

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**Evaluación citológica y su correlación con la
evaluación citogenética de líquidos corporales, para
detectar células neoplásicas Laboratorio de Citología -
Hospital Nacional Dos de Mayo, Lima 2015**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Kevin Jesús Mayma Aguirre

ASESORES

Ricardo Rodríguez Torres

Héctor Herrera Reynoso

Lima - Perú

2016

Dedicado

A mi padre *Carlos Gabriel Mayma Cárdenas*

A mi madre *Vicky Andrea Aguirre Acosta*

A mi hermano *Carlos Martín Mayma Aguirre*

A mi abuela *Dina Acosta*

Agradecimientos

A mis padres, por el gran apoyo brindado, por estar en los momentos difíciles, por la educación brindada, por su cariño y comprensión.

A mi hermano, por su apoyo en mis estudios y dedicar un poco de su tiempo para ayudarme en mi formación universitaria con sus consejos y apoyo en los trabajos.

A mis abuelos y tíos, que aunque no esté mucho tiempo con ellos, me apoyaron con sus buenos deseos de culminar con mi carrera universitaria y tener una profesión de la cual me sienta orgulloso.

Al Lic. Rodríguez Torres Ricardo por aceptar ser mi asesor, ayudarme y motivarme para la culminación de mi trabajo de investigación. Además de apoyarme con sus conocimientos desde un inicio con los cursos que estuvo a cargo durante la etapa universitaria y sobre todo con sus conocimientos brindados en este trabajo de investigación.

Al Lic. Herrera Reynoso Héctor por todo el apoyo en la ejecución de este trabajo de investigación, por sus conocimientos brindados en la parte analítica del trabajo, por sus consejos en la mejora de los procedimientos citogenéticos.

A la Lic. Bardales Suarez Rosa por permitirme el ingreso al área de Citología del Hospital Nacional Dos de Mayo y apoyarme en la recolección de muestras, además de sus consejos brindados como profesional y amiga.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN.....	7
II. BASE CONCEPTUAL.....	8
III. DISEÑO METODOLÓGICO	10
3.1 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.....	11
3.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS	12
IV. RESULTADOS	13
4.1 ANÁLISIS CITOGENÉTICO	14
4.2 ANÁLISIS CITOLÓGICO.....	17
4.3 CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD.....	18
V. DISCUSIÓN.....	22
VI. CONCLUSIONES	25
VII. RECOMENDACIONES.....	25
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
IX. ANEXOS.....	30
ANEXO 1	30
ANEXO 2	31
ANEXO 3	33
ANEXO 4	34
ANEXO 5	35

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El interés en la citogenética se deriva de tres observaciones básicas; la frecuencia de cromosomas anormales en células tumorales, la presencia de estas anomalías asociada con una subsecuente neoplasia y cambios importantes en el cariotipo en un corto tiempo. El análisis cromosómico en los derrames de líquidos corporales (líquido pleural, líquido ascítico) puede ser diagnósticamente útil; incluso un pequeño volumen de muestra puede dar evidencia que apoya el diagnóstico de enfermedad maligna, complementando al análisis citológico, siendo un procedimiento adicional para el diagnóstico de células neoplásicas. **OBJETIVO:** Establecer la correlación de la evaluación citológica y la evaluación citogenética en líquidos corporales para la detección de células neoplásicas en el Hospital Nacional Dos de Mayo. **DISEÑO METODOLÓGICO:** Se planteó un estudio observacional, descriptivo prospectivo y de corte transversal. Se recolectaron muestras de líquido pleural y líquido ascítico de los pacientes que tenían solicitud de análisis citológico para descarte de células neoplásicas. Se separó un volumen de estos líquidos no menor a 15 ml que fueron analizados mediante técnica citogenética convencional y coloración con Giemsa; los resultados del análisis citológico se obtuvieron del registro de resultados del área de citología del Hospital Nacional dos de Mayo. **RESULTADOS:** 70 muestras de líquidos corporales fueron analizadas, el 57.1% fueron líquidos pleurales y el 42.9% líquidos ascíticos. Del total de líquidos con alteraciones cromosómicas (n=39), el 87.2% presentaron metafases hiperdiploides, 43.6% encontrados en líquidos pleurales y 43.6% en líquidos ascíticos. Según los resultados de citología, el 54.3% presentaron células neoplásicas. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 95 - 88% y de 86 - 75%, para las pruebas citogenéticas y citológicas, respectivamente. **CONCLUSIONES:** Se concluye que existe una correlación entre la evaluación citológica y citogenética con un grado de concordancia muy bueno (0.918), además de una asociación entre ambas. Por último, la sensibilidad y especificidad reportada fue mayor para la evaluación citogenética que para la evaluación citológica.

Palabras clave: líquidos corporales, citogenética, líquido pleural, líquido ascítico.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Interest in cytogenetics derives from three basic observations; the frequency of abnormal chromosomes in tumor cells, the presence of these abnormalities associated with a subsequent neoplasm and important changes in the karyotype in a short time. Chromosomal analysis in body fluid spills (pleural fluid, ascitic fluid) may be diagnostically useful; even a small sample volume can give evidence supporting the diagnosis of malignant disease, complementing the cytological analysis, being an additional procedure for the diagnosis of neoplastic cells. **OBJECTIVE:** To establish the correlation of cytological evaluation and cytogenetic evaluation in body fluids for the detection of neoplastic cells at Hospital Nacional Dos de Mayo. **METHODOLOGICAL DESIGN:** An observational, descriptive, prospective and cross-sectional study was presented. Pleural fluid and ascitic fluid samples were collected from patients who had a cytological analysis for the disposal of neoplastic cells. A volume of these liquids of not less than 15 ml were separated which were analyzed by conventional cytogenetic technique and Giemsa staining; the results of cytological analysis were obtained from the cytology area of the Hospital Nacional dos de Mayo. **RESULTS:** 70 samples of body fluids were analyzed, 57.1% were pleural fluids and 42.9% ascitic one. Of the total of liquids with chromosomal alterations (n=39), 87.2% had hyperdiploid metaphases, 43.6% found in pleural fluid and 43.6% in ascitic fluid. According to the cytology results, 54.3% were reported with neoplastic cells. The sensitivity and specificity values were 95-88% and 86-75% for cytogenetic and cytological test, respectively. **CONCLUSIONS:** We conclude that there is a correlation between cytological and cytogenetic evaluation with a concordance of 0.918 and association between both. The sensitivity and specificity reported for this study was greater for cytogenetic than for cytological evaluation.

Keywords: body fluids, cytogenetics, pleural fluid, ascitic fluid.

