



CITOMETRÍA DE FLUJO Y NEOPLASIAS DIGESTIVAS

T.M. MsCs(c) Juan Luis Castillo N.
Citometría de flujo,
Hospital del Trabajador, Concepción
e-mail: axeloyoi@entelchile.net

1.- INTRODUCCIÓN

La Citometría de Flujo es una tecnología que permite medir los más diversos parámetros celulares como antígenos de superficie, citoplasmáticos y nucleares, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática, flujo de calcio, potencial de membrana y pH entre otros.(6,7)

El principio básico de la Citometría de Flujo es la medición de un gran número de células, en forma individual, en un período muy corto de tiempo mientras se desplazan en un sistema de flujo o torrente líquido. Cada célula pasa por un punto donde son impactadas por un láser cuya luz es desviada o alterada de acuerdo a características propias de cada célula. La variación de la longitud de onda así producida, es captada y depurada por un complejo sistema de lentes y espejos especiales, que concentra esta luz y la transforma en pulsos de voltaje. Estos son codificados e interpretados por un computador provisto del programa adecuado. Los datos obtenidos de esta manera pueden manejarse muy versátilmente, siendo de gran confiabilidad y exactitud.

Si además a estas células se les acoplan moléculas fluorescentes, que son excitadas y alteradas por el láser, se facilita la identificación de subgrupos específicos dentro de las grandes poblaciones celulares.(6,7) Estas moléculas fluorescentes pueden estar acopladas a anticuerpos, fundamentalmente monoclonales, dirigidos contra diversos epítopes tanto intra como extra celulares. Bajo este concepto, es posible efectuar mediciones a poblaciones celulares, tanto eucariontes como procariontes, aplicadas a campos tan diversos como la biología celular, inmunología, hematología, patología, microbiología, farmacología, virología, etc.

La determinación de ploidía de ADN y ciclo celular por Citometría de flujo, se ha realizado por más de dos décadas, demostrando que cambios en el contenido de ADN celular se presentan comúnmente en diversos tipos de cáncer.(6,7,23,24,58) Las células marcadas con un fluorocromo, que se une estequiométricamente a los ácidos nucleicos, emiten fluorescencia proporcional al contenido cromosómico global. De esta manera se produce un patrón característico que refleja las fases del ciclo celular dentro de la población de células en estudio(6). El ciclo celular puede reflejarse en una curva que muestre las variaciones del contenido de ADN versus el número de células analizadas(6,7). La fluorescencia medida en las células en fase de reposo (G0) y en fase de síntesis de ADN (G1), produce un pico con distribución normal(7,46). De la misma forma, las células en G2, que tienen duplicado su ADN con respecto a las células en G1, también producen un pico distribuido como una normal. Los mismos factores que afectan la amplitud de los picos G0G1 y G2M, también afectan la amplitud de la Fase S, por lo que en un histograma de ADN, las células que inician la Fase S se superponen con las células G1, como también lo hacen las células al final de la Fase S con las células en G2 (7,58). El contenido de ADN de una población celular se expresa como el índice de ADN, el cual se define como la razón entre el contenido de ADN de la población celular en estudio con respecto a células normales o células control(7,69). En muchos tumores humanos la ploidía representa un factor pronóstico (4,6,7,16,27,28,32,34,36,70). Por lo anterior, en estudios con diversos tipos de cáncer, tradicionalmente se ha relacionado la citometría de flujo con ploidía de ADN y ciclo celular, incluso usándose incorrectamente como sinónimos. En la actualidad la citometría de flujo en el estudio de diversas neoplasias, va más allá del estudio de ciclo celular y contenido de ADN, involucrando el estudio de diversos componentes celulares tanto de extra como intracelulares, lo que queda claramente ejemplificado por los estudios de caracterización inmunofenotípica de leucemias y linfomas. Actualmente, es posible estudiar una población tumoral, desde diversos ángulos, como por ejemplo, la expresión de diversas moléculas, tradicionalmente evaluadas por inmunohistoquímica (p53, PCNA, Ki67, bcl-2, mic, ras, ciclinas, receptores estrógenicos, etc.), el patrón inmunofenotípico de las diversas poblaciones leucocitarias presentes (linfocitos, macrófagos, granulocitos), y lógicamente el ciclo celular y contenido de ADN. En los últimos años, han aumentado los estudios funcionales en diversos tipos de cáncer, como por ejemplo la producción de citocinas por parte de células tumorales, estudios de resistencia a drogas citostáticas (fenotipo MDR: Multi drug resistance), así como el efecto de las mismas sobre el pH intracelular, el potencial de membrana, el flujo de calcio y otros iones, etc. Como podemos ver, las aplicaciones de la citometría de flujo en neoplasias, son amplias y en constante desarrollo. A continuación, revisaremos algunas de las aplicaciones de la citometría de flujo en los estudios de lesiones neoplásicas y pre neoplásicas del tracto gastrointestinal, desde distintos puntos de vista.

