

TRABAJO DE INVESTIGACION

EL EXUDADO PLEURAL MALIGNO: VALOR DIAGNOSTICO DEL ANALISIS CITOGENETICO*

Dres.: José Angulo Márquez; Gustavo Villasmil Prieto; Aída Falcón de Vargas;
José R. Silva; Clarita Roetter de Lucani; Fabio Arias Rojas**

RESUMEN

El Exudado Pleural (EP) metastásico puede constituir la primera y única evidencia de enfermedad pleuro-pulmonar maligna. Su presencia se asocia invariablemente a un pronóstico desfavorable, por lo que se hace necesario el descartar tal naturaleza en todo EP sospechoso de ser neoplásico. Con tal objeto estudiamos un total de 20 pacientes portadores de EP asociado bien a patología pleuro-pulmonar maligna conocida (en 16 de ellos) o a Tuberculosis pleuro-pulmonar (4 de ellos). Todos los especímenes de LP fueron sometidos a análisis citogenético, adicionalmente a la biopsia pleural y/o a la citología de LP. Las frecuencias absolutas de positividad o negatividad para neoplasia fueron analizadas, para cada grupo de pruebas, siguiendo la metodología bayesiana. Nuestros hallazgos citogenéticos son similares a los descritos en la literatura en otras entidades malignas o de tipo congénito o hereditario. Nuestro estudio muestra un incremento sustancial

de la sensibilidad de la combinación citología de LP / biopsia pleural con la adición del análisis citogenético (de un 65 a un 94%), ello sin agregar a la serie falsos positivos. En consecuencia, parece razonable la inclusión de este método en el plan de trabajo diagnóstico ante todo EP sospechoso de ser neoplásico con citología de LP y biopsia pleural no-concluyentes.

Palabras Claves: Características operativas. Citogenética. Epidemiología clínica. Exudado pleural maligno.

ABSTRACT

The metastatic pleural effusion may be the only evidence of pleuro-pulmonar malignancy. As it is always considered to be of bad prognosis, it is important to rule out the neoplastic nature of any suspicious pleural effusion. In order to do it, we studied 20 patients having PE either associated to malignancy (16 out of 20) or to Tuberculosis (4 out of 20). Every single sample of pleural fluid underwent to cytogenetic analysis in addition to biopsy and/or cytology. The absolute frequencies for malignancy and no-malignancy were analyzed according to the bayesian methodology. In our study, we showed an important increase of sensitivity for the set biopsy-cytology by adding cytogenetical analysis (from 65 to 94%) without rising the total number of false positives. Besides, we found out cytogenetical abnormalities very similar to those described in the literature. We think that this

* Trabajo presentado en las X Jornadas de Egresandos de los Cursos de Postgrado en Medicina Interna, Ganador del Primer Premio otorgado por la Sociedad Venezolana de Medicina Interna. Recibido para su publicación en Noviembre de 1992.

** Servicio de Medicina I y Cátedra de Clínica Médica "C", Hospital Vargas de Caracas y Escuela de Medicina Vargas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela. Unidad de Genética, Hospital Vargas de Caracas. Cátedra de Salud Pública, Escuela de Medicina Vargas, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

method may be included in the work up for any pleural effusion whose assessment by cytological and/or histological means is doubtful.

Key Words: Operative characteristics. Cytogenetics. Clinical epidemiology. Malignant pleural effusion.

INTRODUCCION

La enfermedad pleuro-pulmonar metastásica es reconocida actualmente como la segunda causa de EP en orden de frecuencia, después de los de tipo paraneumónico. De acuerdo con Ligth,¹ la pleura visceral siempre está comprometida en la enfermedad pleuro-pulmonar neoplásica, en tanto que la parietal sólo lo está en un 60% de estos casos.

En el paciente con enfermedad pleuro-pulmonar neoplásica, el hallazgo de EP no paraneumónico constituye siempre un elemento de mal pronóstico, sobre todo si se le asocian otras características al LP, tales como pH menor o igual a 7,2 y niveles de glucosa inferiores a los 60 mgrs%.^{2,3,4} Por otro lado, no es infrecuente el debut de afecciones de este tipo bajo la modalidad de EP crípico.⁵

En el presente estudio nos proponemos definir las Características Operativas (CO) del Análisis Citogenético para el diagnóstico de malignidad en EPs, tanto aisladamente considerado como en combinación seriada con otros métodos ya conocidos. Para ello hemos diseñado un estudio prospectivo el cual se aproxima al problema en cuestión a partir de la metodología bayesiana. De este modo, se evaluaron sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para las siguientes pruebas o grupos de pruebas:

- Análisis citogenético de LP, aisladamente.
- Biopsia pleural / citología LP, en serie.
- Biopsia pleural /citología LP / análisis citogenético de LP, en serie.

A los fines de las distintas comparaciones a ser efectuadas se asumió como prueba cierta o estándar de oro la evidencia clínica y radiología de patología pleuro-pulmonar histológicamente definida como benigna o maligna.

Son conocidas las CO de los métodos actualmente en uso para el diagnóstico de EP, los cua-

les han evolucionado relativamente poco desde la introducción de la técnica de biopsia pleural cerrada. De allí que la introducción de nuevas técnicas como las de tipo inmunocitoquímico⁶ y el perfeccionamiento de otras menos novedosas de uso poco difundido -como esta que proponemos- constituyan actualmente áreas de interés investigacional y práctico.

