

ORIGINAL PAPERS

## DNA aneuploidy in colorectal adenomas. Role in the adenoma-carcinoma sequence

M. Alcántara Torres, R. Rodríguez Merlo<sup>1</sup>, A. Repiso Ortega, A. de Lucas Veguillas<sup>2</sup>, J. Valle Muñoz, R. Sánchez Simón<sup>1</sup> and J. L. Martínez Potenciano

*Departments of Gastroenterology and <sup>1</sup>Pathology. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. <sup>2</sup>Service of Public Health. Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla La Mancha. Talavera de la Reina. Toledo, Spain*

### ABSTRACT

**Introduction:** aneuploidy has been observed in 6-27% of lesions known to be precursors of colorectal cancer, such as adenomas or ulcerative colitis. It has been suggested that aneuploidy may predispose to malignancy in these cases. However, its role in the adenoma-carcinoma sequence has not been definitely established. The objective of this study was to assess the incidence of aneuploidy in colon adenomas, as well as to study its possible role in the adenoma-carcinoma sequence.

**Material and methods:** the study was performed on a series of 57 large bowel adenomas measuring 10 mm or more, collected from 54 consecutive patients. All specimens were obtained either by endoscopic or by surgical resection. There were 49 adenomas with low-grade dysplasia, two with high-grade dysplasia, two intramucous carcinomas, and four microinvasive carcinomas. A flow cytometric DNA analysis was performed in fresh specimens following Vindelov's method.

**Results:** aneuploid DNA was detected in five out of 49 low-grade dysplasia adenomas (10%), in all four high-grade dysplasia adenomas or intramucous carcinomas (100%), and in three out of four microinvasive carcinomas (75%). The association between aneuploidy and high-grade dysplasia adenomas, intramucous, or microinvasive carcinoma was statistically significant ( $p < 0.001$ ). No association was found between aneuploidy and any of the following features: age, gender, clinical symptoms of patients, and size or location of adenomas.

**Conclusions:** the incidence of aneuploidy in this series was 10% in low-grade dysplasia adenomas, and 87% in high-grade dysplasia adenomas or carcinomas, and this difference was statistically significant. These findings suggest that aneuploidy may play a role in the adenoma-carcinoma sequence.

**Key words:** Aneuploidy. Colon adenoma. Colon adenocarcinoma. Flow cytometry.

Recibido: 12-02-04.

Aceptado: 11-05-04.

Correspondencia: Mariano Alcántara Torres. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Virgen de la Salud. Avda. de Barber, 30. 45004 Toledo. e-mail: malcantara@cht.insalud.es

This article has been realized with the economic support of a grant of the Junta de Comunidades de Castilla La Mancha GC03012.

Alcántara Torres M, Rodríguez Merlo R, Repiso Ortega A, de Lucas Veguillas A, Valle Muñoz J, Sánchez Simón R, Martínez Potenciano JL. DNA aneuploidy in colorectal adenomas. Role in the adenoma-carcinoma sequence. Rev Esp Enferm Dig 2005; 97: 7-15.

### INTRODUCTION

Abnormal DNA amounts are most commonly caused by changes in the number of chromosomes and chromosomal deletions. Changes in the normal cellular DNA content give rise to aneuploidy, an abnormality that reflects chromosomal alterations that play an essential role in the development and progression of tumors (1).

Aneuploidy has been observed in 6-27% of large bowel lesions known to be precursors of colorectal carcinoma (CRC), such as adenomas or ulcerative colitis (2-5). In colorectal adenomas, the prevalence of aneuploidy increases in parallel to histopathological findings known to be associated with a higher risk of malignant transformation such as larger size, villous elements in the adenoma, or high-grade dysplasia (2-8). These observations suggest that DNA aneuploidy might play an important role in the adenoma-carcinoma sequence (2,4,9,10). However, some authors have found aneuploid DNA content in only 13% of colon adenomas harboring an invasive carcinoma, an observation that does not support an important role for aneuploidy in the adenoma-carcinoma sequence (11).

On the other hand, aneuploidy can be detected in the normal colon mucosa, in hyperplastic polyps, in adenomas with low-grade dysplasia, and in ulcerative colitis without dysplasia (12,13). Thus, it has been suggested that aneuploidy is an early change in carcinogenesis (12).

The purpose of this study was to assess the prevalence of aneuploidy in colorectal adenomas and its possible role in the adenoma-carcinoma sequence.

## MATERIAL AND METHODS

The study was done in a series of 57 large bowel adenomas measuring 10 mm or more, collected from 54 consecutive patients at "Virgen de la Salud" Hospital, Toledo (Spain). Adenoma samples were obtained either by endoscopic or surgical resection. Adenomas were distributed according to the Vienna classification (14) (Fig. 1). Specimens were stained with hematoxylin-eosin and other routine techniques, and then assessed by one single pathologist.

DNA cell content was determined by flow cytometry in fresh specimens or snap-frozen specimens preserved at -80 °C, according to Vindelov's method (15). Briefly, fresh specimens were fragmented with a surgical blade, suspended in a citrate buffer, and filtered through a nylon mesh with 50 µm pores. The cell suspension was digested using trypsin and detergent for 10 minutes, and then digestion was interrupted with a trypsin inhibitor and RNase. Cells were stained with propidium iodide and analysed in a Fac Sort (Becton-Dickinson) flow cytometer. Normal colonic mucosa was used as diploid control using the same procedure. An analysis was done with the CellFit software application on a minimum of 10,000 nuclei.

