

Departamento de Genética de la
Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE EXUDADOS PLEURALES SOSPECHOSOS DE MALIGNIDAD

L. García Quesada *, J. A. Portero Sánchez ** y J. A. Cambronero Galache ***

Introducción

Los estudios citogenéticos en exudados pleurales, ha sido un tema poco estudiado por los diferentes autores, debido, entre otras causas, a las dificultades de obtención e interpretación de los resultados.

En 1956, Hänsen-Melander¹ encuentra, por primera vez, hiperdiploidías en las células procedentes de un derrame ascítico secundario a un carcinoma metastásico de ovario; posteriormente, Ising y Levan², en 1957, al estudiar varios derrames pleurales, encontraron, junto a células poliploides, otras con cromosomas en anillo.

Estos estudios no se habían contrastado con ningún otro método de diagnóstico clínico, dado que eran muestras seleccionadas cuyo diagnóstico era conocido. En 1976, Dewald y cols.³ estudia una serie de 104 casos no seleccionados, comparando los resultados citogenéticos con los citológicos, encontrando similar fiabilidad entre ambos métodos en todos los grupos, excepto en el de leucemias y linfomas, donde la citogenética obtendría una ventaja estadísticamente significativa. Asimismo, Dewald demuestra que la combinación de ambos métodos logra el diagnóstico correcto de malignidad en el 83 % de los casos, resultando claramente superior ($p > 0.01$) que cual-

quiera de las dos técnicas por separado.

Basándonos en estos estudios, presentamos 14 exudados pleurales sospechosos de malignidad, sobre los que se realizaron exámenes citogenéticos y citológicos, comparándose posteriormente con el diagnóstico anatomo-patológico.

Material y métodos

Se estudiaron 14 casos en derrames pleurales sospechosos de malignidad. En ningún caso se conoció el diagnóstico antes de acabar el estudio citogenético. Tras éste, en 2 pacientes no se pudo llegar a un diagnóstico, en el resto éste se documentó con biopsia pleural y de otros órganos. Esto nos permite dividir a nuestros pacientes en 5 grupos:

- 1) Carcinomas primitivos de pulmón: 4 casos,
- 2) carcinomas metastásicos: 3 de mama y 1 de ovario,
- 3) linfoma de Burkitt: un caso,
- 4) casos benignos: 3 y
- 5) casos dudosos: 2.

Examen citológico de rutina:

Se realizaron en todos los casos, menos en el Burkitt, citologías de esputo, líquido pleural y exudado bronquial tras broncoscopia en 2 casos.

Examen citogenético:

Se realizó, según técnica de Dewald³, modificada por nosotros, sin cultivo previo:

- a) Llegada de la muestra al laboratorio, como máximo una hora después de la toracocentesis.
- b) Tratamiento de la muestra con Colchicina 0.2 c.c. durante 2 horas a 37°.
- c) Choque hipotónico durante 10 minutos.
- d) Fijación con Carnoy.
- e) Tinción con Giemsa al 2.5 % durante 15 minutos.

Criterio de malignidad:

Una célula se ha considerado anormal si presentaba hiperdiploidía o contenía algún marcador cromosómico; la muestra se ha definido como maligna si contenía al menos 3 células anormales en 30 metafases.

Resultados

El estudio comparativo de la citogenética y la citología se recoge en la tabla I. En los casos de carcinoma primitivo, la citología y la citogenética dieron el diagnóstico en el 50 % de los casos, resultando 2 falsos negativos en las dos técnicas. En los carcinomas metastásicos, la citogenética diagnosticó los 4, mientras que la citología sólo lo hizo en 3. En el linfoma de Burkitt, no fue posible obtener el estudio citológico y la citogenética fue positiva.

En los derrames benignos, ambos métodos no presentaron ningún falso positivo; es de destacar que en un caso apareció una célula poliploide en 30 metafases analizadas, correspondiendo a una enferma de 28 años que ingresó por un cuadro de tromboembolismo pulmonar, relatando al tiempo intenso tabaquismo.

