

ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN EFUSIONES MALIGNAS

Dr. CESAR PAZ Y MIÑO y Dra. LIGIA OCAMPO²

Resumen:

Mediante uso de técnica directa se han sometido a análisis citogenético 66 efusiones (31 derrames ascíticos y 35 pleurales) provenientes de diferentes tipos de tumores malignos (adenocarcinomas 35, linfomas 10, carcinomas 10, osteosarcomas 4, mesoteliomas 4 y otros 3). La citogenética fue positiva para malignidad en 56 casos (84, 8 o/o), negativa en 7 (10,6 o/o) y dudosa en 3 casos (4,5 o/o). La técnica citogenética mostró una mayor efectividad diagnóstica ($p < 0,05$) que la citológica. La técnica citológica fue positiva para malignidad en 44 casos (66,6 o/o). Negativa para malignidad en 13 casos (19,8 o/o) y dudosa en 9 casos (13, 6 o/o). Cuando ambas técnicas fueron correlacionadas la efectividad diagnóstica fue mayor, 62 casos (93,9o/o) fueron positivos para malignidad mientras que 4 casos (6,1 o/o) fueron negativos. En forma general, los grupos cromosómicos implicados, en orden de frecuencia, en las alteraciones de todos los tipos de efusiones son: C en 21 casos, A en 19, E en 17, D en 16, B en 11 F y G en 10 y el X en 1. Las hiperdiploidías con 36 casos (54,5 o/o) son los hallazgos más frecuentes, las euploidías 17 (25,7 o/o), las hipodiploidías en 12 (18,1 o/o) y las pulverizaciones en 1 caso (1,5 o/o). Se concluye que los criterios citogenéticos de malignidad usados en esta investigación son altamente discriminativos para malignidad. No hemos podido relacionar ningún grupo de cromosomas o aberración con algún tipo histológico de tumor. (Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, 15 (1 - 2): 20 - 27, 1990).

Introducción

Los derrames ascíticos y pleurales son una complicación frecuente de los cánceres de las regiones tóraco-abdominales. En estas efusiones se han descrito tres tipos de aberraciones cromosómicas (1-4): anomalías cromosómicas específicas para cada tipo histopatológico de cáncer, 2) aberraciones cromosómicas no al azar, y 3) aberraciones cromosómicas al azar. Estos cambios cromosómicos se asumen son marcadores de malignidad que tiene que ver

con el proceso de iniciación y progresión del cáncer (3, 5, 6, 7). Hasta el momento se conoce 15 aberraciones específicas en tumores sólidos y 51 alteraciones inespecíficas, pero recurrentes en los análisis citogenéticos de los tumores (3, 5, 6, 8, 9).

La citogenética de las efusiones provenientes de tumores malignos, ha mostrado mayor efectividad diagnóstica, alrededor del 90o/o, en las fases tempranas de la enfermedad, frente a la citología, alrededor del 70 o/o (4, 10-14). Por

1. Laboratorio de Genética, Facultad de Ciencias Médicas - Unidad de Genética Médica de la Fundación "Simón Bolívar", Quito.
2. Instituto Nacional del Cáncer. SOLCA, Quito.

esta razón es importante hallar nuevos y específicos marcadores cromosómicos tumorales, que posibiliten un diagnóstico preciso y rápido del cáncer. El análisis cromosómico de las piezas tumorales primarias conlleva serios problemas técnicos (3, 4, 15, 16), por lo que se ha optado por ensayar técnicas alternativas, que indirectamente permitan conocer el comportamiento citogenético del cáncer. Por estas dificultades los investigadores han puesto atención en hallar, en preparaciones cromosómicas de efusiones "accidentales", marcadores cromosómicos de malignidad específicos (3 - 8, 11, 17, 18). El propósito del presente trabajo es asociar un tipo histopatológico de cáncer, con un grupo cromosómico típico.

Materiales y Métodos

Se analizaron 66 efusiones provenientes de tumores malignos, 31 obtenidas de derrames ascíticos y 35 de pleurales. Las efusiones fueron extraídas por punción transabdominal o torácica. Para el estudio se seleccionaron únicamente aquellas muestras cuyo origen primario del cáncer y tipo histológico eran conocidos (cuadros 1 y 2).

