo soluble fosfatasa-antifosfatasa (Biomedica Corp., Foster City California, EE.UU.). Asimismo se utilizó un panel prediluido (Cormedica, España) con el antígeno común leucocitario CD 45 como marcador de células linfoides, L26 como marcador de linfocitos de fenotipo B y UHCL1 como marcador de linfocitos de fenotipo T. Los tumores fueron clasificados de acuerdo con la clasificación de Isaacson (25). Se analizaron otros factores histológicos por medio de microscopía óptica convencional: mediante tinción de Giemsa se observó la presencia de *H. pylori* y mediante tinciones de hematoxilina-eosina, la afectación del borde quirúrgico y nivel de invasión en la pared gás-

trica –parcial o total–. Debido a que la diferenciación de la zona donde se juntan los linfocitos normales reactivos y neoplásicos es a veces difícil de separar, el nivel de invasión no pudo determinarse con certeza en 3 casos.

El contenido tumoral de ADN se determinó mediante CF. Para ello se preparó una suspensión nuclear de los bloques conservados en parafina de acuerdo con el método descrito por Hedley y cols. (26) con algunas modificaciones (27). Se cortaron 50 secciones mediante un microtomo rotatorio y se colocaron en tubos de vidrio de centrifugación de 10 ml. Las secciones fueron deparafinizadas en xileno y rehidratadas en etanol al 100, 95, 70 y 50% a temperatura ambiente. El tejido se sometió dos veces a lavado en agua destilada y digestión con 2 ml de proteasa al 0,1% (Sigma, España) en salino *buffer* fosfato salino (PBS), pH 7.4. A continuación se colocaron los tubos en baño de agua a 37 °C durante 90 minutos aproximadamente con mezcla en vortex intermitente.

Se filtró esta solución mediante una malla de nylon de 50 micras y se centrifugó y tiñó con propidio iodado según el método descrito por Vindelov y cols. (28). Se analizaron 10.000 células mediante un analizador FACS Becton Dickinson. El índice de ADN, las fracciones en fases G0/G1, S y G2/Mitosis (G2/M) así como el coeficiente de variación (CV) para el pico G0/G1 se calcularon usando el software suministrado por Becton Dickinson (modelo RFIT). Las células inflamatorias y epiteliales de la misma pieza (células normales del huésped) sirvieron como controles. Se determinó el porcentaje de células tumorales en las diferentes fases del ciclo celular: G0/G1, S y G2/M así como el índice de ADN –proporción entre población tumoral en fase G0/G1 y población normal en fase G0/G1–. De este modo, los tumores fueron incluidos en alguna de las siguientes categorías: diploide (0,95-1,10) y aneuploide, fuera de esos límites. Estos últimos pueden subclasificarse en hipodiploides (< 0,95), hiperdiploides (1,10-1,90), tetraploides (1,95-2,10) e hipertetraploides (> 2,10). El coeficiente medio de variación fue de 7,1 (1,6-10,5). El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de Chi<sup>2</sup> y prueba exacta de Fisher. Se emplearon las pruebas de Kaplan-Meier y log rank para el análisis de supervivencia, que sólo se realizó en pacientes no fallecidos antes del alta hospitalaria y no perdidos en el seguimiento. Los pacientes fallecidos por causas diferentes al linfoma gástrico se consideraron como censurados. Los parámetros incluidos en el análisis de supervivencia fueron: contenido de ADN (categoría clonal), estadio de Ann Arbor, nivel de invasión parietal, infección por *H. pylori*, tipo histológico según la clasificación de Isaacson, afectación del borde quirúrgico, fracción en fase S y fracción en fase G2/M. Para estos dos últimos parámetros se definieron arbitrariamente dos grupos, por encima y por debajo de cada valor medio. Para la realización de un análisis multivariable se recomienda que el tamaño muestral incluya al menos 10 eventos (muertes en nuestro caso) por cada variable del modelo (29,30). Como sólo contábamos con 5 muertes

relacionadas con el tumor no se efectuó estimación de hazard ratios mediante regresión de Cox, ni siquiera en su modo univariante. Sin embargo pudo aplicarse la prueba de log rank ya que el error de tipo I aumenta cuando la proporción eventos:variables es menor de 4 (31) y en nuestro trabajo esta proporción es de 5.