I. INTRODUCCIÓN

Desde la primera publicación reportada por Bennett, de células tumorales observadas en efusiones de líquidos, han transcurrido más de 135 años de desarrollo, lo cual ha llevado al diagnóstico citopatológico de fluidos de cavidades corporales como un procedimiento esencial como ayuda para la confirmación del proceso de la enfermedad subyacente. Aunque muchos de estos estudios documentaban la eficacia del método citológico en el diagnóstico de los derrames, los actuales informes reportan la baja frecuencia de diagnóstico de tumores malignos. Esto se explica en que la exactitud del diagnóstico depende de muchos factores, siendo el más importante destacar el nivel de formación y experiencia en citopatología del examinador y la calidad de conservación celular de la muestra. Todo esto hace necesario un método de diagnóstico que contribuya en la mejora de la evaluación citológica.¹

Boyo, E (1981) realizó uno de los primeros estudios citogenéticos en líquidos corporales, Donde analizaron por evaluación citológica y citogenética, líquidos ascíticos de pacientes con cirrosis alcohólica, hallándose alteraciones cromosómicas en los líquidos en un 45%, que no fueron observadas con la evaluación citológica.²

Granados R. (1994) realizó un estudio citogenético y citológico, en efusiones pleurales y ascíticas de mesotelioma maligno reportando metafases sugestivas de malignidad, y con el estudio citológico encontraron células neoplásicas correspondientes a mesotelioma maligno.⁵

En estudios previos se comparan resultados de análisis citogenético y citológico, evaluando además la sensibilidad y especificidad, concluyendo siempre que la sensibilidad y especificidad se incrementa al combinar ambos métodos.⁷ Por ello que al no contar con un estudio base en el contexto peruano que evalúe la sensibilidad y especificidad del estudio citogenético en el análisis de líquidos corporales, se plantea que la evaluación citogenética debe complementarse con una evaluación citológica, logrando así mejorar el diagnóstico de neoplasias, con una alta posibilidad de mejorar la sensibilidad y especificidad de la citología en líquidos corporales.¹⁴ Además de que se hace necesario un método de diagnóstico

mucho más eficiente, como lo es la evaluación citogenética, ya sea por un método convencional (bandeo cromosómico, estudio de metafases) o por métodos más avanzados (Análisis de Hibridación in Situ Fluorescente).¹⁸ Siendo el objetivo del estudio “establecer la correlación de la evaluación citológica y la evaluación citogenética en líquidos corporales para la detección de células neoplásicas en el Hospital Nacional Dos de Mayo”.

Hay que tomar en cuenta que muchos hospitales realizan los estudios citológicos de líquidos corporales, con un gran volumen de muestra, sin embargo solo se recomienda el uso de una pequeña cantidad del volumen total, desechando el resto. El resto de muestra, puede ser usado para estudios citogenéticos convencionales, como lo es el estudio de metafases, mejorando sustancialmente el diagnóstico temprano

II. BASE CONCEPTUAL

El estudio citológico de líquidos corporales, comprende el estudio de líquido pleural, ascítico, cefalorraquídeo y contenido de quistes mamarios o tiroideos.

El fluido peritoneal o líquido ascítico es aquel que se acumula en la cavidad peritoneal del abdomen, mayormente a causa de una cirrosis hepática. Y en menor frecuencia por malignidad o falla cardíaca.¹⁷

El fluido pleural se acumula en la cavidad pleural, teniendo dos subtipos:

Exudado pleural, que se produce debido a la inflamación y caracterizado por una presencia alta de proteínas y trasudado pleural, a causa de cambios en la presión hemodinámica, normalmente con poca celularidad y cantidades bajas de proteínas, a menudo visto en la insuficiencia cardíaca.¹⁷

El análisis cromosómico de las células en los derrames de pacientes con cáncer puede ser diagnósticamente útil; incluso una pequeña muestra puede dar evidencia de que apoya firmemente el diagnóstico de enfermedad maligna (Goodlin 1963, Ishihara y Sandberg 1963, Jackson 1967, Miles & Wolinska 1973).¹⁸ Aunque ha habido muchos estudios citogenéticos en células cancerosas de los derrames, pocos tienen incluidos los análisis estadísticos de las

aberraciones cromosómicas o comparaciones con diagnósticos citológicos convencionales (Moersch et al. 1954, Hansson y Korsgaard 1974).¹⁸

La aplicación de estudios citogenéticos en tejidos y líneas celulares de cáncer ha sido importante, porque la presencia de alguna anomalía cromosómica puede indicar el pronóstico de la enfermedad y la respuesta a la terapia.

En la actualidad se hacen uso de cultivos celulares para favorecer el crecimiento de las células. Una dificultad de hacer uso de los cultivos celulares, es la contaminación que estos pueden sufrir, ya que pueden ser contaminados por hongos, bacterias, virus, parásitos o células de otros tejidos¹⁸. Y estos organismos en su mayoría aparecen en los cultivos celulares debido a varios factores.

Dentro de las técnicas citogenéticas de muestras de tejidos tumorales y de líneas celulares de cáncer; siempre se hace uso de células en metafase para poder realizar el análisis cromosómico, para esto se requiere una serie de reactivos, incluyendo un medio de cultivo. *Sin embargo en este trabajo no se hará uso de un medio de cultivo, debido a que derrames pleurales o ascíticos, indican en la mayoría de casos indicios de alguna neoplasia, división celular acelerada y no controlada; es por ello que en estos casos se puede obviar el uso de un medio de cultivo celular, y obtener metafases.*

Los diferentes tipos de células pueden requerir factores de crecimiento específicos y medios de suplemento adecuado. Una vez que se conocen los requisitos básicos para cada tipo de célula, el medio de cultivo apropiado es seleccionado, verificando siempre la esterilidad del medio. Cuando se trabaja con un medio de cultivo se espera que el cultivo haya alcanzado el 80% de confluencia, y será cosechado y fijado posteriormente, preparando así una suspensión citogenética.²²

Para asegurar el crecimiento celular y la obtención de células en metafase, es importante tener en cuenta todas las condiciones de muestreo. Es decir, que sean muestras estériles, representativas y sobre todo que sea viable.¹⁸

III. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de Estudio

Descriptivo Prospectivo de corte Transversal

Población de Estudio

Muestras de líquidos corporales recepcionadas y procesadas en el Laboratorio de Citología del Hospital Nacional Dos de Mayo.

Muestra

Líquidos corporales de pacientes que se encuentran en el Hospital Nacional Dos de Mayo y se les realiza estudio citológico para descarte de neoplasias.

Recolección de las muestras

Las muestras fueron recolectadas del Laboratorio de Citología del Departamento de Patología del Hospital Nacional Dos de Mayo, entre el periodo de noviembre del 2015 a junio del 2016.

