

Artigo original

Avaliação preliminar da enolase neurônio-específica para o diagnóstico diferencial na síndrome do derrame pleural.

Preliminary evaluation of neuron specific enolase for the differential diagnosis in pleural effusion syndrome.

Cyro Teixeira da Silva Junior¹, Gilberto Perez Cardoso², Elizabeth Giestal de Araujo³.

RESUMO

Introdução: Enolase neurônio-específica (NSE) é uma enzima envolvida na via glicolítica, e seus níveis séricos têm sido analisados nos carcinomas de pulmão. Entretanto, sua presença nos líquidos pleurais ainda não é utilizada como método diagnóstico de rotina. **Objetivo:** Determinar a relevância da dosagem da NSE nos líquidos pleurais (NSE-L) para o diagnóstico diferencial da síndrome do derrame pleural, discriminando, especificamente, entre causas malignas e benignas. **Métodos:** Imunofluorimetria a tempo resolvido (TRIFMA). **Resultados:** NSE-L foi dosada em setenta pacientes: 20 pacientes com derrame pleural maligno, devido a NSCLC ou carcinoma brônquico não pequenas células (n=15), linfomas (n=4) e neuroblastoma (n=1). O grupo controle foi constituído por 50 pacientes com derrames pleurais benignos por várias causas, principalmente tuberculose (33%). O grupo com processos malignos foi constituído por 9 homens, com uma média de idade de 67,6 anos (35–92 anos). O grupo controle foi constituído por 30 homens, com uma média de idade de 49 anos (3–94 anos). A média de dosagens de NSE pleural (NSE-L) foi mais elevada no grupo maligno (38,5 ± 59,9 µg/L) do que no grupo benigno (9,35 ± 23,7 µg/L), com um valor de p bicaudal igual a 0,0304. Comparação multivariada pelo teste de Kruskal-Wallis foi estatisticamente significativa (H=9,998, p=0,0067). Teste post-hoc de Dunn calculou uma diferença estatisticamente significativa entre as doenças benignas e NSCLC (p<0,01), mas não entre linfomas versus NSCLC (p>0,05) e linfomas versus doenças benignas (p>0,05). **Conclusão:** A dosagem de NSE-L serve para diferenciar derrame pleural maligno e benigno.

Descritores: Enolase neurônio específica; derrame pleural; marcador biológico de tumor.

ABSTRACT

Introduction: Neuron-specific enolase (NSE) is a glycolytic enzyme involved in the glycolysis pathway. Serum NSE levels in lung cancer have been investigated widely. However, their diagnostic values have not yet been clarified in pleural fluids (PFs). **Objective:** Determine the usefulness of NSE in PFs (L-NSE) in malign pleural effusion and its differentiation from benign effusions. **Method:** Time-resolved immunofluorometric assay (TRIFMA). **Results:** L-NSE was measured in seventy patients with benign and malignant PFs. Twenty patients with malignant pleurisy due to non-small cell lung cancer or NSCLC (n=15), lymphomas (n=4) and neuroblastoma (n=1). Fifty control patients with benign PFs with miscellaneous causes, mainly tuberculosis (33.0%). The group of malign pleural effusion was 9 men and 11 women with average age of 67.6 years (35 to 92 years). Benign PFs were comprised of 30 men and 20 women with an average age of 49 years (3 to 94 years). The mean level of L-NSE was higher in malign pleural effusions (38.5 ± 54.9 µg/L) than in patients with benign pleural effusions (9.35 ± 23.7 µg/L). Two tail p value was statistically significant (p=0.0304). Kruskal-Wallis test with post hoc procedures compared three unpaired groups. It was statistically significant (H=9.998; p=0.0067). Post-Hoc Dunn's test revealed a significant difference of benign group versus NSCLC group (p<0.01) but not lymphomas versus benign group (p>0.05) and lymphomas versus NSCLC (p>0.05). **Conclusion:** L-NSE is useful to differentiate malignant from benign pleurisy.

Keywords: Neuron-specific enolase; pleural effusions; tumor marker.

1. Professor Adjunto de Pneumologia, da Universidade Federal Fluminense. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural, do Instituto de Biologia, da Universidade Federal Fluminense.