2.- Esófago

Últimamente han aparecido varias publicaciones que intentan etapificar el carcinoma de esófago, sobre la base de parámetros histológicos y biológicos, en muestras obtenidas a partir de procedimientos endoscópicos y/o quirúrgicos (38,59,63,65). Dentro de los marcadores biológicos descritos como indicadores pronósticos, se encuentra las mucinas, en especial, la mucina-1, usada como marcador pronóstico en el carcinoma superficial de células escamosas (superficial squamous-cell carcinoma, SCC) (38,52).

Otro marcador pronóstico en el SCC, lo constituye el estudio de ciclo celular y contenido de ADN, siendo un patrón de ADN aneuploide relacionado con un pronóstico desfavorable (38,68). En forma similar, alteraciones en el p53, es posible encontrarlas como un evento primario en pacientes con acalasia, especialmente en áreas que muestran proliferación (38). A pesar de que se encuentra acumulación de p53 en la mayoría de los casos de cáncer de esófago, así como en tejido normal cercano al tumor, aún se evalúa su utilidad como factor pronóstico, no así en el caso de fenómeno metaplásicos (esófago de Barrett) (38,64).

Otra molécula relacionada con el ciclo celular y cuya sobre expresión se observa en muchos tipos de cáncer, es la ciclina D1. En el caso del cáncer de esófago, la presencia de una sobre expresión de ciclina D1, se correlaciona con una corta sobrevida.(38,66). Además se observa en forma más frecuente en pacientes añosos y en tumores bien diferenciados y moderadamente diferenciados. (3,38). Cuando la ciclina D1 se usa en combinación otras moléculas del ciclo celular, se puede definir un grado de malignidad, de acuerdo al número de moléculas alteradas. Entre estas moléculas, se encuentran Rb, p16INK4, p27KIP1, PCNA, las moléculas de adhesión E-caderina, alpha catenina y beta catenina, y las proteínas heat-hock HSP27 y HSP70 (38,60).

Los adenocarcinomas de la unión gastroesofágica, que presentan expresión de factor de crecimiento tumoral a (TGF- α), pueden



representar un fenotipo biológico más agresivo (12,38). Es de esperar, que la información obtenida a partir de biopsias endoscópicas sea cada vez mayor, tanto desde el punto de vista diagnóstico como pronóstico. En cualquier caso, las aplicaciones de técnicas de biología molecular y de citometría de flujo, sin duda serán fundamentales para obtener dicha información.

En cuanto a marcadores biológicos relacionados con lesiones precancerosas, se han reportado varias asociaciones con esófago de Barrett. La presencia de células con ADN aneuploide, se relaciona estrechamente con la presencia de alteraciones histológicas severas (19,38). Dado que el daño oxidativo del ADN causado por el reflujo gastroesofágico, sería seguido de mutaciones del p53, acumulación de proteínas y aneuploidía del ADN, se ha sugerido detectar estas alteraciones en forma rutinaria, a partir de biopsias (19,38), así como también la expresión de ciclina E. (53).

Por otro lado, uno de las características del esófago de Barrett, es el cambio en las características histoquímicas de las mucinas de la superficie epitelial. Chinyama et al (11,38) encontraron que la mucina intestinal MUC2 estaba presente en pacientes con esófago de Barrett, siendo las mucinas, marcadores capaces de diferenciar entre displasia y carcinoma en biopsias de mucosa, pudiendo ser usados como marcadores pronósticos.

Algunos reportes plantean la medición de Ki-67 y p53 como algunos de los parámetros a considerar en la evaluación de la respuesta a tratamiento en esófago de Barrett (17,38).

3.- Linfoma

Aunque la endoscopia y endosonografía son a menudo diagnósticos, el método más adecuado para la detección de esta neoplasia e las primeras etapas del tumor, lo constituye la evaluación histológica, incluyendo inmunohistoquímica (tradicional y por citometría de flujo). Al respecto, y según nuestra experiencia y la de otros, una buena estrategia diagnóstica, la constituye la determinación de subpoblaciones linfocitarias en mucosa gástrica, especialmente la determinación de linfocitos T (CD3) y B (CD19), y en estos últimos, la expresión de cadenas livianas de inmunoglobulinas del tipo kappa y lambda, a fin de evaluar clonalidad (18). Lo anterior, y según nuestra experiencia, tiene gran importancia en pacientes que al presentar infección por *H. pylori*, también presentan un aumento de las poblaciones linfoides a nivel de mucosa gástrica.