PACIENTES Y METODOS

Se estudió un total de 20 casos de EP (13 varones, 7 hembras) en un número similar de pacientes, cuyas edades oscilaron entre los 24 y los 83 años (promedio 53,2). Diez y ocho casos fueron estudiados entre septiembre de 1991 y agosto de 1992 en los Servicios de Medicina Interna y de Neumonología del Hospital Vargas de Caracas, en el Servicio de Medicina Interna del Hospital José Gregorio Hernández del IVSS y en el Servicio de Tórax del Instituto de Oncología Luis Razetti. Los 2 restantes fueron estudiados por la Unidad de Genética del Hospital Vargas en 1981 y 1985 y su inclusión se decidió previa verificación del cumplimiento de todos los criterios muestrales y metodológicos exigidos por el protocolo original de estudio.

En la totalidad de los pacientes estudiados se tuvo confirmación histopatológica del proceso pleuro-pulmonar de base, para lo cual se empleó la biopsia pleural cerrada en 13 de ellos. En 3 casos, el diagnóstico requirió de técnicas endoscópicas y en otros 3 debieron practicarse biopsias de lesiones extra-torácicas a los fines del diagnóstico. Finalmente, uno de los casos fue sometido a examen directo de la cavidad torácica para poner en evidencia la siembra tumoral de la misma.

Un total de 4 pacientes admitidos en la serie se encontraba bajo alguna modalidad de terapéutica anti-tumoral para el momento de ser sometidos a los procedimientos de diagnóstico.

CRITERIOS DE ADMISION

Se admitieron a la serie aquellos casos que cumplieron con los siguientes criterios:

- 1.- Presencia de EP, considerando como tal a todo LP que reuniera a lo menos una de las siguientes características:
 - a) Relación protéica LP / suero mayor de 0,5. Este criterio tiene una sensibilidad de 90%

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Light RW. Pleural diseases. *Disease-a-month* 1992; 38(5).
- 2.- Sahn SA, Good JT. Pleural fluid pH in malignant effusions: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1988; 108(3): 345-9.
- 3.- Light RW, Erozan YS, Ball WC, Jr. Cells in pleural fluid: their value in differential diagnosis. *Arch Intern Med* 1973; 132: 854-60.
- 4.- Light RW. *Pleural diseases*. 1st ed. Lea and Febinger, Philadelphia, 1983.
- 5.- Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura. An analysis of 96 patients. *Am J Med* 1977; 63: 695-702.
- 6.- Guzmán J, Bross K, Wurtemberg G, Costabel U. Immunocytology in malignant pleural mesothelioma. Expression of tumor markers and distribution of lymphocyte subsets. *Chest* 1989; 95: 590-5.
- 7.- Light RW, McGregor MI, Luchsinger P, Ball WC, Jr. Pleural effusions: the diagnostic separation of transudates and exudates. *Ann Intern Med* 1972; 77: 507-13.
- 8.- Verma RS, Babu A. *Human chromosome. Manual of basic techniques*. Pergamon Press 1989, p. 45.
- 9.- Falcón de Vargas A. Citogenética en hemato-oncología. En: *Avances en Genética. Memorias del IV Congreso Venezolano de Genética*. Aída F de Vargas, ed. Ed. de la Sociedad Venezolana de Genética, Junio 1990. pp. 165-177.
- 10.- Verma RS, Babu A. op cit p. 152.
- 11.- Verma RS, Babu A. op cit p. 48.
- 12.- Capperson T, Zech L, Johnson C, Modest E. Identification of human chromosome by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* 1970; 30: 215-27.
- 13.- Daniel A, Lam Po-Tang. PRLC; mechanism for chromosome banding phenomenon. *Nature* 1973; 244: 358-9.
- 14.- Clark RJ, Felsenfeld G. Association of arginine-rich histones with GC-rich region of DNA chromatin. *Nature* 1972; 240: 226-7.
- 15.- ABC of clinical genetics. *Brit Med J* 1989, Volúmenes 298 y 299.
- 16.- Mitelman F. *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. 1988, 3er Ed. Alan R. Liss, Inc, New York.
- 17.- Dewald GW, Hicks GA, Dines D, Gordon H. Cytogenetic diagnosis of malignant pleural effusions. Culture methods to supplement direct preparations in diagnosis. *Mayo Clin Proc* 1982; 57: 488-94.
- 18.- Hernández DE. *Principios básicos en cáncer*. Ediciones de la Sociedad de Médicos y Cirujanos del Hospital Vargas de Caracas. 1era. Ed. Caracas, 1985.
- 19.- Charbit A, Malaise EP, Tubiana M. Relation between the pathological nature and growth rate of human tumors. *Eur Journal Cancer* 1971; 7: 307.
- 20.- Emanuel BS. Cytogenetics, oncogenes and cancer. En: *Avances en Genética. Memorias del III Congreso Venezolano de Genética*. Aída F de Vargas, ed. Edic. de la Sociedad Venezolana de Genética. Julio 1987, pp. 49-53.
- 21.- Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1982; 221: 227.
- 22.- Vargas-Arenas J. Simposio: Teratógenos ambientales y malformaciones congénitas. Efectos genéticos en el humano. Efectos de la contaminación por mercurio. En: *Memorias del IV Congreso Venezolano de Genética*. Aída F de Vargas, V. Rodríguez Lemoine y O. Arenas, eds. Edic. de la Sociedad Venezolana de Genética, 1992. pp. 123-132.
- 23.- Falcón de Vargas A, Fernández Palazzi A, Bosh N, Radilla B, de Marea N, Sarcos L. Alteraciones cromosómicas en pacientes hemofílicos con hemartrosis tratadas con oro radiactivo intra-articular. Comunicación preliminar. *Archivos del Hospital Vargas* 1979; 21(1-2): 17-30.
- 24.- Falcón de Vargas A. Avances en genética y hemato-oncología. Introducción. En: *Memorias de IV Congreso Venezolano de Genética*. Aída F. de Vargas, V. Rodríguez Lemoine y O. Arenas, eds. Edic. de la Sociedad Venezolana de Genética 1992, p 153-4.
- 25.- Skerfving S, Hansson K, y cols. *Enviroments reseach* 1974; 7:83.
- 26.- Takanari H. Studies of endoreduplications. A three-dimensional scheme for diplo an quadruple chromosomes and model for DNA replication. *Cytogenetic Cell. Genet* 1985; 39: 188-93.
- 27.- Vargas-Arenas J. Taller: Avanes en genética y hemato-oncología. Síndromes genéticos de fragilidad cromosómica y cáncer. En: *Memorias del IV Congreso Venezolano de Genética*. Aída F. de Vargas, V. Rodríguez Lemoine y O. Arenas eds. Edic. de la Sociedad Venezolana de Genética, 1992. pp. 193-200.
- 28.- Bloom AD. Induced chromosomal aberrations in man. En: *Advances in human genetics, 1972*. H. Harris, K. Hirschhorn, eds. Plenum Press, New York-London 1972. p 99.
- 29.- Robertson EA, Zweig MH y cols. Citado por Moller-Petersen J. En: *Evaluation of diagnostic test. Design and phrases*. *Scand J Clin Lab Invest* 1992, Suppl 208. pp 35-50.