## RESULTADOS

De acuerdo con la clasificación de Isaacson pudieron clasificarse 44 tumores: 28 (63,6%) de bajo grado de tipo B (BG), 15 (34,1%) de alto grado de tipo B (AG) y 1 (2,3%) de tipo T. El nivel de invasión en la pared gástrica pudo determinarse en 43 casos: 25 (58,1%) total y 18 (39,1%) parcial. Se aisló *H. pylori* en 28 casos (62,2%) de 45 en los que pudo determinarse. Los datos de CF se muestran en la tabla I. El patrón de ploidía tumoral fue diploide en 40 casos (87%) y aneuploide (hiperdiploide) en 6 (13%). El porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular fue: G0/G1: 83,59% (s.d.: 12,68); S: 12,68% (s.d.: 10,99); G2/M: 3,72% (s.d.: 2,42).

En 3 pacientes se registró una recidiva clínica a los 3, 6 y 9 meses tras la cirugía. La probabilidad de supervivencia postoperatoria (PSP) fue de 62,7% a los 5 años. El análisis estadístico se muestra en la tabla II. Se halló valor pronóstico para la clasificación de Ann Arbor –mayor PSP para los tumores en estadio I<sub>E</sub>– y los parámetros relativos a la CF: una mayor PSP se asoció a tumores diploides (Fig. 1) y tumores con valores de fase S o fase G2-M por debajo de la media. Por el contrario, no se demostró ninguna influencia sobre la PSP del nivel de invasión en la pared gástrica la infección por *Helicobacter pylori*, el tipo histológico según la clasificación de Isaacson ni de la afectación del borde de resección.

Aunque los tumores hiperdiploides fueron más frecuentes entre los linfomas de AG (20%) que entre los de BG (10,7%) no se encontró asociación significativa entre el tipo histológico y el patrón de ploidía (Chi<sup>2</sup> = 0,7, 1df, p = 0,3). Sin embargo sí que se apreciaron algunas diferencias significativas entre tumores de AG y BG: los de AG presentaron menor porcentaje de células en fase G0/G1 (Chi<sup>2</sup> = 10,2, 1df, p = 0,001), mayor porcentaje en fase S (Chi<sup>2</sup> = 10,2, 1df, p = 0,001) y mayor porcentaje en fase G2-M (Chi<sup>2</sup> = 11,0, 1df, p = 0,001). No se observaron diferencias significativas entre los patrones de ploidía según estadio tumoral (Chi<sup>2</sup> = 0,06, 1df, p = 0,9) o nivel de invasión en la pared gástrica (Chi<sup>2</sup> = 1,2, 1 df, p = 0,27). Aunque la infección por *H. pylori* fue más frecuente en tumores diploides (67%) que en los hiperdiploides (33%), las diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas (Chi<sup>2</sup> = 2,5, 1df, p = 0,1). Es de destacar que el grupo de pacientes con afectación del borde de resección sin signos de tumor residual en otra localización no presentó peor PSP que el grupo de pacientes con borde de resección libre. Entre ambos grupos no se apreciaron diferencias significativas en frecuencia de estadio II<sub>E</sub>,