Variables a correlacionar

Evaluación citológica y evaluación citogenética.

Criterios de Inclusión

- ◆ Muestras de líquidos corporales con volumen mayor de 20 ml.
- ◆ Muestras de líquidos corporales con descarte de neoplasia en estudio citológico.
- ◆ La muestra debe evidenciar aspecto turbio y/o celularidad incrementada.

Criterios de Exclusión

- ◆ Muestras de líquidos corporales de aspecto transparente o sin celularidad.
- ◆ Muestras de líquidos corporales conservados por encima de las 24 horas.
- ◆ Muestras de líquidos corporales que presenten coágulos de sangre.

3.1 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos epidemiológicos de las muestras de líquidos corporales se obtuvieron del cuaderno de registro en el área de citología del Hospital Nacional Dos de Mayo. Del cuaderno de registro de muestras se hizo uso de la siguiente información.

1. Datos epidemiológicos del paciente; Edad , Género
2. Tipo de muestra (Líquido Pleural, Líquido Ascítico)
3. Diagnóstico Presuntivo
4. Tratamiento
5. Informe de Estudio Citológico
6. Estudio de Biopsia, en caso tuviese

PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS

La información recolectada del cuaderno de registro se trasladó a una ficha adjunta (**Anexo 1**). Se realizó el estudio citogenético, según el protocolo de trabajo, el cual fue modificado debido a que no se hizo uso de un cultivo celular¹³ (**Anexo 2**). Los resultados obtenidos se registraron dentro de la ficha antes mencionada. Se realizó el cálculo de la sensibilidad y especificidad para la evaluación citogenética y la evaluación citológica.

Análisis Estadístico

Se elaboró una base de datos en el programa Excel 2010, contabilizando las muestras totales, se tomaron en cuenta solo las muestras que cumplieron con los criterios de inclusión, se obtuvieron resultados en base a porcentaje de acuerdo a las variables de la base de datos, tomando en cuenta, tipo de líquido, aspecto del líquido, rango de edades, resultados de análisis citológico y resultados de análisis citogenético

Se hizo uso de la técnica de Chi cuadrado, en la cual se evaluó la correlación de las variables evaluación citológica y evaluación citogenética en una tabla de contingencia. Considerándose que existe correlación alta con un $p > 0.05$.

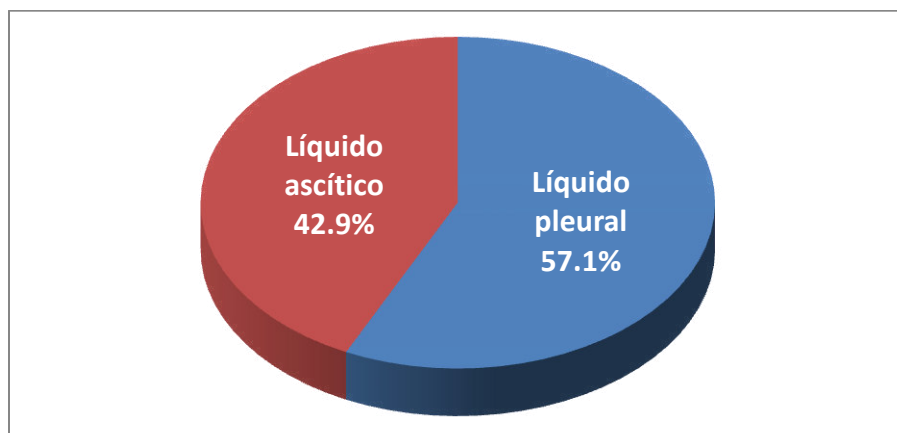
3.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS

- Debido a que las muestras usadas en este estudio forman parte de la evaluación citológica solicitada por el médico patólogo, no se hizo uso de un consentimiento informado, sin embargo sí de una autorización por parte del Jefe de Patología del Hospital Nacional Dos de Mayo.
- No se trabajaron con las muestras directamente una vez recolectadas, es decir, primero se realizó la evaluación citológica por parte del personal encargado del área. Una vez terminada la evaluación citológica de las muestras, se procedió a evaluarlas mediante técnicas citogenéticas, trabajándose con las muestras que ya no serán usadas para evaluación citológica.
- La evaluación citogenética y los resultados emitidos a raíz de la evaluación, no fueron considerados en el diagnóstico de cada paciente.
- Los resultados no tuvieron efecto alguno en los pacientes.

IV. RESULTADOS

Se analizaron 70 muestras de líquidos corporales. Según tipo líquido de punción, el 57.1% correspondieron a líquido pleural, mientras 42.9% fueron líquidos ascíticos (Gráfico 1).

Gráfico N°1 Distribución de líquidos corporales recolectados, según tipo.



Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Uno de los primeros análisis realizados fue determinar el aspecto de los líquidos durante la evaluación macroscópica. Siendo el aspecto ligeramente turbio el que alcanzó la mayor frecuencia (58.6%), seguido por el aspecto turbio y hemático con menores frecuencias. El líquido pleural con aspecto ligeramente turbio fue el que se encontró en mayor frecuencia (65%) (**Tabla N°1**).

Tabla N°1 Distribución de la frecuencia según aspecto de los líquidos corporales recolectados

Aspecto	Líquido pleural	Líquido ascítico
Ligeramente turbio	65%	50%
Turbio	25%	23.3%
Hemático	10%	26.7%
Total	100%	100%

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

*No se colectaron muestras de aspecto transparente

Con respecto a la distribución del tipo de líquido y género, se encontró mayor porcentaje de líquidos en el género masculino, siendo el líquido pleural el más frecuente en estos; a diferencia con el género femenino, que se encontró en mayor frecuencia el líquido ascítico (**Tabla N°2**).

Tabla N°2 Distribución de frecuencia del tipo de líquido según género

Tipo de líquido	Género	
	Masculino	Femenino
Líquido pleural	67.6%	45.4%
Líquido ascítico	32.4%	54.6%
Total	100 %	100%

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Se estableció la frecuencia de los líquidos según edad, encontrándose que la mayor frecuencia de líquidos analizados, se encontraron en un rango de edad de 36 a 46 años. Las mayores frecuencias para líquidos pleurales y ascíticos, se encontraron en un rango de 47 a 57 años y de 36 a 46 años, respectivamente. (**Tabla N°3**)

Tabla N°3 Distribución de frecuencia según tipo de líquido y grupo etario.