Los 2 casos dudosos corresponden a enfermas de avanzada edad y mal estado clínico, por lo que no se pudo realizar biopsia pleural.

TABLA I
Examen de líquidos pleurales sospechosos de malignidad

N.º CASOS	DIAGNOSTICO	DIAGNOSTICO CORRECTO POR:	
		CITOLOGIA %	CITOGENETICA %
4	CA primitivo de pulmón	2 (50 %)	2 (50 %)
4	CA metastásico	3 (75 %)	4 (100 %)
1	Linfoma de Burkitt	—	1 (100 %)
3	Benignos	3 (100 %)	3 (100 %)
2	Dudosos	0	0

* Departamento de Genética.
** Departamento de Genética.
*** Departamento de Medicina Interna.

Recibido el día 19 de julio de 1979



TABLA II

Resultados citogenéticos de casos tumorales

N.º caso	DIAGNOSTICO	CROMOSOMOPATIA	TIPO
1	CA primitivo de pulmón	Sí	Hiperdiploidia (30 %)
2	CA primitivo de pulmón	No	—
3	CA primitivo de pulmón	No	—
4	Adenocarcinoma de pulmón	Sí	Poliploidia (30 %)
5	Metastasis CA de mama	Sí	Hiperdiploidia (40 %) pulverizadas (15 %)
6	Metastasis CA de mama	Sí	Hiperdiploidia (61 %)
7	Metastasis CA de mama	Sí	Hiperdiploidia (35 %)
8	Metastasis CA de ovario	Sí	Poliploidia (43 %) pulverizadas (20 %)
9	Linfoma de Burkitt	Sí	14q- (50 %), iso (17q) doble minute (8 %)

TABLA III

Resultados citogenéticos de casos no tumorales

N.º CASO	DIAGNOSTICO	CROMOSOMOPATIA	TIPO
10	Benigno (tabaquismo)	Sí	Poliploidia < (10 %)
11	Benigno	No	—
12	Benigno	No	—
13	Dudoso	Sí	Poliploidia < 10 %
14	Dudoso	Sí	Poliploidia < 10 %

De los 9 casos tumorales, se hallaron alteraciones citogenéticas en 7 de ellos (tabla II). En 6 las alteraciones cromosómicas encontradas consistieron en hiperdiploidias (tetra-triploidias y otras hiperdiploidias complejas) (fig. 1). Sólo en el linfoma de Burkitt aparecieron marcadores cromosómicos concretos, como es el caso de 14q + en el 50 % de las células (fig. 2), el isocromosoma para los brazos largos del 17 en el 30 % (fig. 3) y el *Double Minute* en el 40 % (fig. 4).

De los 5 casos no tumorales la citogenética fue diagnosticada en todos los casos (tabla III); en los dos casos dudosos las anomalías que aparecieron no cumplían nuestro criterio de malignidad.

Discusión

La presencia de aneuploidias y marcadores cromosómicos en las células de derrames pleurales tumorales ha sido descrita por diversos autores ^{4,5}.