Cuadro 1.— Origen Primario del Cáncer

Organo de Origen	No. Casos	Tipo Efusión
Broncopulmonar	19	^a P
Linfoma	10	A/P
Ovario	9	A/P
Mama	8	P
Estómago	6	A ^b
Costillas	4	A/P
Utero	3	A/P
Intestino D ^c /G ^d	3	A
Riñón	2	A/P
Hígado	1	A
Páncreas	1	A

^a Pleural ^b Ascítico ^c Delgado ^d Grueso

Cuadro No. 2.— Tipos Histológicos de los cánceres

TIPOS	N
Adenocarcinomas	35
Linfomas	10
Carcinomas	10
Osteosarcomas	4
Mesoteliomas	4
Hepatoma	1
T. de Wilms	1
Ca. Cel. Pequeñas	1

El estudio citogenético se realizó mediante la técnica convencional (4, 9, 17, 19, 20). La efusión se centrifugó a 2.000 rpm por 10 minutos, luego se añadió colchicina 0.03 microgramos por mililitro y se incubó a 37 grados centígrados por 90 minutos. Para la cosecha celular, se sometieron las células a un choque hipotónico con cloruro de potasio al 0.54 o/o durante 20 minutos a 37 grados C., posteriormente se fijó y lavó las células con Carnoy (metanol 3 partes y ácido acético 1 parte). Las extensiones sobre portaobjetos fueron teñidas con Giemsa al 20/o por 10 minutos y estudiadas bajo el microscopio óptico con 1.000 aumentos. En cada caso se analizaron las metafases, tratando siempre de hacerlo en un mínimo de 20. Los criterios de malignidad (4, 9, 10, 14, 21) para la evaluación citogenética fueron:

a) Hallar un mínimo de 10o/o de metafases alteradas, esto es: hipo o hiperdiploidías, presencia de marcadores cromosómicos (un marcador se lo consideró como aquel cromosoma que no encuadra en ninguno de los grupos del cariotipo normal), fragmentos cromosómicos, DMS (doble minutos) y HSR (regiones homogéneamente teñidas).

b) Hallar tres marcadores cromosómicos distintos en por lo menos tres metafases diferentes.

c) Hallar un mismo marcador cromosómico en al menos tres metafases distintas.

d) Se descartó malignidad cuando en la evaluación cromosómica se encontró un mínimo consecutivo (cuando fue posible) de 20 metafases normales, o cuando todas las metafases halladas fueron normales (menos de 20 metafases).

En cada muestra evaluada se registró el grupo cromosómico al cual pertenecía el marcador cromosómico hallado; en los casos en que la morfología del cromosoma no fue típica, se lo incluyó en el grupo más parecido o en su defecto para la contabilidad se descartó ese marcador.

Los resultados del estudio citogenético y citológico se los comparó estadísticamente mediante la prueba de chi cuadrado, para obtener el valor de significancia p .

Resultados

De las 66 efusiones analizadas citogenéticamente, 56 casos (83,80/o) fueron positivos para malignidad, el rango de metafases alteradas para estos casos estuvo entre el 23 al 100 o/o; 3 casos (4,50/o) fueron dudosos para malignidad, pues presentaron entre 7 y 11 o/o de metafases alteradas; y 7 casos (10,60/o) fueron negativos para malignidad, con metafases alteradas entre el 2 al 4 o/o (Cuadro 3). La citología fue positiva para malignidad en 44 casos (66,60/o), en 9 casos (13,60/o) fue dudosa y en 13 casos (19,80/o) fue negativa para malignidad. Al realizar el estudio comparativo se

determinó que las diferencias entre la citogenética u la citología son significativas ($p < 0.05$) con respecto a la sensibilidad diagnóstica (Cuadro 3). Cuando se usaron las dos técnicas en forma complementaria (citogenética + citología) para diagnóstico de malignidad, se observó que ciertos casos negativos para una metodología eran positivos para la otra metodología, lo que determinaba que la efectividad diagnóstica de ambas pruebas sea del 93,90/o (62 casos positivos para la malignidad) y 6,10/o (4 casos) negativos para malignidad. No se hallaron casos dudosos. El cuadro 4 recoge los datos de la efectividad diagnóstica de la citogenética por tipo de cáncer.