DNA content was considered aneuploid if there were two clearly separated peaks of G0/G1 cells (Fig. 2). The DNA index was calculated by obtaining the proportion between the mean DNA content of G0/G1 cells in the study cell group and in the normal diploid cell group. In diploid histograms the DNA index was equal to 1. DNA content was considered tetraploid when there was a single G0/G1 peak and the DNA index was equal to 2. The proliferative fraction was determined based on the number of S-phase cells. Proliferative fractions equal to or higher than 10% were considered elevated and those lower than 10% were considered low (1). Histograms with a G0/G1 peak variation coefficient larger than six were considered invalid (16).

Clinical data such as age, gender, symptoms, presence of synchronous CRC, and tumor location were obtained from patient clinical records.

Student's T test was used for comparison of quantitative results, and  $\chi^2$  and Fisher's exact tests were used for comparison of qualitative results. A two-tailed p value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

Forty-nine out of 57 adenomas included in this study were adenomas with low-grade dysplasia, two were adenomas with high-grade dysplasia, two adenomas harbored an intramucous carcinoma, and four adenomas had a microinvasive carcinoma. Regarding clinical features, patients studied included 32 men and 22 women with a mean age of  $65.5 \pm 8.9$  years. Hematochezia prior to diagnosis was present in 51.8% of patients, although in

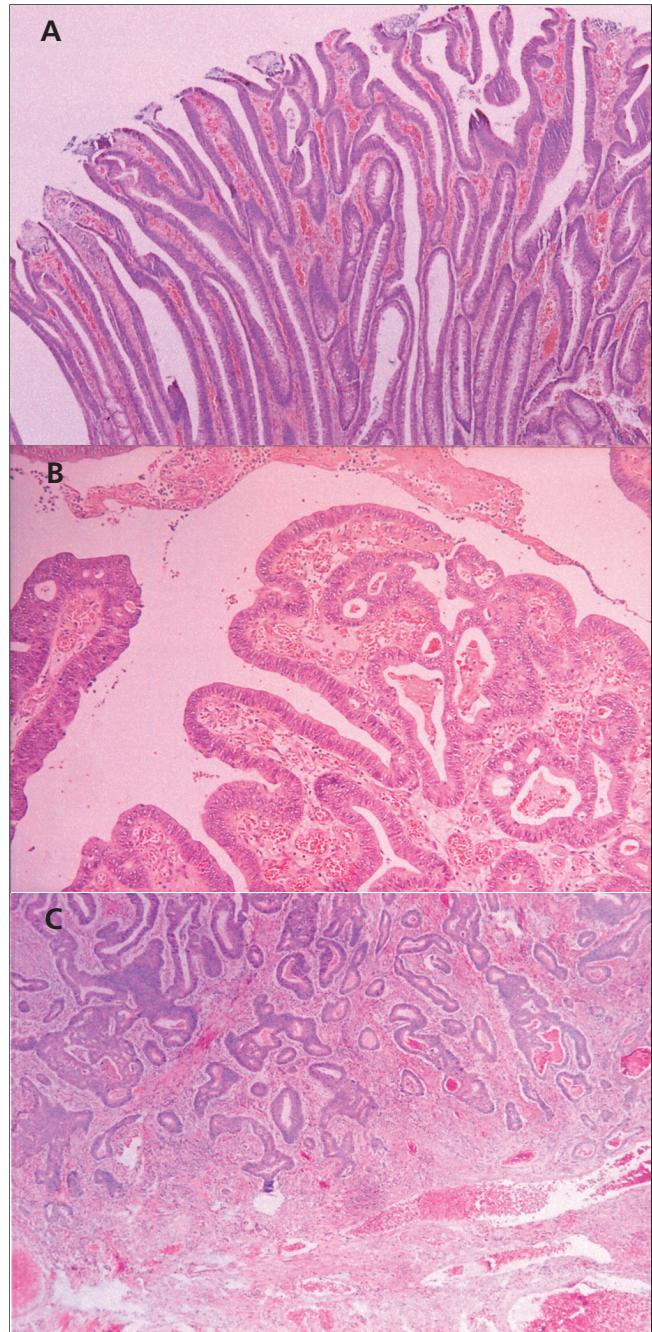


Fig. 1.- A: Villous adenoma. Fibrovascular core covered by columnar epithelium with pseudostratified nuclei (HxE: 20x). B: Intramucous carcinoma. Cribiform structures with rich vascular supply. Pseudostratified nuclei in the epithelium (HxE: 40x). C: Microinvasive carcinoma. Glandular structures rupture the *muscularis mucosae* and infiltrate the polyp stalk near the vessels (HxE: 20x).

A: Adenoma veloso. Ejes fibrovasculares con epitelio seudoestratificado (HxE: 20x). B: Adenocarcinoma intramucoso. Estructuras cribiformes ricamente vascularizadas, con un epitelio seudoestratificado de núcleos vesiculosos (HxE: 40x). C: Adenocarcinoma microinvasivo. Estructuras glandulares que, tras romper la barrera de la muscularis mucosae, infiltran el tallo del pólipos aproximándose a los vasos del pedículo (HxE: 20x).