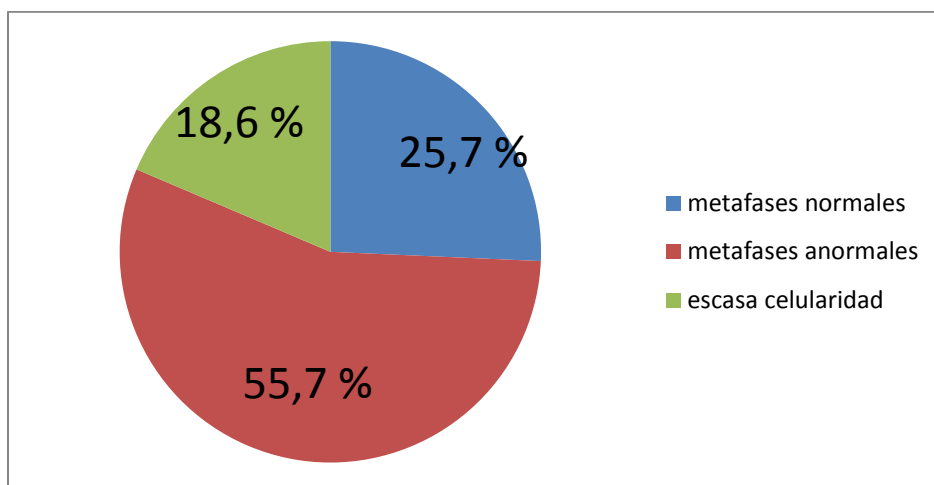
Edad (años)	Tipo de líquido	
	Líquido pleural	Líquido ascítico
25 – 35	7.5%	30%
36 – 46	30%	30%
47 – 57	32.5%	10%
58 – 68	5%	13.3%
69 – 79	12.5%	6.7%
80 – 90	12.5%	10%
TOTAL	100%	100%

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

4.1 ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Del total de muestras evaluadas para análisis citogenético, se halló que el 25.7% de metafases fueron normales, 18.6% de muestras presentó escasa celularidad y 55.7% presentaron metafases anormales, con alteraciones principalmente numéricas (**Gráfico N°2**).

Gráfico N°2 Frecuencia de casos, según análisis citogenético.



Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Los criterios de malignidad incluyen alteraciones citogenéticas numéricas como metafases hipodiploides (rango cromosómico menor a 46 cromosomas) (**Imagen 1**), metafases hiperdiploides (rango cromosómico mayor 46 y menor 65 cromosomas) (**Imagen 2**) y metafases poliploides (rango cromosómico \geq 65 cromosomas). (**Imagen 3**).

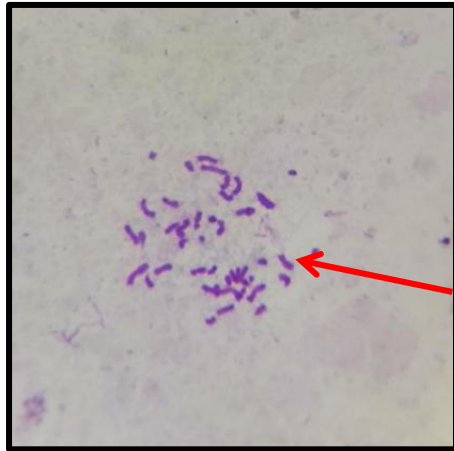
En cuanto a las alteraciones citogenéticas, según el tipo de líquido, se encontró que las metafases hiperdiploides alcanzaron la misma frecuencia en ambos líquidos, con igual porcentaje (43.6%) tanto en líquido pleural como ascítico (**Tabla N°4**)

Tabla N°4 Alteraciones citogenéticas según tipo de líquido corporal

TIPO DE MUESTRA	ALTERACION CITOGÉNICA		
	METAFASES HIPODIPLOIDES	METAFASES HIPERDIPLOIDES	METAFASES POLIPLÓIDES
LÍQUIDO PLEURAL	2.6%	43.6%	5.1%
LÍQUIDO ASCÍTICO	2.6%	43.6%	2.6%
TOTAL	5.1%	87.2%	7.7%

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

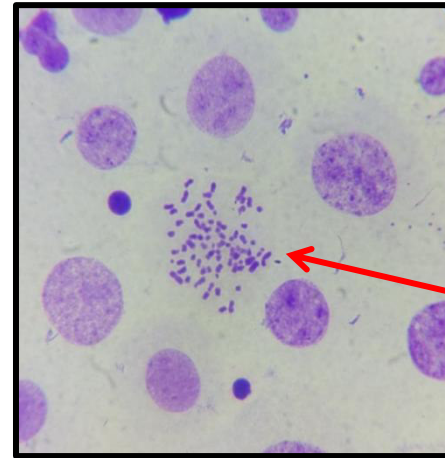
Imagen 1. Metafase hipodiploide (< 46 cromosomas)



n= 36 cromosomas

Muestra de líquido pleural. Imagen a 100x

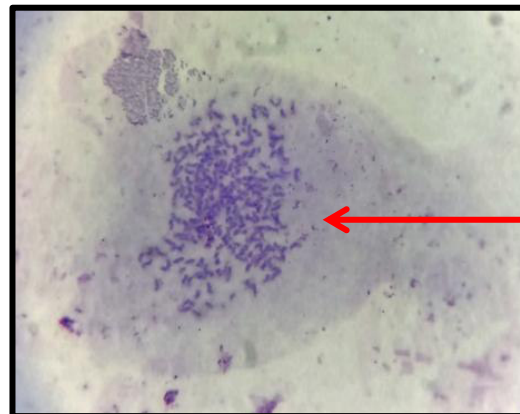
Imagen 2. Metafase hiperdiploide (> 46 y <65 cromosomas)



n= 54 cromosomas

Muestra de líquido ascítico. Imagen a 100x

Imagen 3. Metafase poliploide (mayor a 65 cromosomas)