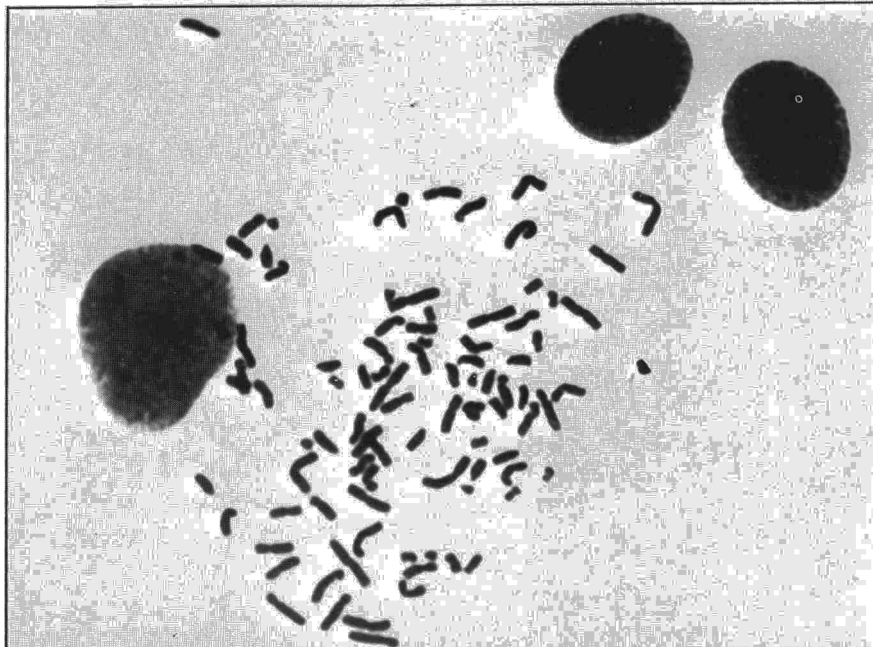


Fig. 1. Célula poliploide hallada en un derrame pleural secundario a un carcinoma de mama.

Jacob, en 1961 ⁶, sugiere que estas observaciones pueden tener importancia en el diagnóstico clínico. Este autor postula que, si la aneuploidia está presente en el derrame, la probabilidad de malignidad es mayor.

Siguiendo esta línea de trabajo, otros autores ^{7,8} demostraron que el estudio citogenético directo sin cultivo previo de derrames pleurales malignos podía diferenciarlos de los benignos.

Benedic, en 1971 y 1972 ^{7,9}, recalca la importancia para el diagnóstico de malignidad de los marcadores acrocéntricos largos. Con la aparición de las técnicas de bandas, Gramberg, en 1973 ¹⁰, introduce las bandas Q en el estudio de los derrames pleurales malignos; y posteriormente Hansson y Korsgaard, en 1974 ¹¹, demuestran la ventaja de utilizar la técnica de bandas G.

Una de las características de la técnica que presentamos es la rapidez con que se puede dar al clínico una orientación sobre el posible origen maligno de exudado pleural. En nuestra serie tenemos un caso de paciente varón, de edad 68 años, que ingresa por astenia, anorexia, adelgazamiento, hemóptisis, dolor pleurítico, objetivándose derrame pleural derecho. Ese mismo día se informó la muestra como sospechosa de malignidad (3 células anormales en 10 metafases). Una semana más tarde se remitió un informe citológico positivo del líquido pleural; a los 1 días se recibió el informe de la biopsia que filiaba el proceso como carcinoma de pulmón tipo «Oat sell».

Respecto a los resultados citogenéticos encontrados por otros autores, destaca la frecuencia de hiperdiploidias halladas en los carcinomas, siendo los cromosomas más frecuentemente afectados los 1, 3, 5, 7 y 8 ¹². En los tumores de mama, Jones Crucinger, en 1976 ⁶ describe el marcador 1q-. En nuestros casos, las hiperdiploidias halladas no involucraban a este cromosoma.

En cuanto a otros marcadores donde más y con mayor frecuencia se han descrito es en los linfomas: 14q-por t ^{1,13} en el tipo Burkitt ¹⁴ y 14q-por t ^{4,13} en los linfomas no Burkitt ^{15,16}.

En los linfomas excluyendo el de Hodgkin, se hallan también translocaciones que involucran a los cromosomas 1 y/o 3 ^{17,18}. Con respecto al marcador iso-17q, no sólo se ha encontrado en linfomas, sino también en leucemias mieloides y linfoides ¹². El *Double Minute* sería también un marcador específico de malignidad con posibles implicaciones etiopatogénicas ^{12,19}.