2. Professor Titular do Departamento de Medicina Clínica, da Universidade Federal Fluminense.

3. Professora Associado I, do Departamento de Neurobiologia e do Programa de Neuroimunologia, da Universidade Federal Fluminense.

Trabalho realizado em conjunto pelos Programas de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médicas e Neuroimunologia, da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil. Não há conflito de interesse por parte dos autores..

Endereço para correspondência: Professor Dr. Cyro Teixeira da Silva Junior. Rua da Conceição, 13/210, Centro, Niterói (RJ), Brasil, CEP: 24020-080 e-mail: ctsilvajunior@predialnet.com.br.

Recebido em 02/02/2008 e aceito em 28/02/2008, após revisão.

INTRODUÇÃO

Dados da literatura mostram que 75% das causas de derrame pleural maligno podem estar relacionadas a carcinomas broncogênicos (especificamente os adenocarcinomas), linfomas e cânceres de mama.¹

Os exames mais sensíveis, decorrentes dos procedimentos indicados para investigar a causa de um derrame pleural maligno, após suspeita clínica e imagética, são o histopatológico pleural e a citopatologia do líquido pleural. Outros exames disponíveis, que podem auxiliar no diagnóstico, são os marcadores tumorais.² Neste contexto, a enzima enolase neurônio específica dosada no líquido pleural (NSE-L) é um exemplo.

A utilização da enolase neurônio-específica como marcador tumoral do pulmão começa a partir dos trabalhos de Cole e colaboradores (1980).³ Estes autores descreveram a enzima glicolítica NSE como marcador histoquímico das células pulmonares que apresentam diferenciação neuroendócrina. Devido a esta diferenciação, os autores propuseram a inclusão do pulmão como membro do sistema APUD (*amine precursor uptake and decarboxilation*).

Em 1984, foi sugerido que a NSE fosse um marcador tumoral com relevância clínica. A dosagem desta enzima poderia ser um método auxiliar para o estadiamento e para a monitoração terapêutica. Além disso, poderia ser um importante indicador para se prever possíveis recidivas da doença nos pacientes com carcinoma de pequenas células submetidos a tratamento.⁴

O objetivo do presente estudo foi avaliar a importância da dosagem da enzima NSE para o diagnóstico diferencial na síndrome do derrame pleural, discriminando, especialmente, os de causa maligna e benigna.

METODOLOGIA

a) Características do local do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural, situado no Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, município de Niterói, Estado do Rio de Janeiro.

b) Delineamento e período

A presente pesquisa foi classificada como método de estudo epidemiológico primário, observacional, do tipo transversal, com a finalidade de diagnóstico, realizada a partir de 2003 e até 2006.

c) Pacientes

Para a pesquisa foram selecionadas 70 (setenta) dosagens de NSE, realizadas no líquido pleural (NSE-L). Essas amostras foram oriundas de 70 (setenta) pacientes, obedecendo a critérios de elegibilidade.

c.1) Critérios de inclusão

Todos os pacientes possuíam tanto diagnóstico clínico como por imagem de síndrome de derrame pleural. Os exames realizados visavam esclarecer a causa da síndrome existente.

A classificação de transudato ou exsudato foi realizada através da relação líquido pleural/soro de desidrogenase láctica, proteínas totais e do gradiente de albumina.¹

O diagnóstico de tuberculose pleural foi confirmado por meio dos exames: histopatológico pleural, atividade da enzima adenosina desaminase e de cultura de Micobactérias no líquido pleural.¹

O diagnóstico de linfomas foi feito através do exame histopatológico convencional e especializado, em gânglios cervicais ou de mediastino, e, ocasionalmente, citometria de fluxo no líquido pleural.¹

O diagnóstico dos diversos tipos de carcinoma brônquicos foi confirmado através dos exames de citopatologia e/ou histopatológico pleural, oriundos de diversos procedimentos orientados pelos exames de imagem.¹