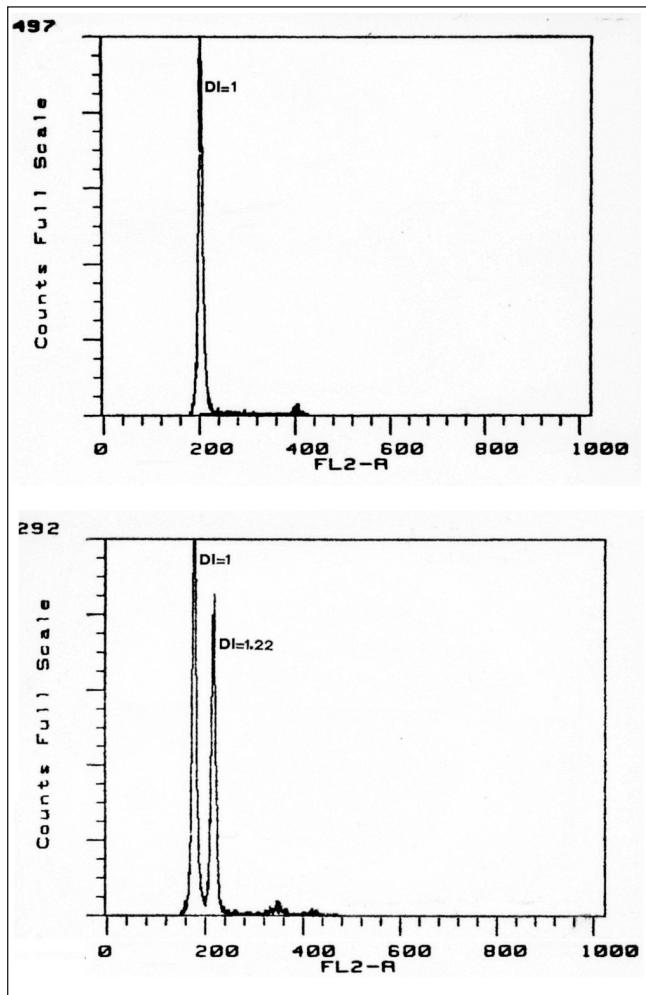


Fig. 2.- A: A histogram of an adenoma with diploid DNA. B: A histogram of an adenoma with aneuploid DNA.  
A: Histograma de adenoma colónico con ADN diploide. B: Histograma de adenoma colónico con ADN aneuploide.

most cases this symptom was not related to the polyps. Other clinico-pathological features are listed in table I.

Twelve out of 57 adenomas (21%) were aneuploid, and the remaining 45 were diploid. There were no cases with tetraploid DNA. When the correlation between aneuploidy and clinico-pathological features was assessed we observed that 50% of adenomas measuring  $\geq 2.5$  cm were aneuploid, whereas only 26% of adenomas smaller than 2.5 cm were aneuploid ( $p = 0.005$ ). Aneuploid DNA was found in 87% of adenomas with high-grade dysplasia or harboring intramucous or microinvasive carcinomas, as compared to 10% in adenomas with low-grade dysplasia ( $p < 0.001$ ). Aneuploid DNA was found in 71% of adenomas with an S-phase higher than 10 versus 5% in adenomas with an S-phase  $\leq 10$  ( $p < 0.001$ ). There was a trend towards a statistically significant association between aneuploidy, male gender, and hematochezia. Other features such as age, synchronous CRC, or histology of

**Table I. Clinicopathological features of patients**

Age	65.58±8.97
Sex	
Male	32 (59.2%)
Female	22 (40.7%)
Hematochezia	
Yes	28 (51.2%)
No	26 (48.1%)
Size	
< 25 mm	49 (85.9%)
≥ 25 mm	8 (14%)
Histology	
Tubular	14 (24.5%)
Tubulo-villous/villous	43 (75.4%)
Dysplasia	
Low grade	49 (85.9%)
High grade/Intramucous carcinoma	4 (7%)
Microinvasive carcinoma	4 (7%)
Synchronous colorectal carcinoma	
Yes	17 (29.8%)
No	40 (70.1%)
Localization	
Colon	49 (85.9%)
Rectum	8 (14%)
Ploidy	
Diploidy	45 (78.9%)
Aneuploidy	12 (21%)
S-phase	
< 10	43 (75.4%)
≥ 10	14 (24.5%)

adenomas were not associated with aneuploidy (Table II). The mean variation coefficient of G0/G1 peaks was  $2.8 \pm 0.99$  (range: 1-5.9).

The presence of high-grade dysplasia or carcinoma inside adenomas was statistically associated with the magnitude of the proliferative fraction (Table III).

## DISCUSSION

The prevalence of DNA aneuploidy in our series of colorectal adenomas was 21% when all cases were included, and 17% after excluding cases with invasive carcinoma inside the polyp. This prevalence is higher than in studies using formalin-fixed specimens (3,4), and similar to that in studies using fresh or frozen specimens (17). The reason is that the sensitivity to detect aneuploid peaks is higher when using fresh specimens (18). On the other hand, we have not included adenomas smaller than

**Table II. Association between DNA ploidy and clinicopathological features**

	Diploid	Aneuploid	p value
Age	65.91±9.22	69.08±7.80	NS
Sex			
Male	24 (71%)	10 (29%)	p = 0.09
Female	21 (91%)	2 (9%)	
Hematochezia			
Yes	21 (70%)	9 (30%)	p = 0.10
No	24 (89%)	3 (11%)	
Synchronous colorectal carcinoma			
Yes	14 (82%)	3 (18%)	NS
No	31 (77%)	9 (22%)	
Localization			
Rectum	6 (75%)	2 (25%)	NS
Colon	39 (80%)	10 (20%)	
Histology			
Tubular	12 (86%)	2 (14%)	NS
Tubulo-villous/villous	33 (77%)	10 (23%)	
Size			
< 25 mm	41 (84%)	8 (16%)	p = 0.05
≥ 25 mm	4 (50%)	4 (50%)	
Dysplasia			
Low grade	44 (90%)	5 (10%)	p < 0.0001
High grade/intramucosal carcinoma/microinvasive carcinoma	1 (12%)	7 (87%)	
S-phase			
≤ 10	41 (95%)	2 (5%)	p < 0.001
> 10	4 (29%)	10 (71%)	

**Table III. Association between proliferative phase and dysplasia grade**

	Low proliferative phase	High proliferative phase	p value
Low-grade dysplasia	41 (84%)	8 (16%)	p < 0.005
High-grade dysplasia + intramucous carcinoma + microinvasive carcinoma	2 (25%)	6 (75%)	

one centimeter, which have a lower prevalence of aneuploidy, a fact that can explain the observation of a larger number of aneuploid adenomas in our study (2,7,19).