n= 72 cromosomas*

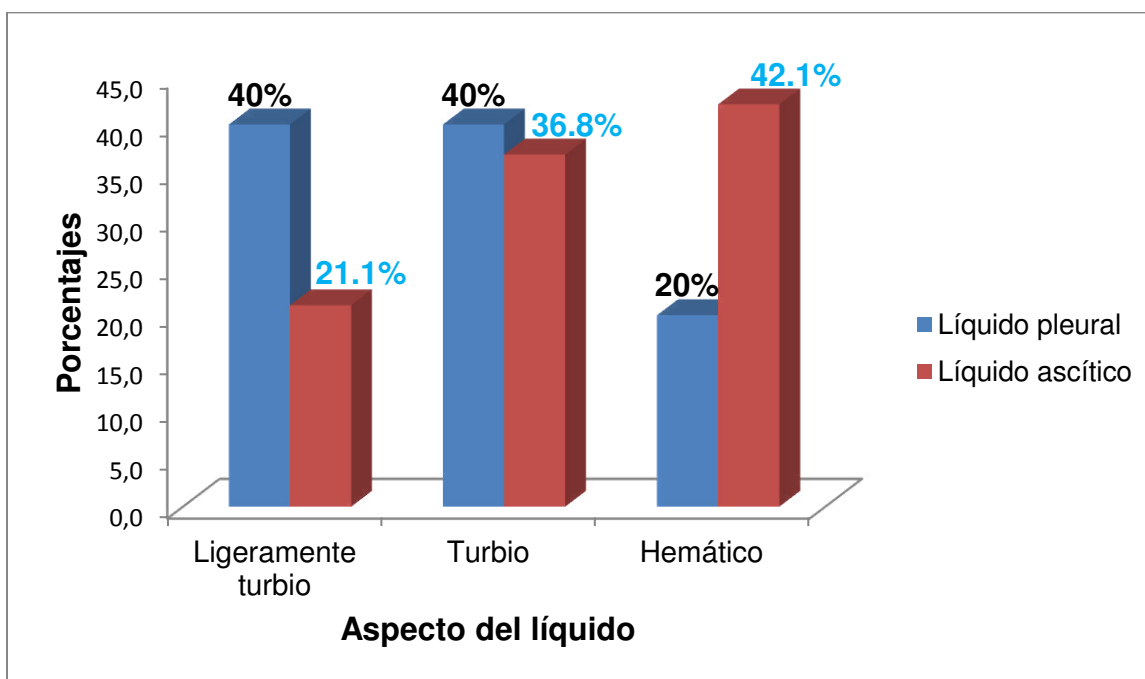
Muestra de líquido pleural. Imagen a 100x

*Número aproximado de cromosomas, debido a los rearrreglos cromosómicos, imposibilita hacer el recuento adecuadamente.

Junto a las metafases anormales (n=39), se relacionó la frecuencia en la turbidez del líquido. En los líquidos pleurales se halló que el 40 % de casos con metafases anormales, presentaron un aspecto ligeramente turbio; siendo idéntico el porcentaje de casos relacionados al aspecto turbio, de otro lado el 20% de casos presentó aspecto hemático.

En líquidos ascíticos con metafases anormales la relación fue de 21.1 %, 36.8% y 42.1 %, para los aspectos ligeramente turbio, turbio y hemático, respectivamente (Gráfico N°3).

Gráfico N°3. Frecuencia de metafases anormales respecto al aspecto del líquido pleural *



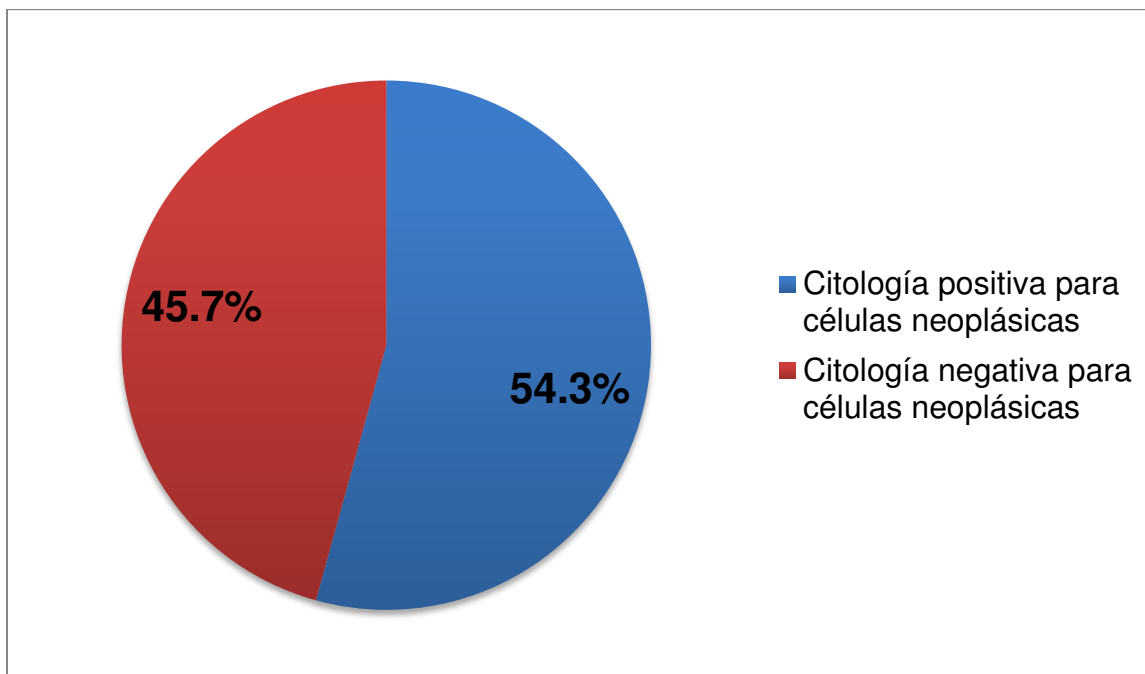
Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

* No se aceptaron muestras de aspecto transparente

4.2 ANÁLISIS CITOLÓGICO

Del total de muestras evaluadas para análisis citológico, se halló que el 54.3% presentaron citología positiva para células neoplásicas, y el 45.7% citología negativa (Gráfico N°4).

Gráfico N°4 Frecuencia de casos, según análisis citológico



Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

En cuanto a la frecuencia de casos positivos por evaluación citológica según el tipo de líquido, se encontró que la mayor frecuencia correspondió a los líquidos pleurales. (Tabla N°5)

Tabla N°5 Frecuencia de casos positivos para la evaluación citológica según tipo de líquido corporal

Tipo de muestra	Citología positiva
Líquido pleural	52.6%
Líquido ascítico	47.4%
Total	100%

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

4.3 CÁLCULO DE LA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Se realizaron los análisis de sensibilidad y especificidad en base a 30 resultados que presentaron el resultado de biopsia (método de referencia) frente a la evaluación citogenética y citológica.

Al comparar frente a la evaluación citogenética, se halló una sensibilidad del 95% y especificidad del 88% (**Tabla N°5**), asimismo se registró una sensibilidad del 86% y especificidad del 75% en el estudio por citología (**Tabla N°6**).

Tabla N°5 Sensibilidad y especificidad de la evaluación citogenética frente a biopsia, (n=30)

	Estudio Citogenético		Total
Reporte de Biopsia	Metafases anormales	Metafases normales	
+	21	1	22
-	1	7	8
Total	22	8	30

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N° 6 Sensibilidad y especificidad de la prueba citológica frente a la biopsia, (n=30)

	Estudio Citológico		Total
Reporte de Biopsia	Positivo para células neoplásicas	Negativo para células neoplásicas	
+	19	3	22
-	2	6	8
TOTAL	21	9	30

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Continuando se realizó el análisis de sensibilidad y especificidad según la procedencia del líquido corporal. En el líquido pleural para la evaluación citogenética fue de 100% (**Tabla.N°7**) y para el líquido ascítico fue del 90% y 50%, respectivamente. (**Tabla N°8**).