Al evaluar el número de cromosomas (ploidía) de todos los casos estudiados, encontramos que las hiperdiploidías son las más frecuentes 36 casos (54,50/o), las euploidías 17 casos (25,70/o), hipodiploidías en 12 casos (18,10/o) y las pulverizaciones en 1 caso (1,50/o). El cuadro 5, muestra las alteraciones del número cromosómico (ploidía) para cada tipo histológico de cáncer analizado.

Se observó gran variedad, en el análisis de los grupos cromosómicos implicados en cada tipo de cáncer. El cuadro 6 recoge estos datos. En forma general, los grupos cromosómicos implicados, en las alteraciones de todos los tipos de efusiones, en orden de frecuencia son: grupo cromosómico C en 21 casos, A en 19, E en 17, D en 16, B en 11, F y G en 10 y el X en 1.

Cuadro No. 3.— *Comparación de la Efectividad Diagnóstica de la Citología frente a la Citogenética*

	Positiva	Dudosa	Negativa	$p (X^2)$
Citogenética	56 (84,8 o/o)		3 (4,5 o/o)	7 (10,6 o/o)
				< 0.05
Citología	44 (66,6 o/o)		9 (13,6 o/o)	13 (19,8 o/o)
Cigenet + Citol	62 (93,9 o/o)		— — —	4 (6,1 o/o)

Cuadro No. 4.— *Efectividad diagnóstica de la citogenética por tipo de cáncer*

Tipo Histológico	No. Casos	Positiva	Dudosa	Negativa
Adenocarcinomas ^a	35	32	1	2
Linfomas	10	7	1	2
Carcinomas	10	8	—	2
Osteosarcomas	4	3	1	—
Mesoteliomas	4	3	—	1
Hepatoma	1	1	—	—
T. Wilms	1	1	—	—
Ca. Cel Pequeñas	1	1	—	—
Total	66	56	3	7

^a Un caso de adenocarcinoma

Cuadro No. 5.— *Alteraciones de la Ploidia por tipo Histológico de cáncer*

Tipo	Hiperdiploide	Euploide	Hipodiploide
Adenocarcinomas ^a	25 (71,5 o/o)	5 (14,3 o/o)	4 (11,4 o/o)
Linfomas	3 (30 o/o)	4 (40 o/o)	3 (30 o/o)
Carcinomas	3 (30 o/o)	4 (40 o/o)	3 (30 o/o)
Osteosarcomas	—	4 (100 o/o)	—
Mesoteliomas	2 (50 o/o)	1 (25 o/o)	1 (25 o/o)
Hepatoma	1 (100 o/o)	—	—
T. de Wilms	1 (100 o/o)	—	—
Ca. Cel. Pequeñas	—	—	1 (100 o/o)
Total	35 (53, 1o/o)	18 (27,2 o/o)	12 (19,7 o/o)

^a Un caso de adenocarcinomas presento metafases pulverizadas.

Cuadro No. 6.— *Análisis de los grupos cromosómicos marcadores, por tipo histológico de cáncer*

Tipo	Grupos Cromosómicos marcadores / No. Casos							
	A	B	C	D	E	F	G	X
Adenocarcinomas (35 casos)	9	8	13 ^a	10	10	5	7	1
Linfomas (10 casos)	5 ^a	1	3	1	2	2	1	—
Carcinomas (10 casos)	3	1	4	4	5 ^a	3	1	—
Osteosarcomas (4 casos)	—	1	—	1	—	—	1	—
Mesoteliomas (4 casos)	2 ^a	—	1	—	—	—	—	—
Hepatoma (1 caso)	—	—	1	1	—	—	—	—
T. De Wilms (1 caso)	—	—	1	—	—	—	—	—
Ca. Cel. Pequeñas (1 caso)	—	—	1	—	—	—	1	—
Total	19	11	24 ^a	17	17	10	11	1

^a Grupo marcador más frecuente

Discusión

El hallazgo de aberraciones cromosómicas en 66 efusiones malignas analizadas, sustenta, de forma importante, el valor práctico de la citogenética como método diagnóstico precoz de malignidad, con una técnica relativamente sencilla.