An association exists between aneuploidy and the histopathological features that predispose to malignant change in adenomas, such as larger size, villous elements, and high-grade dysplasia (3,5). We also found an association between aneuploid DNA and size and degree of adenomatous dysplasia (7,17). Aneuploidy was also more common in adenomas with villous elements, although this association did not reach statistical signifi-

cance, an observation similar to that in other studies (7).

Assessing the incidence of aneuploidy by gender, we observed a higher incidence in men *versus* women (29 vs. 9%). However, this difference did not reach statistical significance. The reason for a higher incidence of aneuploidy in men is not clear; one possible explanation is that in men colorectal adenomas are biologically more aggressive, and thus more prone to malignant transformation. This may explain the higher incidence of CRC in men *versus* women in epidemiological studies (21,22).

In subjects presenting with hematochezia, adenoma DNA aneuploidy was more often than in subjects without such symptom. In most cases, adenomas were not probably the cause of hematochezia; instead, the symptom was related to an associated condition such as CRC, which was present in 30% of patients in our series. One might think that adenomas associated with a synchronous CRC are biologically more aggressive and have a higher frequency of aneuploidy. However, we did not find such association between DNA aneuploidy and the presence of synchronous or metachronous CRC, an observation similar to that reported by other groups (3,11,22).

The prevalence of DNA aneuploidy in adenomas with high grade dysplasia, *in situ* carcinoma, or microinvasive carcinoma ranges from 12.5 to 37% in studies using formalin-fixed specimens (6,23), and is 72% for fresh or frozen specimens (17). In our study, the prevalence of aneuploidy in this group of adenomas was somewhat higher, reaching 87.5%. This prevalence of aneuploidy is even higher than in CRC, in which prevalence ranges from 50 to 68% using formalin-fixed specimens (24-26), and from 64 to 75% using fresh or frozen specimens (27-29). We do not know the reason for the high prevalence of aneuploidy in our study. It is possible that DNA ploidy heterogeneity, which in some studies is over 40% (30,31), was smaller in our study, thus making it more feasible that aneuploid peaks be detected. Taking into account the low prevalence of aneuploidy in low-grade dysplasia adenomas, and its high prevalence in high grade dysplasia adenomas, intramucosal, or microinvasive carcinoma, we think that aneuploidy plays a role in the adenoma-carcinoma sequence. Our results are in contradiction with the results of other authors, who found aneuploidy in only 17% of adenomas with microinvasive carcinoma (11). However, this study was done in formalin-fixed specimens, a method less sensitive to detect aneuploid peaks.

DNA aneuploidy has been observed in adenomas with low-grade dysplasia, in hyperplastic polyps, and in ulcerative colitis mucosa before the development of dysplasia (12,13,32), which suggests that aneuploidy is an early change in carcinogenesis (12). Although the prevalence of aneuploidy in our study was higher in adenomas with high-grade dysplasia or carcinoma, we found DNA aneuploidy in 11% of adenomas with low-grade dysplasia. These results support the hypothesis that aneuploidy is an early event in colorectal carcinogenesis.

The exact mechanism giving rise to aneuploidy is unclear. Cytogenetic and molecular genetic studies indicate that aneuploidy is the result of changes in the number of chromosomes, and of deletions in chromosomes (33,34). Chromosomal alterations more commonly found in association with aneuploidy are located in chromosomes 1, 7, 17, and 18 (34-37). In colorectal adenomas, a close relationship between 1p deletion and DNA aneuploidy has been observed (35).

In this study, we also observed a significant association between increased proliferative cell fraction and signs of malignant transformation in adenomas. However, this association did not add anything to the information provided by DNA ploidy.

In conclusion, although aneuploidy can be detected in low-grade dysplasia adenomas, which supports the hypothesis that aneuploidy is an early event in colorectal carcinogenesis, its prevalence remarkably increases when high-grade dysplasia or carcinoma appear within the adenoma. Therefore, we think that DNA aneuploidy plays an important role in the adenoma-carcinoma sequence.