4.- Cáncer gástrico:

La mayoría de los casos de cáncer gástrico son diagnosticados en etapas avanzadas, lo que se traduce en un pésimo pronóstico. Esto resalta la importancia de la identificación de marcadores diagnósticos y pronósticos para cáncer gástrico, en especial, en sus primeras etapas (10). La aneuploidía del ADN ha mostrado ser un marcador de conducta tumoral más agresiva en cáncer gástrico, siendo significativamente de peor pronóstico que los cánceres con ADN diploide (62). En el cáncer gástrico incipiente, la aneuploidía de ADN y el comportamiento de la Fase S se relacionan directamente con el pronóstico, permitiendo definir conductas terapéuticas a seguir, siendo esta información, junto con la etapificación endosonográfica, fundamentales para efectuar procedimientos endoscópicos (polipectomias, mucosectomias) (28,30,34), incluso siendo un indicador útil, junto con la sobre expresión de p53, de compromiso ganglionar (54).

Lynch O. Y colaboradores, mostraron claramente que el estudio de aneuploidía del ADN, es capaz de establecer subgrupos pronósticos en cáncer gástrico avanzado, dentro del mismo estadio de la enfermedad. Los pacientes con un índice de ADN elevado (mayor grado de DN aneuploide), tienen una curva de sobrevivencia porcentualmente más baja y significativamente diferente a los pacientes con menor grado de aneuploidía (34). Es así como tanto el índice de ADN como la Fase S entregan información sobre el devenir del tumor y este será más agresivo, mientras más aneuploide sea, y su vez, el tumor será menos agresivo si las condiciones son inversas. Lo anterior permite categorizar biológicamente al cáncer gástrico avanzado en de alto o bajo riesgo después del tratamiento quirúrgico (34).

Recientemente se ha relacionado la sobre expresión de p53 con el pronóstico en cáncer gástrico, asociándose estas alteraciones con el grado de aneuploidía del tejido, incluso sugiriéndose que la pérdida del gen p53 tendría un papel en el proceso de aneuploidización del cáncer gástrico (62), siendo uno de los factores asociados con la transformación morfológica de células tumorales durante el proceso de carcinogénesis (62).

A pesar de que varios cambios genéticos son comunes distintos tipos de cáncer, varias alteraciones genéticas características se han observado cuando se compara cáncer gástrico pobremente diferenciado y bien diferenciado. En el caso de cáncer gástrico bien diferenciado, la inactivación los genes supresores APC y DCC es prevalente. Sin embargo en cáncer gástrico pobremente diferenciado, la pérdida de los genes de E-caderina y catenina, son los más prevalentes (10).

5.- Colon

La Enfermedad Neoplásica del Colon incluye lesiones epiteliales adenomatosas planas y pólipoides, ya que prácticamente todos los cánceres de colon comienzan como lesiones adenomatosas, de acuerdo a la progresión de la secuencia adenoma-displasia-carcinoma, la que ocurre por acumulación de cambios genéticos y ambientales (39). La mayoría de los cánceres de colon son adenocarcinomas, siendo los 2/3 de ubicación rectosigmoidea y 1/3 se ubica en el resto del colon (39). En un sentido amplio, se denomina pólipo a todo tumor localizado que protruye desde la pared a la luz intestinal, independientemente de su estructura histológica. El término Poliposis o Enfermedad Poliposa del Colon se aplica al estado de aparición de múltiples pólipos en el colon (26). Pueden ser únicos o múltiples y asentar en cualquier parte del colon. Según la superficie de fijación, se dividen en sésiles y pediculados.

Histológicamente los pólipos de colon se clasifican en Neoplásicos y no neoplásicos. Los de tipo Neoplásico, a su vez se dividen en Benignos (Adenomatosos, Intermedios y vellosos) y Malignos (adenomas con carcinoma in situ). Por otro lado los pólipos de tipo no neoplásico se pueden clasificar en Mucosos, Hiperplásicos, Inflamatorios y Hamartomatosos (26,55,56).

En relación a los pólipos neoplásicos del tipo adenomatoso, estos son tumores epiteliales esencialmente benignos, pero con potencial de malignización, según la secuencia pólipo-cáncer, lo que sería el origen de los cánceres de colon.

Tanto en humanos como en ratones, se han descrito alteraciones en la expresión mediadores de la transducción de señales en linfocitos infiltrantes de tumores con carcinoma de colon y de células renales, lo que también se ha descrito en linfocitos de sangre periférica



(22,35,71). Dentro de las alteraciones que se han descrito, se incluye la pérdida de cadena zCD3, un elemento esencial en la transducción de señales, (13,14,22,35). El receptor de células T (TCR) es el lugar de reconocimiento antigénico, proceso en el que participa el complejo CD3 que contiene un homodímero de una proteína llamada cadena z. Las cadenas z poseen tres copias de un inmunoreceptor de activación basado en tirosina (ITAM), el cual está expresado en forma singular en las otras cadenas CD3 (1,31,35,71).