La efectividad diagnóstica de la citogenética (84,80/o) sobre la citología (66,60/o) es evidente ($p < 0.05$), mientras que la utilización conjunta, es más efectiva (93,90/o), como lo con-

firman otros estudios (2, 4, 11 - 14, 17 - 23).

Por lo tanto, el empleo rutinario de las dos técnicas en el diagnóstico de malignidad es recomendable. La citogenética arroja en las primeras evaluaciones datos diagnósticos más precoces, reduciéndose el índice de negatividad para malignidad, o de resultados dudosos, lo que beneficia directamente al paciente, pues se puede instaurar tratamientos tempranos.

Son varios los estudios que comparan la citogenética con la citología en la evaluación de

efusiones, cada autor ha seleccionado las muestras de acuerdo a diferentes criterios: casos al azar (11), pacientes sometidos a tratamientos antineoplásicos (23), o casos claramente malignos (2, 3, 4, 21) como en el presente estudio.

Los criterios de malignidad así mismo, son variables para cada autor, aunque un factor común es el hallazgo de marcadores cromosómicos y de metafases alteradas, pero sin coincidir en el número de metafases alteradas que den certeramente el diagnóstico de malignidad (9, 14, 17, 18, 20, 21, 23).

Los criterios de malignidad utilizados en este estudio son estrictos, lo que hace suponer una gran confiabilidad en el diagnóstico. La literatura (2, 5, 13, 14) hace referencia a diagnósticos falsos positivos o falsos negativos, lo que debe tomarse en cuenta al momento de la interpretación clínica; estos falsos positivos o negativos, son probablemente reflejo de un estado primario de alteración genética (oncogenética), no evidenciable cromosómicamente. En nuestra serie no existen falsos positivos o negativos, si en cambio casos dudosos, estos pueden deberse a un estado de regresión inmunológica del tumor, o simplemente porque la técnica citogenética no evidenció metafases, ya que el tumor al momento de ser analizado, no contaba con un número suficiente de células en división. Aunque otros factores han sido implicados en la obtención de falsos positivos (infecciones virales, tumores benignos, exposición a químicos, etc.) en este estudio estos factores no han estado presentes, pues todas las muestras seleccionadas provinieron de efusiones malignas comprobadas.

En todos los casos se supo el origen primario del cáncer y su tipo histológico. Se determinó que los grupos cromosómicos C, A, D y E son los marcadores tumorales más frecuentes en efusiones malignas. Así mismo, se pudo determinar que en los adenocarcinomas el grupo cromosómico C es el más frecuentemente implicado, el grupo A en linfomas y mesoteliomas, y el grupo E en carcinomas. Aunque existe una clara predisposición a la presentación de hiperdiplo-

días e implicación de los grupos cromosómicos anotados (C, A, D y E), todavía no se puede relacionar completamente un tipo de cáncer con una alteración citogenética o un grupo cromosómico específico, con las técnicas citogenéticas utilizadas en este estudio.

Por el tipo de cromosomas obtenidos, las técnicas de bandeamiento cromosómico no son satisfactorias en citogenética tumoral en general (5, 6). En este sentido, los intentos de bandeamiento que realizamos no fueron totalmente exitosos y no se pudo determinar exactamente los cromosomas implicados. Otros investigadores con mejores éxitos (3, 5, 6, 13, 15, 17, 18, 20, 24), tipificando los cromosomas marcadores o alteraciones estructurales, apoyan el criterio de una evolución monoclonal del cáncer (3, 5, 6, 7, 15, 24) y descartan un posible origen multiclonal; más aún esta teoría se ve reforzada, al comparar los datos citogenéticos de las efusiones con los del estudio de piezas tumorales primarias, que han revelado alteraciones típicas para cada tumor (3, 5, 6, 7, 13, 15, 16, 24) y que se las puede relacionar morfológicamente con los marcadores hallados en las efusiones, así: deleción del brazo corto del cromosomas 3 (1p -) en el cáncer de pulmón, translocaciones entre los cromosomas 6 y 14 (t(6;14) en carcinoma de ovario y monosomía parcial o completa del cromosoma 22 (-22, o 22q-) en neuroblastoma. Recientemente en los estudios de efusiones malignas (3, 6, 13, 24, 25) se ha informado sobre la implicación frecuente de los cromosomas 1, 3, 13, 6, 7, 9 y 17 (grupos A, D, C y E respectivamente), lo que coincide perfectamente con el tipo de hallazgo nuestro.