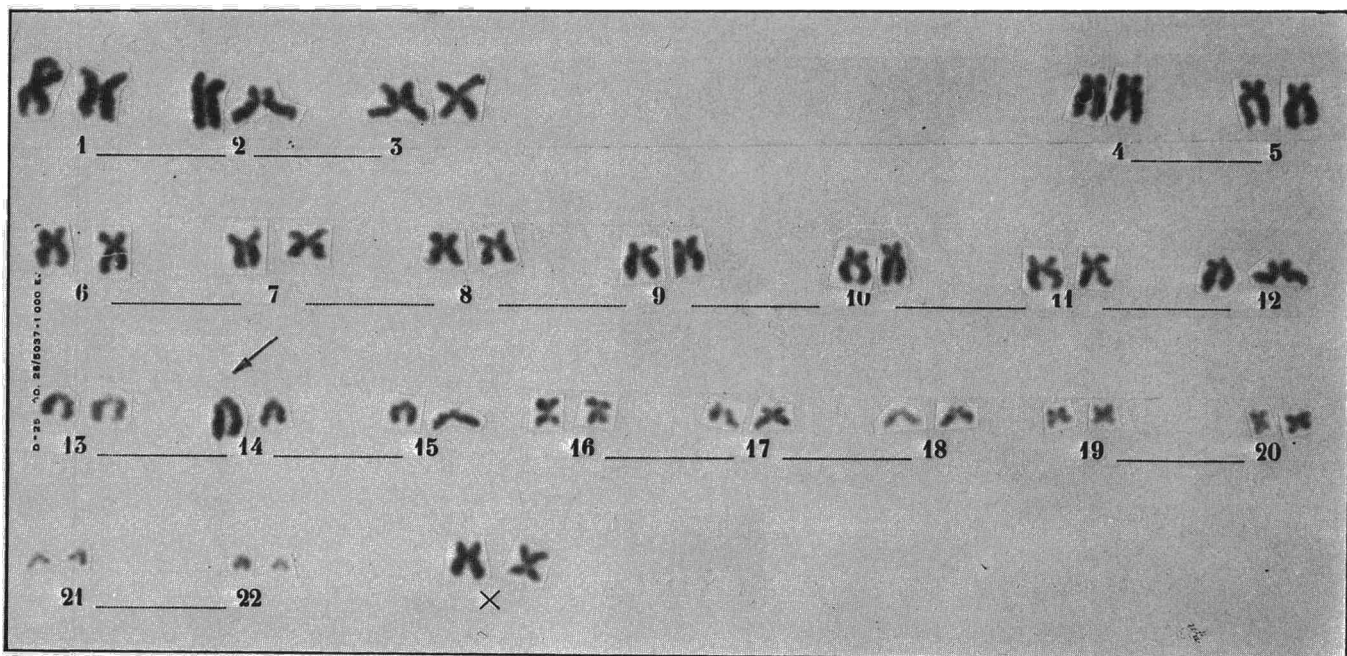


Fig. 2. Marcador 14q+ encontrado en un linfoma de Burkitt.