En forma posterior a la interacción del TCR/CD3 con un ligando, los inmunoreceptores ITAM son fosforilados en los residuos de tirosina por miembros de las familias de kinasas Src (p56lck, p59fyn) y por la ZAP 70, permitiéndoles servir como ancla para reclutar y activar múltiples cascadas de señales intermedias que culminarán con la activación de la célula T y la secreción de citoquinas (1,22,31,37,71).

Se han descrito alteraciones marcadas, que incluyen pérdida de cadena zCD3, un elemento esencial en la transducción de señales, en linfocitos infiltrantes de tumores de pacientes con carcinoma colorectal o de células renales (13,14,22,35,40). Evidencia que afirma la idea que la disminución en la expresión de cadenas z, puede ser uno de los responsables de la pérdida de competencia inmune, característica de pacientes con cáncer, y puede de hecho contribuir a la incapacidad del sistema inmune para enfrentar una neoplasia, con la consiguiente progresión de ésta (22,35,71).

Usando Citometría de Flujo para la detección de cadenas z en linfocitos de sangre periférica, algunos autores han encontrado que su expresión disminuida, en pacientes con neoplasias, disminuye que se correlaciona con la etapa de la enfermedad, pronóstico e incluso muerte del paciente, además aquellos pacientes con compromiso de nódulos linfáticos o con metástasis tienen significativamente menos cadenas z que los pacientes con enfermedad localizada, lo que ha llevado a proponer la determinación de cadenas z en sangre periférica, como un marcador de progresión de la enfermedad (22,35).

Al respecto, en el Hospital del Trabajador de Concepción, hemos estudiado la expresión de cadenas z en linfocitos T de sangre periférica en pacientes con pólipos adenomatosos de colon, los cuales son lesiones neoplásicas benignas. Es así como en un grupo de 19 pacientes con pólipos adenomatosos de colon, el promedio de expresión de cadenas z por parte de linfocitos T de sangre periférica fue de 19.56 %, lo que difiere significativamente del 87.3 % de expresión de cadena z en linfocitos T, encontrado en un grupo de referencia de 18 pacientes (8). Estos resultados nos permiten sugerir la determinación de niveles de cadenas z CD3 en linfocitos T de sangre periférica como un parámetro a considerar al momento de evaluar a un paciente con antecedentes de pólipos o sangramiento fecal persistente, junto con una estrecha vigilancia endoscópica (8).

7.- Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Se define como enfermedad inflamatoria intestinal (EII) a un grupo de enfermedades inflamatorias crónicas, de etiología desconocida, de curso crónico y recurrente, que afectan al tubo digestivo (15,20). Los dos principales exponentes de la EII, son la Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC). Los patrones endoscópicos e histopatológicos característicos (aunque no patognomónicos) (9,20,42), son la base diagnóstica de la EII, previa exclusión de otras causas de inflamación intestinal (infecciosas, alérgicas, etc.) (5,20,42,50). Aunque la etiología precisa permanece desconocida, existe creciente evidencia de una alteración en la regulación del sistema inmune de mucosas, en la cual influyen: 1) antígenos luminales que actuarían como gatillantes (microorganismos patógenos exógenos, antígenos dietarios y, en especial, la flora intestinal) (51); 2) el epitelio intestinal, que presenta una permeabilidad aumentada, secreta citoquinas y actúa como células presentadoras de antígenos (15,41,51,61); 3) las células inmunes de la lámina propia, las cuales inician y perpetúan el proceso inflamatorio, al no responder a los mecanismos reguladores inhibitorios fisiológicos, que modulan la respuesta inmune de la mucosa digestiva, todo esto en el contexto de un huésped genéticamente predispuesto (15,41,42,51,61).

Recientemente se han descrito alteraciones en el inmunofenotipo de algunas células del infiltrado inflamatorio en EII (21,25,43,44,45,48,61), en especial en los macrófagos de la lámina propia de la mucosa intestinal, los cuales en mucosa normal expresan un fenotipo único con funciones inmunes atenuadas (CD33+, CD44+, HLA-DR bajo, CD14-, CD16-, CD11b-, CD11c-, CD80-, CD86-) (49). En EII, los macrófagos de la lámina propia expresan fenotipos inmunológicamente más activos (mayor presentación antigénica, producción de citoquinas proinflamatorias y actividad migratoria) (2,33,41,47,61). Entre estos fenotipos se describen HLA-DR alto, CD11b+, CD11c+, CD16+, CD14+, CD80+, CD86+ (2,41,47,48).