Los hallazgos sobre implicaciones cromosómicas específicas en cánceres, han servido para relacionar los cromosomas implicados y sus sitios de reestructuraciones, con sitios frágiles comunes (c-fra) y sitios de oncogenes celulares (c-one), que posiblemente sean los responsables del desarrollo y evolución del cáncer (3, 5, 6, 7, 24).

De nuestro estudio se desprende que la técnica directa puede ser utilizada sin restricciones

para al análisis cromosómico de malignidad en efusiones. En estudios cromosómicos de células cultivadas *in vitro* (5), provenientes de efusiones malignas, no se han encontrado diferencias citogenéticas entre los resultados de la técnica directa con los de cultivos celulares.

En definitiva, este trabajo evidencia la confiabilidad de la citogenética en el diagnóstico de

malignidad precoz, destacando lo beneficioso de la utilización conjunta con la citología. Ubica grupos cromosómicos predispuestos a conformar marcadores tumorales específicos para cada tipo histológico de tumor y trata de correlacionar con los conocimientos actuales de genética molecular.

Abstract

Chromosomic Aberrations in Malignant Effusions

Sixty six malignant effusion caused by different types of tumor (adenocarcinoma 35, lymphoma 10, carcinoma 10, osteosarcoma 4, mesothelioma 4 and others 3) were subjected to cytogenetic analysis by the use of a simple direct technique. We studied 35 pleural effusions and 31 ascitic effusions. The cytogenetic technique showed 56 positive malignancy cases (84, 8 o/o). Seven cases (10,6 o/o) were negative to malignancy and 3 cases (4,5 o/o) were uncertain. The cytogenetic technique showed a better accuracy for diagnosis than the cytologic one ($p < 0.05$).

The cytologic was positive to malignancy in 44 cases (13, 60/o) were uncertain. When both of these techniques were correlated 93,9 percent uncertain. When both of these techniques were correlated 93,9 percent (62 cases) of diagnostic accuracy was found, and only 4 cases (6.1 o/o) were negative to malignancy. In all types of cancer studied the most frequently groups of marker chromosomes were: C in 21 cases, A in 19, E in 17, D in 16, B in 11, F and G in 10 and X in 1 case. The cytogenetics aberrations were: Hyperdiploids in 36 cases (54,5 o/o), euploids 17 cases (25,7 o/o), hypodiploids in 12 cases (18,1 o/o) and 1 case pulverized (1,5 o/o). We concluded that the malignancy cytogenetics judgments used in this investigation are highly discriminative to malignancy. We can not relate any group of chromosomes, neither any chromosomes aberrations with some type of histologic tumors.

Referencias Bibliográficas

1. Baserga, A., Bosi, L., Castoldi, G., Punturieri, E., Ricci, N., L., analisis cromosomica nello studio dei versamenti sierosi. Arch Obst. Ginec. Suppl N. 68: 414, 1963.
2. Miles, P., Wolinska, W.A. A comparative analysis of chromosomes and diagnostic cytology in effusions from 58 cancer patients. Cancer 32: 1458 - 1469, 1973.
3. Misawa, S., Horike, S., Taniwaki, M., Tsuda, S., Okuda, T., Kashima, K., Abe, T., Sugihara, H., Noriki, S., Fukuda, M. Chromosome Abnormalities of Gastric Cancer Detected in Cancerous Effusions. Jpn J. Cancer Res 81: 148 - 152, 1990.
4. Paz y Miño, C. Valor del Estudio Cromosómico en el Diagnóstico de Malignidad en Efusiones Malignas, comparación con la Citología. Boletín Científico Fundación Simón Bolívar 1 (1): 2 - 6, 1987.
5. Sandberg, A. The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. New York, Elsevier North Holland, 1980.
6. Mitelman, F., Levan, G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1981 cases. Hereditas 95: 79 - 139, 1981.
7. Mitelman, F., Heim, S. Consistent Involvement of only 71 of the 329 Chromosomal Bands of the Human Genome in Primary Neoplasia - associated Rearrangements. Cancer Res 48: 7115 - 7119, 1988.
8. Olinici, C., Giurgiuroman, J., Galatar, N., Lazarov,