Tabla I. Datos de citometría de flujo, histología y estadio tumoral

Caso	Histología	Índice de DNA	Patrón de ploidía tumoral	G0/G1	S	G2/M	Estadio
1	AG	1,8	Hiperdiploide	58,3	36,2	5,6	IE
2	BG	1,2	Hiperdiploide	70,8	23	6,2	IE
3	BG	1,19	Hiperdiploide	61,7	35,1	3,2	IE
4	BG	1,18	Hiperdiploide	55,5	39,8	4,7	IIE
5	AG	1,16	Hiperdiploide	72,1	21,2	6,7	IIE
6	AG	1,12	Hiperdiploide	59,2	30,4	10,4	IE
7	BG	1	Diploide	94,5	4,6	1	IIE
8	BG	1	Diploide	94,3	3,7	2	IIE
9	AG	1	Diploide	63	26,8	10,2	IIE
10	BG	1	Diploide	95,6	2,6	1,8	IIE
11	BG	1	Diploide	94,4	3,9	1,7	IIE
12	BG	1	Diploide	80	17	3	IIE
13	AG	1	Diploide	73,8	25,1	1,1	IIE
14	AG	1	Diploide	86,3	8,8	4,9	IIE
15	BG	1	Diploide	84,3	10,8	4,9	IIE
16	*	1	Diploide	81	13,6	5,3	IIE
17	AG	1	Diploide	86,3	8,5	5,2	IIE
18	AG	1	Diploide	57,4	33,8	8,8	IIE
19	BG	1	Diploide	92,5	6,4	1,1	IIE
20	AG	1	Diploide	88,5	5,6	5,9	IIE
21	AG	1	Diploide	92,5	6,5	0,9	IE
22	AG	1	Diploide	75,4	18,2	6,4	IE
23	BG	1	Diploide	95,6	2,7	1,7	IE
24	BG	1	Diploide	71,4	24,5	4,2	IE
25	BG	1	Diploide	94,6	2,9	2,5	IE
26	AG	1	Diploide	75,9	19,2	4,9	IE
27	BG	1	Diploide	93,2	5	1,8	IE
28	BG	1	Diploide	96,6	1,1	2,2	IE
29	BG	1	Diploide	96,9	1,9	1,2	IE
30	BG	1	Diploide	91,4	4,6	4	IE
31	BG	1	Diploide	88,7	8,5	2,8	IE
32	BG	1	Diploide	96,6	1,8	1,5	IE
33	AG	1	Diploide	81,5	15,6	2,9	IE
34	BG	1	Diploide	87	9,9	3,1	IE
35	BG	1	Diploide	87,5	9,1	3,5	IE
36	AG	1	Diploide	60,7	31,4	7,8	IE
37	BG	1	Diploide	89,7	8,8	1,5	IE
38	BG	1	Diploide	91,2	6,7	2,1	IE
39	BG	1	Diploide	92,9	5,3	1,8	IE
40	*	1	Diploide	87,7	10,4	2	IE
41	BG	1	Diploide	96,7	2	1,3	IE
42	T	1	Diploide	82,5	12,9	4,7	IE
43	BG	1	Diploide	95,2	3,3	1,5	IE
44	BG	1	Diploide	95,5	1,8	2,7	IE
45	BG	1	Diploide	92,7	2,1	5,2	IE
46	AG	1	Diploide	86,1	10,5	3,4	IE

AG: tumor de alto grado; BG: tumor de bajo grado; T: linfoma T; \*: no determinado.

proporción de tumores de AG, categoría clonal o proporción de pacientes que recibieron quimioterapia postoperatoria. Todos los pacientes con afectación de bordes menos uno están vivos, aunque uno de ellos ha tenido una recidiva pulmonar a los 20 meses.

## DISCUSIÓN

La información pronóstica proporcionada por las muestras tumorales es importante porque puede ayudar a definir la estrategia terapéutica. Esto es especialmente re-

**Tabla II. Análisis estadístico: influencia sobre la probabilidad de supervivencia postoperatoria. Análisis univariante**

Factor		Pacientes	Supervivientes a 5 años	Supervivencia a 5 años	p
<i>Glogal</i>		46	19	90,5 (73,3 96,8)	–
Ann Arbor	I <sub>E</sub>	30	11	100	0,009
	II <sub>E</sub>	16	8	70,7 (33,7 89,5)	
<i>Helicobacter pylori</i>	No	17	7	81,8 (44,7 95,1)	0,269
	Sí	28	11	95,2 (70,7 99,3)	
Borde de resección	Libre	36	14	92,1 (71,9 98,0)	0,507
	Afectado	10	5	83,3 (27,3 97,5)	
Tipo histológico	Bajo grado	28	14	94,7 (68,1 99,2)	0,499
	Alto grado	15	5	88,9 (43,3 98,4)	
Invasión parietal	Parcial	25	11	100	0,107
	Total	18	6	83,9 (49,4 95,7)	
Categoría clonal	Diploide	40	15	96,3 (76,5 99,5)	0,009
	Hiperdiploide	6	4	60,0 (12,6 88,2)	
Gastrectomía	Parcial	36	16	88,7 (69,0 96,2)	0,446
	Total	10	3	100	
Fracción en fase S	< 12	26	12	100	0,044
	> 12	20	7	78,6 (47,3 92,5)	
Fracción en fase G2/M	< 4	27	12	100	0,023
	> 4	19	7	75,5 (41,6 91,4)	

levante en el caso del linfoma gástrico ya que existen varias opciones terapéuticas: erradicación de *H. pylori*, quimioterapia, cirugía o combinación de algunas de las anteriores. La CF es una de las técnicas que puede proporcionar tal información pronóstica y nuestros resultados apoyan esta hipótesis: los tumores aneuploides se asociaron a una supervivencia a largo plazo significativamente inferior a la de los tumores diploides; además, mayores valores de fracción en fase S o G2-M se asociaron a una supervivencia significativamente mayor.