## REFERENCES

1. Vielh P, Magdelénat H, Remvikos Y, Dutrillaux B. Analysis of DNA content. In: Vielh P. Flow cytometry. 1th ed. New York, USA: Igaku-Shoin, 1991, p. 21-57.
2. Van der Ingh HF, Griffioen G, Cornelisse CJ. Flow cytometric detection of aneuploidy in colorectal adenomas. *Cancer Res* 1985; 45: 2-3397.
3. Quirque P, Fozard JBJ, Dickson MF, Dickson MF, Dyson JED, Giles GR, et al. DNA Aneuploidy in Colorectal Adenomas. *Br J Cancer* 1986; 53: 477-81.
4. Goh HS, Jass JR. DNA Content and the adenoma-carcinoma sequence in the colorectum. *J Clin Pathol* 1986; 39: 387-92.
5. Hammarberg G, Slezak P, Tribukait B. Early detection of malignancy in ulcerative colitis. A flow-cytometric DNA study. *Cancer* 1984; 53: 291-5.
6. Banner BF, Chacho MS, Roseman DL, Coon JS. Multiparameter flow cytometric analysis of colon polyps. *Am J Clin Pathol* 1987; 87: 313-8.
7. Giaretti W, Sciallero S, Bruno S, Geido E, Aste H, Di Vinci A. DNA flow cytometry of endoscopically examined colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Cytometry* 1988; 9: 238-44.
8. Murad T, Bauer KD, Scarpelli DJ. Histopathologic flow cytometric analysis of adenomatous colonic polyps. *Arch Pathol Lab Med* 1989; 113: 1003-8.
9. Sugai T, Nakamura S, Habano W, Uesugi N, Sato H, Yoshida T, et al. Usefulness of proliferative activity, DNA ploidy pattern and p53 products as diagnostic adjuncts in colorectal adenomas and intramucosal carcinomas. *Pathol Int* 1999; 49: 617-25.
10. Sugai T, Takahashi H, Habano W, Nakamura S, Sato K, Orii S, et al. Analysis of genetic alterations, classified according to their DNA ploidy pattern, in the progression of colorectal adenomas and early colorectal carcinomas. *J Patol* 2003; 200: 168-76.
11. Scott NA, Weiland LH, Dozois RR, Beart RW, Lieber MM. DNA Aneuploidy in solitary colonic adenomas and the future risk of colorectal cancer. *Dis Col Rectum* 1988; 31: 423-6.
12. Barletta A, Marzullo F, Pellechia A, Montemurro S, Labriola A, Lomonaco R, et al. DNA flow cytometry, p53 levels and proliferative cell nuclear antigen in human colon dysplastic, precancerous and cancerous tissues. *Anticancer Research* 1998; 18: 1677-82.
13. Lofberg R, Caspersson T, Tribukait B, Ost A. Comparative DNA analysis in longstanding ulcerative colitis with aneuploidy. *Gut* 1989; 30: 1731-16.
14. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal neoplasia. *Gut* 2000; 47: 251-5.
15. Vindelov LL, Christensen JJ, Nissen NI. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983; 3: 323-7.
16. Rabinovitch PS. In: Bauer K, Duque RE, Shankey TV. Practical considerations for DNA content and cell cycle analysis. 1th ed. Baltimore: Williams and Williams, 1993, p. 117-42.
17. Giaretti W, Santi L. Tumor progression by DNA flow cytometry in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1990; 45: 597-603.
18. Giaretti W, Danova M, Geido E, Mazzini G, Sciallero S, Aste H, et al. Flow cytometric DNA index in the prognosis of colorectal cancer. *Cancer* 1991; 67: 1921-7.
19. Vant MH, Hoff G, Clausen PF, Foerster A. Enzyme patterns and flow cytometric DNA. Measurements in colorectal hyperplastic polyps and tubular adenomas less than five millimeters. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 1031-8.
20. Whelan SL, Parkin DM, Masuyer E. Patterns of cancer in five continents. International Agency for Research on Cancer. Lyon, 1990.
21. González J, Gorgojo L, Martín J, Villar F. Cáncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 1993, p. 117-22.
22. Miller F, Heimann TM, Szporn A, Martinelli G, Kurtz RJ, Fasy TM. DNA ploidy of colorectal cancer and synchronous polyps in polyposis coli. *Dis Col Rectum* 1991; 34: 1103-8.
23. Beuvon F, Laquerrière A, Doublet B, Hemet J. Étude en cytométrie de flux des néoplasies polyposides du côlon resequés par endoscopie. *Gastroenterol Clin Biol* 1989; 13: 671-5.
24. Witzig TE, Loprinzi CL, Gonchoroff NJ, Reiman HM, Cha SS, Wieand HS, et al. DNA ploidy and cell kinetic measurements as predictors of recurrence and survival in stages B2 and colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1991; 68: 879-88.
25. Tang R, Ho Y-S, You YT, Hsu KC, Chen JS, Changchien CR, et al. Prognostic evaluation of DNA flow cytometric and histopathologic parameters of colorectal cancer. *Cancer* 1995; 76: 1724-30.
26. Jass JR, Mukawa K, Goh HS, Love SB, Capellaro D. Clinical importance of DNA contact in rectal cancer measured by flow cytometry. *J Clin Pathol* 1989; 42: 254-9.
27. Enker WE, Kimmel M, Cibas ES, Cranor ML, Melamed MR. DNA/RNA content and proliferative fractions of colorectal carcinomas: a five-year prospective study relating flow cytometry to survival. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 701-7.
28. Chapman M, Hardcastle J, Armitage N. Five-year prospective study of DNA tumor ploidy and colorectal cancer survival. *Cancer* 1995; 76: 383-7.
29. Lanza G, Gafá R, Santini A, Maestri J, Dubini A, Gilli G, et al. Prognostic significance of DNA ploidy in patients with stage II and stage III colon carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 49-59.
30. Quirque P, Dixon MF, Clayden A, Dudev P, Dyson JED, Williams NS, et al. Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol* 1987; 151: 285-91.
31. Schillaci A, Tirindelli DD, Ferri M, Teodori L, Mauro F, Nicolanti V, et al. Flow cytometric analysis in colorectal carcinoma: prognostic significance of cellular DNA content. *Int J Colorectal Dis* 1990; 5: 223-7.
32. Tripodi SA, Minacci C, Amato T, Mangiavacchi P, Perrone A, Luzi P, et al. DNA nuclearprotein content in the evaluation of cell cycle modifications during colon carcinogenesis. *Anal Quant Cytol Histol* 2000; 22: 133-8.
33. Remvikos Y, Muleris M, Vieth P, Salmon RJ, Dutrillaux B. DNA content and genetic evolution of human colorectal adenocarcinoma. A study by flow cytometry and cytogenetic analysis. *Int J Cancer* 1988; 42: 539-43.
34. Offerhaus GJA, De Feyter EP, Cornelisse CJ, Tersmette KWF, Floyd J, Kern SE, et al. The relationship of DNA aneuploidy to molecular genetic alterations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1992; 102: 1612-9.
35. Di Vinci A, Infusini E, Peveri C, Sciutto A, Geido E, Risio M, et al. Correlation between 1p deletions and aneusomy in human colorectal adenomas. *Int J Cancer* 1998; 75: 45-50.
36. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, et al. Allelic of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994; 331: 215-21.
37. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup M, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, et al. p53 Gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 1990; 50: 7717-22.