- b) Relación niveles de LDH LP / suero mayor de 0,6. Este criterio tiene una sensibilidad de 86% y una especificidad de 98%.^{4,7}
- c) Niveles netos de LDH en LP equivalentes a los 2/3 de aquellos en suero. Este criterio tiene una sensibilidad de 70% y una especificidad de 100%.^{4,7}

2.- Diagnóstico histopatológico de la lesión pleuro-pulmonar de base a través de algún método aceptado por los respectivos servicios tratantes y de indicación inequívoca en cada caso.

PROCEDIMIENTO DIAGNOSTICO

En la totalidad de los casos de la serie se practicó toracentesis diagnóstica con aguja #22 inserta, previa antisepsia y bajo anestesia local, a nivel del 8° - 9° espacio intercostal, en su intersección con la línea axilar media. Se extrajo cada vez un volumen variable de LP, a juicio del tratante. De inmediato se remitieron muestras para análisis químico (dosificación de LDH y proteínas totales) y citológico. Al verificarse su carácter de EP, se procedió a practicar biopsia cerrada de pleura mediante inserción de aguja de Abrams, previa antisepsia y anestesia locales, en situación a juicio del operador. El material así obtenido se fijó en formol y se remitió para su estudio histopatológico.

Nuevamente, una muestra de 20 cc. de LP se tomó a los fines del análisis citogenético. Dicha muestra, contenida en jeringa heparinizada, se remitió al Laboratorio de Citogenética de inmediato. De no ser posible, se mantuvo en refrigeración a 8 grados Celsius y por no más de 24 horas hasta su envío al Laboratorio.

Conjuntamente con esta se remitió otra de sangre periférica, igualmente heparinizada. El estudio en sangre periférica (SP) se realizó con la finalidad de precisar aquellas alteraciones cariotípicas aleatorias presentes en el sujeto estudiado y sin significación patológica alguna. Todos los especímenes de biopsia fueron objeto de coloraciones especiales para el diagnóstico de granulomatosis (coloración de Fite-Faraco). Otras coloraciones fueron practicadas a juicio del Servicio de Anatomía Patológica y de acuerdo con las hipótesis diagnósticas proporcionadas por los servicios tratantes.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE LP Y SP A LOS FINES DEL ANALISIS CITOGENETICO

El material remitido para el Análisis Citogenético fue procesado mediante la técnica modificada de Sandberg, que permite recoger y fijar el material cromosómico para su posterior bandeado.

Las muestras de LP se centrifugaron a 1000 rpm en una cetrífuga para propósitos generales y por espacio de 10 minutos. El precipitado contenido del material celular fue sometido a shock hipotónico con solución de Colchicina, a razón de 10 microgramos/ml, en buffer cuya composición precisamos a continuación:

NaCl	16	grs.
KCl	0,4	grs.
Na ₂ HPO ₄	2,3	grs.
KH ₂ PO ₄	0,4	grs.
H ₂ O	2000	mls.