Para los estudios citológicos, en líquido pleural la sensibilidad fue del 92.3% y especificidad del 80% (**Tabla N°9**); mientras para los líquidos ascíticos fue de 77.8% y 66.7%, respectivamente. (**Tabla N°10**)

Tabla N°7 Sensibilidad y especificidad de la evaluación citogenética en líquido pleural frente a biopsia (n=18)

Reporte de Biopsia	Estudio Citogenético Líquido pleural		Total
	Metafases anormales	Metafases normales	
+	12	0	12
-	0	6	6
Total	12	6	18

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N°8 Sensibilidad y especificidad de la evaluación citogenética en líquido ascítico frente a biopsia (n=12)

Reporte de Biopsia	Estudio Citogenético Líquido ascítico		Total
	Metafases anormales	Metafases normales	
+	9	1	10
-	1	1	2
Total	10	2	12

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N°9 Sensibilidad y especificidad del estudio citológico en líquido pleural frente a biopsia (n=18)

Reporte de Biopsia	Estudio Citológico Líquido pleural		Total
	Positivo para células neoplásicas	Negativo para células neoplásicas	
+	12	1	13
-	1	4	5
TOTAL	13	5	18

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N°10 Sensibilidad y especificidad del estudio citológico en líquido ascítico frente a biopsia (n=12)

Reporte de Biopsia	Estudio Citológico Líquido ascítico		Total
	Positivo para células neoplásicas	Negativo para células neoplásicas	
+	7	2	9
-	1	2	3
TOTAL	8	4	12

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Finalmente, se realizó el análisis de Chi cuadrado (Chi²), y el cálculo del índice kappa, con un nivel de confianza del 95%, y un $p > 0.05$ para determinar si existe asociación y concordancia entre el estudio citogenético y citológico.

Los resultados indican que el valor de Chi2 calculado fue mayor al Chi2 tabulado. Interpretándose que estadísticamente existe una relación en los resultados de la evaluación citológica y citogenética (**ANEXO 4**).

Los resultados para el cálculo del índice kappa, presentaron un grado de concordancia de 1 y de 0.918 para la evaluación citogenética y citológica, respectivamente. Se realizaron los análisis en base a 30 resultados que presentaron el resultado de biopsia. (**ANEXO 5**).

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del estudio, plantean que la citogenética con técnicas convencionales en líquidos corporales en el contexto peruano, es comparable a otros reportes realizados internacionalmente

Boyo E. realizó uno de los primeros estudios mediante evaluación citológica y citogenética en líquidos ascíticos de pacientes con cirrosis alcohólica, encontrando múltiples alteraciones cromosómicas numéricas; con una frecuencia de 45%², mientras en el estudio, este dato alcanzó una frecuencia del 55.7% (39/70) en muestras de líquido ascítico y pleural.

Tiainem M realizó un estudio de anormalidades cromosómicas en mesotelioma maligno pleural, donde analizaron 30 muestras de líquido pleural, mediante bandas G, obteniendo alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales³. A diferencia de este estudio, el bandedo cromosómico se realizó solo a casos de hiperdiploidias y poliploidias; sin embargo a causa de los múltiples rearrreglos cromosómicos, no se pudieron definir las bandas y no fueron reportadas en el estudio.

Rachel E. un análisis de 48 líquidos pleurales y ascíticos provenientes de pacientes con histología confirmada de mesotelioma maligno, obtuvo 20 cariotipos normales y 15 anormales, adicionalmente realizó el estudio de FISH, reportando 8 casos con resultados anormales en el cariotipo y que fueron negativos o con diagnóstico no concluyente mediante la citología⁶. En este estudio no se realizó el estudio de FISH ni del cariotipo, sin embargo también se encontraron casos en los cuales la citogenética convencional reportó casos que la citología no lo hizo.

Renshaw A. y Col. realizaron una investigación aplicando técnicas citológicas y citogenéticas en efusiones pleurales de 29 pacientes con sospecha clínica de mesotelioma maligno, encontraron que la sensibilidad de la citología fue del 32% para el diagnóstico de mesotelioma maligno, a diferencia de su estudio citogenético que fue del 56 %, además de encontrar 1 caso positivo que al estudio citológico resultó negativo¹¹. En nuestro estudio, también se encontró 1 caso positivo que al estudio citológico resultó negativo.

Izadian Nejat realizó un estudio basado en el análisis citogenético comparado con el análisis citológico en 52 efusiones malignas. Encontró que el diagnóstico fue positivo en 38 de estos, por evaluación citológica, y 41 de las 52 efusiones por evaluación citogenética, contando con 73 % y 78 % de sensibilidad, respectivamente⁷. A comparación con el estudio realizado por Izadian Nejat, hemos encontrado que la sensibilidad para el estudio citogenético y citológico fue del 95% y 86%, respectivamente. En ambos estudios se encontró que la sensibilidad fue mayor para el estudio citogenético

Vasquez O. encontró que la asociación del estudio citológico y citogenético para la detección de células neoplásicas en muestras de líquidos pleurales elevó la sensibilidad de ambas pruebas. Con la citología encontró una sensibilidad del 49%, sin embargo con el uso de observación de metafases obtuvo un 55 % de sensibilidad. La cual aumentó al juntar ambas pruebas, al 74 % de sensibilidad⁸; Angulo Márquez J y col. 1993 estudiaron 20 pacientes con exudado pleural. Sometieron todas las muestras a estudios citogenéticos, adicionalmente a la biopsia pleural y/o a la citología del líquido. Mostraron que había un aumento de la sensibilidad del 65% al 94% combinando el estudio citológico o biopsia pleural con el análisis citogenético¹².

En esta investigación realizada, también se registra que aumenta la sensibilidad de la prueba citológica al 100%, combinando ambas pruebas. Sin embargo hay que señalar que la evaluación de la sensibilidad y especificidad no se hizo en base a todas las muestras analizadas, ya que si se analizaran todas pudiese disminuir la sensibilidad debido al posible aumento de los falsos positivos en la evaluación citológica. Se halló que la mayoría de casos con metafases anormales,

correspondieron a las muestras de líquidos pleurales (51.2%), resultados similares al estudio de Michael Fiegl y Col. 2003¹³; que encontraron en los derrames pleurales un 48.3% de metafases anormales, que correspondían a alteraciones cromosómicas numéricas, al igual que en este estudio.