La expresión de molécula HLA-DR, refleja la presentación de antígenos a las células T por los macrófagos de la lámina propia intestinal. Esta presentación antigénica, se encuentra crónicamente elevada en EII (42). La descripción de este fenotipo (elevada expresión de HLA-DR), evidencia la gran capacidad de presentar antígenos que muestran los MI de los pacientes con EII, en comparación con los pacientes con mucosa intestinal normal, en los cuales, los MI presentan una baja expresión de HLA-DR. Lo anterior refleja la baja capacidad que tiene los MI de la mucosa normal, de activar células T, mediante presentación antigénica, lo que es muy importante dentro del equilibrio en el que se encuentra la mucosa. Esto ha sido demostrado por otros autores en estudios similares, señalando el elevado aumento de la expresión de la molécula HLA-DR en MI de pacientes con EII y la baja expresión de ésta en mucosa intestinal normal (16,18). Al respecto, en el Hospital del Trabajador de Concepción, hemos estudiado la expresión de HLA-DR y CD16 en macrófagos intestinales de pacientes con sospecha de EII, encontrando una mayor expresión de HLA-DR en los MI de pacientes con EII que en el grupo de referencia, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Es así como la especificidad, la sensibilidad y el VPP del estudio fenotípico de MI, mediante citometría de flujo, con marcador para HLA-DR en pacientes con EII, sugiere su utilidad para apoyar el diagnóstico de EII, cuando el resultado es positivo, no así cuando éste es negativo (bajo VPN). A nuestro juicio, el mayor aporte de este estudio para el clínico, estaría dado en aquellos pacientes con cuadro clínico característico, endoscopia sugerente de EII y que sin embargo, la histología no es concluyente. A su vez el estudio de expresión de CD16, no sería de utilidad para el diagnóstico de EII, pero sí lo es para evaluar la presencia de una EII activa (29).

8.- Consideraciones finales

Si bien las aplicaciones de la citometría de flujo en oncología, podríamos continuar enumerándolas, la especificidad de cada una de ellas dependerá del modelo celular estudiado, así como de las condiciones de dicho estudio. Es indudable que en los próximos podremos ser testigos de grandes avances tanto en la génesis, diagnóstico y tratamiento de diversas neoplasias, siendo la citometría de flujo una de las herramientas principales.