Hay que reconocer, no obstante, que este estudio tiene algunas limitaciones como el número limitado de casos, su carácter retrospectivo y el hecho de que algunos casos fueron tratados hace bastantes años con diferentes estrategias terapéuticas. Un análisis multivariable sólo puede realizarse en grandes series de estudios multicéntrico, ya que el linfoma gástrico es un tumor infrecuente. Además, el pequeño número de muertes por tumor impedía tal análisis multivariable, como se explicó. Pese a todas estas limitaciones este trabajo proporciona información valiosa referente al valor pronóstico de la CF, teniendo en cuenta que los estudios existentes son escasos y contradictorios. Además, no puede esperarse mucha más información sobre este tema puesto que la mayoría de los nuevos linfomas gástricos diagnosticados no serán operados sino tratados de forma conservadora, siguiendo las tendencias terapéuticas actuales. Otra posible limitación de este estudio es el hecho de que las muestras se encontraran conservadas en parafina y no fueran frescas, puesto que la calidad del material puede ser peor (13). En otros

trabajos, no obstante, se ha encontrado buena correlación entre CF realizada a partir de células preparadas tanto de muestras en fresco como de parafina (32).

Existe controversia en relación con el posible valor pronóstico de los distintos parámetros obtenidos a partir de la CF en los linfomas en general. Según se desprende de la revisión de Braylan (13), parece que no hay suficiente evidencia que sostenga un valor pronóstico independiente para la aneuploidía, aunque trabajos posteriores sí encuentran influencia significativa sobre la supervivencia (14,15). También se ha descrito valor pronóstico para la fracción en fase S (17).

Son escasos los estudios de CF en linfomas gástricos en particular y cuentan con un reducido número de casos: menos de 30 pacientes en todos excepto en el de Aydin y cols. (20) que incluye 78. En algunos de ellos el único hallazgo es que la fracción en fase S tiene valor pronóstico exclusivamente en el análisis univariante pero no el multivariante (11,20). Joensuu y cols. (18) encontraron la que la aneuploidía era un factor de mal pronóstico, igualmente sólo en el análisis univariante. El estudio de Bronzo y cols. (12) sólo incluía 4 pacientes con linfoma gástrico, por lo que sus conclusiones no pueden ser tenidas en cuenta. El estudio de Okuda y Suzuki (19) es el único que demuestra valor pronóstico para la aneuploidía, confirmado en el análisis multivariable, aunque sólo se estudiaron 24 casos de linfoma gástrico que no fueron separados de los linfomas de otras localizaciones.

En cuanto a las características tumorales no relativas a la CF, no encontramos influencia sobre el pronóstico del

nivel de invasión en la pared gástrica ni del tipo histológico, en contraste con otros autores (7,9,10) e incluso con nuestro propio análisis previo (6). Esto último puede explicarse por un seguimiento más largo e inclusión de nuevos pacientes. Sólo hemos encontrado valor pronóstico para la clasificación de Ann Arbor. La menor proporción de células en fase G0/G1 y mayor en fase S en los tumores de AG sólo refleja una mayor proliferación celular. Como ya hemos publicado recientemente (22), sorprende la falta de influencia sobre la supervivencia de la afectación del borde de resección a pesar de que la mayoría de estos pacientes no recibieran quimioterapia postoperatoria. Esto contrasta con los datos de mayor supervivencia a largo plazo en pacientes sin tumor residual anteriormente publicados (9,10,33).

No es objetivo de este trabajo la discusión sobre las distintas opciones terapéuticas. Desde nuestro actual punto de vista, la mayoría de los casos deberían ser tratados de forma no quirúrgica.

El frecuencia de *H. pylori* en nuestra serie se encuentra en los rangos publicados de 62-96% en tumores de BG y de 52-79% en los de AG (4). Esta elevada frecuencia constituye uno de los principales argumentos a favor de su relación etiopatogénica con el linfoma MALT.

En conclusión, hemos encontrado valor pronóstico de los parámetros de CF en el linfoma gástrico. Si pudieran ser determinados con precisión en las biopsias gástricas endoscópicas, podría constituir una importante ayuda para definir la estrategia terapéutica en estos tumores.