# Aneuploidía del ADN en adenomas colónicos. Papel en la secuencia adenoma-carcinoma

M. Alcántara Torres, R. Rodríguez Merlo<sup>1</sup>, A. Repiso Ortega, A. de Lucas Veguillas<sup>2</sup>, J. Valle Muñoz, R. Sánchez Simón<sup>1</sup> y J. L. Martínez Potenciano

*Servicio de Aparato Digestivo y <sup>1</sup>Anatomía Patológica. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. <sup>2</sup>Servicio de Salud Pública. Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla La Mancha. Talavera de la Reina. Toledo*

## RESUMEN

**Introducción:** en patología benigna de intestino grueso precursora del cáncer colorrectal, como adenomas o colitis ulcerosa, se ha observado aneuploidía en el 6-27% de los casos y se ha sugerido que su presencia predispone al desarrollo de malignidad. Sin embargo, su papel en la secuencia adenoma-carcinoma no se ha demostrado de forma concluyente. El objetivo de nuestro trabajo fue valorar la incidencia de aneuploidía en adenomas colónicos, con y sin signos de malignidad, y estudiar su posible papel en la secuencia adenoma-carcinoma.

**Material y métodos:** el estudio se realizó en una serie de 57 adenomas de intestino grueso, de 10 o más milímetros, recogidos de forma consecutiva de 54 pacientes. Las piezas se obtuvieron en todos los casos mediante resección endoscópica o quirúrgica. En 49 casos se trataba de adenomas con displasia de bajo grado, en dos casos de adenomas con displasia de alto grado, dos adenocarcinomas intramucosos y en otros cuatro de adenocarcinomas microinvasivos. El estudio del ADN se realizó en la pieza operatoria en fresco mediante citometría de flujo utilizando el método de Vindelov.

**Resultados:** se detectó ADN aneuploide en cinco de los 49 adenomas con displasia de bajo grado (10%), en los cuatro adenomas con displasia de alto grado o adenocarcinomas intramucosos (100%) y en tres de los cuatro adenocarcinomas microinvasivos (75%). Se observó asociación significativa entre el hallazgo de aneuploidía y displasia de alto grado, adenocarcinoma intramucoso o microinvasivo ( $p < 0,001$ ). No se apreció asociación entre la existencia de aneuploidía y la edad de los pacientes, sexo, sintomatología clínica, tamaño ni localización de los adenomas.

**Conclusiones:** en adenomas colónicos la incidencia de aneuploidía fue del 10% cuando se trataba de adenomas con displasia de bajo grado y del 87% cuando presentaban displasia de alto grado o adenocarcinoma siendo la diferencia estadísticamente significativa. Estos hallazgos sugieren que la aneuploidía juega un papel en la secuencia adenoma-carcinoma.

**Palabras clave:** Aneuploidía. Adenoma colónico. Adenocarcinoma colónico. Citometría de flujo.

## INTRODUCCIÓN

Las alteraciones cromosómicas más frecuentes que pueden producir modificación del contenido de ADN

Este trabajo se ha realizado con el apoyo económico de la beca de la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha GC03012.

normal son los cambios del número de cromosomas o delecciones de los mismos. Los cambios en el contenido normal de ADN de la célula pueden dar lugar a ADN aneuploide y son el reflejo de las alteraciones cromosómicas que juegan un papel esencial en el desarrollo y progresión de los tumores (1).

En la patología de intestino grueso precursora del cáncer colorrectal (CCR) como adenomas o colitis ulcerosa, se ha observado ADN aneuploide en el 6-27% de los casos (2-5). En los adenomas colónicos la incidencia de aneuploidía aumenta de forma paralela a la presencia en los mismos de parámetros anatomo-patológicos de riesgo de degeneración maligna tales como: mayor tamaño, componente vellositario o displasia severa (2-8). Estos hallazgos han sugerido que la aneuploidía juega un papel importante en la secuencia adenoma-carcinoma (2,4,9,10). Sin embargo, algunos autores han observado ADN aneuploide sólo en el 13% de adenomas colónicos con cáncer invasivo, lo que no apoya la hipótesis de que esta alteración juegue un papel importante en la secuencia adenoma-carcinoma (11).

Por otro lado, se puede detectar aneuploidía en mucosa colónica normal, pólipos hiperplásicos, adenomas con displasia de bajo grado y en colitis ulcerosa antes de la aparición de displasia (12,13). Todo ello ha sugerido que la aneuploidía es un acontecimiento precoz en la carcinogénesis (12).

El objetivo de nuestro trabajo fue valorar la incidencia de aneuploidía en adenomas colónicos y su posible papel en la secuencia adenoma-carcinoma.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una serie de 57 adenomas de intestino grueso, de al menos 10 mm de diámetro, recogidos de forma consecutiva de 54 pacientes en el Hospital Virgen de la Salud de Toledo. Las piezas se obtuvieron mediante resección endoscópica o quirúrgica. Los adenomas se distribuyeron según la clasificación de Viena (14) (Fig. 1). Todas las piezas fueron teñidas con hematoxili-

na-eosina y otras técnicas rutinarias y fueron analizadas por el mismo patólogo.

El análisis del ADN se realizó por citometría de flujo utilizando material fresco o congelado en nitrógeno líquido y posteriormente conservado a -80 °C, utilizando el método de Vindelov (15). De forma breve se daban los siguientes pasos: una vez recibida la pieza se fragmentaba con bisturí, se colocaba en *buffer* citrato y se filtraba por una malla de nylon con microporos de 50 micras. A continuación se realizaba digestión con tripsina y un detergente durante 10 minutos, añadiéndose posteriormente un inhibidor de la tripsina y RNAsa y más adelante se teñía con ioduro de propidio. Para el análisis de ADN se utilizó un citómetro FacSort (Becton-Dickinson). Como control de células diploides se utilizó mucosa colónica normal utilizando la misma técnica. El análisis se realizó sobre un mínimo de 10.000 núcleos, empleando el programa informático CellFit (Becton-Dickinson).