O diagnóstico de infarto pulmonar foi confirmado através da evolução clínica, imagética e negatividade no líquido pleural para outras causas. Empiema pleural, pelos marcadores bacteriológicos, glicose e desidrogenase láctica pleural, em relação a dosagens séricas.¹

c.2) Critérios de exclusão

Líquidos pleurais de pacientes com infecção pelo HIV, síndrome de imunodeficiência adquirida, insuficiência renal crônica, hemotórax, terapia anticoagulante e trombolítica, presença de fibrina e àqueles em que o diagnóstico ficou indeterminado, apesar de exaustivamente investigados.

d) Método de dosagem

As amostras de líquido pleural, para dosagem de NSE-L, foram coletadas em frascos padronizados que estavam secos, haviam sido esterelizados e não continham anticoagulante. Antes de serem testadas, as amostras sofreram, primeiramente, macrocentrifugação após retração completa do coágulo. A seguir, a parte celular foi desprezada e, em casos de turvação, houve clareamento. Em caso de estocagem, as amostras foram armazenadas em refrigerador por até 24 horas entre 2 a 8 graus C e, após este período, em freezer a -20 ° C.

Quando transportadas, as amostras foram embaladas e rotuladas de acordo com as regulamentações nacionais e internacionais aplicáveis, referentes ao transporte de amostras clínicas e agentes biológicos.

A determinação quantitativa da NSE-L foi realizada através do ensaio de imunofluorimetria a tempo resolvido, existente em kit comercial de oncologia.⁵

e) Análise estatística⁶

Como se tratou de uma pesquisa clínica-laboratorial-diagnóstica, a técnica estatística utilizada, e adequada, consistiu na comparação, de dois grupos de pacientes: grupo I (com diagnóstico de síndrome de derrame pleural maligno tendo como causa principal carcinoma brônquico não pequenas células (NSCLC), além de linfomas e neuroblastoma) e grupo II (grupo controle, com diagnóstico de síndrome de derrame pleural benigno por outras causas).

Foi feito cálculo de freqüência das várias causas, nos dois grupos, com cálculo dos intervalos de confiança a 95%. Estatística descritiva de atividade da NSE-L, idade e sexo dos pacientes nos grupos testados. Teste de Kolmogorov-Smirnov, para avaliação da distribuição de normalidade. Teste U não paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney, para comparação das medianas de dosagens de atividade da NSE-L em ambos os grupos. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação geral das várias medianas das causas de síndrome do derrame pleural. Teste Post Hoc de Dunn. O valor de p significativo foi estabelecido em 5% para a probabilidade alfa.

Os resultados da pesquisa, decorrentes das análises estatísticas, foram embasados nos dados da casuística disponíveis em uma planilha do *software* Excel MS 2000® e programas estatísticos específicos contidos no *software* MedCalc versão 9.0 e GraphPad Prism versão 3.0.

RESULTADOS

A tabela 1 resume as freqüências das diversas causas de derrames pleurais incluídos no estudo transversal.

Tabela 1 – Freqüência das causas dos 70 derrames pleurais analisados para dosagem de NSE-L pelo método de imunofluorimetria a tempo resolvido em um delineamento transversal

Causa	Nº de Líquidos Pleurais	Freqüência (%)	Intervalo de Confiança (95%)
Tuberculose	23	33	22,9 – 44,5
Neoplasia Maligna	20	29	19,3 – 40,09
Empiema pleural	7	10	4,90 – 19,20
Transudato	6	9	4,05 – 17,4
Parapneumônico	5	7	3,16 – 15,6
TEP	5	7	3,16 – 15,6
Uremia	2	3	0,88 – 9,8
Paracoccidiodomicose	1	1	0,34 – 7,59
Hemotórax	1	1	0,34 – 7,59
TOTAL	70	100	0,34 – 44,5

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Instituto de Biologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

A tabela 2 resume os resultados da estatística descritiva encontrados para as variáveis estudadas, nos 70 pacientes com síndrome do derrame pleural nos grupos de casos e controles.

Com a finalidade de estudo estatístico inferencial, foi resumida, na tabela 3, a análise para distribuição de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov dos valores encontrados de NSE-L nos casos e controles nos 70 líquidos pleurais analisados.