- P., Marza, V. Diagnostic value of chromosome examination in effusions from cancer patients. *ARCh. Geschwulstforsch* 46: 129 - 139, 1976.
9. Korsgaard, R. Chromosome Analysis of Malignant Human Effusions in vivo. *Scand J. Res Dis. Suppl N. 105*: 1 - 100, 1979.
 10. Paz y Miño, C.: Diagnóstico Citogenético de Cáncer en Fluidos Corporales In: *Memorias del I Congreso Nacional de Ciencias, Quito: Quito, s.e.; 1987, vol. 2, pp. 232 - 235.*
 11. Dewald G., Dines, D., Weiland, L., Gordon, H. Usefulness of chromosome examination in the diagnosis of malignant pleural effusion. *Engl. J. Med.* 295: 1494 - 1500, 1976.
 12. Hansson, A., Korsgaard, R. Cytogenetical diagnosis of malignant pleural effusions. *Scand J. Resp. Dis* 55: 301-308, 1974..
 13. Musilová, J., Michalová, K. Cytogenetic Study of Cancer Cells in Effusions. *Can Genet Cytogenet* 19: 271 - 279, 1986.
 14. Bello, M.J., Rey, J.A., Ramos, C., Santillan, S., Ibañez, A. La citogenética en el diagnóstico de malignidad de las efusiones. *Rev. Clin. Esp.* 169: 229 - 232, 1983.
 15. DeFusco, P., Frytak, S., Dahl, R., Weiland, L., Unni, K., Dewald, G. Cytogenetic Studies in 11 Patients with Small Cell Carcinoma of the Lung. *Mayo Clin. Proc* 64: 168 - 176, 1989.
 16. Gebhart, E., Tulusan, A.H., Maillot, K.V., Mulz, D.S. Cytogenetic Studies on Human Breast Carcinomas. *Breast Can Res Treat* 8: 125 - 127, 1986.
 17. Musilová, J., Michalová, K., Dvorák, O., Slavik, S., Mericka, O., Novotná, J. Cytogenetic study of malignant and benign effusions. *Neoplasma* 28: 463-471, 1981.
 18. Bousfield, L.R. Cytogenetic Diagnosis of Cancer from Body Fluids. *Acta Cytologica* 29: 768 - 774, 1985.
 19. Bello, M.J., Rey, J.A., Ramos, C., Santillan, S.: Estudio Citogenético de Exudados Ascíticos y Pleurales. *Rev. Esp. Onc.* 30 (4): 477 - 483, 1983.
 20. Mathe, O., Briancon, G., Turchini, M.F., Geneix, A., Malet, P. Apport des Techniques de Cytogénétique Appliquées aux Cellules des Liquides d'Épanchement dans le Dépistage de la Malignité. *Citologia* 50: 323 - 331, 1985.
 21. Paz y Miño, C.: Resultados Citogenéticos en 38 Efusiones Malignas. In: *Libro de Resúmenes VIII Congreso Latinoamericano de Genética, La Habana, 1987, p. 287.*
 22. Carlevaro, C., Rossi, G., Cerri, E., Pelucco, D. Cytogenetic study of pleural effusions. *Tumori* 64: 335 - 344, 1978.
 23. Ishihara, T., Sandberg, A.: Chromosome constitution of diploid and pseudodiploid cells in effusions of cancer patients. *Cancer* 16: 885 - 895, 1963.
 24. Bullerdiek, J., Barnitzke, S., Kahrs, E., Schloot, W. Chromosome abnormalities in a carcinoma cells. In: *Abstracts of the 8th International Chromosome Conference, Luceck, 1983.*
 25. Paz y Miño, C., Ocampo, L.: Análisis de los Grupos Cromosómicos Marcadores Tumorales en Efusiones Malignas. In: *Libro de Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Genética, Lima, 1989, p. 83.*