9.- BIBLIOGRAFIA

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J. T lymphocyte Antigen Recognition and Activation. In *Cellular and Molecular Immunology*. 3th edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1997, 138-170.
2. Allison MC, Poulter LW. Changes in phenotypically distinct mucosal macrophage populations may be a prerequisite for the development of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1991;85(3):504-9.
3. Arber N, Gammon MD, Hibshoosh H, Britton JA, Zhang Y, Schonberg JB, Rotterdam H, Fabian I, Holt PR, Weinstein IB. Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach. *Hum Pathol*. 1999 (9):1087-92.
4. Bergers E. Comparison of Five Cell Cycle Analysis Models Applied to 1414 Flow Cytometry DNA of Frozen Breast Cancer. *Cytometry(CCC)*1997;30:54-60.
5. Boerr L. Enfermedades inflamatorias del intestino In: Valenzuela J, Rodés J. *Gastroenterología y hepatología*. Stgo, Chile: Pub. Téc. Mediterráneo.1997, 337-356.
6. Bono M R, Simon V. Citometría de Flujo: Principios Básicos y Aplicaciones. En *Fundamentos de Inmunología*. Palomo I, Ferreira A, Sepúlveda C, Roseblatt M, Vergara U. Ed. Universidad de Talca, 1998, pp6 47-665.
7. Castillo J.L., Kawaguchi F., Madariaga B., Venegas O., Lecannelier E., Ocampo S., Castillo M. 1999. Aspectos que afectan el análisis de contenido de ADN por citometría de flujo. *Rev Méd Chile* 127: 1385-1397.
8. Castillo J.L., Kawaguchi F., Venegas O., Castillo M., Madariaga J., Riquelme F., Yañez C.G., Vega E., Gonzalez C. 2003. Expresión de cadenas zeta CD3 en linfocitos periféricos de pacientes con pólipos adenomatosos de colon. Escrito en preparación.
9. Cotran R, Kumar V, Collins T. *Patología estructural y funcional*. 6ª Edición. Madrid: Mc-Graw-Hill interamericana de España S.A.U., 2000, 850-855.
10. Chew-Wun Wu, Chin-Wen Chi, Wen-chang Lin. 2002. Gastric cancer: prognosis and diagnostic advances. *Exp. Rev. Mol. Med*. 21 March, <http://www.emm.cbcu.cam.ac.uk/02004337h.htm>.
11. Chinyama CN, Marshall RE, Owen WJ, Mason RC, Kothari D, Wilkinson ML, Sanderson JD. Expression of MUC1 and MUC2 mucin gene products in Barrett's metaplasia, dysplasia and adenocarcinoma: an immunopathological study with clinical correlation. *Histopathology*. 1999; 35(6):517-24.
12. D'Errico A, Barozzi C, Fiorentino M, Carella R, Di Simone M, Ferruzzi L, Mattioli S, Grigioni WF. Role and new perspectives of transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) in adenocarcinoma of the gastro-oesophageal junction. *Br J Cancer*. 2000;82(4):865-70.
13. Farace F, Angevin E, Vanderplancke J, Escudier B, Triebel F. The decreased expression of CD3 ? chains in cancer patients is not reversed by IL-2 administration. *Int. J. Cancer*: 59,752-755, (1994).
14. Finke J, Zea A, Stanley J, Longo D, Mizoguchi H, Tubbs R, Wiltrout R, O'Shea J, Kudoh S, Klein E, Bukowski R, Ochoa A. Loss of T-Cell Receptor ? chain and p56lck in T-cells infiltrating Human Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* 53, 5613-5616, 1993.
15. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.
16. Fujimaki E, Sasaki K, Nakano O, Chiba S, Tazawa H, Yamashiki H, Orii S, Tazawa H. DNA Ploidy Heterogeneity in Early and Advanced Gastric Cancers. *Cytometry(CCC)* 1996; 26:131-136.
17. Garewal H, Ramsey L, Sharma P, Kraus K, Sampliner R, Fass R. Biomarker studies in reversed Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol*. 1999;94(10):2829-33.
18. Ghoshal U., Guha D., Bandyopadhyay, Pal C., Chakraborty S., Ghoshal G., Ghosh T., Pal B. and Banerjee P. 2002. Gastric adenocarcinoma in a patient re-infected with H. pylori after regression of MALT lymphoma with successful anti H. pylori therapy and gastric resection: a case report. *BMC Gastroenterology* 2: <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/2/6>.
19. Gimenez A, Minguela A, de Haro LM, Parrilla P, Bermejo J, Perez D, Garcia AM, Ortiz MA, Molina J, Alvarez R. DNA ploidy status and proliferative activity as markers of malignant potential in Barrett's esophagus: flow cytometric study using routinely paraffin-embedded tissue. *World J Surg*. 2000;24(1):72-7.
20. Glickman R. *Enfermedad inflamatoria intestinal: colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn* In: Harrison. *Principios de medicina interna*. 14ª Edición. Madrid: Mc-Graw-Hill interamericana de España S.A.U., 1998, 1853-1867.
21. Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1995; 100(2):291-7.
22. Healy C, Simons J, Carducci M, DeWeese T, Bartkowski M, Tong K, Bolton W. Impaired Expression and Function of Sigal-Transducing Zeta Chains in Peripherer T Cells and natural Killer Cells in Patients with Prostate Cancer. *Cytometry* 32:109-119 (1998).
23. Hedley D. Flow Cytometry Using Paraffin-Embedded Tissue: Five years On. *Cytometry* 1989; 10:229-241.
24. Hedley DW, et al. Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31:1333-5.
25. Iizuka M, Chiba M, Horie Y, Masamune O, Ohta H. Lymphoid cell subsets in colonic mucosa and HLA-DR antigens on colonic epithelia in colitis excluding ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Jpn* 1990, (6):700-7.
26. Iwama T, Kawachi Y, Mishima Y. Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP) o Poliposis Adenomatosa de Colon (APC). En *Avances en el diagnóstico y Tratamiento de las Afecciones Rectocolónicas*. Llorens P, Nakamura K. 1995. Instituto Chileno-Japonés de Enfermedades Digestivas, Hospital Clínico San Borja-Arriarán, Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). pp 142-162.
27. Joensuu H, Toikkanen S, Klemi PJ: DNA Index and S-phase fraction and their combination as prognostic factors in operable ductal breast carcinoma. *Cancer* 1990; 66:331-340.
28. Kawaguchi F, Kuniyasu S, Tsuneko Y, Kiyoshi Y. Variación del patrón diploide en tejidos usados como controles normales de tumores sólidos: Ventajas y desventajas del análisis fluorocitométrico en tejidos incluidos en parafina. *Rev. Méd. Chile* 1993; 121:738-745.
29. Kawaguchi F., Castillo J.L., Venegas O., Alarcón R., Lazcano C., Riquelme F. Madariaga J., Yañez C.G., Castillo M., Vega E., Gonzalez C. 2002. Expresión de HLA-DR y CD16 en Macrófagos intestinales de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal CONGRESO LATINOAMERICANO DE GASTROENTEROLOGIA, Santiago, Chile, 05, 06 Diciembre 2002
30. Kim J., Lee D., Kim Y., Baik S., Lee C., Kwon S., Jung S. 1997. DNA analysis by flow cytometry in early gastric cancer. *Korean J Intern Med* 2: 137-143.