Considerando as amostras independentes e o resultado da análise de distribuição de normalidade resumido na tabela 3, a comparação das medianas de dosagem da dosagem de NSE-L dos casos e controles pelo teste não-paramétrico U de Wilcoxon-Mann-Whitney foi resumida na tabela 4.

A tabela 5 resume a estatística descritiva e inferencial de dosagem da NSE-L de diferentes amostras de pacientes que apresentaram síndrome do derrame pleural.

Tabela 2 - Variáveis estudadas nos casos (líquido pleural maligno) e controles (líquido pleural benigno de causas diversas) dos pacientes com síndrome do derrame pleural

Variáveis	Casos (n = 20)	Controles (n = 50)
Média de idade (anos)	67,6	49,3
Limite de idade (anos)	35 – 92	3 – 94
Desvio padrão da idade	16,93	25,63
Coeficiente de variação da idade (%)	25,2	52,2
Média aritmética de atividade de NSE-L (µg/L)	38,51	9,35
Limite de NSE-L (µg/L)	0,1 – 161,9	0,1 – 166,1
Desvio padrão de NSE-L (µg/L)	54,96	23,79
Coeficiente de variação de NSE-L (%)	142,7	254,4
Sexo feminino (%)	55	40
Sexo masculino (%)	45	60

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Instituto de Biologia/Universidade Federal Fluminense. Janeiro 2003-Janeiro 2006

Tabela 3 – Análise para distribuição de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov dos valores encontrados de NSE-L nos derrames pleurais malignos (casos) e controles (causas diversas) nos 70 líquidos pleurais analisados

Grupos	Valor de p	Interpretação de Distribuição de Normalidade *
Casos	0,07	Aceita
Controles	< 0,001	Rejeitada
Empiema pleural	0,58	Aceita
Tuberculose	0,004	Rejeitada
Parapneumônico	0,95	Aceita
Tromboembolismopulmonar	0,73	Aceita
Transudato	0,63	Aceita
Uremia	-	Amostra pequena
Paracoccidiodomicose	-	Amostra pequena

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Instituto de Biologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

* Aceita-se normalidade ou Ho quando $p > 0,05$

Tabela 4 – Comparação entre as medianas de dosagem da enolase-neurônio específica (NSE-L) dos casos e controles pelo teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney

NSE-L (µg/L)	Valor de Z	Resultado de p bicaudal *
Casos vs Controles	2,16	P = 0,0304

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Instituto de Biologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

* Ha: $p < 0,05$

Tabela 5 – Comparações múltiplas entre as medianas de dosagens de enolase-neurônio específica (NSE-L) em 70 líquidos pleurais

Causa	Número de Amostras	Limites de Dosagens (NSE-L - µg/L)	Média Aritmética (NSE-L - µg/L)	Mediana (NSE-L - µg/L) *
Neoplasias Malignas	20	0,1 - 161,9	38,51	12
Linfomas	4	0,1 - 161,9	40,97	0,95
NSCLC	15	1,4 - 130,7	38,5	12
Neuroblastoma	1	3,1	-	-
Doenças benignas	50	0,1 - 161,9	9,3	3,3

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural/Pneumologia/Universidade Federal Fluminense (2003-2006)

* Teste de Kruskal-Wallis: $H = 9,998$ ($p = 0,0067$); Teste Post-Hoc de Dunn: doenças Benignas vs NSCLC: $p < 0,01$, linfomas vs NSCLC ($p > 0,05$) e doenças benignas vs linfomas ($p > 0,05$)

DISCUSSÃO

Os marcadores tumorais são macromoléculas produzidas, predominantemente, por células neoplásicas. A detecção pode ser realizada em amostras diversas como células, biópsias de tecido, sangue ou líquido orgânico.⁷

Uma variedade de substâncias foi qualificada como marcadores tumorais, incluindo antígenos oncofetais, proteínas placentárias, hormônios, enzimas, metabólitos de catecolaminas e outras espécies moleculares. Classicamente, os marcadores tumorais são produzidos por células neoplásicas e liberados na corrente sanguínea. Entretanto, esses marcadores podem ser produzidos por tecidos locais invadidos pelo tumor, em resposta a invasão direta ou mudanças metabólicas induzidas pelo tumor.⁷

Assim, o conceito mais preciso de marcador tumoral seria aquela substância biológica que expressa alterações celulares e moleculares associadas à transformação maligna.