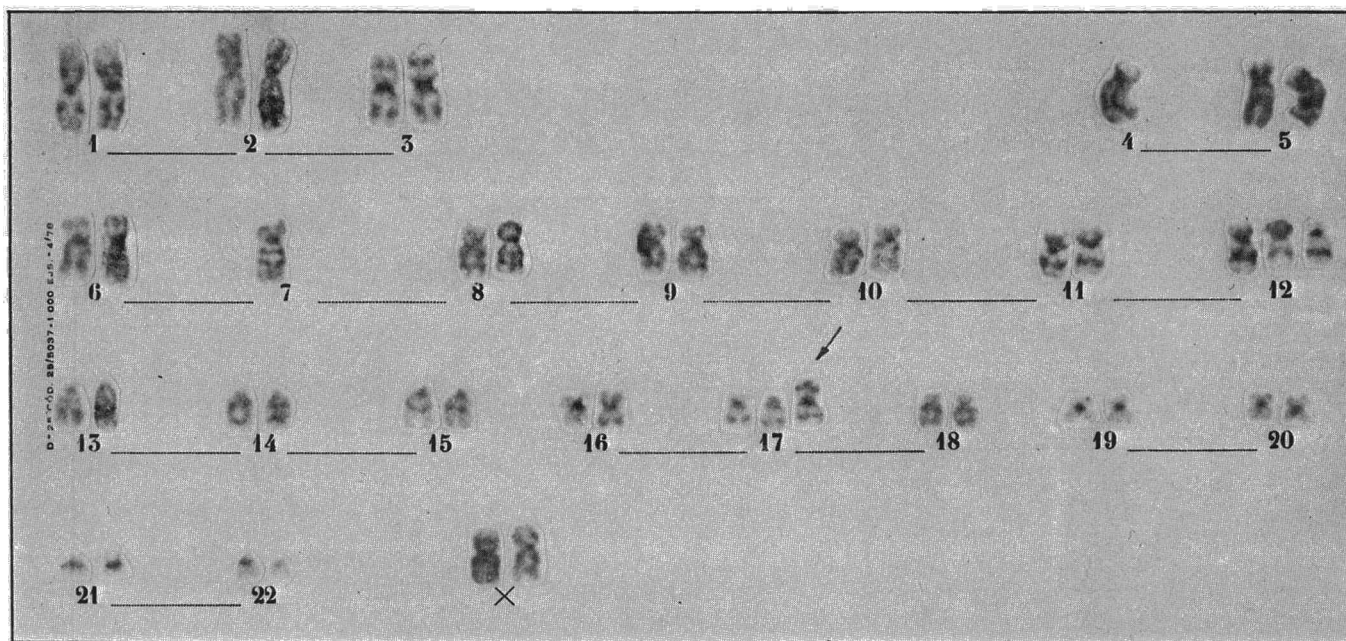


Fig. 3. Isocromosoma para los brazos largos del cromosoma número 17, también hallado en un linfoma de Burkitt. Identificado por bandas G.

En la mayoría de las revisiones se considera que la fiabilidad de la citología en el examen de los líquidos pleurales es del 55%²⁰. En la serie de Dewald³, fue del 65%, mientras que en la nuestra supuso el 62,5%. La citogenética tiene para Dewald³ una fiabilidad del 71%, para nosotros, el 75%. Estos datos apoyarían la tesis ya reflejada en la literatura de la similar fiabilidad de ambos métodos, excepto en los secundarios a leucemias y linfomas, donde la citogenética, según Dewald³,

muestra tener una ventaja estadísticamente significativa sobre la citología: ello se debería al alto índice mitótico de los linfomas.

La fiabilidad de la técnica viene determinada por el binomio volumen de muestra-índice mitótico del tumor. Esto nos hablaría de las posibles causas de falsos negativos: un derrame pleural no siempre está en relación causa-efecto con un tumor pulmonar coexistente, dado que existen mecanismos como pleuritis paraneoplásicas,

embolismos pulmonares originados por el éstasis local secundario a la masa tumoral y que puede muy bien no estar contaminado por células malignas. Es de destacar la no aparición de falsos negativos con esta técnica, tanto en la serie de Dewald³ como en la nuestra.

El criterio de malignidad que hemos empleado en nuestra serie, inspirado en los trabajos de Levan, 1976¹³, y de Dewald, 1976³, se ha visto confirmado a posteriori al revisar los diagnósticos histológicos de nuestros casos. El