31. Lazarus A, Ellis J, Blanchette V, Freedman J, Sheng-Tanner X. Permeabilization and Fixation Conditions for intracellular Flow Cytometric Detection of the T-cell Receptor γ Chain and Other Intracellular Proteins in Lymphocyte Subpopulations. *Cytometry* 32:206-213. (1998).
32. Lofberg R, Caspersson T, Tribukait B, Ost A. Comparative DNA analyses in longstanding ulcerative colitis with aneuploidy. *Gut* 1989; 30:1731-1736.
33. Luger N, Kucharzik T, Stoll R, Domschke W. A system of nonspecific defense in chronic inflammatory bowel disease pathophysiologic and therapeutic aspects. *Z Gastroenterol* 1998 ;36(2):173-87.
34. Lynch O, Kawaguchi F, Madariaga J, Cao C, Zilic M, Fernández M, et al. Estudio de ploidía del ADN e índice de proliferación celular en el cáncer gástrico avanzado. Validación de su capacidad pronóstica. *Cuadernos Chilenos de Cirugía*. N°40, 1996, pp 166-174.
35. Matsuda M, Petersson M, Lenkei R, Taupin JL, Magnusson Y, Mellstedt H, Anderson P, Kiessling R. Alterations in the signal-transducing molecules of T cell and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: Correlation with the stage of the disease. *Int. J. Cancer*:61,765-772 (1995).
36. Merkel DE, McGuire WL. Ploidy, proliferative activity and Prognosis. *DNA Flow Cytometry of solid tumors*. *Cancer* 1990; 65 :1194-1205.
37. Mizoguchi H, O'Shea J, Longo D, Loeffler C, McVicar D, Ochoa A. Alterations in signal transduction molecules in T Lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science* 258:1795-1798,1992.
38. Moretó M. Diagnosis of Esophagogastric Tumors. *Endoscopy* 2001;33(1):1-7.
39. Motwani B, Shafir M, Merrick M, Tepper J, Bruckner H. Adenocarcinoma of the Colon and Rectum. In *Cancer Medicine*. Fourth Edition. Holland J, Frei III E, Bast R, Kufe D, Morton D, Weichselbaum R editors. Williams & Wilkins, 1997. Chapter 121, pp 2029-2072.
40. Nakagomi h, Peterson M, Magnusson Y, Juhlin C, Matsuda M, Mellstedt T, Taupin J, Viver E, Anderson P, Kiessling R. Decreased Expression of the Signal-transducing γ chains in Tumor-infiltrating T-cells and NK Cells of Patients with Colorectal Carcinoma. *Cancer Research* 53, 5610-5612, 1993.
41. Neurath M. Immunological finding in Inflammatory Bowel Disease In: Fellermann K, Jewell D. *Falk Symposium 104. Induction and Modulation of gastrointestinal inflammation*. Dordrecht, Germany: Kluwer Academic Publ. 1999, 243-248.
42. Ogra P, Mestecky J, Lamm M, Strober W, Bienenstock J, McGhee J. *Mucosal Immunology*. 2ª Edición. San Diego USA: Academic Press, 1999, 1047-1080
43. Polese L, Angriman I, Cecchetto A, Norberto L, Scarpa M, Et al. The role of CD40 in ulcerative colitis: histochemical analysis and clinical correlation. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14(3):237-41.
44. Polko J, Vrlík M, Petriskova J, Strakova J, Mokaň M. Importance of determination of lymphocytes in intestinal mucosa biopsy specimens using flow cytometry in the evaluation of ulcerative colitis activity. *Vnitř Lek* 2002;48(3):197-201.
45. Qin OY, el-Youssef M, Yen-Lieberman B, Sapatnekar W, Youngman KR, Et al. Expression of HLA-DR antigens in IBD mucosa: role of intestinal lamina propria mononuclear cell-derived interferon gamma. *Dig Dis Sci* 1988, 33(12):1528-36.
46. Rabinovitch P: Practical Considerations for DNA Content and Cell Cycle Analysis. In: *Clinical Flow Cytometry: Principles and Applications*. Bauer Ketal(eds), W&W., Baltimore, 1993, pp 117-142.
47. Rogler G, Andus T, Aschenbrenner E, Vogl D, Falk W, Et al. Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9(9):893-9.
48. Rogler G, Hausmann M, Spottl T, Vogl D, Aschenbrenner E, Et al. T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11(10):1105-11.
49. Rogler G, Hausmann M, Vogl D, Aschenbrenner E, Et al. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 1998;112(2):205-15.