Este tratamiento del precipitado permite la ruptura de las membranas plasmática y nuclear de las células en él contenidas, con lo cual se libera el material cromosómico. La adición de Colchicina detiene el proceso de división celular en virtud de su efecto tóxico sobre el sistema de microtúbulos del huso cromático. Ello facilita la obtención de un mayor número de metafases, fase esta de la división celular en la que la morfología cromosómica luce más apta para su estudio en detalle. El material así tratado se colocó en una estufa a 37 grados Celsius por 20 minutos.

La fijación del material se inició añadiendo al precipitado solución de Carnoy (ácido acético + metanol, en proporción de 1:3) y enfriándolo luego por 30 minutos a 8 grados Celsius.

El volumen de solución de Carnoy añadido es variable y podrá repetirse el lavado a juicio del operador hasta tanto se logre un sobrenadante límpido. Llegado a este punto, el precipitado se distribuyó generosamente en laminillas porta-objeto, las cuales fueron colocadas en estufa a 60 grados Celsius hasta completar su fijación.

Las laminillas contentivas del material cromosómico se sometieron a digestión con Tripsina, siendo lavadas posteriormente con la solución buffer ya descrita. Finalmente, las laminillas fueron coloreadas con tinción de Giemsa. Esta tinción

permite observar las distintas bandas presentes sobre la superficie del cromosoma. En general, las técnicas de bandeo⁸ consisten en procedimientos tintoriales que inducen la aparición de bandas claras y oscuras a todo lo largo de la superficie cromosómica.⁹ Las distintas técnicas pueden variar en cuanto a su resolución. En el laboratorio de la Unidad de Genética del Hospital Vargas se emplean técnicas de resolución intermedia que permiten visualizar entre 350 y 650 bandas por cromosoma. Se describen numerosas variaciones en estas técnicas, muchas de las cuales han sido introducidas por los propios laboratorios. En todo caso, nuestro laboratorio emplea la técnica de bandeo G con Tripsina, que se basa en la tinción del material cromosómico con la tinción de Giemsa.^{10,11} Previamente, el material cromosómico es digerido con Tripsina. El fundamento tintorial de este método no es del todo conocido. Posiblemente, el colorante interactúa con los residuos de Arginina de las nucleoproteínas cromosómicas.^{11,12,13,14}

Una vez bandeadas, las preparaciones fueron estudiadas exhaustivamente en procura del mayor número de metafases posible. El análisis de cada cariotipo se efectuó durante esta fase de la división celular dadas las ventajas técnicas que la misma ofrece para ello. Durante la metafase, las cromátidas aparecen unidas por el centrómero y se presentan al observador con un volumen y forma tales que el estudio detallado de las distintas bandas resulta relativamente sencillo.¹⁵

Las preparaciones seleccionadas fueron microfotografiadas, con lo que los cariotipos pudieron ser organizados para su análisis. Tal análisis fue elaborado con arreglo a las normas oficiales de nomenclatura aprobadas en 1971 por la Conferencia de París.¹⁶

El cariotipo, en cada caso, fue cuidadosamente comparado con su similar en SP en procura de descartar la presencia de alteraciones aleatorias sin significación patológica. De este modo, el diagnóstico de cariotipo sugestivo de malignidad se basó en los siguientes criterios:

- 1.- Presencia de aneuploidías.
- 2.- Presencia de cromosomas marcadores.

Como cariotipo negativo para malignidad asumimos todo aquel en el cual:

- 1.- No se observaron metafases.
- 2.- Las metafases observadas no reunieron los criterios anteriormente definidos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Definidas las frecuencias respectivas de enfermedad pleuro-pulmonar, maligna o benigna, así como las de cariotipo sugestivo de malignidad de benignidad, se procedió a ordenarlas en una tabla tetracórica a los fines del cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos (positivo y negativo) para las pruebas y grupos de pruebas considerados.

Como se señaló, la Prueba Cierta o Estándar de Oro estuvo constituida por la evidencia clínica y radiológica de afección pleuro-pulmonar causada por algún proceso -neoplásico o no- histopatológicamente determinado, ello en el entendido de que toda afección pleuro-pulmonar maligna interesa invariablemente a la pleura parietal.¹ Esto hace posible el que, de existir un EP, se produzca una interfase tumor LP, que explica la presencia eventual del clono neoplásico en el sobrenadante celular presente en el EP.

Las probabilidades post-test de enfermedad y de no enfermedad dado un resultado positivo o negativo de la(s) prueba(s) propuesta(s) se estimaron, de acuerdo con el Teorema de Bayes, asumiendo una probabilidad pre-test de enfermedad neoplásica (prevalencia) igual a la observada en el grupo estudiado (16/20 u 80%).

Las comparaciones entre los distintos métodos a fin de estimar su grado de concordancia mutua en los diagnósticos de malignidad o benignidad, se realizaron empleando la prueba Kappa.

RESULTADOS

Los estudios histopatológicos y citológicos tanto de especímenes de biopsia pleural como de lesiones extratorácicas, permitieron confirmar la presencia de patología pleuro-pulmonar maligna en 16 casos, en tanto que benigna (granulomatosa) en 4.