Existem vários critérios de classificação. O proposto por Schwartz,⁸ em 1993, classifica os marcadores tumorais em: **a) intermediários ou precoces**, que expressam alterações celulares e moleculares antes do aparecimento da malignidade; e **b) marcadores tumorais de diagnóstico**, presentes em associação com a malignidade.

Os marcadores tumorais de diagnóstico podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas e prognóstico.

A NSE existe na forma de diversas isoenzimas diméricas: alfa-alfa, alfa-beta, beta-beta e gama-gama. Dessas subunidades, as isoenzimas alfa-gama e gama-gama são as enolases neurônio-específica encontradas, principalmente, nos neurônios e nas células neuroendócrinas.⁴

A NSE é um marcador diagnóstico de maior sensibilidade no soro e tecido para carcinoma de pequenas células de pulmão (SCLC).⁴

A NSE também é encontrada em outras condições malignas como neuroblastoma, melanoma, carcinoma de células da ilhota pancreática e hipernefoma. No neuroblastoma, o NSE correlaciona-se ao prognóstico, mas não é útil para o acompanhamento das recidivas.

Neste trabalho, a atividade da NSE no líquido pleural maligno por neuroblastoma ficou abaixo da média dos derrames pleurais benignos por várias causas.

Assim como acontece nos vários trabalhos com prevalência de causas de síndrome do derrame pleural no Brasil, tanto com delineamentos prospectivos como com transversais, a maior prevalência/frequência encontrada sempre é de tuberculose (tabela 1).

A precisão do ensaio foi determinada como descrita no *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*.

Os autores não encontraram, na literatura pesquisada, dosagens de NSE no líquido pleural pela técnica

de imunofluorometria a tempo resolvido (TRIFMA) para a comparação de resultados.

Outras técnicas ou testes imunológicos para dosagem de NSE-L, tais como a quimioluminescência, também estão disponíveis comercialmente, mas com ausência de pesquisas em nosso meio para parâmetros diagnósticos no líquido pleural.

Os parâmetros de validade do uso da NSE-L pesquisados na literatura internacional não possuem, como dosagem de NSE, a técnica de TRIFMA.

Matsumoto e colaboradores⁹ dosaram alfa-feto proteína e antígeno carcinoembrionário no soro por TRIFMA. Os pesquisadores encontraram boa avaliação estatística do ensaio, mas não tiveram objetivos de estabelecer parâmetros diagnósticos.

A média de idade dos pacientes com derrame pleural maligno foi de 67,6 anos, com limites de 35 e 92 anos, desvio padrão de 16,9 e coeficiente de variação de 25,2% (tabela 2). A média de idade dos pacientes com derrame pleural por outras causas foi menor, de 49,3 anos, com limites 3 e 94 anos, desvio padrão de 25,3 e coeficiente de variação de 52,25% (tabela 2).

Após análise de distribuição de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (tabela 3) foi realizada a comparação entre as medianas de dosagem da NSE-L dos casos e controles pelo Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney (tabela 4). O resultado calculado foi de Z igual a 2,1645, o que determinou uma conclusão de p bicaudal igual 0,0304 (tabela 4).

Os resultados obtidos nos parágrafos anteriores estão de acordo com a literatura pesquisada.¹⁰⁻¹³

Um teste diagnóstico, para ser utilizado na prática clínica, precisa de parâmetros de validade. Porém, estes parâmetros somente podem ser calculados a partir de um valor de referência selecionado. Portanto, a escolha adequada de um valor de referência é condição imprescindível para uso laboratorial e clínico de um teste diagnóstico.

Os objetivos deste artigo não foram calcular valores de referência da NSE-L para diagnóstico de derrame pleural maligno.

Na tabela 5 também foi realizada a estatística de inferência, para comparação entre as medianas da NSE nos casos e controles, incluindo os subgrupos dos casos das múltiplas causas de síndrome do derrame pleural da pesquisa. Considerando as amostras independentes, o tamanho das amostras desiguais, o resultado da análise de distribuição de normalidade e análise de variâncias desiguais, o método estatístico indicado foi o não-paramétrico ANOVA de Kruskal-Wallis por classificações. Este teste serve para comparação das medianas, entre três ou mais populações, quanto à tendência central dos dados.