En el análisis de los histogramas sólo se consideró que el ADN era aneuploide cuando había dos picos de células G0/G1 claramente separados (Fig. 2). El índice de ADN se calculó como el cociente entre las medias de las fases G0/G1 de las células problema y de las células normales diploides. En los histogramas diploides este índice era igual a uno. Se consideró que el ADN era tetraploide cuando había un solo pico de células G0/G1 y el índice de ADN era igual a 2. La fase proliferativa se valoró según el porcentaje de células que se encontraban en fase S, considerándose alta o baja según ese porcentaje fuera igual o superior al 10% o inferior respectivamente (1). Los histogramas con un coeficiente de variación (CV) del pico G0/G1 mayor de 6 se consideraron no válidos (16).

Se recogieron de la historia clínica las variables: edad, sexo, clínica, cancer colorrectal asociado y localización tumoral.

El análisis estadístico se realizó mediante el test de Student para variables cuantitativas y Chi cuadrado o test exacto de Fisher para variables cualitativas. Se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

De los 57 adenomas incluidos en el estudio en 49 casos se trataba de adenomas con displasia de bajo grado, en dos casos de adenomas con displasia de alto grado, dos adenocarcinomas intramucosos y en otros cuatro casos de adenocarcinomas microinvasivos.

En cuanto a las características clínicas se trataba de 32 varones y 22 mujeres con una media de edad de 65,5 años ( $\pm 8,9$ ), de los que presentaron rectorragia previa a la exploración el 51,8% de los casos, si bien en la mayoría de las ocasiones este síntoma no guardaba relación con la existencia de los pólipos. Otras características clínico-patológicas se reflejan en la tabla I.

De los 57 adenomas incluidos en el estudio 12 tenían ADN aneuploide (21%) y el resto diploide. No había

**Tabla I. Características clínico-patológicas de los pacientes**

Edad	65,58±8,97
Sexo	
Varón	32 (59,2%)
Mujer	22 (40,7%)
Rectorragia	
Sí	28 (51,2%)
No	26 (48,1%)
Tamaño	
< 25 mm	49 (85,9%)
≥ 25 mm	8 (14%)
Histología	
Tubular	14 (24,5%)
Tubulo-veloso/veloso	43 (75,4%)
Displasia	
Bajo grado	49 (85,9%)
Alto grado/adenocarcinoma intramucoso	4 (7%)
Adenoma microninvasivo	4 (7%)
Tumor colónico maligno asociado	
Sí	17 (29,8%)
No	40 (70,1%)
Localización	
Colon	49 (85,9%)
Recto	8 (14%)
Ploidía	
Diploide	45 (78,9%)
Aneuploide	12 (21%)
Fase S	
< 10	43 (75,4%)
≥ 10	14 (24,5%)

ningún caso con ADN tetraploide. Cuando se relacionó la aneuploidía con las características clínico-patológicas observamos que el 50% de los adenomas de 2,5 mm de tamaño o más presentaban ADN aneuploide por sólo en 26% de los menores de este tamaño ( $p = 0,005$ ). El 87% de los adenomas con displasia de alto grado, adenocarcinoma intramucoso o microinvasivo presentaba ADN aneuploide por sólo el 10% de los que tenían displasia de bajo grado ( $p < 0,001$ ). El 71% de los adenomas con fase S mayor de 10% presentaban ADN aneuploide mientras que sólo la presentaba el 5% de los que tenían fase S menor o igual al 10% ( $p < 0,001$ ). Había tendencia a la asociación significativa entre la aneuploidía y el sexo varón y presencia de rectorragia. Otras variables como la edad, CCR asociado, localización y tipo histológico no se asociaban (Tabla II). El CV de los picos G0/G1 de los histogramas fueron de  $2,8 \pm 0,99$  (rango 1-5,9).

Cuando se relacionó la presencia de displasia de alto grado o adenocarcinoma en los adenomas con la fase proliferativa se apreció que había asociación significativa entre ambas variables (Tabla III).

**Tabla II. Asociación de la ploidía del ADN con las características clínico-patológicas**

	Diploide	Aneuploide	Valor p
Edad	65,91±9,22	69,08±7,80	NS
Sexo			
Hombre	24 (71%)	10 (29%)	p = 0,09
Mujer	21 (91%)	2 (9%)	
Rectorragia			
Sí	21 (70%)	9 (30%)	p = 0,10
No	24 (89%)	3 (11%)	
Cáncer colorrectal asociado			
Sí	14 (82%)	3 (18%)	NS
No	31 (77%)	9 (22%)	
Localización			
Recto	6 (75%)	2 (25%)	NS
Colon	39 (80%)	10 (20%)	
Tipo histológico			
Tubular	12 (86%)	2 (14%)	NS
Túbulo-vellosa/vellosa	33 (77%)	10 (23%)	
Tamaño			
< 25 mm	41 (84%)	8 (16%)	p = 0,05
≥ 25 mm	4 (50%)	4 (50%)	
Displasia			
Bajo grado	44 (90%)	5 (10%)	p < 0,0001
Alto grado/adenocarcinoma intramucoso/adenocarcinoma microinvasivo	1 (12%)	7 (87%)	
Fase S			
≤ 10	41 (95%)	2 (5%)	p < 0,001
≥ 10	4 (29%)	10 (71%)	

**Tabla III. Relación de la fase proliferativa con el grado de displasia**

	Fase proliferativa baja	Fase proliferativa alta	Valor p
Displasia de bajo grado	41 (84%)	8 (16%)	p < 0,005
Displasia de alto grado + adenocarcinoma intramucoso + adenocarcinoma microinvasivo	2 (25%)	6 (75%)	

## DISCUSIÓN

La incidencia de ADN aneuploide en nuestra serie de adenomas colónicos fue del 21% y si se excluyen los casos con signos histológicos de adenocarcinoma invasivo del 17%. Esta incidencia es superior a la descrita en trabajos en los que se ha utilizado material fijado en parafina (3,4), y similar la referida en estudios en las que se ha utilizado material fresco o congelado (17) con el que la sensibilidad para detectar un pico aneuploide es mayor (18).