Las frecuencias absolutas de cada tipo tumoral así como las alteraciones citogenéticas demostradas en cada uno de ellos son resumidas en la Tabla I.

TABLA I

ANOMALIAS CITOGENETICAS POR TIPO HISTOPATOLOGICO
UNIDAD DE GENETICA. HOSPITAL VARGAS
1991-92

TIPO HISTOPAT	ANOMALIAS CITOGENETICAS		FREC
	LP	SP	
TBC	-	-9 (1)	4
Ca CU	Polip/Aneu	-	1
LNH	RC	Endo(2)/-X(1)	1
HIPERNEFROMA	-	-8 (1)	1
ADC Prim	Endo(1)/Polip/Aneu/Ph	-	3
MTPD	Aneu.	12q-(1)	1
MT ADC Prost	-	-14 (1)	1
Ca. Epider	-	-	3
Ca. Anapl	Polip/Aneu	-	1
Ca. Cel. Peq.	-	Polip(1)	1
Ca. Mama	-	Endo(2)	1
MT ADC Colon	Aneu.	-	1
E. HODGKIN	Aneu.	-	1

El Análisis Citogenético del LP fue practicado en todos los casos, obteniéndose desarrollo de metafases en 11 de ellos. De las metafases estudiadas, 9 resultaron anormales, sugestivas de malignidad (45%), en tanto que 2 resultaron normales. En las restantes muestras no se observó desarrollo de metafases.

Complementariamente se practicaron 18 estudios similares en SP, de donde se obtuvo desarrollo de metafases en 12 casos. De estas, 8 resultaron anormales, sugestivas de malignidad, en tanto que las 4 restantes fueron normales. Las anomalías cromosómicas observadas en SP no coincidieron siempre con aquellas en LP proveniente del mismo caso. En las 6 muestras restantes no hubo desarrollo de metafases (ver Tabla II).

En el Análisis Citogenético de las muestras de LP evaluamos un total de 122 metafases, con un promedio de 11 por paciente (rango 1-57). En los estudios practicados en SP se analizó un total de 222 metafases, con un promedio de 18,5 por paciente (rango 3-35). Estos resultados se resumen en la Tabla III.

TABLA II

ALTERACIONES CITOGENETICAS HALLADAS POR TIPO DE MUESTRA
UNIDAD DE GENETICA. HOSPITAL VARGAS
1991-92

TIPO DE MUESTRA	No. TOTAL		MET NORM	MET ANORM
	S/METAFASES OBS	C/ METAFASES		
LP	9/20	11/20	2/20	9/20
SP	6/18	12/18	4/18	8/18

TABLA III

METAFASES EVALUADAS POR METODO DIRECTO
UNIDAD DE GENETICA. HOSPITAL VARGAS
1991-92

TIPO DE MUESTRA	METAFASES EVALUADAS	PROMEDIO	RANGO
LP	122	11.00	57-1
SP	222	18.50	35-3

Las alteraciones cromosómicas halladas pertenecen a dos grandes grupos: las de tipo numérico: poliploidías (3 casos en LP, 1 caso en SP), aneuploidías (6 casos en LP, 4 casos en SP) y las de tipo morfológico: reorganizaciones complejas (1 caso en LP), endorreduplicaciones (1 caso en LP y 2 casos en SP), presencia de Cromosoma Philadelphia (1 caso en LP, 1 caso en SP) y presencia de Cromosomas Marcadores (ver Figura N° 1).

Las CO de la combinación en serie de biopsia pleural / citología de LP a los fines del diagnóstico de malignidad, se estimaron del siguiente modo: (ver Tabla IV).

Figura Nº 1: 4043.LP4. Alteraciones citogenéticas en cultivo linfocitario. Rupturas, deleciones, marcadores, translocaciones.