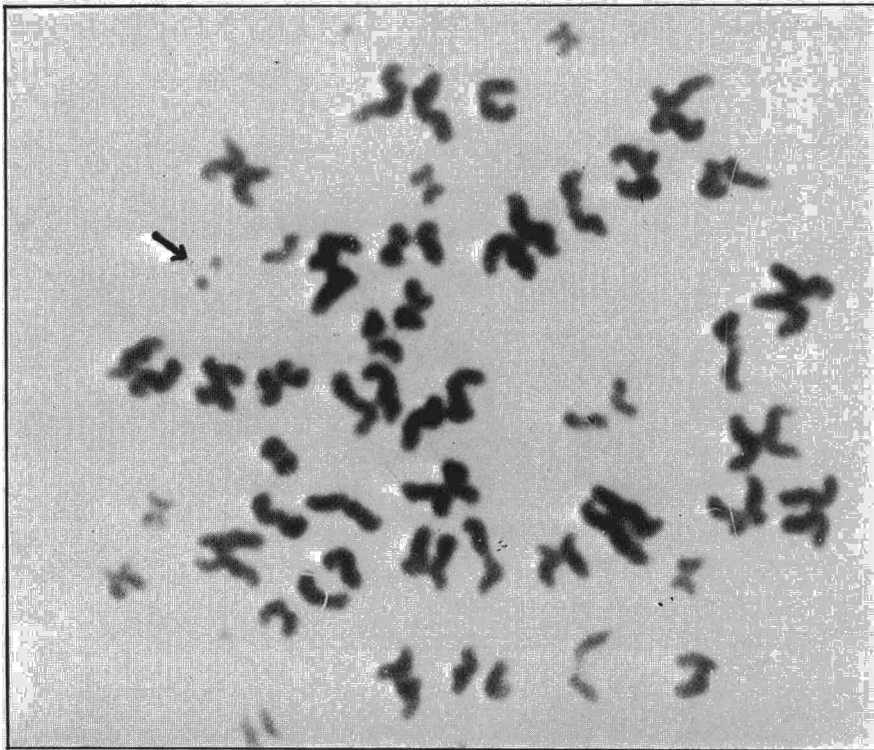


Fig. 4. Double minute, marcador característico de los procesos tumorales.

adoptar el minimum de 3 células anormales nos permite no obtener ningún falso positivo, aunque más amplias series ayudarían a definir dicho criterio.

Tras revisar la corta bibliografía que existe sobre el tema, y en base también a nuestra casuística, pensamos que las indicaciones de esta técnica son:

1) Derrames pleurales secundarios a leucemias y linfomas: existe en este grupo una diferencia de fiabilidad estadísticamente significativa a favor de la citogenética³.

2) Derrames pleurales secundarios a carcinomas primitivos de pulmón: existe indicación siempre que dispongamos de un volumen de muestra mayor de 100 c.c. y bajo protección citológica.

3) Exudados secundarios a tumores que invaden precozmente pleura (ejm.: Mesotelioma): dado que el cuadro clínico es lo suficientemente confuso como para valorar el dato citogenético.

4) Como campo de estudio para la determinación de marcadores cromosómicos específicos de cada tipo tumoral.

Este estudio abre un nuevo campo de colaboración entre la citogenética y la clínica en base a un más rápido y seguro diagnóstico de malignidad en los casos de derrames pleurales, así como una esperanzadora línea de estudio para la determinación de los marcadores cromosómicos específicos de cada tipo tumoral.

Resumen

Presentamos una nueva técnica para realizar el diagnóstico de malignidad en derrames pleurales sospechosos. Consiste en el análisis citogenético del exudado en busca de hiperdiploidia o marcadores cromosómicos. Se realizó la técnica sobre 14 muestras que, al

tiempo, fueron estudiadas desde e punto de vista citológico e histológico.

En relación a la citología, ambos métodos revelaron similar fiabilidad; er ningún caso se obtuvieron falsos positivos, y en 2 se hallaron falsos negativos, igual porcentaje que en la citología. De los 9 casos tumorales estudiados, se hizo el diagnóstico en 7; de ellos, en 6 se halló hiperdiploidia en e porcentaje que exigía nuestro criterio de malignidad, y en 1 se hallaron marcadores cromosómicos.

El interés de esta técnica residiría er su rapidez, su fiabilidad y la búsqueda de marcadores cromosómicos específicos de cada proceso tumoral.

Summary

CYTOGENETICAL ANALYSIS OF PLEURAL EXUDATES OF SUSPECTED MALIGNANCY

The authors present a new technique for carrying out the diagnosis of malignancy in suspicious pleural exudates. This technique consists in cytogenetical analysis of the exudate searching for polyploidy or chromosomal markers. This technique was used for 14 samples which were also studied at the same time from the cytologic and histological point of view.

In relation to cytology, both methods revealed similar trustworthiness; in no case were false positives obtained, but in two cases false negatives were found, the same percentage as that in cytology. Of the nine cases of tumor studied, the diagnosis was made in 7. Of these seven, polyploidy was found in the percentage that the authors criteria of malignancy required, and in one case chromosomal markers were found.