Por otro lado, en nuestro estudio se justifica una mayor proporción de tumores aneuploidados porque se excluyeron los adenomas menores de 10 mm, y se ha comprobado que en los adenomas de pequeño tamaño la incidencia de aneuploidía es menor (2,7,19).

Se ha descrito que en los adenomas colónicos existe asociación entre la presencia de aneuploidía y parámetros anatomo-patológicos predisponentes de malignización tales como mayor tamaño, componente vellositario y displasia de alto grado (3,5). En nuestro estudio también observamos asociación entre la existencia de ADN aneuploide y el tamaño y el grado de displasia de los adenomas (7,17). Los adenomas con componente vellositario presentaban ADN aneuploide con más frecuencia que los adenomas tubulares, sin llegar a alcanzar significación estadística, hallazgos similares a los descritos en otros estudios (7).

Al valorar la incidencia de aneuploidía según el sexo, pudimos apreciar que esta era mayor en hombres que en mujeres (29 versus 9%) diferencia que tenía tendencia a la significación aunque no llegaba a alcanzarla. No está clara la razón de esta mayor tasa de ADN aneuploide en el sexo masculino en nuestro estudio; una posibilidad es que los adenomas colónicos en varones tengan una mayor agresividad biológica y por lo tanto una mayor tendencia a la malignización, lo que podría explicar la mayor incidencia del CCR en el sexo masculino con respecto al femenino en los estudios epidemiológicos (20,21).

Los pacientes que presentaban rectorragia tenían adenomas con ADN aneuploide con mayor frecuencia que los adenomas de los pacientes que no tenían este síntoma. Posiblemente los adenomas no fueran responsables de la rectorragia en la mayoría de las ocasiones, sino que este síntoma fuera debido a patología asociada, como por ejemplo CCR, que en nuestra serie se presentaba en el 30% de los pacientes. Esto podría hacer pensar que los adenomas asociados a CCR pudieran tener mayor agresividad biológica y por lo tanto una tasa de aneuploidía mayor. Sin embargo, no observamos asociación entre la presencia de aneuploidía y CCR sincrónico o metacrónico, hallazgos similares a los descritos en otros estudios (3,11,22).

En adenomas con displasia de alto grado, adenocarcinoma intramucoso o microinvasivo se ha observado ADN aneuploide en el 12,5-37% cuando se utiliza material fijado en parafina (6,23) y del 72% cuando se utiliza material fresco o congelado (17). En nuestro estudio esta cifra fue algo superior alcanzando el 87,5%. Esta tasa de aneuploidía es también superior a la descrita en el CCR avanzado, que con material fijado en parafina se observa en el 50-68% (24-26), y con material fresco o congelado en el 64-75% (27-29). No sabemos con precisión la causa de la alta incidencia de aneuploidía en nuestro estudio; es posible que al tratarse de lesiones malignas incipientes la heterogeneidad de la ploidía del ADN, que en algunos trabajos supera el 40% (30,31), fuera menor y resultara más factible

recoger algún pico aneuploide. Dada la baja incidencia de aneuploidía en los adenomas con displasia de bajo grado y la alta tasa de la misma en adenomas con displasia de alto grado, adenocarcinoma intramucoso o microinvasivo, pensamos que la misma juega un papel esencial en la secuencia adenoma-carcinoma. Estos datos contrastan con los aportados por otros autores que observan aneuploidía sólo en el 13% de los pacientes con adenomas colónicos con cáncer microinvasivo, si bien estos estudios se hicieron con material fijado en parafina que son menos sensibles para detectar aneuploidía (11).

Se ha observado aneuploidía en adenomas con bajo grado de displasia, pólipos hiperplásicos y colitis ulcerosa antes de la aparición de displasia (12,13,32), lo que sugiere que se trata de un acontecimiento precoz de la génesis tumoral (12). Aunque en nuestro estudio la incidencia de ADN aneuploide aumentaba de forma notable al aparecer displasia de alto grado o adenocarcinoma, también la observamos en el 11% de los que presentaban displasia de bajo grado. Estos datos apoyan la hipótesis de que la aneuploidía puede ser un acontecimiento precoz de la carcinogénesis colorrectal.

El mecanismo exacto por el que se produce la aneu-

ploidía no es bien conocido, aunque tras estudios de citogenética y genética molecular se ha sugerido que se produce por una alteración en el número de cromosomas y delecciones de los mismos (33,34). Las alteraciones cromosómicas que se asocian con mayor frecuencia a la aneuploidía son las de los cromosomas 1, 7, 17 y 18 (34,35), en los que se encuentran genes implicados en el desarrollo del CCR como p53 y DCC (36,37). En adenomas colónicos se ha observado una estrecha correlación entre la delección de 1p y la existencia de ADN aneuploide (35).

También observamos una asociación significativa entre la existencia de un aumento de la fase proliferativa y la aparición de signos de malignización en los adenomas aunque esta variable no aportaba información adicional a la ofrecida por la ploidía del ADN.

En conclusión, aunque la aneuploidía se puede detectar en adenomas colónicos con displasia de bajo grado y por lo tanto puede ser un acontecimiento precoz en la carcinogénesis colorrectal, su incidencia aumenta de forma notable al aparecer displasia de alto grado o adenocarcinoma en los adenomas, por lo que pensamos que juega un papel esencial en la secuencia adenoma-carcinoma.