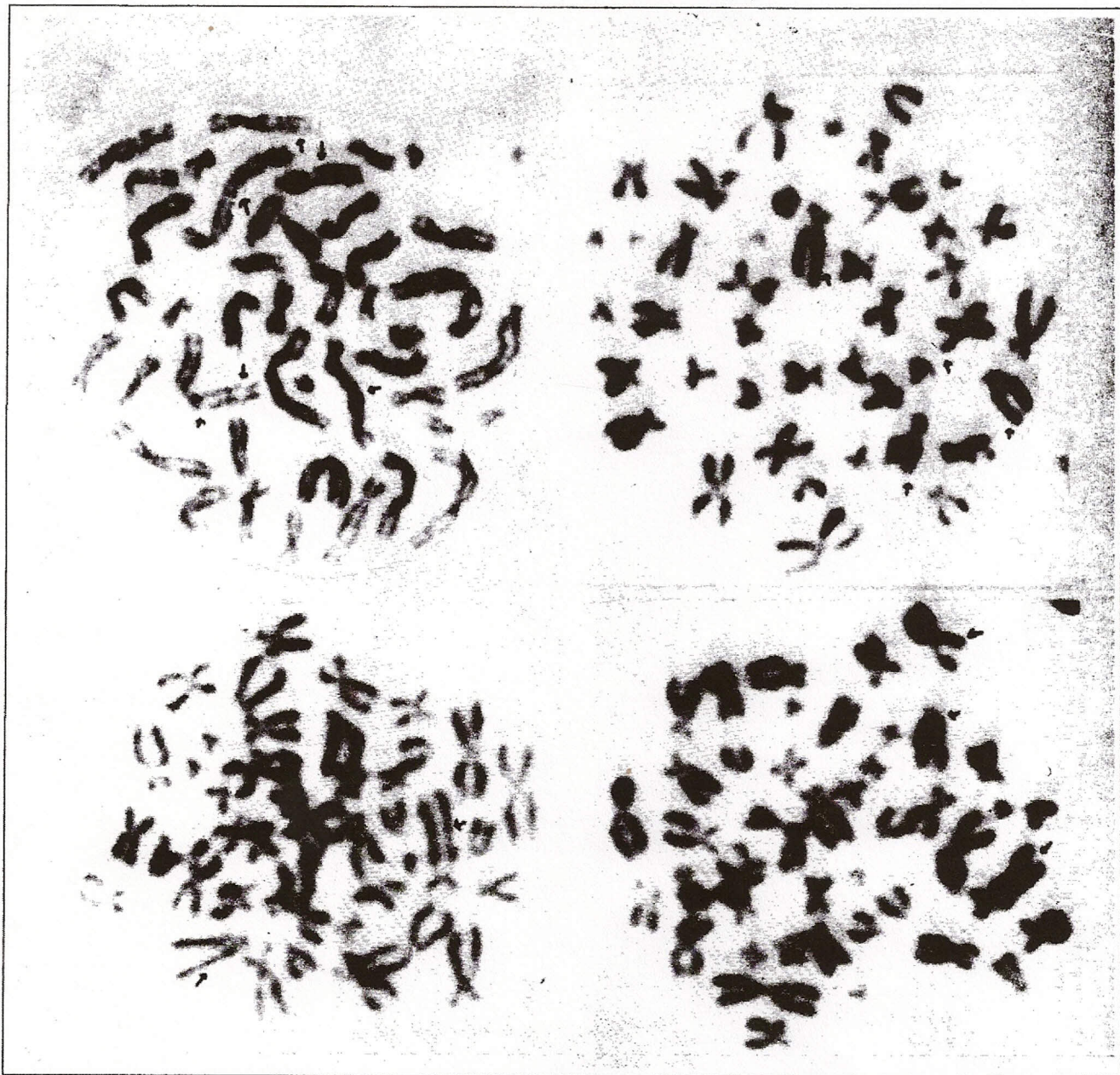


TABLA IV

CARACTERISTICAS OPERATIVAS DE LA COMBINACION EN SERIE
CITOLOGIA / BIOPSIA PLEURAL
UNIDAD DE GENETICA. HOSPITAL WARGAS
1991-92

	NEO +	NEO -	TOTAL
Bx y/o Cx (+)	12	0	12
Bx y Cx (-)	4	4	8
TOTAL	16	4	20

$$S = VP / (VP + FN) = 12 / (12 + 0) = 1.00$$

$$E = VN / (FP + VN) = 4 / (0 + 4) = 1.00$$

$$VP(+) = VP / (VP + FP) = 12 / (12 + 0) = 1.00$$

$$VP(-) = VN / (VN + FN) = 4 / (4 + 0) = 1.00$$

TABLA V

CARACTERISTICAS OPERATIVAS DEL METODO AISLADO
UNIDAD DE GENETICA. HOSPITAL WARGAS
1991-92

	NEO +	NEO -	TOTAL
AC +	9	0	9
AC -	7	4	11
TOTAL	16	4	20

$$S = VP / (VP + FN) = 9 / (9 + 0) = 1.00$$

$$E = VN / (FP + VN) = 4 / (0 + 4) = 1.00$$

$$VP(+) = VP / (VP + FP) = 9 / (9 + 0) = 1.00$$

$$VP(-) = VN / (VN + FN) = 4 / (4 + 0) = 1.00$$

$$\text{INDICE KAPPA} = (9 + 4) / 20 = 0.65$$

Sensibilidad	75%
Especificidad	100%
Valor Predictivo Positivo	100%
Valor Predictivo Negativo	50%

Las CO del Análisis Citogenético, aisladamente considerado, para los mismos fines diagnósticos, se estimaron del siguiente modo: (ver Tabla V)

Sensibilidad	56%
Especificidad	100%
Valor Predictivo Positivo	100%
Valor Predictivo Negativo	36%

Finalmente, las CO para la triple combinación biopsia pleural / citología de LP / análisis citogenético se estimaron del modo siguiente: (ver Tabla VI)

Sensibilidad	94%
Especificidad	100%
Valor Predictivo Positivo	100%
Valor Predictivo Negativo	80%

TABLA VI

CARACTERISTICAS OPERATIVAS DE LA COMBINACION EN SERIE
CITOLOGIA / BIOPSIA PLEURAL / ANALISIS CITOGENETICO
UNIDAD DE GENETICA. HOSPITAL WARGAS
1991-92