Costa JR, en su libro de estudios citogenéticos en líquidos orgánicos, menciona que una sola técnica de diagnóstico como lo es la citología, usada en diferentes centros de salud siempre debería ir acompañada por un estudio citogenético, siempre y cuando se pueda realizar; debido a la limitada sensibilidad del estudio citológico⁹; Costa JR y otros autores así lo sugieren; este estudio no es la excepción. A diferencia de otros estudios reportados, este ha sido uno de los pocos que ha mostrado imágenes del estudio citogenético de los fluidos corporales, además de ser el primer estudio reportado en el contexto peruano, que compara el estudio citológico y citogenético con técnicas convencionales, sin el uso de un medio de cultivo.

En la actualidad en los hospitales se descartan los líquidos corporales luego de ser procesados mediante evaluación citológica, perdiéndose la oportunidad de realizar una evaluación citogenética con técnicas convencionales, apoyando así al diagnóstico citológico.

VI. CONCLUSIONES

- El número de casos con metafases anormales por citogenética fue 55.7%, (hallando en 87.2% del total, metafases hiperdiploides). Los casos positivos por la evaluación citológica fue 54.3%,
- La sensibilidad y especificidad de la evaluación citogenética mediante el uso de metafases en líquido corporales fue 95% y 88%, respectivamente.
- La sensibilidad y especificidad de la evaluación citológica en líquidos corporales fue 86% y 75%, respectivamente.
- En líquido pleural, la sensibilidad por evaluación citogenética y citológica, fue de 100% y de 92.3 % respectivamente; mientras la especificidad fue de 100% para la evaluación citogenética y 80% en la citología.
- En líquido ascítico, la sensibilidad por evaluación citogenética y evaluación citológica, fue 90% y 77.8% respectivamente. La especificidad fue de 50% por citogenética y 66.7%, en la evaluación citológica.
- Existe asociación entre la evaluación citológica y citogenética.
- El grado de concordancia entre ambas pruebas es muy bueno (0.918)

VII. RECOMENDACIONES

- ◆ Repetir el estudio en líquidos corporales con un número mayor de muestras. Incluir además de las técnicas citogenéticas convencionales, otras metodologías como moleculares (FISH, microarrays).
- ◆ Realizar el seguimiento de aquellos casos que resultaron con escasa celularidad y de los casos que resulten positivos para la evaluación citogenética y no para la evaluación citológica.
- ◆ La turbidez de la muestra puede sugerir la presencia de celularidad en esta, así como de metafases anormales.
- ◆ Implementar la evaluación citogenética convencional de líquidos pleurales y ascíticos en los laboratorios de citología de los hospitales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Johnston WW. The malignant pleural effusion. A review of cytopathologic diagnoses of 584 specimens from 472 consecutive patients. *Cancer*. 1985 Aug 15;56(4):905–9.
2. To a, Boyo-Ekwueme HT, Posnansky MC, Coleman D V. Chromosomal abnormalities in ascitic fluid from patients with alcoholic cirrhosis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981;282(6277):1659–60.
3. Tiainen M, Tammilehto L, Mattson K, Knuutila S. Nonrandom chromosomal abnormalities in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988 Jul 15;33(2):251–74.
4. Hagemeyer A, Versnel MA, Van Drunen E, Moret M, Bouts MJ, van der Kwast TH, et al. Cytogenetic analysis of malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1990 Jul 1;47(1):1–28.
5. Granados R, Cibas ES, Fletcher JA. Cytogenetic analysis of effusions from malignant mesothelioma. A diagnostic adjunct to cytology. *Acta Cytol*. 1994 Oct;38(5):711–7.
6. Factor RE, Dal Cin P, Fletcher JA, Cibas ES. Cytogenetics and fluorescence in situ hybridization as adjuncts to cytology in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Cancer*. 2009 Aug 25;117(4):247–53
7. Izadian N. Use of cytogenetic analysis of body fluids in cancer diagnosis. *J R Soc Med*. 1982;75(6):435–42.

8. Vázquez Oliva R, Rodríguez Panadero F, Sammartín Díez MV, González Castro A. [Correlation between sensitivity of the cytogenetic and cytological analysis and thoracoscopic findings in the study of malignant pleural effusions]. Arch Bronconeumol. 1995 Nov;31(9):437–42
9. Costa JR, Vázquez D de A. Líquidos orgánicos- I. Cuadernos de Citopatología-1. Ediciones Díaz de Santos; 2004. 84 p.
10. Meyers FJ, Lewis JP, Marianos S. The integration of cytogenetic analysis into the evaluation of cryptic exudative effusions. Cancer. 1986;58(7):1479–83.
11. Renshaw A a., Dean BR, Antman KH, Sugarbaker DJ, Cibas ES. The role of cytologic evaluation of pleural fluid in the diagnosis of malignant mesothelioma. Chest. 1997;111(1):106–9.
12. Angulo Márquez J, Villasmil Prieto G, Falcón de Vargas A, Silva J, Roetter de Lucani C, Arias Rojas F. El exudado pleural maligno: valor diagnóstico del análisis citogenético. Med Interna Caracas. 1993 Mar; 9(1):24-34
13. Fiegl M, Massoner A, Steurer M, Grünwald K, Krugmann J, Hack R, et al. Improving tumor cell detection in pleural effusions by interphase cytogenetics. Cytometry B Clin Cytom. 2003 Sep 1;55B(1):60–2.
14. Fiegl M, Massoner A, Haun M, Sturm W, Kaufmann H, Hack R, et al. Sensitive detection of tumour cells in effusions by combining cytology and fluorescence in situ hybridisation (FISH). Br J Cancer. 2004 Aug 2;91(3):558–63.
15. Han J, Cao S, Zhang K, Zhao G, Xin Y, Dong Q, et al. Fluorescence in situ hybridization as adjunct to cytology improves the diagnosis and directs

estimation of prognosis of malignant pleural effusions. J Cardiothorac Surg. 2012 Nov 13; 7(1):121.