Assim como acontece no teste F de uma ANOVA paramétrica, o valor significativo encontrado de 9,998 de H ($p = 0,0067$) não indicou em quais grupos, tomados dois a dois, especificamente, ocorreram as diferenças da tabela 5.

Para identificar diferenças significativas entre as medianas dos grupos, tomados dois a dois, uma possibilidade é usar um procedimento não-paramétrico de comparações múltiplas. Neste caso, as comparações a *posteriori* ou *post-hoc* (do latim, significando “depois disso”) entre pares de medianas podem ser feitas usando-se o teste da soma de postos de Wilcoxon-Mann-Whitney, com um ajuste descendente do nível alfa para compensar as comparações múltiplas. Isto porque, quando são realizadas várias comparações planejadas, a probabilidade de se obter a significância estatística ao acaso está aumentada ou a probabilidade de um erro tipo I aumenta.

Outra maneira correta de proceder um teste *post-hoc* é calculando o teste das comparações múltiplas de Dunn (também chamado teste t de Bonferroni) após o teste de Kruskal-Wallis para avaliar a hipótese nula (tabela 5).

REFERÊNCIAS

1. Neves DD, Silva Junior CT, Chibante AM. Derrame pleural. In: Sociedade de Pneumologia e Tisiologia do Estado do Rio de Janeiro. Pneumologia: prática e atual. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2001; 185-99.
2. Silva Junior CT, Cardoso GP, Santos LM, Zamboni M, Araújo EG. Diferenciação neuroendócrina dos carcinomas brônquicos. Pulmão RJ 2006; 15(1):39-43.
3. Cole GA, Polak JM, Wharton J, Marangos PJ, Pearse AGE. Neuron specific enolase as a useful histochemical marker for the neuroendocrine system of the lung. J Pathol 1980;132:351-2.
4. Johnson DH, Marangos PJ, Forbes JT, Hainsworth JD, Welch RV, Hande KR, Greco FA. Potential utility of serum neuron-specific enolase levels in small cell carcinoma of the lung. Cancer Research 1984; 44:5409-14.
5. Diamandis EP. Immunossays with time-resolved fluorescence spectroscopy: principles and applications. Clin Bioch 1988; 21(3):139-50.
6. Dawson B, Trapp RG. Basic & Clinical Biostatistics. 3rd. Lisboa: McGraw- Hill Companies; 2001.
7. Silva Junior CT, Cardoso GP. Endocrine expression in bronchogenic carcinoma. Rev Port Pneum 2003; IX (2):109-15.
8. Schwartz MK. Cancer markers. In: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosemberg SA, editors. Cancer: principles and practices of oncology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1993; 531-42.
9. Matsumoto K, Yuan J, Wang G, Kimura H. Simultaneous determination of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum by time-resolved fluoroimmunoassay. Anal Biochem 1999; 276(1):81-7.
10. Shimokata K, Yamamoto M, Morishita M. Pleural fluid neuron-specific enolase. A useful diagnostic marker for small cell lung cancer pleurisy. Chest 1989; 95: 602-3.
11. Ghayumi SMA, Mehrabi S, Doroudchi M, Ghaderi A. Diagnostic value of tumor markers for differentiating malignant and benign pleural effusions of Iranian patients. Path Oncol Res 2005; 11(4):236-41.
12. Miedouge M, Rouzaud P, Salama G, Pujazon MC, Vincent C, Mauduyt MA, Reyre J, Carles P, Serre G. Evaluation of seven tumour markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions. Br J Cancer 1999; 81(6):1059-65.
13. Ferrer J, Villarino MA, Encabo G, Felip E, Bermejo B, Vila S, Orriols R. Diagnostic utility of CYFRA 21-1, carcinoembryonic antigen, CA 125, neuron specific enolase, and squamous cell antigen level determinations in the serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. Cancer 1999; 86(8):1488-95.