	NEO +	NEO -	TOTAL
ALGUN METODO +	15	0	15
TODOS -	1	4	5
TOTAL	16	4	20

$$S = VP / (VP + FN) = 15 / (15 + 0) = 1.00$$

$$E = VN / (FP + VN) = 4 / (0 + 4) = 1.00$$

$$VP(+) = VP / (VP + FP) = 15 / (15 + 0) = 1.00$$

$$VP(-) = VN / (VN + FN) = 4 / (4 + 0) = 1.00$$

DISCUSION

El Análisis Citogenético

Se efectuó durante la metafase en razón de las ventajas técnicas que esta fase del ciclo de división celular ofrece.¹⁵ El número de metafases analizadas resultó bien variable. De acuerdo con los criterios más rígidos, el análisis de no menos de 3 de ellas es necesario para la conclusión en cuanto al significado de una alteración cromosómica observada.¹⁷ Sin embargo, Yunis discute tal limitación enfatizando la relativa mayor importancia de los aspectos morfológicos de la metafase sobre aquellos relacionados con su cuantía.⁹ En nuestro estudio se asume la positividad diagnóstica aún de 1 metafase siempre que su morfología fuera compatible con los criterios de malignidad cromosómica establecidos.

El criterio de negatividad para el Análisis Citogenético empleado por nosotros requiere de algunas precisiones. El patrón de cinética celular de los tejidos normales y de algunos neoplásicos es bien conocido. La Curva de Gompertz¹⁸ muestra cómo el patrón exponencial de crecimiento no es constante a todo lo largo del desarrollo tumoral. El tumor, en tanto es mayor en masa, tarda más en crecer. Por otro lado, el tiempo de duplicación de la masa tumoral (TD) varía según el tipo tumoral. Así, los tumores de estirpe mesenquimática, embrionaria o linfomatosa exhiben TDs relativamente breves, en tanto que los de estirpe glandular o epitelial exhiben TDs más prolongados.¹⁹ En nuestro estudio, 6 de los 9 casos de neoplasia en los que no se observaron metafases, correspondieron a tumores de estirpes con TDs característicamente prolongados y en los que la masa tumoral impresionaba como cuantiosa. De este modo, nos parece razonable pensar que la no observación de metafases en estos casos fue debida a la presencia de un número relativamente bajo de células tumorales en división en el EP. Esto explica la baja sensibilidad del método, aisladamente considerado, para el diagnóstico de neoplasia pleuro-pulmonar.

Los aspectos técnicos merecen algunas consideraciones ya que la sensibilidad del método guarda estrecha relación con el desempeño del observador, el número de metafases estudiadas y la interpretación de los hallazgos observados. Es posible la generación de artefactos a todo lo largo

del procesamiento de las muestras. Esta fuente de error, sin embargo, escapa a nuestro control.

Un problema aún vigente es el planteado por las alteraciones cromosómicas aleatorias que pueden ocurrir como consecuencia de medicaciones, infecciones virales intercurrentes, etc. Frecuentemente nuestros pacientes están polimedcados o presentan alguna otra afección intercurrente. Así, la evaluación del impacto de tales variables sobre el material cromosómico se hace difícil. El diseño propuesto hace imposible la evaluación del sesgo impuesto por la contingencia de estas otras variables en su totalidad.

En este sentido y a los fines metodológicos, clínicos, patólogos y citogenetistas operamos a ciegas e independientemente unos de otros. Pese a esta emisión separada de juicios diagnósticos, fue posible una alta coincidencia entre citogenética e histopatología (65% de los casos). Ello da consistencia a los hallazgos citogenéticos reportados como sugestivos de neoplasia y no de alteraciones aleatorias sin significado alguno.

En los 4 casos de granulomatosis pleuro-pulmonar no se observaron metafases anómalas en LP. En uno de estos casos se reportó una metafase anómala en SP cuyo significado procuraremos discutir a continuación.

Las anomalías cromosómicas en SP no coincidieron siempre con las detectadas en LP para cada caso. Sin embargo, unas y otras se correspondieron siempre en el contexto de cada caso con patrones cromosómicos descritos con anterioridad en la literatura.¹⁶ Este hecho es coherente con la teoría clonal de la génesis tumoral.²⁰

En algunos casos, tales anomalías fueron comunes para neoplasias de distinta estirpe e, incluso, se reportaron en casos portadores de patología pleuro-pulmonar benigna. Este hecho es comentado por Yunis²¹ y constituye una de las principales limitaciones del diagnóstico de neoplasia por estos medios. Por otro lado, y como se destacó, no nos fue posible valorar el significado de una alteración citogenética aislada en el contexto de un cuadro benigno.

Inequívocamente, el criterio numérico ha constituido la base más sólida y reproducible para sustentar el diagnóstico de neoplasia por Análisis Citogenético. De este modo y ante la presencia de

es indudable. Las alteraciones cromosómicas presentes en cultivos linfocitarios y en estudios de exudados incluyen, fundamentalmente, a aquellas de tipo numérico (aneuploidías, poliploidías) similares a aquellas inducidas por virus, químicos y agentes radionucleares.^{22,23} Otras alteraciones, de tipo morfológico, tales como deleciones, reorganizaciones complejas, rupturas y "gaps", han sido descritas en entidades de tipo maligno y pre-maligno.^{24,25}