The interest of this technique lies in its rapidity, reliability and the search for specific chromosomal markers of each tumorous process.

Agradecimiento

Agradecemos a los doctores A. Sánchez Casco y J. Benítez su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- HANSEN-MELANDER, E., KULLANDER, S. y MELANDER, Y.: Chromosome analyses of a human ovarian cystocarcinoma in the ascites form. *J. Natl. Cancer Inst.*, 16: 1067, 1956.
- SPRIGGS, A. I., BODDINGTON, M. M. y

CLARKE, C. M.: Chromosome of human cancer cells. *Br. Med. J.*, 2: 1431, 1962.

- DEWALD, G., DINES, D. E. y WEYLAND, L. H.: Usefulness of chromosome examination in the diagnosis of malignant pleural effusions. *N. Engl. J. Med.*, 295: 1494, 1976.
- HAUSCHKA, T. S.: The chromosome in

ontogeny and oncogeny. *Cancer Res.*, 21: 957, 1961.

- SLOT, E.: A Karyologic study of the cancer of the ovary and the cancer cell in the ascitic effusions. *Neoplasma*, 14: 3, 1967.
- JACOBS, G. F.: Diagnosis of malignancy by chromosome counts. *Lancet*, 2: 724, 1961.



7. BENEDIC, W. F., BROWN, C. D. y PORTER, I. H.: Long acrocentric marker chromosomes in malignant effusions and solid tumors. *N.Y. State J. Med.*, 71: 952, 1971.
8. SPRIGGS, A. I., BODDINGTON, M. M. y CLARKE, C. M.: Chromosomes of human cancer cells. *Br. Med. J.*, 2: 1431, 1962.
9. BENEDIC, W. F. y PORTER, I. H.: The cytogenetics diagnosis of malignancy in effusions. *Acta Cytol.* (Baltimore), 16: 304, 1972.
10. GRAMBERG, I., GUPTA, S. y ZECH, L.: Chromosome analyses of a metastatic gastrocarcinoma including quinacrine fluorescence. *Hereditas*, 75: 189, 1973.
11. HANSON, A. y KORSGAARD, R.: Cytogenetical diagnosis of malignant pleural effusions. *Scand. J. Respir. Dis.*, 55: 301, 1974.
12. MITELMAN, F. y LEVAN, G.: Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. *Hereditas*, 82: 167, 1976.
13. KATATI, S., HAYATA, I., OSHIMURA, M. y SANDBERG, A.: Chromosomes and causation of human cancer and leukemias. X: Banding Patterns in cancerous effusions. *Cancer*, 36: 1729, 1975.
14. MITELMAN, F. y LEVAN, G.: Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. II Incidence and geographic distribution of chromosome aberrations in 856 cases. *Hereditas*, 89: 207, 1978.
15. CATOVSKY, D., PITTMAN, S., LEWIS, D. y PEARSE, E.: Marker chromosome 14q+ in follicular lymphoma in transformation. *Lancet*, 2: 934, 1977.
16. FLEISCHMAN, T., HAKANSSON, C. H. y LEVAN, A.: C. cromosomes of malignant lymphomas. Studies in short term cultures from lymph nodes of twenty cases. *Hereditas*, 83: 47, 1976.
17. JONES CRUCIGER, Q. V., PATHAX, S. y CALLIAN, R.: Human breast carcinoma: marker chromosome involving 1q in seven cases. *Cytogenet Cell Genet.*, 1: 231, 1976.
18. MANOLOV, G. y MANOLOVA, Y.: A marker in one chromosome n.º 14 in Burkitt lymphoma. *Hereditas*, 69: 300, 1971.
19. REEVES, B. R.: Cytogenetics of malignant lymphomas studies utilising a Giemsa-banding technique. *Hum. Gen.*, 20: 231, 1974.
20. FRASER, R. G. y PARE, J. A. P.: Neoplastic diseases of the lungs, *Diagnosis of Diseases of the chest: An integrated study based on the abnormal roentgenogram*, pág. 723. Volumen 2. Philadelphia. W. B. Saunders Co., 1970.