16. Turizo GM, Hoyos AV. Manejo de líquidos corporales y coloraciones de mayor utilidad. 2010; 1–23.
17. Clinical Laboratory Standards Institute. Analysis of body fluids in clinical chemistry. Wayne, PA, CLSI. 2007.
18. Milena S, Lagos R, Enrique N, Jiménez R. Chapter Number Cytogenetic Analysis of Primary Cultures and Cell Lines : Generalities, Applications and Protocols. : 1–24. 2012.
19. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (1994) Robbins Pathologic Basis of Diseases, 5a edición, W.B. Saunders Co., Philadelphia
20. Damjanov I, Linder J (1996) Anderson's Pathology, 10a edición, Mosby Inc, St. Louis.
21. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA (2013). Conceptos de Genética 10ª edición. Pearson Educación.
22. Pierce, B.A. (2009) Genética. Un enfoque conceptual 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
23. La sensibilidad y especificidad: entendiendo su origen y utilidad real... Rev Colomb Gastroenterol. 2003 Aug;18(3):180–2
24. Sensibilidad y especificidad - Definición [Internet]. CCM Salud. [cited 2015 Oct 12]. Available from: <http://salud.ccm.net/faq/17713-sensibilidad-y-especificidad-definicion>

- 25.** Zicre D. Neoplasia. 2012; 1–6. Available from:
<http://www.patologiafcm.com.ar/wpcontent/uploads/downloads/2012/04/Neoplasia.pdf>
- 26.** Robert L. Nussbaum, (2008) Thompson y Thompson Genética en Medicina 7ª Edición. Editorial Masson

IX. ANEXOS

ANEXO 1

Ficha de Recolección de Datos

Código	Sexo	Edad	Tipo de muestra	Volumen de muestra	Aspecto	Diagnóstico citológico	Diagnóstico citogenético	Biopsia

ANEXO 2

PROTOCOLO DE ESTUDIO CITOGENETICO EN LIQUIDO PLEURAL / LIQUIDO ASCITICO

PROCEDIMIENTO:

1.- Centrifugar más de 20 ml de líquido utilizando 2 a 3 tubos de centrifuga cónicos de 15 ml. Centrifugar de 1000 a 1500 rpm. Por 10 minutos

2.- Utilizando una pipeta Pasteur de plástico de 3ml. eliminar el sobrenadante. Luego juntar los sedimentos en un solo tubo.

3.- Añadirle 6 ml de Solución Hipotónica (Cl K 0.075M) agitar fuertemente con la pipeta Pasteur por 2 minutos o por 5-10 segundos en un vórtex. Luego Incubar a 37°C por 20-30 minutos.

4.- Sacar el tubo de la incubadora y añadirle 10 gotas del fijador. Agitar fuertemente con la pipeta Pasteur por 2 minutos o por 5-10 segundos en un vórtex. Luego centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos.

5.- Eliminar el sobrenadante utilizando la pipeta Pasteur. Resuspender el sedimento golpeando fuertemente el fondo del tubo y añadir 5 ml de fijador, agitar fuertemente con la pipeta Pasteur por 2 minutos o por 5-10 segundos en un vórtex. Dejar fijando a temperatura ambiente por 20 minutos.

6.- Luego centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos. Eliminar el sobrenadante utilizando la pipeta Pasteur. Resuspender el sedimento golpeando fuertemente el fondo del tubo y añadir 4 ml de fijador, agitar fuertemente con la pipeta Pasteur por 2 minutos o por 5-10 segundos en un vórtex. Luego centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos.

Repetir este paso por 2 veces más a manera de lavados.

7.- En el último paso resuspender el sedimento final con 1 ó 2 ml de fijador dependiendo de la cantidad de sedimento. Si hay poco sedimento añadir 1 ml y si hay más sedimento 2 o 3 ml.

8.- Utilizando la pipeta Pasteur coger una pequeña cantidad del preparado celular y dejar caer 3 ó 4 gotas sobre una lámina portaobjetos limpia y helada, luego flamear suavemente en un mechero de alcohol para eliminar el exceso de fijador. Preparar 3 ó 4 láminas.

9.- Dejar secar las láminas a temperatura ambiente y colorearlas con Giemsa.

En un koplín colocar 5 ml de giemsa y añadir 50 ml de agua destilada, mezclar bien. Colocar las láminas en el koplín por 8 minutos y luego enjuagarlas con agua destilada. Dejar secar a temperatura ambiente.

10.- Buscar las metafases con objetivo de 10X recorriendo toda lámina. Luego analizar la metafase con 100X.

ANEXO 3

PROTOCOLO DE ESTUDIO CITOLÓGICO Y BLOCK CELL DE LIQUIDO PLEURAL / LIQUIDO ASCÍTICO

ESTUDIO CITOLÓGICO

1. Rotulación e identificación:
 - ◆ Edad
 - ◆ Tipo de muestra
2. Homogenizar bien la muestra y centrifugarla por 10 minutos a 1500 R.P.M.
3. Decantar el sobrenadante
4. Fijar el sedimento inmediatamente en alcohol-éter por 15 minutos
5. Coloración de Papanicolaou.

ESTUDIO DE BLOCK CELL

1. Rotulación e identificación
 - ◆ Edad
 - ◆ Tipo de muestra
2. Homogenizar la muestra y centrifugarla por 10 minutos a 1500 R.P.M
3. Decantar el sobrenadante
4. Fijar el sedimento con formol al 10%
5. Colocar en papel filtro
6. Coloración con Hematoxilina- Eosina

ANEXO 4

CÁLCULO DE LA PRUEBA DE CHI CUADRADO.

Tabla N°11. Resultados obtenidos para la evaluación citológica y evaluación citogenética

Evaluación citológica			Total
Evaluación citogenética	citología positiva	citología negativa	
metafases normales	0	18	18
metafases anormales	38	1	39
escasa celularidad	0	13	13
Total	38	32	70

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N°12 Resultados esperados para la evaluación citológica y evaluación citogenética

Evaluación citológica			Total
Evaluación citogenética	citología positiva	citología negativa	
metafases normales	9,8	8,2	18
metafases anormales	21,2	17,8	39
escasa celularidad	7,1	5,9	13
Total	38	32	70

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Nivel de confianza	95%
Grados de libertad	2
Chi2 calculado	66.33
Chi2 tabulado	5.9915

ANEXO 5

CÁLCULO DEL ÍNDICE KAPPA DE COHEN

Tabla N°13 Resultados de la evaluación citogenética con respecto a la biopsia

Evaluación citogenética	Biopsia		Total
	Negativo	Positivo	
Metafases normales	8	0	8
Metafases anormales	0	22	22
Total	8	22	30

		Valor
Medida de acuerdo	Kappa	1,000
N de casos válidos		30

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N°14 Resultados de la evaluación citológica con respecto a la biopsia

Evaluación citológica	Biopsia		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo para células neoplásicas	8	1	9
Positivo para células neoplásicas	0	21	21
Total	8	22	30

		Valor
Medida de acuerdo	Kappa	0,918
N de casos válidos		30

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

Tabla N°15 Resultados de la evaluación citológica con respecto a la evaluación citogenética

Evaluación citológica	Evaluación citogenética		Total
	Metafases normales	Metafases anormales	
Negativo para células neoplásicas	8	1	9
Positivo para células neoplásicas	0	21	21
Total	8	22	30

Fuente: Hospital Nacional Dos de Mayo Noviembre 2015 a Junio 2016

		Valor
Medida de acuerdo	Kappa	0,918
N de casos válidos		30