La célula normal se divide una vez por ciclo celular. Ocasionalmente, sin embargo, 2 síntesis sucesivas de DNA ocurren sin una mitosis interpuesta. Ello da origen a los cromosomas endorreduplicados presentes en algunas de las metafases estudiadas.²⁶ Las endorreduplicaciones han sido positivamente reportadas en sujetos con exposición ocupacional a mercuriales (odontólogos y asistentes dentales), habiéndose descrito también, en estos casos, aneuploidías (56,5%) y alteraciones del tipo "gaps", deleciones y rupturas hasta en un 2%. Estos hallazgos aparecen descritos en cultivos linfocitarios y en estudios de Médula Osea.^{24,25,27,28}

El criterio numérico es menos sólido al tratarse de cromosomas en defecto, casos estos en los que el error artefactual es más probable (2/16 en nuestra serie). Sin embargo, la dificultad mayor está constituida por aquellos casos en los que el diagnóstico de malignidad se basó en criterios de tipo morfológico. Es en estos casos (3/16 en nuestra serie) en los que el diagnóstico depende de la habilidad y experiencia del observador.

Las alteraciones morfológicas descritas tras estudios realizados mediante técnicas de cultivos linfocitarios, fibroblásticos y de líquidos corporales patológicos (exudados), incluyen lesiones de tipo cromátida como "gaps" y rupturas del tipo cromosómico como intercambio de cromátidas, cromosomas dicéntricos y rearrreglos estructurales. Estos rearrreglos traducen fracturas en puntos específicos del DNA conocidos como "sitios frágiles". Los sitios frágiles predispone a deleciones y recombinaciones intercromosómicas (translocaciones).²⁸

En nuestros estudios, las alteraciones cromosómicas son similares a las descritas en otros en los que se reportan cariotipos provenientes de sujetos sometidos a la acción de mutágenos o portadores de patologías malignas o pre-malignas.²⁴

Las CO del Análisis Citogenético aisladamente considerado y en combinación con Biopsia Pleural / Citología de LP

Algunas de las CO del Análisis Citogenético como prueba aislada para el diagnóstico de neoplasia pleuro-pulmonar resultaron comparables con las de métodos de uso más común como la biopsia pleural y la citología de LP. En nuestra serie, la combinación de biopsia pleural y citología de LP mostró un cuadro de CO compatible con lo reportado por la literatura. Para todas ellas la alta especificidad (100%) se debe a la no presencia de Falsos Positivos.

El valor predictivo positivo para la citogenética aisladamente considerada fue del 100%. Sin embargo, su valor predictivo negativo apenas fue de 36%. Es claro entonces que la negatividad de esta prueba no permite descartar definitivamente el carácter maligno de un EP. La combinación en serie de biopsia pleural / citología exhibe un valor predictivo negativo un tanto mayor (50%), pero aún insuficiente para el adecuado descarte de malignidad en el EP críptico. Es finalmente la combinación en serie de biopsia pleural / citología de LP / análisis citogenético la que logra incrementar el valor predictivo negativo hasta un 80% y la sensibilidad de la serie a 94%. Un elemento interesante lo constituye el hecho de que estos incrementos en la sensibilidad y el valor predictivo negativo no ocurren a expensas de un inaceptable aumento en el número de falsos positivos. La aceptación de estas probabilidades post-test debe ser cautelosa en razón del sesgo inherente a la constitución del grupo de estudio. Es claro que una prevalencia de enfermedad pleuro-pulmonar neoplásica como la descrita para nuestro grupo (80%) resulta inverosímil.

Esta limitación es típica de los estudios de fase II (llamados de "overlap performance") como el nuestro, tendientes siempre a rendir resultados "demasiado buenos" en el decir de Robertson y colaboradores.²⁹ Este tipo de estudio, muy preliminar, permite evaluar la potencia de la prueba en la labor de discriminación entre portadores y no-portadores de una condición, (neoplasia pleuro-pulmonar, en nuestro caso). Al exhibir una sensibilidad del 94% y una especificidad del 100%, creemos que la adición del análisis citogenético a la serie biopsia pleural / citología de LP está justificada, por cuanto incrementa notablemente la potencia discriminatoria de estas pruebas con respecto

a la condición neoplasia pleuro-pulmonar, presente o ausente. La estimación correcta de las probabilidades post-test, (valor predictivo), requiere de un estudio de fase III, (llamado de "clinical performance"), en el que se estudia una muestra representativa del universo en cuestión, sin el sesgo indefectiblemente impuesto por los investigadores. Solo así sería razonablemente valorable el impacto diagnóstico definitivo de estos métodos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

1.- De acuerdo con los resultados de presente estudio, la inclusión del Análisis Citogenético en el plan diagnóstico de un EP críptico resulta útil en tanto que incrementa notablemente la

sensibilidad de la serie biopsia pleural / citología de LP para el diagnóstico de neoplasia pleuro-pulmonar.

2.- La inclusión del Análisis Citogenético no es suficiente, empero, para descartar definitivamente la naturaleza neoplásica de un EP, ello dado su valor predictivo negativo. Esta CO no es cabalmente estimable a partir de un estudio de fase I como el que presentamos.

3.- La inclusión del Análisis Citogenético en el plan de estudio de un EP sospechoso de malignidad, parece justificada en aquellos casos en los que biopsia pleural / citología de LP, ambos en serie, no fueran concluyentes (ver Tabla VII).

TABLA VII