50. Roth M, Bernhardt V. *Inflammatory bowel disease: Practice manual*. 1ª Edición. Freiburg, Germany: Dr. Falk Pharma GMBH, 1999, . 3-21.
51. Rowe W. *Inflammatory Bowel Disease*. eMedicine Journal, 2002, Volume 3, Number 1.
52. Sagara M, Yonezawa S, Nagata K, Tezuka Y, Natsugoe S, Xing PX, McKenzie IF, Aikou T, Sato E. Expression of mucin 1 (MUC1) in esophageal squamous-cell carcinoma: its relationship with prognosis. *Int J Cancer*. 1999 ;84(3):251-7
53. Sarbia M, Bektas N, Muller W, Heep H, Borchard F, Gabbert HE. Expression of cyclin E in dysplasia, carcinoma, and nonmalignant lesions of Barrett esophagus. *Cancer*. 1999;86(12):2597-601.
54. Sasaki O., Kido K., Nagahama S. 1999. DNA ploidy, Ki-67 and p53 as indicators of lymph node metastasis in early gastric carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 21(1):85-88.
55. Schofield PF, Jones DJ. Colorectal neoplasia. I. Benign colonic tumours. *British Medical Journal*, 304; 1992: 1498-1500.
56. Schofield PF, Jones DJ. Colorectal neoplasia. II. Large Bowel cancer. *British Medical Journal*, 304; 1992: 1561-1563.
57. Shackney S, Sankey TV. *Cell Cycle Models For Molecular Biology and Molecular Oncology: Exploring New Dimensions*. *Cytometry*, 1999 : 35:97-116.
58. Shankey TV, Rabinovitch P, Bagwell B, Bauer K, Duque R, Hedley D, et al: *Guidelines for Implementation of Clinical DNA Cytometry*. *Cytometry* 1993;14:472-477.
59. Shih CH, Ozawa S, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res*. 2000 (3):1161-8
60. Shiozaki H, Doki Y, Kawanishi K, Shamma A, Yano M, Inoue M, Monden M. Clinical application of malignancy potential grading as a prognostic factor of human esophageal cancers. *Surgery*. 2000;127(5):552-61.
61. Strober W, Fuss I, Blumberg R. *The immunology of Mucosal Models of Inflammation*. *Annu. Rev. Immunol*. 2002. 20: 495-549.
62. Sugai T., Nakamura S., Uesugi N., Habano W., Yoshida T., Tazawa H. Orii S., Suto T., Itoh C. 1999. Role of DNA aneuploidy, overexpression of p53 gene product, and cellular proliferation in the progression of gastric cancer. *Cytometry (CCC)* 38: 111-117.
63. Tajima Y, Nakanishi Y, Ochiai A, Tachimori Y, Kato H, Watanabe H, Yamaguchi H, Yoshimura K, Kusano M, Shimoda T. Histopathologic findings predicting lymph node metastasis and prognosis of patients with superficial esophageal carcinoma: analysis of 240 surgically resected tumors. *Cancer*. 2000 ;88(6):1285-93.
64. Tanaka M, Nonogaki S, Alberti VN, Forones NM. p53 in epidermoid cancer of the esophagus. *Hepatogastroenterology*. 1999 (27):1765-8.
65. Torres C, Wang H, Turner J, Shahsafaie A, Odze RD. Prognostic significance and effect of chemoradiotherapy on microvessel density (angiogenesis) in esophageal Barrett's esophagus-associated adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 1999 ;30(7):753-8.
66. Toyoda H, Nakamura T, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S, Ohashi K, Seto M, Shiku H, Nakamura S. Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Dig Dis Sci*. 2000 (5):864-9.
67. Velloso A, De la Santa J. En Berenguer J (de)., *Gastroenterología y Hepatología*. Doyma Barcelona, 1986: 476-482.

Bioarrayanes

Centro de Estudios Médicos Enfermedades Gastroenterológicas



68. Watanabe M, Kuwano H, Tanaka S, Toh Y, Sadanaga N, Sugimachi K. Flow cytometric DNA analysis is useful in detecting multiple genetic alterations in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 1999;85(11):2322-8.

69. Wersto RP, Liblit RL, Deitch D, Koss LG. Variability in DNA measurements in multiple tumor samples of human colonic carcinoma. *Cancer* 1991; 67:106-115.

70. Xiang JH, Spanier SS, Benson Na, Braylan RC. Flow Cytometric analysis of DNA in bone and soft-tissue tumors using nuclear suspensions. *Cancer* 1987; 59:1951-1958.

71. Zier K, Gansbacher B, Salvadori S. Preventing Abnormalities in Signal Transduction of T Cells in Cancer: The Promise of Cytokine Gene Therapy. *Immunology Today* 17:39-45, 1996.